

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas

Opción Ciencias Fisiológicas

Programa para el Desarrollo de las Ciencias Básicas

(PEDECIBA)

Efectos de la restricción de sueño durante el postparto de la rata

Lic. Florencia N. Peña

Orientadora: Dra. Luciana Benedetto

Co-orientadora: Dra. Ana Hernández

29 de setiembre de 2025

Laboratorio de Neurobiología del Sueño,
Unidad Académica de Fisiología
Facultad de Medicina,
Universidad de la República

Índice

PREFACIO	4
AGRADECIMIENTOS	5
LISTADO DE ABREVIATURAS	7
TABLAS Y FIGURAS	8
RESUMEN	9
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1. CICLO SUEÑO-VIGILIA	11
1.2. FUNCIONES Y MECANISMOS REGULATORIOS DEL SUEÑO	11
1.3. ALTERACIONES DEL SUEÑO Y SUS CONSECUENCIAS FISIOLÓGICAS	12
1.3.1. <i>Efectos comportamentales y cognitivos de la falta de sueño</i>	12
1.3.2. <i>Efectos de la falta de sueño sobre el sistema endócrino</i>	12
1.3.3. <i>Impactos de la falta de sueño sobre el sistema inmunológico</i>	13
1.4. LA MATERNIDAD Y SU RELACIÓN CON EL SUEÑO	13
1.4.1. <i>Postparto y comportamiento maternal</i>	13
1.4.2. <i>El sueño durante el postparto</i>	14
1.4.3. <i>Consecuencias de la falta de sueño durante el postparto</i>	14
1.5. MÉTODOS DE PRIVACIÓN DE SUEÑO EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	16
2. JUSTIFICACIÓN DE TRABAJO	17
3. HIPÓTESIS	17
3.1. HIPÓTESIS GENERAL	17
3.2. HIPÓTESIS DE TRABAJO	18
4. OBJETIVOS	18
4.1. OBJETIVO GENERAL	18
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
5. MATERIALES Y MÉTODOS	18
5.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	19
5.2. IMPLANTE DE ELECTRODOS Y ADQUISICIÓN DE SEÑALES BIOELÉCTRICAS	19
5.3. DISEÑO Y SESIONES EXPERIMENTALES	20
5.3.1. <i>Experimento 1: Relación entre sueño, amamantamiento y leche eyectada</i>	20
5.3.2. <i>Experimento 2: Privación de sueño con GH y DBES</i>	20
5.3.3. <i>Experimento 3: Efectos de la restricción de sueño aguda y crónica durante el postparto</i>	21
5.4. ANÁLISIS ELECTROFISIOLÓGICOS Y COMPORTAMENTALES	23
5.4.1. <i>Parámetros de sueño y vigilia</i>	23
5.4.2. <i>Comportamiento maternal</i>	23
5.4.3. <i>Evaluación de la eyección de leche</i>	24
5.5. ENSAYOS BIOQUÍMICOS	24
5.5.1. <i>Cantidad y composición de la leche</i>	24
5.5.2. <i>Cuantificación hormonal</i>	25
5.5.3. <i>Cuantificación de citoquinas</i>	25
5.5.4. <i>Cuantificación de inmunoglobulinas</i>	26
5.5.5. <i>Parámetros hematológicos y recuento diferencial leucocitario</i>	26
5.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	27

