



Facultad de Medicina



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

Licenciatura en Neurociencias

**LA PÉRDIDA CRÓNICA DE SUEÑO COMO POTENCIAL
INDUCTOR DE SENESCENCIA CELULAR EN LA BARRERA
HEMATOENCEFÁLICA: CONSECUENCIAS FISIOLÓGICAS Y
CONDUCTUALES**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

Licenciada en Neurociencias

Presenta:

Paulina García López

Directora

Dra. Beatriz Gómez González
Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa

Ciudad Universitaria, CD. MX. Febrero de 2024.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

DEDICATORIA

Es para mí un enorme logro haber culminado esta etapa. Sin embargo, no habría podido alcanzar esta meta sin el apoyo incondicional de las personas que recorrieron este camino conmigo.

A mis padres, Paula y Angel, por ser una fuente de inspiración diaria, por estar para mí tanto en los días buenos, como en los días que no lo eran tanto, por darme sus consejos y por no dudar de mí, muchas gracias por ser los mejores del mundo.

A mi hermano, Luis Angel, mi güerito, por sacarme siempre una sonrisa y tener una conexión que va más allá de las palabras.

A mis abuelitos, Angel, Carmen, Lore, y a toda mi familia, quienes pusieron sus esperanzas en que lograría terminar con éxito, gracias por todo su amor y cariño.

A mi equipo favorito, Lui, Joha y Ro, la mejor elección que hice en la carrera, gracias por haber hecho de mis días en la uni los mejores con su compañía, este cachito de vida juntos perdurará siempre.

Esta historia no termina en la última página...

“Las historias nunca acaban... Las historias siempre continúan, comienzan en la primera página, pero no terminan en la última.”

—Cornelia Funke, *Sangre de tinta*

Agradecimientos

El presente trabajo fue realizado gracias al apoyo de la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Universidad Autónoma Metropolitana.

Con agradecimientos especiales para:

- Dra. Beatriz Gómez González, mi directora, quien me recibió en su laboratorio a pesar de que sabía que tenía que comenzar a aprender las técnicas desde cero y me dio la confianza que necesitaba.
- Dra. María Fernanda Medina Flores, mi asesora y supervisora de trabajo en el laboratorio.
- Los miembros del laboratorio de Neuropsicobiología W-215 de la UAM, por ser mis compañeras en cada etapa de aprendizaje y por sus comentarios los cuales sin duda, me ayudaron a mejorar.
- Dra. Mina Königsberg Fainstein, por sus aportaciones a la presente investigación.
- Dr. Javier Velázquez Moctezuma, por estar dispuesto a apoyar mi trabajo en el laboratorio.
- La coordinación de la Licenciatura en Neurociencias de la Facultad de Medicina UNAM:
 - A la Dra. Susana Castro Obregón, que además formó parte de mi jurado, muchas gracias por el tiempo dedicado a pesar de todas sus labores académicas.
 - A la Lic. Lisset Germán Rodríguez, por estar al tanto de mi proceso de titulación.
 - A la Lic. Nancy González Sandoval y al Dr. Daniel Guzmán Toledo, por su apoyo fuera del salón de clases al siempre tomarme en cuenta en las actividades de difusión y guiarme durante el proceso de movilidad.
- A mi jurado de examen, la Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez, la Dra. Beatriz Gómez González, la Dra. María de la Luz Navarro Angulo, la Dra. Susana Castro Obregón, y la Dra. Anahí Chavarría Krauser, por aceptar, aportar, por dedicarle tiempo a la revisión del presente trabajo y cumplir de manera excelente con su papel.
- Al CONAHCYT (CVU 1264114), por brindarme apoyo económico para realizar este proyecto.
- A la máxima casa de estudios, porque mediante la DGOAE y DGECI, recibí ayuda económica desde mi primer año en la carrera, la cual continuó incluso durante la realización de mi proceso de movilidad académica, y hasta ahora con la ‘Beca De Titulación del Programa De Vinculación con los Egresados de la UNAM Alto Rendimiento 2023-2024’.

Y finalmente, me gustaría darles las gracias infinitas a todos los profesores que a lo largo de la carrera, impulsaron mi aprendizaje y desempeño al probar mis capacidades, además de ayudarme a reafirmar mi amor por las neurociencias.

ÍNDICE

Abreviaturas.....	6
Resumen.....	7
Introducción.....	9
Generalidades de la barrera hematoencefálica.....	9
Sueño.....	14
Sueño y cognición.....	15
Senescencia celular.....	16
Antecedentes.....	18
Consecuencias de la pérdida de sueño: disfunción de la barrera hematoencefálica.....	18
Consecuencias de la pérdida de sueño: déficit cognitivo.....	18
Consecuencias de la pérdida de sueño: senescencia celular.....	20
Senescencia celular, disfunción de la barrera hematoencefálica y deterioro cognitivo.....	20
Justificación.....	22
Hipótesis.....	22
Objetivos.....	22
Objetivo general.....	22
Objetivos específicos.....	23
Métodos y materiales.....	23
Sujetos.....	23
Restricción de sueño.....	24
Prueba de reconocimiento de objetos (NOR).....	24
Ensayos de permeabilidad de la BHE.....	25
Aislamiento de la microvasculatura cerebral.....	26
Ensayo de la actividad de β -galactosidasa asociada a la senescencia.....	27
Análisis estadísticos.....	28
Resultados.....	28
La pérdida crónica de sueño aumentó la permeabilidad de la BHE.....	28
La pérdida crónica de sueño promovió el incremento de la actividad de β -galactosidasa asociada a senescencia en las células de la BHE.....	31
La disfunción de la BHE después de la pérdida crónica de sueño generó deterioro cognitivo.....	34
Discusión.....	35
Conclusiones.....	43
Referencias.....	44

ABREVIATURAS

BHE	Barrera Hematoencefálica
SNC	Sistema Nervioso Central
JAM	<i>Junctional Adhesion Molecule</i> [molécula de adhesión de la unión]
MOR	Movimientos Oculares Rápidos
NOR	<i>Novel Object Recognition</i> [reconocimiento de objetos novedosos]
SASP	<i>Senescence-Associated Secretory Phenotype</i> [fenotipo secretor asociado a la senescencia]
IL	Interleucina
MCP	<i>Monocyte Chemoattractant Protein</i> [proteína quimioatrayente de monocitos]
MMP	<i>Matrix Metalloproteinase</i> [metaloproteínasa de matriz extracelular]
RS	Restricción de Sueño
PVDF	<i>Polyvinylidene Difluoride</i> [fluoruro de polivinilideno]
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i> [análisis de varianza]
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i> [error estándar de la media]
Na-Fl	Sodio-fluoresceína

RESUMEN

El papel fundamental que desempeña la barrera hematoencefálica en el mantenimiento de la integridad y el funcionamiento del sistema nervioso central, se ve afectado por la pérdida de sueño. Puesto que la pérdida de sueño y el fenotipo secretor asociado a la senescencia comparten la presencia de mediadores inflamatorios, es posible que algunos de los cambios reportados en la fisiología de la barrera hematoencefálica durante la pérdida de sueño estén relacionados con la inducción de senescencia celular. Asimismo, existe evidencia del vínculo bidireccional entre la pérdida de sueño y el deterioro cognitivo. En la presente investigación, se realizó la evaluación de los efectos de la restricción de sueño sobre la inducción de senescencia celular en la barrera hematoencefálica, y sus consecuencias sobre la memoria. Se restringió de sueño a ratas macho y hembra de la cepa Wistar de 3 meses de edad a través de la técnica de plataformas múltiples durante 3, 5, y 10 días consecutivos. Al término de este periodo, se realizó la prueba de reconocimiento de objetos seguida de ensayos de permeabilidad de la barrera hematoencefálica. Asimismo, se aisló la microvasculatura cerebral y se evaluó la actividad de uno de los marcadores de senescencia celular más utilizados. La pérdida crónica de sueño incrementó la actividad de la enzima β -galactosidasa asociada a senescencia en la microvasculatura de la corteza cerebral y del hipocampo. De la misma manera, la pérdida de sueño aumentó la permeabilidad de la barrera hematoencefálica a trazadores de distinto peso molecular e indujo déficit cognitivo al evaluar la memoria de reconocimiento de objetos.

Es el primer reporte que muestra la relación directa entre la pérdida de sueño y uno de los marcadores de la senescencia celular en el sistema nervioso central además de su vinculación con la disfunción de la barrera hematoencefálica y el deterioro cognitivo.

ABSTRACT

The critical role which the blood-brain barrier plays in maintaining the integrity and functioning of the central nervous system is affected by sleep loss. Since sleep loss and the senescence-associated secretory phenotype share inflammatory mediators, it is possible that some of the reported changes in the physiology of the blood-brain barrier during sleep loss are related to the induction of cellular senescence. Likewise, there is evidence of a bidirectional link between sleep loss and cognitive decline. In the present research, the effects of chronic sleep restriction on the induction of cellular senescence in the blood-brain barrier along with its consequences on memory were evaluated. Three-month-old male and female Wistar rats were sleep restricted using the multiple platform technique for 3, 5, and 10 consecutive days. At the end of this period, the novel object recognition test was conducted followed by blood-brain barrier permeability assays. Additionally, brain microvasculature was isolated, and the activity of one of the most commonly used cellular senescence markers was evaluated. Chronic sleep loss increased the activity of senescence-associated β -galactosidase in the microvasculature of the cerebral cortex and hippocampus. Similarly, sleep loss increased the permeability of the blood-brain barrier to tracers of different molecular weights and induced cognitive deficits when evaluating object recognition memory.

This is the first report demonstrating a direct relationship between sleep loss and one of the features of cellular senescence in the central nervous system, in addition to its link with blood-brain barrier dysfunction and cognitive impairment.

INTRODUCCIÓN

Generalidades de la barrera hematoencefálica

La barrera hematoencefálica (BHE) es una interfaz reguladora y de intercambio bidireccional del componente intravascular y el parénquima nervioso que mantiene la homeostasis del microambiente del sistema nervioso central (SNC). La BHE está constituida por células del endotelio vascular que adquieren su fenotipo de barrera en función de interacciones con células murales como los pericitos, y por la exposición a diversos factores solubles liberados por las células residentes del SNC, como la astroglia (Fig. 1) (Medina-Flores et al., 2023; Avilez-Aviles et al., 2024).

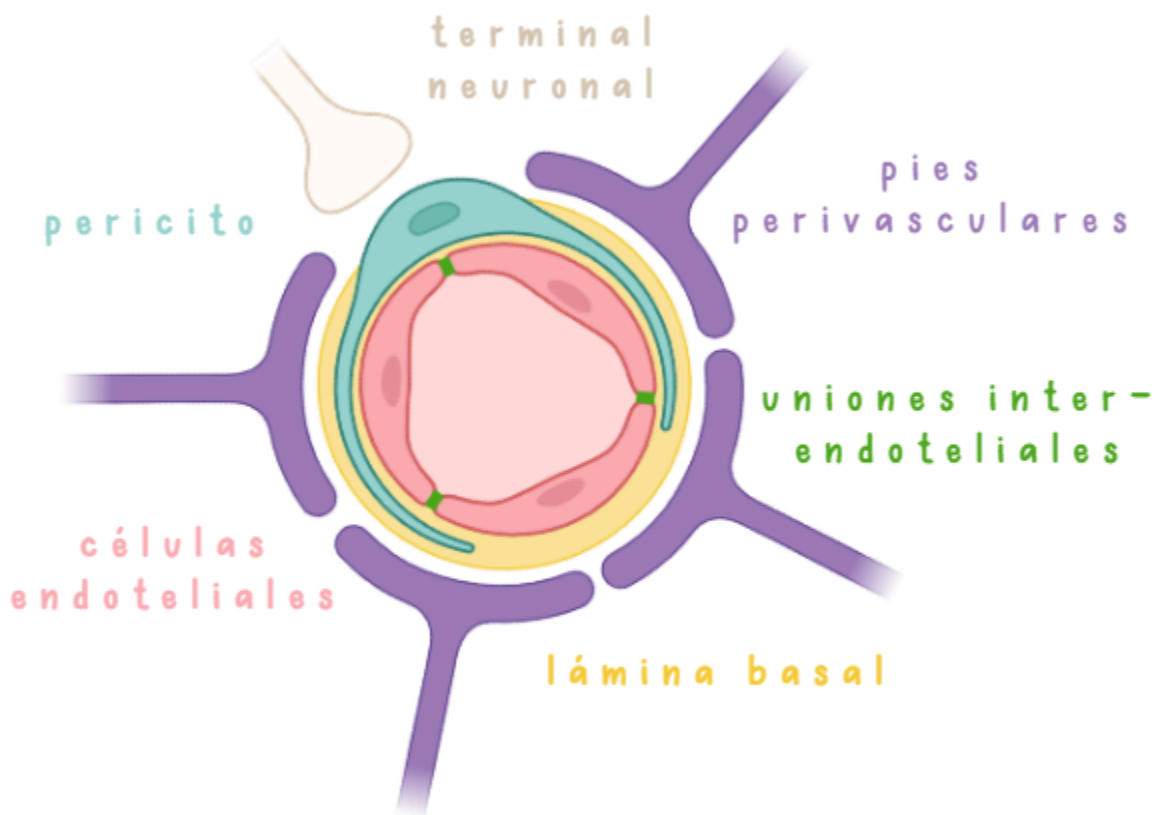


Figura 1. Diagrama que ilustra los componentes principales de la BHE. En color rosa se esquematizan las células endoteliales, en color azul se aprecia a un pericito envolviendo al capilar, en color morado se observan los pies perivasculares de los astrocitos, en color amarillo aparece la lámina basal y en beige una terminal neuronal.

Las *células endoteliales* de los capilares cerebrales que forman la BHE se caracterizan por tener una lámina basal continua, numerosas mitocondrias en su citoplasma, ausencia de fenestraciones y complejos de unión inter-endoteliales que regulan la difusión y comunicación entre células (Nag, 2003; Ballabh et al., 2004; Hurtado-Alvarado et al., 2017). Estos complejos los conforman uniones estrechas u ocluyentes, uniones adherentes y uniones comunicantes. Esta organización impide la extravasación paracelular de moléculas circulantes potencialmente tóxicas y mantiene un nivel bajo de trans migración de células inmunes en condiciones basales (Langen et al., 2019).

Las *uniones ocluyentes* poseen una estructura de placa, organizada por un entramado de proteínas integrales de membrana y citosólicas (Fig. 2). Las proteínas integrales de membrana incluyen a miembros de la familia de las claudinas, a la proteína ocludina y a proteínas de la familia de las inmunoglobulinas, denominadas moléculas de adhesión de la unión (JAMs, por sus siglas en inglés) (Lochhead et al., 2020). Las proteínas integrales de membrana de las uniones ocluyentes presentan interacciones con proteínas de andamiaje localizadas en la cara interna de la membrana, como zonula occludens-1, zonula occludens-2, zonula occludens-3 (ZO-1, ZO-2, ZO-3) y cingulina, tales proteínas forman un enlace con el citoesqueleto de actina. El anclaje de las proteínas de la unión ocluyente al citoesqueleto desempeña un papel clave en el mantenimiento del fenotipo de barrera del endotelio cerebral (Greene y Campbell, 2016). Las uniones ocluyentes se caracterizan por su contribución a establecer y mantener una barrera paracelular selectiva de tamaño y carga, regulando la difusión de solutos e iones (Tietz y Engelhardt, 2015). Las claudinas cuentan con cuatro dominios transmembranales, dos bucles extracelulares y dos extremos citoplasmáticos, el extremo carboxilo permite su interacción con las proteínas de andamiaje. La claudina-5 predominantemente participa en la formación de las

uniones ocluyentes de la BHE, pero también están presentes la claudina-1, claudina-3 y claudina-12 (Greene y Campbell, 2016; Hashimoto et al., 2021). La ocludina es un componente funcional de las uniones ocluyentes y, también es una proteína tetra-transmembranal con dos bucles extracelulares; ayuda a regular las propiedades de adhesión entre las células, la permeabilidad paracelular, la migración transepitelial de los neutrófilos, e interactúa con las proteínas de andamiaje (Wolburg y Lippoldt, 2002; Hashimoto et al., 2021; Knox et al., 2022). Las JAMs son proteínas de la familia de las inmunoglobulinas cuyo extremo carboxilo igualmente interactúa con proteínas de andamiaje, incluida ZO-1. JAM-A, JAM-B y JAM-C son clave para el establecimiento de los complejos de unión, así como en la regulación de la adhesión y trans migración de leucocitos en la BHE (Greene y Campbell, 2016; Stamatovic et al., 2016).