6.	RESULTADOS	28
6.1.	EXPERIMENTO 1: RELACIÓN ENTRE SUEÑO, AMAMANTAMIENTO Y LECHE EYECTADA.....	28
6.2.	EXPERIMENTO 2: PRIVACIÓN DE SUEÑO CON GH Y DBES	29
6.2.1.	<i>Parámetros de sueño y vigilia</i>	29
6.2.2.	<i>Eyecciones de leche</i>	31
6.2.3.	<i>Cantidad de leche eyectada</i>	32
6.2.4.	<i>Comportamiento maternal</i>	33
6.3.	EXPERIMENTO 3: EFECTOS DE LA RESTRICCIÓN DE SUEÑO AGUDA Y CRÓNICA DURANTE EL POSTPARTO	35
6.3.1.	<i>Restricción de sueño</i>	35
6.3.2.	<i>Comportamiento maternal</i>	36
6.3.3.	<i>Cantidad de leche eyectada y su contenido de macronutrientes</i>	39
6.3.4.	<i>Niveles de hormonas en suero materno</i>	40
6.3.5.	<i>Parámetros inmunológicos humorales de ratas madre y crías</i>	41
6.3.6.	<i>Parámetros hematológicos de ratas madre y crías</i>	42
6.3.7.	<i>Correlaciones de variables</i>	47
6.4.	RESUMEN DE RESULTADOS	47
6.4.1.	<i>Experimento 1: Relación entre sueño, amamantamiento y leche eyectada</i>	47
6.4.2.	<i>Experimento 2: Privación de sueño con GH y DBES</i>	47
6.4.3.	<i>Experimento 3: Efectos de la restricción de sueño aguda y crónica durante el postparto</i>	48
7.	DISCUSIÓN	49
7.1.	EL SUEÑO Y EL AMAMANTAMIENTO CORRELACIONARON A NIVEL COMPORTAMENTAL	50
7.2.	AMBAS INTERVENCIONES, <i>GENTLE HANDLING</i> Y <i>DEEP BRAIN ELECTRICAL STIMULATION</i> , FUERON EFECTIVAS PARA PRIVAR DE SUEÑO 50	
7.3.	LA PRIVACIÓN DE SUEÑO GENERÓ DÉFICITS EN LOS COMPORTAMIENTOS MATERNALES	51
7.4.	LA CANTIDAD DE LECHE SE VIO AFECTADA POR LA RESTRICCIÓN DE SUEÑO, DEPENDIENDO DE LA METODOLOGÍA EMPLEADA Y DE LOS DÍAS DE RESTRICCIÓN	52
7.5.	LA RESTRICCIÓN DE SUEÑO AGUDA DISMINUYÓ EL APORTE PROTEICO DE LA LECHE	54
7.6.	LA RESTRICCIÓN DE SUEÑO AGUDA O CRÓNICA NO SE ASOCIÓ A CAMBIOS SIGNIFICATIVOS EN LOS NIVELES MATERNO DE OXITOCINA Y CORTICOSTERONA	55
7.7.	LA RESTRICCIÓN DE SUEÑO MATERNO ALTERÓ LOS NIVELES DE ANTICUERPOS SÉRICOS EN LAS CRÍAS, SIN MODIFICAR LOS PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS MATERNO EN SANGRE	56
7.8.	EL RECuento DE LEUCOCITOS TOTALES Y LINFOCITOS FUE AFECTADO EN LAS CRÍAS DE MADRES SOMETIDAS A RESTRICCIÓN CRÓNICA DE SUEÑO, EN AUSENCIA DE ALTERACIONES MATERNAS	58
7.9.	SE NECESITAN MÁS ESTUDIOS PARA EVALUAR EL EFECTO ESTRESANTE DE LA RESTRICCIÓN DE SUEÑO	59
7.10.	CONSIDERACIONES TÉCNICAS	60
8.	OBSERVACIONES FINALES	61
8.1.	CONCLUSIONES	61
8.2.	LAS MADRES, ¿GUERRERAS CONTRA LA FALTA DE SUEÑO?.....	61
9.	PERSPECTIVAS	62
10.	MENCIONES ESPECIALES	62
11.	BIBLIOGRAFÍA	63

Prefacio

Para mi felicidad y desgracia en iguales proporciones, a mí se me olvidan la mayoría de las cosas. Por lo que, mi mayor objetivo de esta tesis, es exponer mis conocimientos reclutados hasta el momento sobre el tema que me ha apasionado lo suficiente como para mantenerme entretenida estos últimos diez años. Este objetivo no es con el fin de cautivar a nadie más que a mí misma, para que mañana no se me olvide por qué hoy decidí estar acá.

Agradecimientos

Quisiera agradecer a todas las personas que de alguna forma u otra formaron parte de la realización de este trabajo:

Unidad Académica de Fisiología. Todos los integrantes de Fisiología de alguna manera me ayudaron a llegar hasta acá, ya sea en la preparación de los concursos o discutiendo conceptos. De corazón considero que la formación que he recibido de parte del departamento ha sido sumamente valiosa. En particular quisiera agradecer a Patricia Lagos, por estar siempre a disposición para dar una mano en lo que pueda. Siempre consideraré esa forma de trabajo un modelo a seguir.

Laboratorio de Inmunología. Si bien mi estadía por el Instituto de Higiene fue breve, siempre se prestaron a ayudarme y a colaborar con lo que necesitara. En especial quisiera agradecer a Ana Hernández, mi cotutora, por todas las enseñanzas y por haber sido motivación para seguirme formando en técnicas nuevas, a aprender de ELISAS, de medición de nutrientes, de leche, de inmunoglobulinas. También quisiera agradecer a Claudio Rodríguez-Camejo, quien me enseñó y asistió mientras estuve por Higiene.

Laboratorio de Neurobiología del Sueño. Siempre dispuestos a ayudar, a sacar las crías, a pesarlas, a limpiar cajas, a hacer alguna disección, a discutir conceptos, a lo que sea. Gracias por ayudarme, por estar, por permitirme pertenecer, por darme un entorno donde poder desarrollarme. En particular, quisiera agradecer a Pablo Torterolo, por ser un referente como jefe, académico y docente. También quisiera agradecer a Diego Serantes, por haber sido parte de todos estos experimentos y siempre haberme ayudado en lo que precisé.

Línea de Maternal y Sueño. Este es un agradecimiento especial, porque son las personas con las que comparto mi día a día, porque muchas veces las veo más a ellas que a Martín, porque me han visto reír, llorar, triunfar y fracasar y, en todos los casos, siempre estuvieron ahí para mí. A las chicas de sueño, a las todo terreno, que te hacen una cirugía de EEG, te arreglan el desagüe de una pileta, te sueldan un setup, te limpian cajas, aprenden de genética, de hormonas, de sueño, de maternal, de cardio, de neuro, de renal, de lo que sea. A Lu, May, Clari y Nati, gracias por todo.

En especial quisiera agradecer a mi tutora, Luciana Benedetto, con quien hace 10 años compartimos la ciencia. Entré al laboratorio en el 2015, no entendiendo nada no sólo de ciencia, sino de la vida, y Lu me apoyó, enseñó y cuidó durante todos estos años. Gracias por ayudarme cuando más lo necesite, por siempre ser un lugar donde sentirme segura, por enseñarme de todo, por prenderte a cada idea que se me ocurre y redoblar la apuesta.

A mi familia. Es muy difícil explicar qué es lo que hacemos a personas por fuera del ámbito académico. Aun así, de alguna forma u otra ellos se las arreglan para apoyarme y darme para adelante. Gracias a Mamá, Papá, Nata y Facu por ser un pilar fundamental en mi vida, por darme cariño y apoyo cuando lo necesito, y a las tías Noemí y Nancy y al tío Eduardo por siempre creer en mí y festejar mis logros.

A mis amigos. En especial a Sofi y Andy, por compartir las buenas y las malas, por siempre estar para mí, por ser un apoyo emocional fundamental, siempre darme para adelante y confiar en mí. Otro gracias especial a Ro Lozano, mi hermana de la vida, porque pese a no entender nada de lo que yo hago, igual siempre me ha apoyado y confiado en mí. Por último, un especial gracias a JP y Mateo, por bancarme cuando la ciencia (y la vida) no son tan felices, por siempre tener un chiste para todo, por estar para discutir de ciencia, de matemática, de estadística, de fisiología, de política, de religión, de la vida y de todos sus misterios. A todos ellos gracias por ayudarme a ver lo bueno de mí.

A Martín Figares. Mi dos de la vida, mi compañero de aventuras. Gracias por todo, por apoyarme, acompañarme, cuidarme y estar ahí para mí si necesito algo. Gracias por pasarme a buscar cuando salgo de dar clases de noche, por

hacerme arroz con leche cuando la ciencia me tira el cora contra el piso, por ser el mejor del mundo, por siempre creer en mí y por darme más amor del que jamás pude imaginar. Sin vos, nada de esto hubiera sido posible.

A Appa. Mi bebé, quién con su amor perruno hizo que todo esto fuera más feliz.