Las *uniones adherentes* son complejos de unión indispensables para el establecimiento y mantenimiento de las uniones ocluyentes (Fig. 2). Las uniones adherentes se conforman por proteínas transmembranales de la familia de las cadherinas y proteínas periféricas denominadas cateninas. Las cadherinas son moléculas de adhesión dependientes de calcio, poseen 5 dominios extracelulares, un dominio transmembranal y un dominio citosólico, las cadherinas son responsables de la adhesión celular. Mientras que, las cateninas son proteínas citosólicas que anclan las cadherinas al citoesqueleto de las células endoteliales. Una vez que se desensambla la unión adherente, las cateninas regulan eventos de señalización intracelular (Dejana et al., 2009; Stamatovic et al., 2016).

Las *uniones comunicantes* tienen como unidad funcional un hexámero de proteínas llamadas conexinas. Las conexinas son proteínas integrales de membrana que comparten el mismo dominio que las proteínas de uniones adherentes y ocluyentes (Fig. 2). Cada conexina recibe su nombre en función de su peso molecular. Los hexámeros están conformados por

conexinas de diversos pesos moleculares; la yuxtaposición entre los hemicanales de dos células adyacentes forma canales intercelulares denominados conexones (Segretain y Falk, 2004; Zhao et al., 2018). Los iones y moléculas pequeñas pueden viajar por difusión pasiva a través de estas uniones y transmitir señales a las células adyacentes, lo que las hace esenciales para la comunicación intercelular (Stamatovic et al., 2016; Belousov et al., 2017).

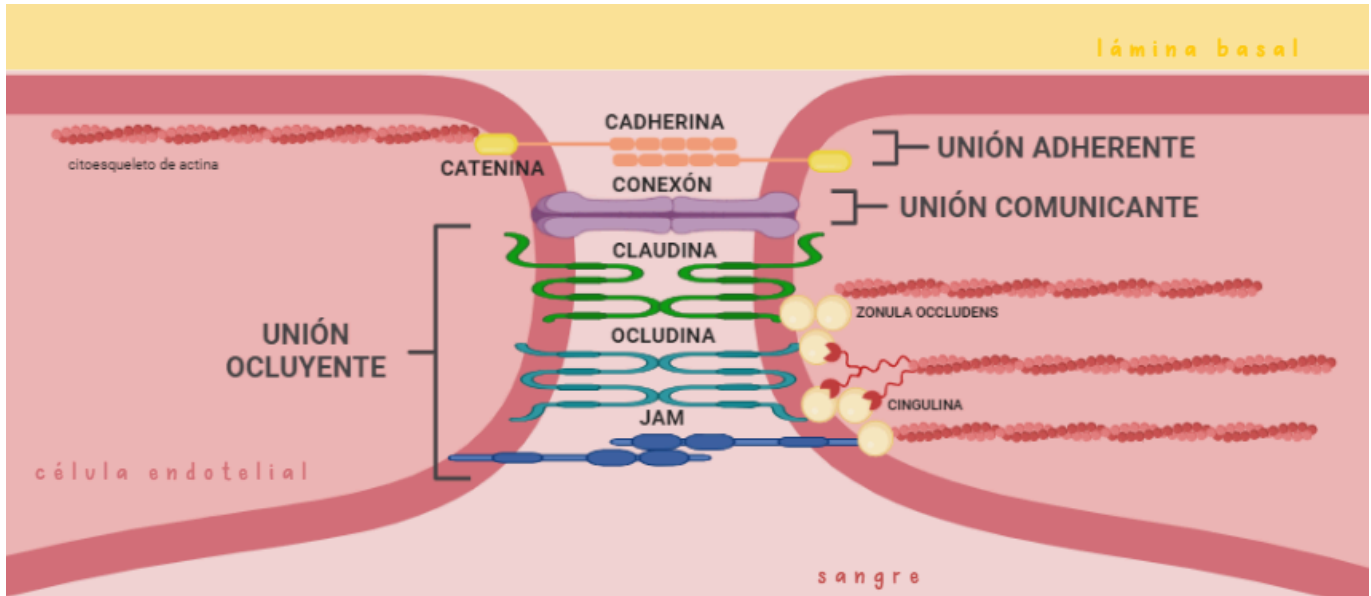


Figura 2. Tipos de unión entre las células endoteliales que forman la BHE. Las uniones ocluyentes limitan la difusión paracelular de diversos solutos, iones y moléculas liposolubles. Las principales moléculas transmembranales que median el contacto celular son la ocludina, claudina-1, claudina-3, claudina-5 y las moléculas de adhesión de la unión (JAMs). Estas moléculas se unen mediante la familia de proteínas zonula occludens (ZO-1/ZO-2/ZO-3) y su interacción con la cingulina al citoesqueleto. Las uniones adherentes son necesarias para el contacto primario entre las células endoteliales. Este contacto lo realizan las cadherinas, que se acoplan al citoesqueleto mediante cateninas. La comunicación intercelular por uniones comunicantes está formada por dos hemicanales ubicados en las membranas celulares opuestas; cada uno compuesto por seis proteínas transmembrana denominadas conexinas.

La fisiología de la BHE depende de las interacciones entre las células endoteliales y otros componentes celulares, como son los astrocitos y pericitos (Fig. 1). Los *astrocitos* son el tipo de células gliales más abundantes en el cerebro de los mamíferos, sus prolongaciones forman pies terminales que cubren la superficie de la microvasculatura del SNC. Mediante los pies perivasculares la astroglija regula el flujo sanguíneo local y la permeabilidad de la BHE para

garantizar que se cubran las necesidades metabólicas dependientes de la actividad sináptica de las neuronas, tal fenómeno se denomina acoplamiento neurovascular y neurobarrera (Nag, 2003; Cabezas et al., 2014; Hurtado-Alvarado et al., 2017). Una vez dentro del SNC, la astroglia suministra energía a las neuronas en forma de glucosa (Maxwell et al., 1989; Alvarez et al., 2013) u otros metabolitos, como cuerpos cetónicos, piruvato y lactato (Guzmán y Blázquez, 2001; Wang et al., 2001; Bélanger et al., 2011). Se ha demostrado que los astrocitos juegan un papel esencial en la regulación de la formación y el mantenimiento de la BHE, ya que influyen en el mantenimiento de las uniones interendoteliales (Tao-Cheng et al., 1987), en la expresión de sistemas enzimáticos especializados y de sistemas de transporte (Beck et al., 1986; Abbott et al., 2006), así como en la resistencia y polaridad de la membrana celular (Beck et al., 1984). Adicionalmente, los astrocitos apoyan la neurotransmisión proporcionando precursores como la glutamina, que una vez en las terminales neuronales puede ser convertida en glutamato y GABA (Verkhratsky y Nedergaard, 2018; Michinaga y Koyama, 2019).

Los *pericitos* son células que también contribuyen a regular la integridad de la BHE. Los pericitos rodean a las células endoteliales y, aunque están separados de ellas por la lámina basal, se pueden apreciar contactos mediante procesos citoplasmáticos del pericito que indentan la célula endotelial y viceversa, conocidos como uniones “*peg-socket*” (Nag, 2003; Armulik et al., 2005; Medina-Flores et al., 2023). Los pericitos establecen uniones comunicantes con las células endoteliales, principalmente constituidas por conexina 43, entre otras (Medina-Flores et al., 2022). Igualmente, los pericitos son importantes para el control del crecimiento y la migración de las células endoteliales, producen y liberan factores de crecimiento que controlan la permeabilidad de la BHE (Dohgu et al., 2005; Armulik et al., 2005; Hill et al., 2014), contribuyen al control del diámetro de los capilares para regular el flujo sanguíneo (Peppiatt et

al., 2006; Hamilton et al., 2010), a la eliminación de productos de desecho (Winkler et al., 2014) y, al control del tráfico de células inmunitarias hacia el SNC (Barkaway et al., 2022). En resumen, los distintos componentes de la BHE y sus interacciones proporcionan el entorno adecuado y la protección necesaria para el funcionamiento óptimo del SNC durante el ciclo sueño/vigilia.

Sueño

El sueño es un estado fisiológico vital para la supervivencia de los organismos, su privación conduce a déficits neuroinmunoendocrinos que eventualmente contribuyen a la muerte (Everson et al., 1989). El sueño se divide en dos fases: el sueño de movimientos oculares rápidos (MOR) y el sueño sin movimientos oculares rápidos (no-MOR) (Siegel et al., 2011). Las mediciones de la actividad eléctrica oscilatoria del cerebro revelan distintos patrones que ayudan a distinguir estas fases (Zielinski et al., 2016). El sueño no-MOR también se conoce como "*sueño de ondas lentas*" debido al predominio de actividad electroencefalográfica de ondas lentas de gran amplitud (Medina-Flores y Gómez-González, 2019). El sueño no-MOR se divide, a su vez, en tres etapas, la etapa 1 (N1) es la más ligera y se caracteriza por actividad electroencefalográfica lenta de 4-7 Hz, la fase N2 se caracteriza por la presencia de husos de sueño y complejos K; en tanto que, la etapa 3 se caracteriza por la presencia en el electroencefalograma de ondas delta (0.5 a 2 Hz). La fase N3 se considera la más profunda, en la que ocurren los procesos de reparación y limpieza del SNC (Zielinski et al., 2016; Tarun et al., 2020). Por otro lado, el sueño MOR se caracteriza por una actividad electroencefalográfica que se asemeja al estado de vigilia, atonía muscular en los músculos antigravitatorios, movimientos oculares rápidos y la experiencia de sueños vívidos (El Shakankiry, 2011; Medina-Flores y Gómez-González, 2019; Patel et al., 2022).

El estudio de la función del sueño ha implicado la implementación de diversos paradigmas experimentales de pérdida de sueño. En condiciones experimentales de laboratorio se han generado paradigmas de privación de sueño, que se refiere a periodos continuos de ausencia total de sueño; la fragmentación de sueño, que conlleva breves despertares a lo largo del episodio consolidado de sueño; y la restricción de sueño, también llamada privación parcial de sueño, que se define como la reducción de las horas de sueño por noche (Banks y Dinges, 2007; Magee et al., 2010; Mezick et al., 2013; Medina-Flores y Gómez-González, 2019). La restricción de sueño es la más común en la sociedad actual debido a una amplia gama de factores, que incluyen el estilo de vida, enfermedades, trastornos del sueño, responsabilidades sociales, domésticas y laborales, así como el uso de medios electrónicos durante la noche (Durmer y Dinges, 2005).

La pérdida o disminución de la duración del sueño implica no solo alteraciones metabólicas e inmunitarias, sino también tiene un impacto en la conducta de los organismos, en la capacidad cognitiva y en la fisiología celular, por ejemplo, induce disfunción de la BHE (Franken, 2008; He et al., 2014; Hurtado-Alvarado et al., 2016a). Sin embargo, los cambios dinámicos de la BHE ante la pérdida de sueño no se han estudiado a profundidad.

Sueño y cognición

El sueño juega un papel clave en el rendimiento cognitivo, reduce la fatiga mental, modifica el estado de ánimo, y las habilidades motoras (Walker et al., 2002; Deak y Stickgold, 2010; Eugene y Masiak, 2015). En particular, la mayoría de las investigaciones sobre la relación entre el sueño y la cognición se centran en la memoria y el aprendizaje. De hecho, se ha demostrado que dormir después de aprender, mejora el rendimiento de la memoria (Jenkins y Dallenbach, 1924; Walker et al., 2002; Walker y Stickgold, 2006). Además, existen diversas aproximaciones que explican los mecanismos por los cuales el sueño facilita la consolidación de

la memoria (Stickgold y Walker, 2007; Rasch y Born, 2013; Lendner et al., 2023). Algunos sugieren que durante el sueño, la reorganización y reactivación de la memoria puede resultar en una representación de almacenamiento de información más fina; de manera que, el acceso y la disponibilidad de su recuperación sean más eficientes (Maquet, 2001; Walker, 2008).

A fin de estudiar alteraciones en la memoria y aprendizaje, se han utilizado distintas tareas y modelos experimentales. En particular, la tarea de reconocimiento de objetos novedosos (NOR, por sus siglas en inglés *Novel Object Recognition*) (Ennaceur y Delacour, 1988), se ha convertido en un paradigma ampliamente utilizado y también se ha empleado para probar efectos de tratamientos farmacológicos (Goulart et al., 2010; Rajagopal et al., 2014; Szczepańska et al., 2023). Esta tarea es un ensayo conductual que se basa en el enfoque etológico de preferencia por explorar un objeto nuevo más que uno familiar en ausencia de reforzamiento de la conducta (Torres et al., 2007; Chen et al., 2014). Dado que esta tarea permite comparaciones entre especies, es de gran relevancia en la investigación básica y preclínica. Por otra parte, ya que las capacidades cognitivas se modifican a lo largo de la vida, se ha observado que el proceso de envejecimiento deteriora el aprendizaje y la memoria (Khan et al., 2014).

Senescencia celular

A lo largo del tiempo, se han identificado características comunes asociadas al envejecimiento, la senescencia celular es una de ellas. La senescencia celular que ocurre en las células se distingue por una detención estable del ciclo celular en respuesta a algún tipo de daño, como el daño persistente al ADN y otras señales inducidas por estrés (Rodier y Campisi, 2011; Calcinotto et al., 2019; Di Micco et al., 2021; Zhang et al., 2022), esta detención duradera del ciclo celular, es regulada en parte por inhibidores de las cinasas dependientes de ciclinas como $p16^{INK4a}$ (Sharpless et al., 2015; Hernandez-Segura et al., 2018). Aunado a lo anterior, las

células senescentes poseen otras características como una morfología aplanada, aumento del contenido lisosomal, reflejado en alta actividad de la enzima β -galactosidasa asociada a la senescencia (Dimri et al., 1995; Lee et al., 2006); diferencias morfológicas por el compromiso de la integridad nuclear debido a la pérdida de la proteína lamina B1 que da como resultado otros cambios nucleares, como cambios en la estructura de la cromatina, incluida su descondensación transitoria, y la aparición de fragmentos de cromatina citoplasmática enriquecidos de marcas epigenéticas asociadas con daño al ADN (Freund et al., 2012; Ivanov et al., 2013; Criscione et al., 2016; Hernandez-Segura et al., 2018; Lukášová et al., 2018); la producción de altos niveles de especies reactivas de oxígeno por disfunción mitocondrial (Miwa et al., 2022), y por la presencia del fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP, por sus siglas en inglés), el cual conlleva la secreción de un conjunto de moléculas entre las que se incluyen interleucinas (IL-6, IL-8, IL-1), proteínas quimioatrayentes de monocitos (MCP-2, MCP-3), metaloproteinasas de matriz extracelular (MMP-1, MMP-3), y muchas de las proteínas de la familia del factor de crecimiento similar a la insulina (revisado extensamente en Freund et al., 2010). En conjunto, las moléculas del SASP son capaces de ejercer efectos autocrinos y paracrinos, al fomentar el fenotipo senescente, promover un perfil pro-inflamatorio e inducir senescencia en las células circundantes (Maciel-Barón et al., 2017; Hernandez-Segura et al., 2018; Moreno-Blas et al., 2019).