Listado de abreviaturas

EEG	Electroencefalograma
EMG	Electromiograma
REM	Sueño de movimientos oculares rápidos
NREM	Sueño no REM
LS	<i>Light sleep</i> , sueño ligero
SWS	<i>Slow wave sleep</i> , sueño de ondas lentas
IS	<i>Intermediate stage</i> , estado intermedio
ASR	<i>Acute sleep restriction</i> , restricción de sueño aguda
CSR	<i>Chronic sleep restriction</i> , restricción de sueño crónica
IL	Interleuquina
TNF	Tumor necrosis factor, factor de necrosis tumoral
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
GH	<i>Gentle handling</i> , manipulación suave
DBES	<i>Deep brain electrical stimulation</i> , estimulación eléctrica profunda del cerebro
ZT	Zeitgeber de tiempo
PPT	Tegmento pedúnculo pontino
CWP	<i>Control with pups</i> , control con crías
CWOP	<i>Control without pups</i> , control sin crías
W	Vigilia
TST	<i>Total sleep time</i> , tiempo total de sueño
LWG	<i>Litter weight gain</i> , ganancia de peso de las crías
BCA	Ácido bicinconínico
PBS	Buffer fosfato salino
DNS	Ácido 3,5 dinitrosalicílico
NaOH	Hidróxido de sodio
OPD	o-Phenilendiamina dihidrocloruro
HPR	Peroxidasa de rábano
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
SEM	Error estándar
A	Amamantamiento
ACC	Comportamientos activos con las crías
CSC	Comportamientos sin contacto con las crías
FcRn	Receptor neonatal para la región Fc

Tablas y figuras

- Tabla 1.** Resumen de las condiciones generales de cada experimento
- Tabla 2.** Media \pm error estándar de los parámetros de sueño-vigilia y amamantamiento de las 38 ratas utilizadas para los análisis de correlación.
- Tabla 3.** Parámetros de sueño y vigilia durante el periodo de privación de sueño (tres horas), utilizando gentle handling (GH) y deep brain electrical stimulation (DBES).
- Tabla 4.** Parámetros de sueño y vigilia durante el periodo de recuperación de sueño (una hora) después de la privación de sueño utilizando gentle handling (GH) y deep brain electrical stimulation (DBES).
- Tabla 5.** Comportamientos de la madre durante el periodo de privación de sueño usando gentle handling (GH) y deep brain electrical stimulation (DBES).
- Tabla 6.** Comportamientos de la madre durante el periodo de recuperación de sueño.
- Tabla 7.** Efectos de la restricción de sueño en las latencias a los comportamientos maternos durante el periodo de evaluación maternal.
- Tabla 8.** Efectos de la restricción de sueño sobre la duración de los comportamientos maternos durante el periodo de evaluación maternal.
- Tabla 9.** Efectos de la restricción de sueño en los comportamientos de autocuidado de la madre durante el periodo de evaluación maternal.
- Tabla 10.** Efectos de la restricción de sueño sobre los parámetros inmunológicos celulares maternos.
- Tabla 11.** Efectos de la restricción de sueño maternal sobre los parámetros inmunológicos celulares de las crías.
- Tabla 12.** Resumen de resultados obtenidos en el experimento 3.
- Figura 1.** Diseño y sesiones experimentales.
- Figura 2.** Relación entre el ciclo sueño vigilia y el amamantamiento.
- Figura 3.** Efectos de la privación de sueño sobre las eyecciones de leche.
- Figura 4.** Efectos de la privación de sueño sobre la cantidad de leche eyectada.
- Figura 5.** Maternogramas representativos durante la privación de sueño.
- Figura 6.** Restricción de sueño a través de las sesiones experimentales.
- Figura 7.** Comportamientos maternos durante el período de evaluación maternal luego de la restricción aguda y crónica de sueño.
- Figura 8.** Efectos de la restricción de sueño sobre la cantidad y composición de la leche.
- Figura 9.** Concentraciones de hormonas séricas maternas luego de la restricción de sueño.
- Figura 10.** Efectos de la restricción de sueño materno sobre los parámetros inmunológicos en el suero y en la leche de madres y crías (PPD9).
- Figura 11.** Parámetros inmunológicos celulares maternos después de la restricción aguda y crónica de sueño.
- Figura 12.** Parámetros inmunológicos celulares de las crías después de la restricción aguda y crónica de sueño materna.

Resumen

El sueño presenta un rol esencial en muchas funciones fisiológicas. Sin embargo, múltiples factores, desde la presencia de enfermedades, la necesidad de adecuarse a un horario laboral, o incluso cuidar de otros individuos, pueden impedir el correcto descanso. Los efectos de las alteraciones del sueño han sido ampliamente estudiados, reportándose una gran variedad de repercusiones fisiológicas, desde afectándose el rendimiento psicomotor y cognitivo, hasta inducir cambios en los sistemas endocrino e inmunológico. Si bien normalmente en nuestras vidas podemos transitar episodios donde nuestro sueño se ve alterado, existen situaciones fisiológicas particulares que conllevan a la falta de sueño permanente y a un mayor desgaste energético; tal es el caso del periodo postparto. La gran mayoría de los estudios de sueño realizados durante este periodo, independientemente de la especie estudiada, coinciden en que todas las madres presentan algún tipo de alteración del sueño. Teniendo en cuenta los efectos evidenciados frente a las alteraciones de sueño, es esperable observar consecuencias fisiológicas significativas durante la maternidad, sin embargo, pocos estudios se han realizado sobre el tema.