Aunque se sabe que la senescencia celular desempeña funciones fisiológicas, sobre todo durante el desarrollo de un organismo, la acumulación de células senescentes también puede contribuir a desencadenar enfermedades y alteraciones relacionadas con la edad (Rodier y Campisi, 2011; Van Deursen, 2014; Herranz y Gil, 2018; Roger et al., 2021).

ANTECEDENTES

Consecuencias de la pérdida de sueño: disfunción de la barrera hematoencefálica

La pérdida de sueño, incluida la privación, restricción o fragmentación de sueño, genera un estado inflamatorio de bajo grado independiente de patógenos (Yehuda et al., 2009; Zielinski et al., 2014; Venancio & Suchecki, 2015; Hurtado-Alvarado et al., 2016a). Altos niveles de varios marcadores inflamatorios se asocian de forma independiente con cambios en la permeabilidad de la BHE (He et al., 2014; Hurtado-Alvarado et al., 2016a; Hurtado-Alvarado et al., 2018). La pérdida de sueño aumenta la permeabilidad de la BHE a moléculas circulantes a través de la disrupción de las uniones ocluyentes y del aumento en la endocitosis adsorptiva (Hurtado-Alvarado et al., 2016b; Hurtado-Alvarado et al., 2017; Medina-Flores et al., 2020).

Adicionalmente, las células reguladoras del fenotipo de la BHE también se ven afectadas por la pérdida crónica de sueño. Las interacciones entre los pericitos y las células endoteliales se alteran, ya que se promueve el desprendimiento de pericitos de la pared capilar (Medina-Flores et al., 2020), además de observarse disminución en su densidad (Wu et al., 2023). La restricción crónica de sueño, puede conducir a un estado de activación sostenida de la microglia y a la reactividad de los astrocitos en ausencia de signos evidentes de neuroinflamación (Bellesi et al., 2017; Que et al., 2023).

Consecuencias de la pérdida de sueño: déficit cognitivo

Las consecuencias de la pérdida crónica de sueño en múltiples estudios indican que en humanos dormir menos de 7 h por noche durante 4 o más días, tiene efectos adversos sobre tareas que involucran funciones cognitivas (Durmer y Dinges, 2005). Mediante el uso de baterías de evaluación neuroconductual para medir el estado de alerta y la memoria de trabajo, se observó que la restricción de sueño (6 o 4 h de sueño por noche durante 14 días) en adultos de entre 21 y

38 años, produjo déficit cognitivo en comparación con participantes que durmieron 8 h por noche (Van Dongen et al., 2003).

El deterioro de la memoria y el aprendizaje causado por la pérdida de sueño es un fenómeno que se ha demostrado ampliamente. Palchykova *et al.* (2006) sometieron a privación de sueño a un grupo de ratones por 6 h enseguida del aprendizaje de la tarea NOR mediante el manejo moderado de los animales. Como resultado, este grupo fue incapaz de discriminar entre los objetos familiares y el objeto nuevo presentados en la prueba 24 h después del aprendizaje de la tarea. En este sentido, Chen *et al.* (2014) obtuvieron los mismos resultados al exponer a un grupo de ratas a privación de sueño MOR por 6 h luego del aprendizaje de la tarea NOR mediante la técnica de plataforma individual o técnica de “maceta”, en la que se coloca al animal sobre una maceta invertida de 10 cm de diámetro colocada dentro de un balde, el cual se llena con agua hasta 1 cm por debajo del nivel de la maceta. Siguiendo esta misma línea, Shahveisi *et al.* (2020) encontraron que la privación de sueño MOR por 12 h en ratas, inducida por la técnica de plataformas múltiples (explicada a detalle más adelante), posterior al aprendizaje de la tarea NOR, afecta la memoria de reconocimiento de objetos en diversas etapas. Su hallazgo se debe a que implementaron el paradigma de privación de sueño en temporalidades distintas: inmediatamente después de aprender la tarea, justo antes de la fase de prueba de la tarea o seguida de re-aprender la tarea. Aunado a lo anterior, Cordeira *et al.* (2018) encontraron que al privar a ratones hembra de sueño por 12 h antes de aprender la tarea NOR, utilizando un sistema automatizado de privación de sueño para ratones (*Pinnacle Technologies, Inc.*), el cual consiste en hacer girar una barra en el fondo de la jaula-habitación con cambios aleatorios de dirección, conlleva a déficits de aprendizaje y de memoria ya que se reduce el tiempo de exploración y la preferencia por el objeto novedoso.

Consecuencias de la pérdida de sueño: senescencia celular

Aun cuando el riesgo de enfermedades asociadas a la edad se relaciona con alteraciones del sueño, los mecanismos y vías moleculares subyacentes no se han descrito. Con todo, se sabe que una noche de privación parcial de sueño induce ciertos patrones de expresión génica en células mononucleares de sangre periférica que son consistentes con la hipótesis de que la pérdida de sueño promueve el envejecimiento biológico tales como la activación de respuesta de daño al ADN, que inicia la detención del ciclo celular y promueve la senescencia, además del aumento en la expresión de genes de moléculas que conforman al SASP 24 h después del protocolo de restricción de sueño en adultos de entre 61 y 86 años (Carroll et al., 2016). La información precedente sugiere la acumulación progresiva de daño al ADN y, por tanto, incremento de senescencia celular (Carroll y Prather, 2021).

Igualmente, existe evidencia de que ratones sometidos a 20 h de privación de sueño durante 7 días aumenta la secreción de IL-4, IL-6 y del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) en sangre, además de la acumulación de radicales libres en tejido hepático. Adicionalmente, este estudio reporta en una población de humanos que la mala calidad de sueño, medida mediante el índice de calidad de sueño de Pittsburgh, puede provocar daño en el ADN (Zhang et al., 2019). En conjunto, estos hallazgos vinculan a la pérdida sostenida de sueño con los procesos moleculares asociados a la senescencia.

Senescencia celular, disfunción de la barrera hematoencefálica y deterioro cognitivo

La senescencia celular y los cambios en la BHE no se han estudiado a detalle. No obstante, en un modelo *in vitro* de la BHE, Yamazaki *et al.* (2016) observaron que la acumulación de células endoteliales y pericitos senescentes se asocia con la pérdida de la

integridad de la BHE debido a la reducción en la expresión de proteínas de las uniones ocluyentes.

El incremento en la permeabilidad de la BHE durante la pérdida de sueño depende del aumento en las concentraciones de mediadores inflamatorios como interferón γ (IFN- γ), TNF- α , IL-1 β e IL-6 (Hurtado-Alvarado et al., 2018; Medina-Flores et al., 2020). En este sentido, el SASP comparte con la inflamación de bajo grado algunos mediadores inflamatorios (eg. TNF- α , IL-6, IFN- γ), además de cambios en el fenotipo de la microglia y de la astrogliia; lo que sugiere que algunos de los cambios reportados en la fisiología de la BHE durante la pérdida de sueño pudieran estar relacionados con la inducción de senescencia celular.

La disfunción de la BHE, la senescencia celular y las enfermedades neurodegenerativas tienen factores comunes, como mecanismos de estrés oxidativo y la inflamación (Sweeney et al., 2018; Hou et al., 2019; Knopp et al., 2023). Ciertamente, la acumulación de daño celular y patrones de señalización alterados son parte de la patología presente en las enfermedades relacionadas con la edad (Carroll y Prather, 2021). Considerando lo anterior, se ha observado que el daño a la BHE después de una cirugía en ratones envejecidos induce deterioro cognitivo y la producción de citocinas proinflamatorias como IL-6 e IL-1 β ; del mismo modo, el implementar un protocolo de alteración de sueño de manera preoperatoria aumenta la neuroinflamación, la disrupción de la BHE y el deterioro de la memoria 24 h después de la cirugía (Ni et al., 2019). Por lo tanto, la acumulación progresiva de metabolitos tóxicos por la función alterada de la BHE podría conducir a alteraciones en la fisiología neural que, eventualmente, generen déficit cognitivo.

JUSTIFICACIÓN

La pérdida de sueño es un problema cada vez más frecuente en la sociedad, y se calcula que su prevalencia actual es del 45% en los mexicanos adultos. A pesar de que en las enfermedades neurodegenerativas y en las enfermedades relacionadas con la edad se presenta una disrupción en los patrones de sueño, los estudios referentes a los mecanismos que expliquen esta relación son relativamente escasos.

La reducción en las horas de sueño potencialmente promueve la acumulación de metabolitos neurotóxicos en el cerebro, lo que podría asociarse tanto con la senescencia celular como con la disfunción de la BHE; sucesos posiblemente precedentes al deterioro cognitivo. La descripción de los cambios fenotípicos que experimentan los componentes celulares de la BHE en condiciones de pérdida de sueño permitirá determinar posibles vías por las que se induce la senescencia celular. Encima, proporcionará información sobre la importancia de la disrupción que se presenta en relación con los eventos neuropatológicos subsecuentes.

HIPÓTESIS

La pérdida crónica de sueño inducirá senescencia celular en las células endoteliales cerebrales y en las células reguladoras del fenotipo de la BHE (pericitos) lo que en conjunto, conducirá a alteraciones en la permeabilidad de la BHE y, se asociará con déficit cognitivo.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto de la pérdida crónica de sueño sobre la generación de senescencia celular en las células de la BHE, y caracterizar el efecto de la disfunción de la BHE sobre la cognición.

Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de la pérdida crónica de sueño sobre la inducción de senescencia celular en las:
 - a) células endoteliales cerebrales.
 - b) células reguladoras del fenotipo de la BHE (pericitos).
- Evaluar el efecto de la alteración en la función de la BHE inducido por la pérdida crónica de sueño sobre la memoria.

MÉTODOS Y MATERIALES

Sujetos

Se utilizaron 40 ratas macho y 40 ratas hembra de la cepa Wistar de 3 meses de edad ($n = 20$ ensayos de permeabilidad, $n = 20$ aislamiento de microvasculatura cerebral -a los que también se les evaluó con la prueba NOR-), con comida comercial para ratas (*Laboratory Rodent Diet - 5001*) y agua *ad libitum*, a temperatura ambiente (20 - 25°C), bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12 h (luz encendida a las 7 am). Los sujetos fueron asignados aleatoriamente a las condiciones experimentales. En primer lugar, se separaron a las hembras de los machos; a su vez, estos se subdividieron en los grupos: control intacto, restricción de sueño por 3 días (RS3d), restricción de sueño por 5 días (RS5d) y restricción de sueño por 10 días (RS10d). Todos los experimentos se realizaron siguiendo los lineamientos para el cuidado y uso de mamíferos en neurociencia e investigación del comportamiento (*National Research Council, 2010*), siendo aprobados además por la Comisión Académica de Ética de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, dictamen CECBS1916.

Restricción de sueño

La restricción de sueño se llevó a cabo mediante la técnica de plataformas múltiples, que suprime el sueño MOR y reduce parcialmente el sueño de ondas lentas. La técnica consiste en colocar a las ratas en una cámara de acrílico ($82 \times 59 \times 48 \text{ cm}$) sobre plataformas de 7 cm de diámetro que se elevaban $\cong 2 \text{ cm}$ por encima de la superficie de agua, lo que permitía a las ratas moverse de una plataforma a otra (Gómez-González et al., 2013). Las ratas se mantuvieron en las condiciones de la técnica de plataformas múltiples durante 20 h diarias permitiéndoles dormir 4 h en su jaula-habitación durante las últimas 4 h de la fase de luz. Para reducir el estrés, los animales permanecieron en su mismo grupo social durante los periodos de restricción de sueño y oportunidad para dormir (Gómez-González et al., 2013; Medina-Flores et al., 2020). El protocolo de restricción de sueño, en cada caso, se realizó durante 3, 5 ó 10 días consecutivos.

Prueba de reconocimiento de objetos (NOR)

En los días 2, 4 y 9 de restricción de sueño a cada animal se colocó en un campo abierto sin objeto alguno y se le permitió familiarizarse con el entorno durante 5 minutos (Fig. 3 A). Después de 1 h, se colocaron 2 objetos idénticos en posiciones diferentes en el campo abierto y se le permitió a cada sujeto explorar los objetos durante 5 minutos (Fig. 3 B). En los días 3, 5 y 10 de restricción de sueño, se colocó un solo objeto de la fase de entrenamiento y un objeto novedoso, permitiendo a cada sujeto explorar los objetos durante 5 minutos (Fig. 3 C). Se registró el tiempo de exploración de los dos objetos en el día del entrenamiento y en el día de la prueba de reconocimiento de objetos. El grupo control tuvo las sesiones de habituación, entrenamiento y prueba el día correspondiente al de los sujetos de los grupos de restricción de sueño. Entre cada fase, tanto la arena como los objetos se limpiaron con etanol al 70%.

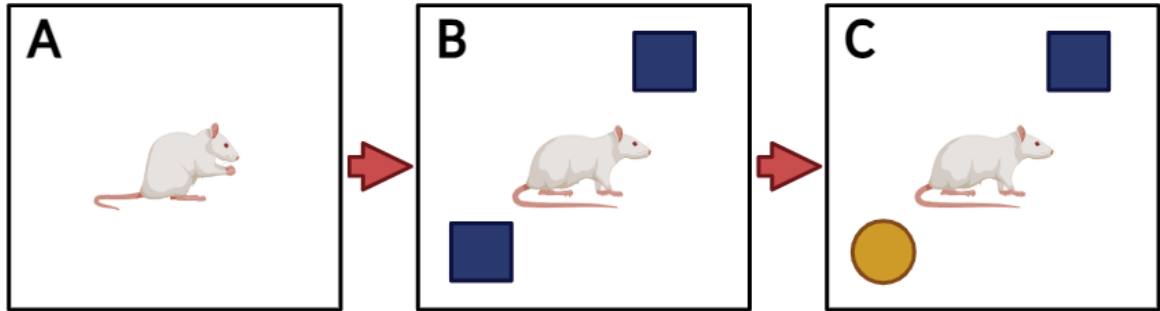


Figura 3. Protocolo de la prueba de reconocimiento de objetos.

A) En la fase de habituación, el animal se familiariza con el entorno en el campo abierto por 5 minutos, **B)** 1 h después en la fase de entrenamiento, se le colocan dos objetos idénticos y se le permite explorarlos por 5 minutos, **C)** 24 h más tarde en la prueba, se le coloca un objeto de la fase de entrenamiento y un objeto nuevo con dimensiones similares al familiar, y se le permite explorarlos por 5 minutos. Se registra el tiempo de exploración de ambos objetos en la segunda y tercera fase de la tarea.

Al comienzo de cada fase del protocolo de la tarea, las ratas se colocaron en el centro de la caja, orientadas en dirección opuesta a los objetos y así, evitar el sesgo de preferencia por comenzar a explorar cualquiera de los objetos. La exploración de los objetos se definió como dirigir la nariz a una distancia ≤ 2 cm hacia el objeto y/o tocarlo con la nariz; mientras que, darse la vuelta o sentarse sobre los objetos no se consideró como conducta exploratoria. No se consideraron aquellos animales que exploraron los objetos menos de un tiempo total de 10 segundos en la fase de prueba (Ennaceur y Delacour, 1988; Shahveisi et al., 2020).

A partir del registro de los tiempos de exploración del objeto novedoso y el objeto familiar en el día de la prueba, se calculó el *índice de preferencia* el cual es una relación entre la cantidad de tiempo dedicado a explorar el objeto nuevo en la fase de prueba sobre el tiempo dedicado a explorar tanto al objeto familiar (F) como al nuevo (N), es decir, el tiempo total dedicado a explorar ambos objetos: $(N/(F + N)) * 100$ (Antunes y Biala, 2012).

Ensayos de permeabilidad de la BHE

Se administró un cóctel de trazadores que contenía sodio-fluoresceína (10 mg/ml) y azul de Evans (1 mg/ml) por vía intravascular (0.2ml/100g de peso corporal) a los animales

anestesiados con pentobarbital sódico (ip. 0.063g/kg de peso corporal) de todos los grupos. En el caso de los grupos experimentales, este ensayo se llevó a cabo al finalizar la restricción de sueño en los días 3, 5 y 10, respectivamente. El cóctel se dejó circular durante 5 minutos; posteriormente, las ratas se perfundieron con solución salina al 0.9% por 5 minutos. El cerebro se removió y se disecaron las regiones de interés (corteza e hipocampo). Las muestras se pesaron, homogeneizaron con 200µl de PBS, y centrifugaron a 13500 rpm durante 10 minutos. Luego, se colectó el sobrenadante, se le añadieron 200µl de metanol y se homogeneizó. Las muestras se centrifugaron a 13500 rpm por 10 minutos, 100µl de cada muestra se colocaron en placas de 96 pozos para determinar la absorbancia en un lector de placas ELISA para fluoresceína (excitación 485 nm/emisión 535 nm) y para azul de Evans (excitación 535 nm/emisión 595 nm). Cada muestra se cuantificó por duplicado. La concentración de ambos trazadores se calculó usando una curva estándar y los resultados se muestran como la concentración por peso de cerebro fresco (*mg marcador/g de tejido*).

Aislamiento de la microvasculatura cerebral

Los microvasos cerebrales se aislaron inmediatamente después de retirar a las ratas de la cámara de privación de sueño en los días 3, 5 y 10, respectivamente. También se aislaron los microvasos cerebrales de los animales pertenecientes al grupo control intacto. Se obtuvieron muestras de tejido completo de la corteza cerebral e hipocampo, las cuales fueron homogeneizadas con 1 ml de buffer frío (sacarosa 0.3M, HEPES 3M, BSA al 1% en PBS, pH 7.4) y se centrifugaron a 1000 × g durante 10 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes se desecharon y los sedimentos se resuspendieron en 1 ml de buffer, luego se centrifugaron a 1000 × g durante 10 minutos. Los sobrenadantes se obtuvieron y se centrifugaron a 200 × g durante 5 minutos, los sedimentos se lavaron con 1 ml de PBS a 100 × g durante 2 minutos (Medina-Flores et al.,

2020). Los botones de microvasos cerebrales se almacenaron a 4 °C para su uso en la tinción con X-gal.

Ensayo de la actividad de β -galactosidasa asociada a la senescencia

La actividad de β -galactosidasa asociada a senescencia se evalúa mediante la tinción de las células con el sustrato cromogénico X-gal, que produce un compuesto azul insoluble al ser escindido por β -galactosidasa, y se distingue de la actividad de β -galactosidasa lisosomal usando un buffer de ácido cítrico/fosfato de sodio a pH 6.0, ya que aunque la enzima tiene un pH óptimo de 4.0, la magnitud del aumento en la senescencia es suficiente para la detección al pH subóptimo de 6.0 (Gary y Kindell, 2005; Debaq-Chainiaux et al., 2009). Por lo tanto, se realizaron ensayos de β -galactosidasa asociada a senescencia en la microvasculatura de las regiones de interés (corteza e hipocampo) en cada condición experimental, al igual que en el grupo control intacto. Los microvasos se colocaron en PFA al 4% durante 24 h. Después, se les colocó en laminillas previamente gelatinizadas para realizar la tinción. Las laminillas se hidrataron con PBS 1X y se pusieron en agitación suave a temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBS 1X. Las laminillas se incubaron con aproximadamente 100 μ l de la solución de X-gal (0.2M ácido cítrico/buffer fosfato de sodio pH 6.0, ferrocianuro 100mM, ferricianuro 100mM, NaCl 5M, MgCl₂ 1M, y X-gal 50 mg/ml) (Thermo-Scientific, USA) durante toda la noche a 37 °C (no CO₂). Después, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS 1X, se les colocaron 25 μ l de medio de montaje Vectashield con DAPI (Vector, USA) y se sellaron para su observación en el microscopio (modificado de Dimri et al., 1995; Lee et al., 2006; Salas-Venegas et al., 2023).

Análisis estadísticos

El análisis de los datos obtenidos para la comparación entre machos y hembras, al igual que la comparación entre los grupos control intacto y de restricción de sueño, se realizó implementando la prueba de análisis de varianza (ANOVA, por sus siglas en inglés) de dos vías, seguido de la prueba Tukey para múltiples comparaciones como *post hoc*. Todos los resultados se presentan como media \pm error estándar de la media (SEM, por sus siglas en inglés). Se consideró una diferencia estadísticamente significativa cuando $p < 0.05$. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, CA, EE. UU.).

RESULTADOS

La pérdida crónica de sueño aumentó la permeabilidad de la BHE

La función de la barrera hematoencefálica se evaluó mediante ensayos de permeabilidad *in vivo* con los trazadores azul de Evans y sodio-fluoresceína (Na-FI). Como ilustra la figura 4, se observó que los controles intactos tanto de machos como de hembras, presentaron baja permeabilidad de la BHE a Na-FI en la corteza cerebral y en el hipocampo. Sin embargo, las hembras restringidas de sueño presentaron significativamente mayor permeabilidad a Na-FI que los machos restringidos de sueño tanto en la corteza cerebral (ANOVA de dos vías $F_{3-28} = 7.4, p = 0.0008$), como en el hipocampo (ANOVA de dos vías $F_{3-30} = 4.541, p = 0.0097$). En el caso de las hembras, el aumento significativo de la permeabilidad a Na-FI en la corteza cerebral y el hipocampo se mantuvo presente a lo largo de los 10 días de restricción de sueño. Mientras que en los machos, el incremento significativo de la permeabilidad a Na-FI solamente se observó a los 3 y a los 10 días de restricción de sueño en el hipocampo ($p = 0.001$ | $p = 0.0023$) en comparación con los controles intactos.

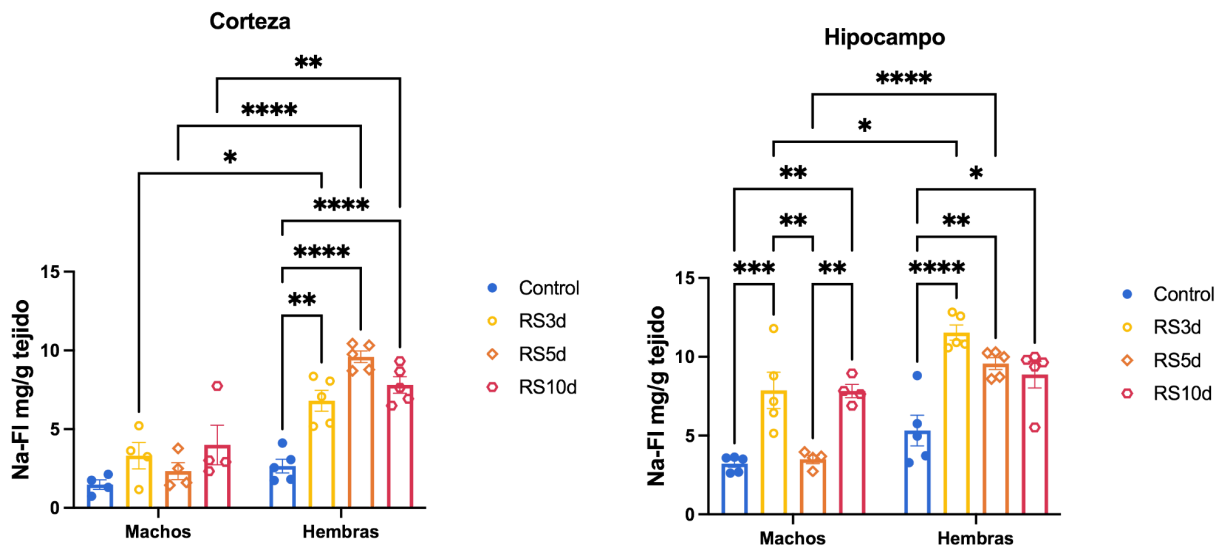


Figura 4. La restricción de sueño incrementó la permeabilidad de la BHE al trazador sodio-fluoresceína (Na-FI), este incremento fue mayor en hembras que en machos. En las hembras, la permeabilidad de la BHE a Na-FI en la corteza cerebral y en el hipocampo aumentó significativamente a partir del día 3 de restricción de sueño (RS3d), manteniéndose elevada hasta el día 10 de restricción de sueño (RS10d) con respecto a las hembras control. En los machos, la permeabilidad de la BHE a Na-FI se incrementó de manera significativa a los RS3d y a los RS10d en el hipocampo, mientras que en el día 5 de restricción de sueño (RS5d) se observó una reducción en la permeabilidad de la BHE a Na-FI en comparación con los RS3d y RS10d. En general, se observó un mayor incremento de la permeabilidad de la BHE a Na-FI en las hembras restringidas de sueño con respecto a los machos restringidos de sueño en ambas regiones. Las figuras representan puntos de datos individuales. ANOVA de dos vías, seguido de la prueba para múltiples comparaciones de Tukey, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Media \pm S.E.M.

En el caso del trazador azul de Evans, la figura 5 muestra la baja permeabilidad de la BHE de las hembras y machos control en ambas regiones (corteza e hipocampo). No obstante, los machos sometidos a restricción de sueño presentaron un mayor aumento de la permeabilidad de la BHE a este trazador en comparación con las hembras restringidas de sueño en el hipocampo (ANOVA de dos vías $F_{3-29} = 5.349$, $p = 0.0047$). En cambio, no se observaron diferencias significativas en la permeabilidad de la BHE al trazador azul de Evans entre los

machos restringidos de sueño y las hembras restringidas de sueño en la corteza cerebral (ANOVA de dos vías $F_{3-27} = 1.570$, $p = 0.2197$). En cuanto a los machos, la permeabilidad de la BHE a azul de Evans en la corteza cerebral tuvo un aumento significativo a los 5 días de restricción de sueño con respecto a los controles intactos ($p = 0.0029$). En tanto que, en el hipocampo se observó este aumento a lo largo de los tres periodos de restricción de sueño en comparación con los controles intactos. Si bien las hembras control presentaron baja permeabilidad de la BHE al trazador azul de Evans en ambas regiones cerebrales, no se observó incremento significativo de la permeabilidad de la BHE a este trazador en las hembras sometidas a restricción de sueño.

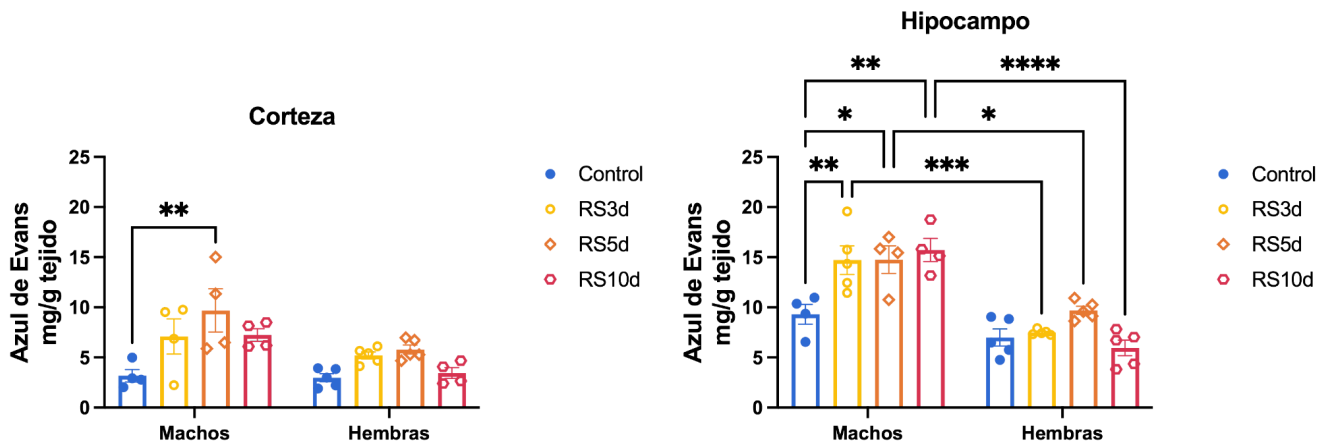


Figura 5. La restricción de sueño incrementó la permeabilidad de la BHE al trazador azul de Evans, este incremento fue mayor en machos que en hembras. En los machos, la permeabilidad de la BHE a azul de Evans en la corteza cerebral aumentó significativamente en el día 5 de restricción de sueño (RS5d); mientras que en el hipocampo la permeabilidad incrementó y se mantuvo elevada desde el día 3 de restricción de sueño (RS3d) en comparación a los machos control. En las hembras, se observó una normalización de la permeabilidad de la BHE a azul de Evans en el día 10 de restricción de sueño (RS10d), tanto en la corteza como en el hipocampo. Esencialmente, se observó un mayor incremento de la permeabilidad de la BHE al trazador azul de Evans en los machos sometidos a restricción de sueño con respecto a las hembras restringidas de sueño en el hipocampo. Las figuras representan puntos de datos individuales. ANOVA de dos vías, seguido de la prueba para múltiples comparaciones de Tukey, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Media \pm S.E.M.

La pérdida crónica de sueño promovió el incremento de la actividad de β -galactosidasa asociada a senescencia en las células de la BHE

Dado que una de las características de las células senescentes es el incremento de la actividad de la enzima lisosomal β -galactosidasa asociada a la senescencia, se evaluó la microvasculatura de la corteza cerebral y del hipocampo de los grupos control y experimentales mediante la tinción X-gal, este ensayo enzimático monitorea el aumento de la expresión y actividad de esta proteína lisosomal en células senescentes (González-Gualda et al., 2021). En las figuras 6 y 7 se observa que los microvasos cerebrales aislados de la corteza cerebral y del hipocampo desde el día 3 del protocolo de restricción de sueño (RS3d) hasta el día 10 del protocolo de restricción de sueño (RS10d) presentaron un aumento en la tinción azul a diferencia de los machos y hembras control que durmieron *ad libitum*, indicando un mayor incremento en la actividad de β -galactosidasa asociada a la senescencia.

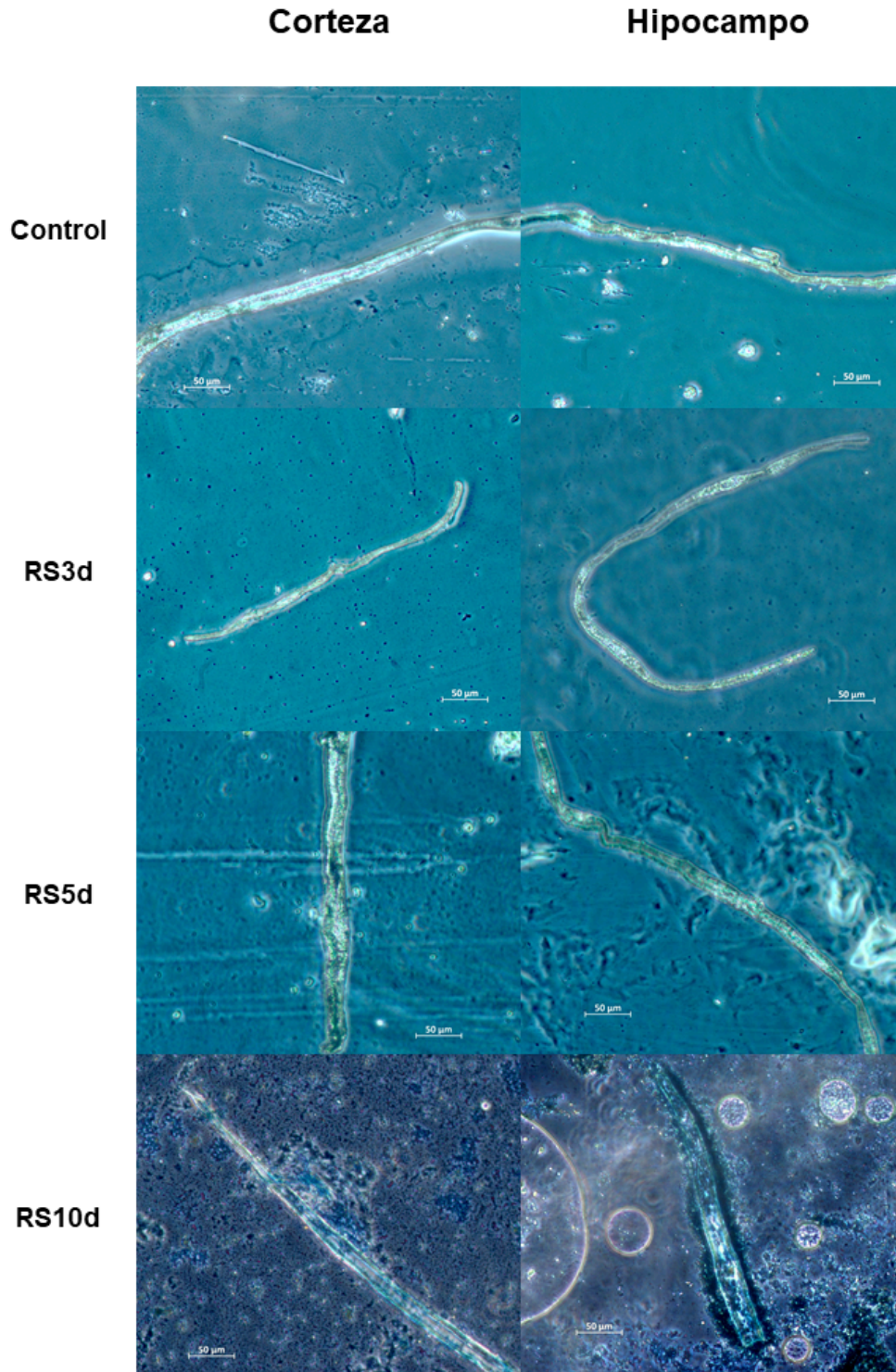


Figura 6. La restricción de sueño indujo el aumento de la actividad de la enzima β -galactosidasa asociada a senescencia en ratas macho. Las micrografías presentan imágenes representativas de microvasos aislados de la corteza cerebral e hipocampo procesados con la tinción X-gal de un sujeto de cada grupo: control intacto, restricción de sueño por 3 días (RS3d), restricción de sueño por 5 días (RS5d), y restricción de sueño por 10 días (RS10d). Microscopía de campo claro, objetivo 20X, la barra de escala representa 50 μ m.

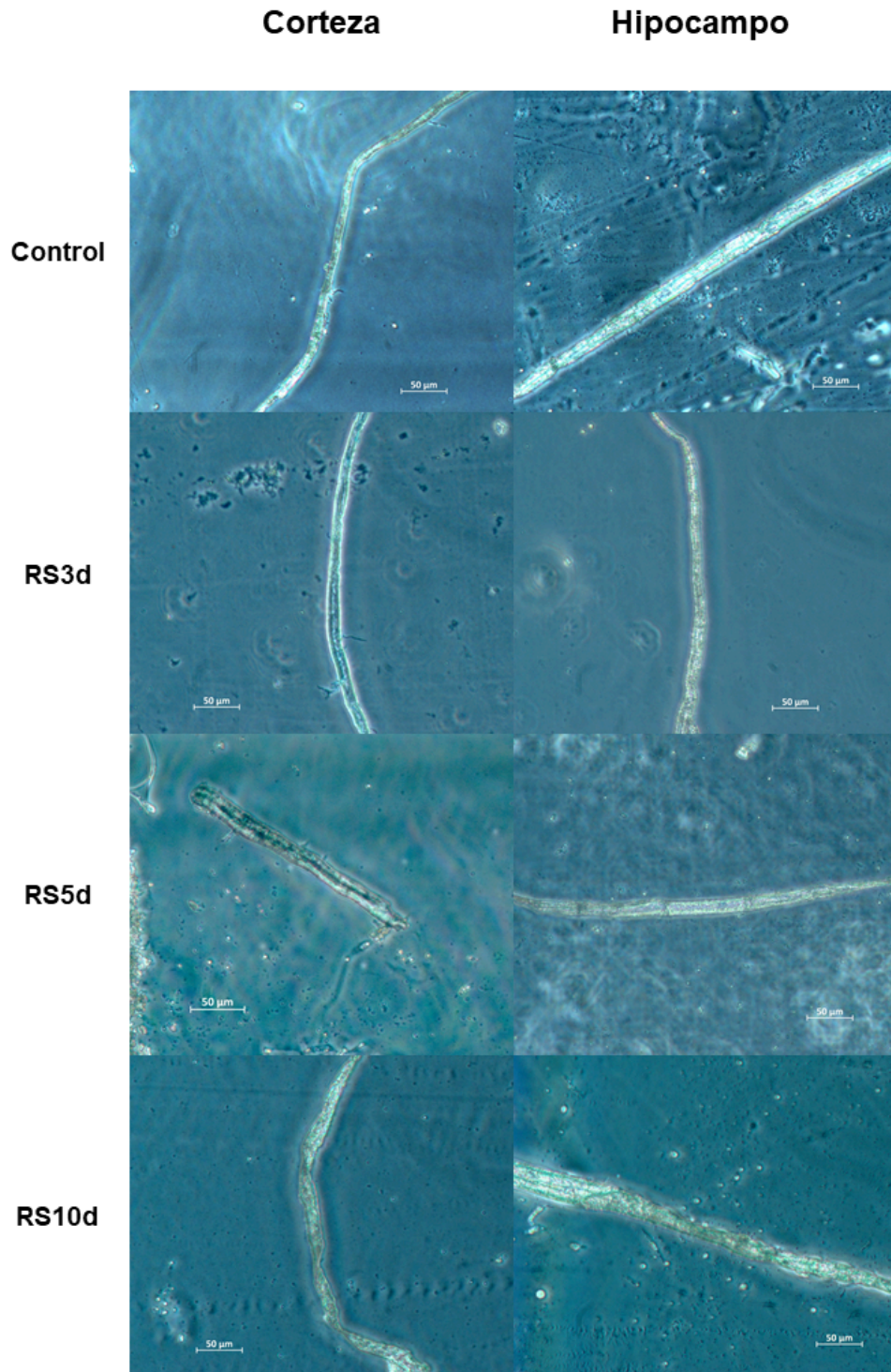


Figura 7. La restricción de sueño indujo el aumento de la actividad de la enzima β -galactosidasa asociada a senescencia en ratas hembra. Las micrografías presentan imágenes representativas de microvasos aislados de la corteza cerebral e hipocampo procesados con la tinción X-gal de un sujeto de cada grupo: control intacto, restricción de sueño por 3 días (RS3d), restricción de sueño por 5 días (RS5d), y restricción de sueño por 10 días (RS10d).

Microscopía de campo claro, objetivo 20X, la barra de escala representa 50 μ m.

La disfunción de la BHE después de la pérdida crónica de sueño generó deterioro cognitivo

La tarea NOR, desarrollada por Ennaceur y Delacour (1988), permite evaluar la memoria de reconocimiento de objetos en roedores. En la figura 8 se muestra el índice de preferencia de todos los grupos en el día de la prueba de la tarea, el cual indica la proporción de tiempo dedicado a explorar el objeto novedoso en relación con el tiempo total dedicado a explorar ambos objetos. Por lo que, un índice de preferencia superior al 50 % indicaría la preferencia por explorar el objeto nuevo, por debajo del 50 % una preferencia por explorar el objeto familiar, mientras que un 50 % indicaría una preferencia nula (Hammond et al., 2004; Antunes y Biala, 2012). Tal como se muestra en la figura 8, los machos sometidos a los tres periodos de restricción de sueño presentaron de manera significativa una menor preferencia por el objeto nuevo en comparación a los controles intactos (RS3d $p = 0.0013$, RS5d $p = 0.0085$, RS10d $p = 0.0028$). De manera similar, se observó una reducción de la preferencia por el ON en las hembras restringidas de sueño durante 5 días consecutivos con respecto a las hembras control ($p = 0.0190$). En tanto que, las hembras sometidas a restricción de sueño por 3 y 10 días consecutivos a diferencia de los controles, no mostraron una preferencia evidente por alguno de los objetos, indicando déficits en el reconocimiento de los objetos y, por tanto, en el rendimiento cognitivo.

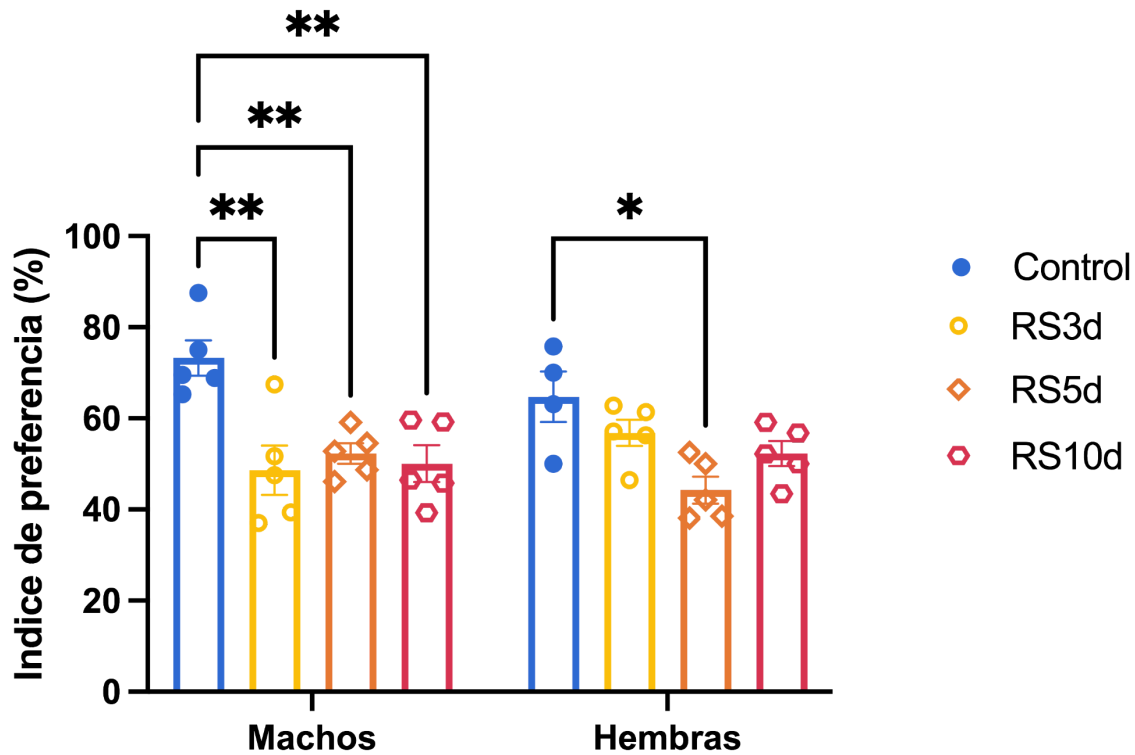


Figura 8. La restricción de sueño indujo déficit en la prueba de reconocimiento de objetos novedosos. Las gráficas muestran el índice de preferencia de todos los grupos en la prueba de reconocimiento de objetos (NOR). Los machos restringidos de sueño presentaron una reducción significativa de este índice desde el día 3 de restricción de sueño (RS3d) hasta el día 10 de restricción de sueño (RS10d) con respecto a los controles intactos. Por otra parte, en las hembras el índice de preferencia disminuyó significativamente en el día 5 de restricción de sueño (RS5d) en comparación con las hembras control. Las figuras representan puntos de datos individuales. ANOVA de dos vías, seguido de la prueba para múltiples comparaciones de Tukey, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Media \pm S.E.M.

DISCUSIÓN

Dado el vital papel de la BHE, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de la pérdida de sueño sobre la generación de senescencia celular en las células de la BHE, y describir sus efectos sobre la cognición. Los resultados revelan que, la pérdida crónica de sueño, al someter a ratas macho y hembra a un protocolo de 20 h de privación de sueño con supresión completa del sueño MOR acompañada de la reducción parcial del sueño no-MOR, más 4 h de oportunidad para dormir durante 3, 5, y 10 días consecutivos, indujo el incremento de la

actividad de β -galactosidasa asociada a senescencia en la microvasculatura cerebral, además de comprometer la función de la BHE e impactar de manera perjudicial el rendimiento cognitivo.

En el presente trabajo, la permeabilidad de la BHE a los trazadores azul de Evans y sodio-fluoresceína se incrementó desde los 3 días de restricción de sueño. Debido a su pequeño peso molecular, el trazador Na-FI puede cruzar la BHE mucho más fácilmente que los trazadores de mayor peso molecular y es un indicador del flujo paracelular de las células endoteliales en la BHE, aparte de que se une sólo débilmente a las proteínas (Kaya y Ahishali, 2011; Gómez-González et al., 2013; Saunders et al., 2015). En contraste, el trazador azul de Evans se utiliza como un marcador de alto peso molecular. Tan pronto como se presenta al sistema vascular, el azul de Evans se une a la albúmina sérica la cual se transporta a través de las células endoteliales (Kaya y Ahishali, 2011; Lu, 2012). En relación a esto, Gómez-González *et al.* (2013) demostraron que la supresión del sueño MOR aumenta la densidad de vesículas pinocíticas en las células endoteliales del hipocampo y se relaciona con la ruta de extravasación del azul de Evans.

Tomando en cuenta lo anterior, Sun *et al.* (2020) evaluaron la pérdida crónica de sueño por 72 h mediante la técnica de “maceta” en ratones C57BL/6 de 18 meses de edad para después identificar el efecto sobre la permeabilidad de la BHE al trazador azul de Evans. La concentración del trazador en el cerebro completo de los ratones privados de sueño aumentó significativamente en comparación con los ratones del grupo control. De la misma manera, He *et al.* (2014), utilizando el sistema automatizado *Pinnacle Technologies*, restringieron de sueño a ratones C57BL/6 de 3 meses de edad por 6 días consecutivos. Luego, determinaron la permeabilidad paracelular de la BHE a sodio-fluoresceína y encontraron un aumento significativo en los ratones sometidos a restricción de sueño en comparación con el grupo de

control tanto en cerebro completo, como en la corteza cerebral y estructuras subcorticales. En cuanto a la pérdida crónica de sueño por 10 días, el grupo de Gómez-González ha caracterizado en distintas cepas de roedores, el aumento significativo de la permeabilidad de la BHE a moléculas de pequeño, mediano y gran peso molecular como azul de Evans, sodio-fluoresceína, rodamina 123, entre otros, implementando la técnica de plataformas múltiples (Gómez-González et al., 2013; Hurtado-Alvarado et al., 2017; Hurtado-Alvarado et al., 2018; Medina-Flores et al., 2020).

Es de interés discutir la diferencia en el aumento de permeabilidad de la BHE observado entre machos y hembras, lo cual no había sido evaluado en condiciones de pérdida de sueño. A pesar de ello, coincidiendo con los resultados aquí expuestos, un par de estudios refieren que las ratas macho presentan mayor permeabilidad de la BHE que las hembras al trazador azul de Evans ante otras situaciones de estrés como en el caso de convulsiones inducidas por pentilentetrazol (Oztas et al., 2007) y, la exposición a la radiación de radiofrecuencia (Sirav y Seyhan, 2011). Incluso, Sirav y Seyhan mostraron que las ratas hembras tampoco tuvieron una extravasación significativa del trazador. En contraste, en el presente estudio se observó una hiperpermeabilidad de la BHE al trazador Na-Fl tanto en corteza como en hipocampo en las ratas hembra restringidas de sueño a comparación de los machos restringidos de sueño. La contribución de otros mecanismos subyacentes a la permeabilidad de la BHE podrían explicar estas diferencias (revisado en Dion-Albert et al., 2022). Por ejemplo, Erickson *et al.* (2018) mostraron que los niveles de IL-6 e IFN- γ en ratones hembra se correlacionan positivamente con la permeabilidad de la BHE, la cual fue significativamente más alta que en sus homólogos masculinos ante la estimulación del sistema inmunológico. Encima de lo anterior, se destaca la contribución de las hormonas sexuales y sus fluctuaciones en la pérdida de permeabilidad

selectiva de la BHE. Wilson *et al.* (2008) observaron un aumento en la extravasación del trazador azul de Evans en el cerebro de ratones hembra ovariectomizadas en comparación con controles intactos.

Si bien es cierto que el aumento significativo de la permeabilidad al trazador sodio-fluoresceína en el caso de los machos se observó solamente en el hipocampo, también se resalta la tendencia a este aumento en la corteza cerebral de los sujetos restringidos de sueño. Lo anterior, podría relacionarse con el hecho de que la BHE tiene una susceptibilidad regional a los cambios de permeabilidad en ciertas circunstancias. Por ejemplo, Hurtado-Alvarado *et al.* (2017) indujeron la pérdida crónica de sueño por 10 días en ratas macho Wistar mediante la técnica de plataformas múltiples y observaron una hiperpermeabilidad de la BHE al trazador sodio-fluoresceína en el hipocampo en comparación con los controles que dormían *ad libitum*, seguido de la restauración progresiva de la BHE en esta región promovida por 120 minutos de recuperación de sueño. En el caso del trazador azul de Evans, Gómez-González *et al.* (2013) sugieren que las diferencias regionales en la disrupción y recuperación de la barrera hematoencefálica después de la privación de sueño MOR por 10 días mediante la técnica de plataformas múltiples en ratas macho Wistar pueden surgir de diferencias en el flujo sanguíneo entre regiones cerebrales. Esto, debido a que se presentó una hiperpermeabilidad prolongada de la BHE inducida por la pérdida de sueño que se mantuvo alta incluso después de 120 minutos de recuperación de sueño en regiones como el hipocampo, el vermis del cerebelo, la corteza somatosensorial, corteza motora, corteza auditiva, corteza orbitofrontal, entre otras. Por ende, el hipocampo parece mostrar una lenta reducción en la permeabilidad de la BHE a lo largo del tiempo de recuperación del sueño.

Ahora bien, la disfunción de la BHE acompaña a muchas afecciones neurológicas, incluidas la epilepsia, la esclerosis múltiple, la esclerosis lateral amiotrófica, y las enfermedades neurodegenerativas asociadas a la edad, como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson (Knox et al., 2022). De hecho, la permeabilidad de la BHE puede verse comprometida en ciertas regiones cerebrales durante el envejecimiento o en condiciones fisiopatológicas (Villaseñor et al., 2017), y se ha sugerido que el deterioro de la funcionalidad de la BHE es un evento en el proceso de envejecimiento que precede a la enfermedad (Montagne et al., 2015; Montagne et al., 2020). Para ilustrar un caso, Montagne *et al.* (2015) al realizar el análisis de imágenes por resonancia magnética en 24 individuos sin deterioro cognitivo, de los cuales 18 tenían entre 55 y 90 años de edad y, 6 de entre 23 y 47 años de edad, encontraron una pérdida progresiva de la integridad de la BHE en el hipocampo dependiente de la edad debido al aumento de permeabilidad en esa región. Por ello, sugieren que la disfunción vascular en el cerebro humano que envejece comienza en el hipocampo.

Puesto que, la relación entre el compromiso de la BHE y las enfermedades asociadas a la edad es clara, la investigación actual se centró en evaluar el efecto de la pérdida crónica de sueño sobre la inducción de senescencia celular en las células de la BHE. Por ello, se evaluó la actividad de la enzima β -galactosidasa asociada a senescencia. Se observó un incremento de este marcador en la microvasculatura tanto de la corteza cerebral como del hipocampo de ratas jóvenes restringidas de sueño, lo que podría sugerir el desarrollo de senescencia celular. Sin embargo, el aumento en la actividad de β -galactosidasa asociada a senescencia no es un marcador específico de este fenómeno. En cuanto a lo anterior, Timonina *et al.* (2023) detectaron la actividad aumentada de esta enzima en el tejido adiposo visceral de ratones C57BL/6 de 48 semanas de edad sometidos a un paradigma de pérdida crónica de sueño utilizando el sistema

automatizado *Pinnacle Technologies* por 30 días, además de otros marcadores de senescencia celular como niveles reducidos de la proteína nuclear lámina B1 y, un aumento en la expresión génica de $p16^{INK4a}$, $p21^{Cip1/Waf1}$, MMP-3 e IL-1 β a comparación con los grupos control. Junto con lo anterior, señalaron que el aumento de la actividad de β -galactosidasa asociada a la senescencia se detectó desde el día 16 del protocolo experimental y continuó aumentando durante los días 23 y 30, lo que sugieren podría ser un marcador de “pre-senescencia” (Timonina et al., 2023).

Con respecto a la causa de la inducción de senescencia por la disrupción del sueño, distintos grupos de investigación han encontrado que en varios protocolos de pérdida de sueño se presenta un aumento en la expresión de genes que tienen que ver con la respuesta de daño al ADN (Carroll et al., 2016; Zhang et al., 2019; Timonina et al., 2023). Entre los que destaca la investigación de Andersen *et al.*, 2009 en la que ratas de la cepa Wistar–Hannover sometidas a restricción de sueño aguda (24 h / 96 h) ó crónica por 21 días (privación de sueño por 18 h, oportunidad para dormir de 6 h) mediante la técnica de plataformas múltiples, mostraron un daño elevado en el ADN, medido por el ensayo de electroforesis unicelular, en el cerebro y las células inmunes en comparación con las ratas no expuestas a las condiciones de privación de sueño; estos efectos fueron más pronunciados a medida que aumentaba la duración de la pérdida de sueño (96 h y 21 días consecutivos). La información precedente supone que la interrupción del sueño induce daño al ADN. En suma, se sabe que la pérdida de sueño genera un estado inflamatorio de bajo grado caracterizado por un aumento crónico de mediadores proinflamatorios (Hurtado-Alvarado et al., 2018). Por lo tanto, el ambiente inflamatorio que se promueve tanto por la propia pérdida de sueño como por el SASP, harían posible la disrupción observada en la BHE.

Un factor adicional a considerar es el papel de la regulación que ejerce la pérdida de sueño en relación con la disfunción de la BHE y el deterioro cognitivo. En este sentido, se ha documentado que los individuos con disfunción cognitiva temprana presentan daño en los capilares cerebrales y alteraciones en la BHE independientemente de cambios en los indicadores moleculares de la enfermedad de Alzheimer, sugiriendo que la disrupción de la BHE es un biomarcador temprano de la disfunción cognitiva (Nation et al., 2019). Por otra parte, un estudio de seguimiento por seis años, vincula altos niveles en la fragmentación del sueño con la tasa de deterioro cognitivo y el riesgo de desarrollar Alzheimer en adultos mayores que no presentan demencia (Lim et al., 2013).

Lo expuesto anteriormente, concuerda con los hallazgos encontrados en el rendimiento cognitivo observado en la prueba NOR. En esta tarea, el tiempo que el animal dedica espontáneamente a explorar el objeto nuevo, en relación con el objeto familiar el día de la prueba, se toma como medida del reconocimiento de los objetos vistos previamente. Dado que en este caso, únicamente los animales control presentaron una preferencia significativa por explorar el objeto nuevo en comparación con los animales sometidos al protocolo de restricción de sueño, es evidente el efecto perjudicial de la pérdida de sueño para discriminar los objetos. Este patrón conductual, concuerda con otros informes descritos previamente (Palchykova et al., 2006; Chen et al., 2014; Cordeira et al., 2018; Shahveisi et al., 2020). Incluso, la fragmentación crónica de sueño inducida por estimulación táctil intermitente mediante un dispositivo automatizado (*Lafayette Instruments*) por 4 y 9 semanas en ratones macho C57BL/6 de 8 semanas de edad tuvo como resultado una disminución de la preferencia por el objeto novedoso en la prueba NOR, así como una mayor permeabilidad de la BHE a dextranos de 3-5 *kDa* comparado con los controles (Puech et al., 2023). De manera integral, las conclusiones coinciden en que la pérdida crónica de

sueño, independientemente de que se implementen distintos paradigmas experimentales, tiene un efecto perjudicial en la memoria de reconocimiento de objetos en roedores.

Las consecuencias de la pérdida crónica de sueño observadas en el presente modelo experimental muestran diferencias significativas entre machos y hembras en el caso de la permeabilidad de la BHE a trazadores de distinto peso molecular, las cuales se mantienen a lo largo del protocolo de restricción de sueño. En cambio, el incremento medido y paulatino de la actividad de β -galactosidasa asociada a senescencia se observa independientemente del sexo. Lo que también resulta en la evaluación de la memoria de reconocimiento, ya que tanto en machos como en hembras se presenta un deterioro significativo en el rendimiento cognitivo. Podría considerarse entonces que, aunque los mecanismos fisiológicos subyacentes de disrupción de la BHE actúan de manera diferente entre sexos, esta disrupción tiene el mismo efecto perjudicial en la cognición.

Ahora bien, tomando en cuenta que en la edad adulta cada día de una rata equivale aproximadamente a 34.8 días humanos (Sengupta, 2013). Se destaca la importancia de los hallazgos de la presente investigación ya que, podrían extrapolarse a las consecuencias de la restricción de sueño durante aproximadamente 3, 5 y 10 meses en humanos, lo cual es evidente en la sociedad actual.

Las limitantes presentes en esta investigación se basan en que si bien una característica más comunes observadas en la senescencia celular es la actividad de la enzima lisosomal β -galactosidasa asociada a senescencia, se requiere corroborar la presencia de otros marcadores para garantizar que la pérdida crónica de sueño induce senescencia celular en la BHE. Análogamente, es la primera vez que se llevan a cabo los ensayos de la actividad de este marcador en la microvasculatura cerebral, lo cual requirió una adecuación y estandarización de la

técnica, en la cual, la cantidad de vasos sanguíneos por ensayo es una limitante para realizar un análisis cuantitativo en este tipo de tejido.

CONCLUSIONES

A lo largo de este escrito, se muestra al sueño como posible regulador de la senescencia celular en la BHE, al describir las consecuencias frente a la pérdida crónica del mismo en la fisiología de la BHE y su efectos sobre el desempeño en una prueba de memoria. El hallazgo principal muestra que el modelo implementado de restricción de sueño indujo un aumento en la actividad de β -galactosidasa asociada a senescencia en la microvasculatura cerebral. Adicionalmente, los ensayos de permeabilidad a trazadores con distinto peso molecular mostraron la disrupción de la BHE. La prueba NOR indicó que los animales expuestos a la restricción crónica de sueño mostraron déficit cognitivo al ser incapaces de discriminar entre el objeto familiar y el novedoso.

En el futuro, se pretende continuar con esta línea de investigación, poniendo un énfasis importante en corroborar la generación de senescencia celular mediante la evaluación de otros marcadores. Asimismo, se espera comparar los resultados con animales envejecidos para así, caracterizar la pérdida crónica de sueño y su relación con la senescencia celular de manera puntual. Finalmente, se desean utilizar otros paradigmas experimentales con el propósito de evaluar distintos tipos de memoria y cuantificar el grado de afectación que se presente.

La pérdida crónica de sueño es una realidad prevalente en la sociedad, ésta no sólo reduce la cantidad de sueño, sino que también aumenta la fragmentación del mismo y altera el ritmo circadiano de la actividad sueño-vigilia. La pérdida de sueño es un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas y la posible inducción senescencia celular en la BHE podría jugar un papel en el inicio del deterioro cognitivo.

REFERENCIAS

- Abbott, N. J., Rönnbäck, L., & Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature reviews. Neuroscience*, 7(1), 41–53. <https://doi.org/10.1038/nrn1824>
- Andersen, M. L., Ribeiro, D. A., Bergamaschi, C. T., Alvarenga, T. A., Silva, A., Zager, A., Campos, R. R., & Tufik, S. (2009). Distinct effects of acute and chronic sleep loss on DNA damage in rats. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 33(3), 562–567. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2009.02.014>
- Alvarez, J. I., Katayama, T., & Prat, A. (2013). Glial influence on the blood brain barrier. *Glia*, 61(12), 1939–1958. <https://doi.org/10.1002/glia.22575>
- Armulik, A., Abramsson, A., & Betsholtz, C. (2005). Endothelial/pericyte interactions. *Circulation research*, 97(6), 512–523. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000182903.16652.d7>
- Banks, S., & Dinges, D. F. (2007). Behavioral and physiological consequences of sleep restriction. *Journal of clinical sleep medicine : JCSM : official publication of the American Academy of Sleep Medicine*, 3(5), 519–528.
- Ballabh, P., Braun, A., & Nedergaard, M. (2004). The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiology of disease*, 16(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2003.12.016>
- Barkaway, A., Attwell, D., & Korte, N. (2022). Immune-vascular mural cell interactions: consequences for immune cell trafficking, cerebral blood flow, and the blood-brain barrier. *Neurophotonics*, 9(3), 031914. <https://doi.org/10.1117/1.NPh.9.3.031914>

- Beck, D. W., Vinters, H. V., Hart, M. N., & Cancilla, P. A. (1984). Glial cells influence polarity of the blood-brain barrier. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 43(3), 219–224. <https://doi.org/10.1097/00005072-198405000-00001>
- Beck, D. W., Roberts, R. L., & Olson, J. J. (1986). Glial cells influence membrane-associated enzyme activity at the blood-brain barrier. *Brain research*, 381(1), 131–137. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(86\)90700-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(86)90700-6)
- Bélanger, M., Allaman, I., & Magistretti, P. J. (2011). Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell metabolism*, 14(6), 724–738. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.08.016>
- Bellesi, M., de Vivo, L., Chini, M., Gilli, F., Tononi, G., & Cirelli, C. (2017). Sleep Loss Promotes Astrocytic Phagocytosis and Microglial Activation in Mouse Cerebral Cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 37(21), 5263–5273. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3981-16.2017>
- Belousov, A. B., Fontes, J. D., Freitas-Andrade, M., & Naus, C. C. (2017). Gap junctions and hemichannels: communicating cell death in neurodevelopment and disease. *BMC cell biology*, 18(Suppl 1), 4. <https://doi.org/10.1186/s12860-016-0120-x>
- Cabezas, R., Avila, M., Gonzalez, J., El-Bachá, R. S., Báez, E., García-Segura, L. M., Jurado Coronel, J. C., Capani, F., Cardona-Gomez, G. P., & Barreto, G. E. (2014). Astrocytic modulation of blood brain barrier: perspectives on Parkinson's disease. *Frontiers in cellular neuroscience*, 8, 211. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00211>
- Calcinotto, A., Kohli, J., Zagato, E., Pellegrini, L., Demaria, M., & Alimonti, A. (2019). Cellular Senescence: Aging, Cancer, and Injury. *Physiological reviews*, 99(2), 1047–1078. <https://doi.org/10.1152/physrev.00020.2018>

- Carroll, J. E., Cole, S. W., Seeman, T. E., Breen, E. C., Witarama, T., Arevalo, J. M. G., Ma, J., & Irwin, M. R. (2016). Partial sleep deprivation activates the DNA damage response (DDR) and the senescence-associated secretory phenotype (SASP) in aged adult humans. *Brain, behavior, and immunity*, *51*, 223–229. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.08.024>
- Carroll, J. E., & Prather, A. A. (2021). Sleep and Biological Aging: A Short Review. *Current opinion in endocrine and metabolic research*, *18*, 159–164. <https://doi.org/10.1016/j.coemr.2021.03.021>
- Chen, L., Tian, S., & Ke, J. (2014). Rapid eye movement sleep deprivation disrupts consolidation but not reconsolidation of novel object recognition memory in rats. *Neuroscience letters*, *563*, 12–16. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.01.024>
- Cordeira, J., Kolluru, S. S., Rosenblatt, H., Kry, J., Strecker, R. E., & McCarley, R. W. (2018). Learning and memory are impaired in the object recognition task during metestrus/diestrus and after sleep deprivation. *Behavioural brain research*, *339*, 124–129. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.11.033>
- Criscione, S. W., Teo, Y. V., & Neretti, N. (2016). The Chromatin Landscape of Cellular Senescence. *Trends in genetics : TIG*, *32*(11), 751–761. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2016.09.005>
- Cuddapah, V. A., Zhang, S. L., & Sehgal, A. (2019). Regulation of the Blood-Brain Barrier by Circadian Rhythms and Sleep. *Trends in neurosciences*, *42*(7), 500–510. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2019.05.001>
- Deak, M. C., & Stickgold, R. (2010). Sleep and cognition. *Wiley interdisciplinary reviews. Cognitive science*, *1*(4), 491–500. <https://doi.org/10.1002/wcs.52>

- Debacq-Chainiaux, F., Erusalimsky, J. D., Campisi, J., & Toussaint, O. (2009). Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nature protocols*, 4(12), 1798–1806. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.191>
- Dejana, E., Tournier-Lasserre, E., & Weinstein, B. M. (2009). The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: molecular basis and pathological implications. *Developmental cell*, 16(2), 209–221. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.01.004>
- Di Micco, R., Krizhanovsky, V., Baker, D., & d'Adda di Fagagna, F. (2021). Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 22(2), 75–95. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00314-w>
- Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., & Pereira-Smith, O. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(20), 9363–9367. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.20.9363>
- Dion-Albert, L., Bandeira Binder, L., Daigle, B., Hong-Minh, A., Lebel, M., & Menard, C. (2022). Sex differences in the blood-brain barrier: Implications for mental health. *Frontiers in neuroendocrinology*, 65, 100989. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2022.100989>
- Dohgu, S., Takata, F., Yamauchi, A., Nakagawa, S., Egawa, T., Naito, M., Tsuruo, T., Sawada, Y., Niwa, M., & Kataoka, Y. (2005). Brain pericytes contribute to the induction and up-regulation of blood-brain barrier functions through transforming growth

factor-beta production. *Brain research*, 1038(2), 208–215.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.01.027>

- Durmer, J. S., & Dinges, D. F. (2005). Neurocognitive consequences of sleep deprivation. *Seminars in neurology*, 25(1), 117–129. <https://doi.org/10.1055/s-2005-867080>
- Ennaceur, A., & Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioural brain research*, 31(1), 47–59. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(88\)90157-x](https://doi.org/10.1016/0166-4328(88)90157-x)
- El Shakankiry, H. M. (2011). Sleep physiology and sleep disorders in childhood. *Nature and science of sleep*, 3, 101–114. <https://doi.org/10.2147/NSS.S22839>
- Erickson, M. A., Liang, W. S., Fernandez, E. G., Bullock, K. M., Thysell, J. A., & Banks, W. A. (2018). Genetics and sex influence peripheral and central innate immune responses and blood-brain barrier integrity. *PloS one*, 13(10), e0205769. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205769>
- Eugene, A. R., & Masiak, J. (2015). The Neuroprotective Aspects of Sleep. *MEDtube science*, 3(1), 35–40.
- Everson, C. A., Bergmann, B. M., & Rechtschaffen, A. (1989). Sleep deprivation in the rat: III. Total sleep deprivation. *Sleep*, 12(1), 13–21. <https://doi.org/10.1093/sleep/12.1.13>
- Franken, P. (2008). Sleep Homeostasis. In *Encyclopedia of Neuroscience* (pp. 3721–3725). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-29678-2_5441
- Freund, A., Orjalo, A. V., Desprez, P. Y., & Campisi, J. (2010). Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends in molecular medicine*, 16(5), 238–246. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.03.003>

- Freund, A., Laberge, R. M., Demaria, M., & Campisi, J. (2012). Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. *Molecular biology of the cell*, 23(11), 2066–2075. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-10-0884>
- Gary, R. K., & Kindell, S. M. (2005). Quantitative assay of senescence-associated beta-galactosidase activity in mammalian cell extracts. *Analytical biochemistry*, 343(2), 329–334. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.06.003>
- Greene, C., & Campbell, M. (2016). Tight junction modulation of the blood brain barrier: CNS delivery of small molecules. *Tissue barriers*, 4(1), e1138017. <https://doi.org/10.1080/21688370.2015.1138017>
- González-Gualda, E., Baker, A. G., Fruk, L., & Muñoz-Espín, D. (2021). A guide to assessing cellular senescence in vitro and in vivo. *The FEBS journal*, 288(1), 56–80. <https://doi.org/10.1111/febs.15570>
- Goulart, B. K., de Lima, M. N., de Farias, C. B., Reolon, G. K., Almeida, V. R., Quevedo, J., Kapczinski, F., Schröder, N., & Roesler, R. (2010). Ketamine impairs recognition memory consolidation and prevents learning-induced increase in hippocampal brain-derived neurotrophic factor levels. *Neuroscience*, 167(4), 969–973. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.03.032>
- Guzmán, M., & Blázquez, C. (2001). Is there an astrocyte-neuron ketone body shuttle?. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 12(4), 169–173. [https://doi.org/10.1016/s1043-2760\(00\)00370-2](https://doi.org/10.1016/s1043-2760(00)00370-2)
- Hashimoto, Y., Campbell, M., Tachibana, K., Okada, Y., & Kondoh, M. (2021). Claudin-5: A Pharmacological Target to Modify the Permeability of the Blood-Brain

Barrier. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 44(10), 1380–1390.
<https://doi.org/10.1248/bpb.b21-00408>

- Hamilton, N. B., Attwell, D., & Hall, C. N. (2010). Pericyte-mediated regulation of capillary diameter: a component of neurovascular coupling in health and disease. *Frontiers in neuroenergetics*, 2, 5. <https://doi.org/10.3389/fnene.2010.00005>
- Hammond, R. S., Tull, L. E., & Stackman, R. W. (2004). On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. *Neurobiology of learning and memory*, 82(1), 26–34. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2004.03.005>
- Hawkins, B. T., Ocheltree, S. M., Norwood, K. M., & Egleton, R. D. (2007). Decreased blood-brain barrier permeability to fluorescein in streptozotocin-treated rats. *Neuroscience letters*, 411(1), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.09.010>
- He, J., Hsueh, H., He, Y., Kastin, A. J., Wang, Y., & Pan, W. (2014). Sleep restriction impairs blood-brain barrier function. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 34(44), 14697–14706. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2111-14.2014>
- Hernandez-Segura, A., Nehme, J., & Demaria, M. (2018). Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends in cell biology*, 28(6), 436–453. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.001>
- Herranz, N., & Gil, J. (2018). Mechanisms and functions of cellular senescence. *The Journal of clinical investigation*, 128(4), 1238–1246. <https://doi.org/10.1172/JCI95148>
- Hill, J., Rom, S., Ramirez, S. H., & Persidsky, Y. (2014). Emerging roles of pericytes in the regulation of the neurovascular unit in health and disease. *Journal of neuroimmune*

pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology, 9(5), 591–605. <https://doi.org/10.1007/s11481-014-9557-x>

- Hou, Y., Dan, X., Babbar, M., Wei, Y., Hasselbalch, S. G., Croteau, D. L., & Bohr, V. A. (2019). Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nature reviews. Neurology*, 15(10), 565–581. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0244-7>
- Hurtado-Alvarado, G., Becerril-Villanueva, E., Contis-Montes de Oca, A., Domínguez-Salazar, E., Salinas-Jazmín, N., Pérez-Tapia, S. M., Pavon, L., Velázquez-Moctezuma, J., & Gómez-González, B. (2018). The yin/yang of inflammatory status: Blood- brain barrier regulation during sleep. *Brain, behavior, and immunity*, 69, 154–166. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.11.009>
- Hurtado-Alvarado, G., Domínguez-Salazar, E., Pavon, L., Velázquez-Moctezuma, J., & Gómez-González, B. (2016a). Blood-Brain Barrier Disruption Induced by Chronic Sleep Loss: Low-Grade Inflammation May Be the Link. *Journal of immunology research*, 2016, 4576012. <https://doi.org/10.1155/2016/4576012>
- Hurtado-Alvarado, G., Domínguez-Salazar, E., Velázquez-Moctezuma, J., & Gómez-González, B. (2016b). A2A Adenosine Receptor Antagonism Reverts the Blood-Brain Barrier Dysfunction Induced by Sleep Restriction. *PloS one*, 11(11), e0167236. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167236>
- Hurtado-Alvarado, G., Velázquez-Moctezuma, J., & Gómez-González, B. (2017). Chronic sleep restriction disrupts interendothelial junctions in the hippocampus and increases blood-brain barrier permeability. *Journal of microscopy*, 268(1), 28–38. <https://doi.org/10.1111/jmi.12583>

- Ivanov, A., Pawlikowski, J., Manoharan, I., van Tuyn, J., Nelson, D. M., Rai, T. S., Shah, P. P., Hewitt, G., Korolchuk, V. I., Passos, J. F., Wu, H., Berger, S. L., & Adams, P. D. (2013). Lysosome-mediated processing of chromatin in senescence. *The Journal of cell biology*, 202(1), 129–143. <https://doi.org/10.1083/jcb.201212110>
- Jenkins, J.G., & Dallenbach, K.M. (1924) Obliviscence during Sleep and Waking. *Am J Psychol* 35: 605–612.
- Kaya, M., & Ahishali, B. (2011). Assessment of permeability in barrier type of endothelium in brain using tracers: Evans blue, sodium fluorescein, and horseradish peroxidase. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 763, 369–382. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-191-8_25
- Khan, Z. U., Martín-Montañez, E., Navarro-Lobato, I., & Muly, E. C. (2014). Memory deficits in aging and neurological diseases. *Progress in molecular biology and translational science*, 122, 1–29. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420170-5.00001-5>
- Knopp, R. C., Erickson, M. A., Rhea, E. M., Reed, M. J., & Banks, W. A. (2023). Cellular senescence and the blood-brain barrier: Implications for aging and age-related diseases. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, 248(5), 399–411. <https://doi.org/10.1177/15353702231157917>
- Knox, E. G., Aburto, M. R., Clarke, G., Cryan, J. F., & O'Driscoll, C. M. (2022). The blood-brain barrier in aging and neurodegeneration. *Molecular psychiatry*, 27(6), 2659–2673. <https://doi.org/10.1038/s41380-022-01511-z>
- Lu W. (2012). Adsorptive-mediated brain delivery systems. *Current pharmaceutical biotechnology*, 13(12), 2340–2348. <https://doi.org/10.2174/138920112803341851>

- Maciel-Barón, L. Á., Pérez, V. I., Torres, C., González-Puertos, V. Y., Konigsberg, M., & López-Diazguerrero, N. E. (2017). La senescencia celular como denominador común de enfermedades asociadas a la edad. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 55(4), 490–497.
- Magee, C. A., Huang, X. F., Iverson, D. C., & Caputi, P. (2010). Examining the pathways linking chronic sleep restriction to obesity. *Journal of obesity*, 2010, 821710. <https://doi.org/10.1155/2010/821710>
- Maquet P. (2001). The role of sleep in learning and memory. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5544), 1048–1052. <https://doi.org/10.1126/science.1062856>
- Maxwell, K., Berliner, J. A., & Cancilla, P. A. (1989). Stimulation of glucose analogue uptake by cerebral microvessel endothelial cells by a product released by astrocytes. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 48(1), 69–80. <https://doi.org/10.1097/00005072-198901000-00006>
- Medina-Flores, F., Hurtado-Alvarado, G., Deli, M. A., & Gómez-González, B. (2023). The Active Role of Pericytes During Neuroinflammation in the Adult Brain. *Cellular and molecular neurobiology*, 43(2), 525–541. <https://doi.org/10.1007/s10571-022-01208-5>
- Medina-Flores, F., & Gómez-González, B. (2019). La Función del Sueño: Mantener la Integridad de los Sistemas de Protección y Limpieza del Cerebro. *Contactos, Revista De Educación En Ciencias E Ingeniería*, (112), 30 - 39. Recuperado a partir de <https://contactos.izt.uam.mx/index.php/contactos/article/view/29>
- Medina-Flores, F., Hurtado-Alvarado, G., Contis-Montes de Oca, A., López-Cervantes, S. P., Konigsberg, M., Deli, M. A., & Gómez-González, B. (2020). Sleep loss disrupts

pericyte-brain endothelial cell interactions impairing blood-brain barrier function. *Brain, behavior, and immunity*, 89, 118–132. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.05.077>

- Mezick, E. (2013). Sleep Fragmentation. In *Encyclopedia of Behavioral Medicine* (pp. 1810–1811). Springer New York.
- Michinaga, S., & Koyama, Y. (2019). Dual Roles of Astrocyte-Derived Factors in Regulation of Blood-Brain Barrier Function after Brain Damage. *International journal of molecular sciences*, 20(3), 571. <https://doi.org/10.3390/ijms20030571>
- Miwa, S., Kashyap, S., Chini, E., & von Zglinicki, T. (2022). Mitochondrial dysfunction in cell senescence and aging. *The Journal of clinical investigation*, 132(13), e158447. <https://doi.org/10.1172/JCI158447>
- Montagne, A., Barnes, S. R., Sweeney, M. D., Halliday, M. R., Sagare, A. P., Zhao, Z., Toga, A. W., Jacobs, R. E., Liu, C. Y., Amezcua, L., Harrington, M. G., Chui, H. C., Law, M., & Zlokovic, B. V. (2015). Blood-brain barrier breakdown in the aging human hippocampus. *Neuron*, 85(2), 296–302. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.032>
- Montagne, A., Nation, D. A., Sagare, A. P., Barisano, G., Sweeney, M. D., Chakhoyan, A., Pachicano, M., Joe, E., Nelson, A. R., D'Orazio, L. M., Buennagel, D. P., Harrington, M. G., Benzinger, T. L. S., Fagan, A. M., Ringman, J. M., Schneider, L. S., Morris, J. C., Reiman, E. M., Caselli, R. J., Chui, H. C., ... Zlokovic, B. V. (2020). APOE4 leads to blood-brain barrier dysfunction predicting cognitive decline. *Nature*, 581(7806), 71–76. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2247-3>
- Moreno-Blas, D., Gorostieta-Salas, E., Pommer-Alba, A., Muciño-Hernández, G., Gerónimo-Olvera, C., Maciel-Barón, L. A., Konigsberg, M., Massieu, L., & Castro-Obregón, S. (2019). Cortical neurons develop a senescence-like phenotype

promoted by dysfunctional autophagy. *Aging*, 11(16), 6175–6198.
<https://doi.org/10.18632/aging.102181>

- Nag S. (2003). Morphology and molecular properties of cellular components of normal cerebral vessels. *Methods in molecular medicine*, 89, 3–36.
<https://doi.org/10.1385/1-59259-419-0:3>
- Nation, D. A., Sweeney, M. D., Montagne, A., Sagare, A. P., D'Orazio, L. M., Pachicano, M., Sepelband, F., Nelson, A. R., Buennagel, D. P., Harrington, M. G., Benzinger, T. L. S., Fagan, A. M., Ringman, J. M., Schneider, L. S., Morris, J. C., Chui, H. C., Law, M., Toga, A. W., & Zlokovic, B. V. (2019). Blood-brain barrier breakdown is an early biomarker of human cognitive dysfunction. *Nature medicine*, 25(2), 270–276.
<https://doi.org/10.1038/s41591-018-0297-y>
- Ni, P., Dong, H., Zhou, Q., Wang, Y., Sun, M., Qian, Y., & Sun, J. (2019). Preoperative Sleep Disturbance Exaggerates Surgery-Induced Neuroinflammation and Neuronal Damage in Aged Mice. *Mediators of inflammation*, 2019, 8301725.
<https://doi.org/10.1155/2019/8301725>
- Langen, U. H., Ayloo, S., & Gu, C. (2019). Development and Cell Biology of the Blood-Brain Barrier. *Annual review of cell and developmental biology*, 35, 591–613.
<https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100617-062608>
- Lee, B. Y., Han, J. A., Im, J. S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E. C., Kleijer, W. J., DiMaio, D., & Hwang, E. S. (2006). Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging cell*, 5(2), 187–195.
<https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2006.00199.x>

- Lendner, J. D., Niethard, N., Mander, B. A., van Schalkwijk, F. J., Schuh-Hofer, S., Schmidt, H., Knight, R. T., Born, J., Walker, M. P., Lin, J. J., & Helfrich, R. F. (2023). Human REM sleep recalibrates neural activity in support of memory formation. *Science advances*, *9*(34), eadj1895. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adj1895>
- Lim, A. S., Kowgier, M., Yu, L., Buchman, A. S., & Bennett, D. A. (2013). Sleep Fragmentation and the Risk of Incident Alzheimer's Disease and Cognitive Decline in Older Persons. *Sleep*, *36*(7), 1027–1032. <https://doi.org/10.5665/sleep.2802>
- Lochhead, J. J., Yang, J., Ronaldson, P. T., & Davis, T. P. (2020). Structure, Function, and Regulation of the Blood-Brain Barrier Tight Junction in Central Nervous System Disorders. *Frontiers in physiology*, *11*, 914. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00914>
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, *153*(6), 1194–1217. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>
- Lukášová, E., Kovařík, A., & Kozubek, S. (2018). Consequences of Lamin B1 and Lamin B Receptor Downregulation in Senescence. *Cells*, *7*(2), 11. <https://doi.org/10.3390/cells7020011>
- Oztas, B., Akgul, S., & Seker, F. B. (2007). Gender difference in the influence of antioxidants on the blood-brain barrier permeability during pentylentetrazol-induced seizures in hyperthermic rat pups. *Biological trace element research*, *118*(1), 77–83. <https://doi.org/10.1007/s12011-007-0020-1>
- Palchykova, S., Winsky-Sommerer, R., Meerlo, P., Dürr, R., & Tobler, I. (2006). Sleep deprivation impairs object recognition in mice. *Neurobiology of learning and memory*, *85*(3), 263–271. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2005.11.005>

- Patel, A. K., Reddy, V., & Araujo, J. F. (2022). Physiology, Sleep Stages. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.
- Peppiatt, C. M., Howarth, C., Mobbs, P., & Attwell, D. (2006). Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature*, *443*(7112), 700–704. <https://doi.org/10.1038/nature05193>
- Puech, C., Badran, M., Runion, A. R., Barrow, M. B., Cataldo, K., & Gozal, D. (2023). Cognitive Impairments, Neuroinflammation and Blood-Brain Barrier Permeability in Mice Exposed to Chronic Sleep Fragmentation during the Daylight Period. *International journal of molecular sciences*, *24*(12), 9880. <https://doi.org/10.3390/ijms24129880>
- Que, M., Li, Y., Wang, X., Zhan, G., Luo, X., & Zhou, Z. (2023). Role of astrocytes in sleep deprivation: accomplices, resisters, or bystanders?. *Frontiers in cellular neuroscience*, *17*, 1188306. <https://doi.org/10.3389/fncel.2023.1188306>
- Rajagopal, L., Massey, B. W., Huang, M., Oyamada, Y., & Meltzer, H. Y. (2014). The novel object recognition test in rodents in relation to cognitive impairment in schizophrenia. *Current pharmaceutical design*, *20*(31), 5104–5114. <https://doi.org/10.2174/1381612819666131216114240>
- Rasch, B., & Born, J. (2013). About sleep's role in memory. *Physiological reviews*, *93*(2), 681–766. <https://doi.org/10.1152/physrev.00032.2012>
- Rodier, F., & Campisi, J. (2011). Four faces of cellular senescence. *The Journal of cell biology*, *192*(4), 547–556. <https://doi.org/10.1083/jcb.201009094>
- Roger, L., Tomas, F., & Gire, V. (2021). Mechanisms and Regulation of Cellular Senescence. *International journal of molecular sciences*, *22*(23), 13173. <https://doi.org/10.3390/ijms222313173>

- Salas-Venegas, V., Santín-Márquez, R., Ramírez-Carreto, R. J., Rodríguez-Cortés, Y. M., Cano-Martínez, A., Luna-López, A., Chavarría, A., Konigsberg, M., & López-Díazguerrero, N. E. (2023). Chronic consumption of a hypercaloric diet increases neuroinflammation and brain senescence, promoting cognitive decline in middle-aged female Wistar rats. *Frontiers in aging neuroscience*, *15*, 1162747. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2023.1162747>
- Saunders, N. R., Dziegielewska, K. M., Møllgård, K., & Habgood, M. D. (2015). Markers for blood-brain barrier integrity: how appropriate is Evans blue in the twenty-first century and what are the alternatives?. *Frontiers in neuroscience*, *9*, 385. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00385>
- Segretain, D., & Falk, M. M. (2004). Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal. *Biochimica et biophysica acta*, *1662*(1-2), 3–21. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.01.007>
- Sengupta P. (2013). The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *International journal of preventive medicine*, *4*(6), 624–630.
- Shahveisi, K., Farnia, V., Khazaie, H., Ghazvini, H., Nozari, M., & Khodamoradi, M. (2020). Novel object recognition memory in REM sleep-deprived rats: Role of the cannabinoid CB1 receptor. *Behavioural brain research*, *381*, 112311. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112311>
- Sharpless, N. E., & Sherr, C. J. (2015). Forging a signature of in vivo senescence. *Nature reviews. Cancer*, *15*(7), 397–408. <https://doi.org/10.1038/nrc3960>
- Siegel, G. J., Albers, R. W., Price, D., & Brady, S. (Eds.). (2011). *Basic neurochemistry: Principles of molecular, cellular, and medical neurobiology* (8th ed.). Academic Press.

- Sirav, B., & Seyhan, N. (2011). Effects of radiofrequency radiation exposure on blood-brain barrier permeability in male and female rats. *Electromagnetic biology and medicine*, 30(4), 253–260. <https://doi.org/10.3109/15368378.2011.600167>
- Stamatovic, S. M., Johnson, A. M., Keep, R. F., & Andjelkovic, A. V. (2016). Junctional proteins of the blood-brain barrier: New insights into function and dysfunction. *Tissue barriers*, 4(1), e1154641. <https://doi.org/10.1080/21688370.2016.1154641>
- Stickgold, R., & Walker, M. P. (2007). Sleep-dependent memory consolidation and reconsolidation. *Sleep medicine*, 8(4), 331–343. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2007.03.011>
- Sun, J., Wu, J., Hua, F., Chen, Y., Zhan, F., & Xu, G. (2020). Sleep Deprivation Induces Cognitive Impairment by Increasing Blood-Brain Barrier Permeability via CD44. *Frontiers in neurology*, 11, 563916. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.563916>
- Sweeney, M. D., Sagare, A. P., & Zlokovic, B. V. (2018). Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Nature reviews. Neurology*, 14(3), 133–150. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.188>
- Szczepańska, K., Bojarski, A. J., Popik, P., & Malikowska-Racia, N. (2023). Novel object recognition test as an alternative approach to assessing the pharmacological profile of sigma-1 receptor ligands. *Pharmacological reports : PR*, 75(5), 1291–1298. <https://doi.org/10.1007/s43440-023-00516-x>
- Tarun, A., Wainstein-Andriano, D., Sterpenich, V., Bayer, L., Perogamvros, L., Solms, M., Axmacher, N., Schwartz, S., & Van De Ville, D. (2020). NREM sleep stages specifically alter dynamical integration of large-scale brain networks. *iScience*, 24(1), 101923. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101923>

- Tao-Cheng, J. H., Nagy, Z., & Brightman, M. W. (1987). Tight junctions of brain endothelium in vitro are enhanced by astroglia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 7(10), 3293–3299. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.07-10-03293.1987>
- Tietz, S., & Engelhardt, B. (2015). Brain barriers: Crosstalk between complex tight junctions and adherens junctions. *The Journal of cell biology*, 209(4), 493–506. <https://doi.org/10.1083/jcb.201412147>
- Timonina, D., Hormazabal, G. V., Heckenbach, I., Anderton, E., Haky, L., Floro, A., Riley, R., Kwok, R., Breslin, S., Ingle, H., Tiwari, R., Bielska, O., Scheibye-Knudsen, M., Kasler, H., Campisi, J., Walter, M., & Verdin, E. (2023). Chronically disrupted sleep induces senescence in the visceral adipose tissue of C57BL/6 mice. In *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2023.10.17.562803>
- Torres, A., Vargas, V., Múnera, A., & Lamprea, M. (2007). Evaluación de preferencia por la forma o la textura de dos tipos de objetos en ratas Wistar. *Revista Colombiana de Psicología*, (16), 49-56.
- Van Deursen J. M. (2014). The role of senescent cells in ageing. *Nature*, 509(7501), 439–446. <https://doi.org/10.1038/nature13193>
- Venancio, D. P., & Suchecki, D. (2015). Prolonged REM sleep restriction induces metabolic syndrome-related changes: Mediation by pro-inflammatory cytokines. *Brain, behavior, and immunity*, 47, 109–117. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.12.002>
- Verkhratsky, A., & Nedergaard, M. (2018). Physiology of Astroglia. *Physiological reviews*, 98(1), 239–389. <https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2016>

- Villaseñor, R., Kuennecke, B., Ozmen, L., Ammann, M., Kugler, C., Grüninger, F., Loetscher, H., Freskgård, P. O., & Collin, L. (2017). Region-specific permeability of the blood-brain barrier upon pericyte loss. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 37(12), 3683–3694. <https://doi.org/10.1177/0271678X17697340>
- Walker, M. P., Brakefield, T., Morgan, A., Hobson, J. A., & Stickgold, R. (2002). Practice with sleep makes perfect: sleep-dependent motor skill learning. *Neuron*, 35(1), 205–211. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(02\)00746-8](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(02)00746-8)
- Walker, M. P., & Stickgold, R. (2006). Sleep, memory, and plasticity. *Annual review of psychology*, 57, 139–166. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.56.091103.070307>
- Walker M. P. (2008). Cognitive consequences of sleep and sleep loss. *Sleep medicine*, 9 Suppl 1, S29–S34. [https://doi.org/10.1016/S1389-9457\(08\)70014-5](https://doi.org/10.1016/S1389-9457(08)70014-5)
- Wang, X. F., & Cynader, M. S. (2001). Pyruvate released by astrocytes protects neurons from copper-catalyzed cysteine neurotoxicity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(10), 3322–3331. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-10-03322.2001>
- Winkler, E. A., Sagare, A. P., & Zlokovic, B. V. (2014). The pericyte: a forgotten cell type with important implications for Alzheimer's disease?. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 24(4), 371–386. <https://doi.org/10.1111/bpa.12152>
- Wilson, A. C., Clemente, L., Liu, T., Bowen, R. L., Meethal, S. V., & Atwood, C. S. (2008). Reproductive hormones regulate the selective permeability of the blood-brain barrier. *Biochimica et biophysica acta*, 1782(6), 401–407. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2008.02.011>

- Wolburg, H., & Lippoldt, A. (2002). Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vascular pharmacology*, 38(6), 323–337. [https://doi.org/10.1016/s1537-1891\(02\)00200-8](https://doi.org/10.1016/s1537-1891(02)00200-8)
- Wu, Y., Li, P., Bhat, N., Fan, H., & Liu, M. (2023). Effects of repeated sleep deprivation on brain pericytes in mice. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-40138-0>
- Yamazaki, Y., Baker, D. J., Tachibana, M., Liu, C. C., van Deursen, J. M., Brott, T. G., Bu, G., & Kanekiyo, T. (2016). Vascular Cell Senescence Contributes to Blood-Brain Barrier Breakdown. *Stroke*, 47(4), 1068–1077. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.115.010835>
- Yehuda, S., Sredni, B., Carasso, R. L., & Kenigsbuch-Sredni, D. (2009). REM sleep deprivation in rats results in inflammation and interleukin-17 elevation. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 29(7), 393–398. <https://doi.org/10.1089/jir.2008.0080>
- Zhang, L., Pitcher, L. E., Yousefzadeh, M. J., Niedernhofer, L. J., Robbins, P. D., & Zhu, Y. (2022). Cellular senescence: a key therapeutic target in aging and diseases. *The Journal of clinical investigation*, 132(15), e158450. <https://doi.org/10.1172/JCI158450>
- Zhang, X., Wang, Y., Zhao, R., Hu, X., Zhang, B., Lv, X., Guo, Z., Zhang, Z., Yuan, J., Chu, X., Wang, F., Li, G., Geng, X., Liu, Y., Sui, L., & Wang, F. (2019). Folic Acid Supplementation Suppresses Sleep Deprivation-Induced Telomere Dysfunction and Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP). *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019, 4569614. <https://doi.org/10.1155/2019/4569614>

- Zhao, Y., Xin, Y., He, Z., & Hu, W. (2018). Function of Connexins in the Interaction between Glial and Vascular Cells in the Central Nervous System and Related Neurological Diseases. *Neural plasticity*, 2018, 6323901. <https://doi.org/10.1155/2018/6323901>
- Zielinski, M. R., Kim, Y., Karpova, S. A., McCarley, R. W., Strecker, R. E., & Gerashchenko, D. (2014). Chronic sleep restriction elevates brain interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha and attenuates brain-derived neurotrophic factor expression. *Neuroscience letters*, 580, 27–31. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.07.043>
- Zielinski, M. R., McKenna, J. T., & McCarley, R. W. (2016). Functions and Mechanisms of Sleep. *AIMS neuroscience*, 3(1), 67–104. <https://doi.org/10.3934/Neuroscience.2016.1.67>