En el presente trabajo se planteó evaluar la relación entre el sueño y el amamantamiento en la rata; estudiar cómo diferentes metodologías de privación de sueño aplicadas a ratas lactantes pueden afectar el comportamiento maternal y la lactancia; y evidenciar si la adición de restricción de sueño aguda (ASR) o crónica (CSR) a las alteraciones del sueño maternales intrínsecas al postparto puede conllevar a cambios comportamentales, nutricionales, hormonales e inmunológicos en ratas madre y sus crías.

Para ello, se realizaron tres series experimentales: I. Se correlacionaron los estados de sueño y vigilia con diferentes parámetros de amamantamiento en ratas lactantes. II. Se privaron de sueño a ratas madre utilizando dos técnicas diferentes: *gentle handling* (GH) y *deep brain electrical stimulation* (DBES). III. Basados en los resultados del segundo objetivo, se privaron de sueño por seis horas a ratas madre durante un día (restricción de sueño aguda, ASR; *acute sleep restriction*) o durante cinco días consecutivos (restricción de sueño crónica, CSR; *chronic sleep restriction*) mediante DBES. Se evaluaron cambios en los comportamientos maternales, la cantidad y composición de la leche eyectada, la concentración de hormonas en suero materno, la concentración de diferentes parámetros inmunológicos en sangre tanto en madres como en crías, así como la concentración de anticuerpos en leche.

En el primer experimento, se evidenció una correlación positiva entre el tiempo transcurrido en la mayoría de las etapas del sueño y el tiempo que la madre invierte amamantando a sus crías, no observándose una correlación con las eyecciones de leche ni con la cantidad de leche eyectada.

En el segundo experimento, se observó que las madres fueron capaces de eyectar leche a pesar de estar privadas de sueño; y que el comportamiento maternal, las eyecciones de leche y la cantidad de leche eyectada fueron más afectadas cuando la privación de sueño se realizó mediante GH que cuando se realizó mediante DBES.

En el tercer experimento, se evidenció que frente a la restricción de sueño crónica existe una disminución de los comportamientos maternales, una reducción en la cantidad de leche eyectada, y un aumento del recuento linfocitario de las crías macho y hembra. Luego de una restricción de sueño aguda, se evidenció una disminución del contenido proteico de la leche y una disminución de la IgG sérica en las crías macho. Asimismo, se observó que la mayoría de los parámetros maternales hormonales e inmunológicos medidos parecen no verse afectados con la restricción de sueño.

Al considerar los resultados obtenidos, se sugiere que el sueño y el amamantamiento podrían compartir ciertas características conductuales, lo que habilitaría a la rata madre a realizarlos de manera simultánea. Se plantea que las ratas madres serían capaces de eyectar leche incluso frente a la falta de sueño, aunque las características de dichas eyecciones dependen del método utilizado para la privación. Se plantea la

hipótesis de que existe una habituación a la falta de sueño que permite mantener la nutrición de las crías, dado que el deterioro en la lactancia parece recuperarse a lo largo de los días de restricción de sueño. Los resultados también sugieren que, aunque los efectos de la restricción de sueño en las madres parecen ser más sutiles, algunas de sus consecuencias se manifiestan de manera más pronunciada en las crías. Por último, se plantea que las madres lactantes serían capaces de compatibilizar sus propias necesidades de descanso al cuidado constante de sus crías, aunque esta capacidad se ve comprometida cuando enfrentan una restricción de sueño adicional. Dado que es muy limitada la literatura sobre los efectos de la falta de sueño sobre el sistema inmune, el endócrino y la lactancia durante el postparto, consideramos sumamente valioso el aporte de este trabajo.

1. Introducción

1.1. Ciclo sueño-vigilia

¿Qué es el sueño? Parece algo tan sencillo como contestar “es aquello que hacemos cuando estamos muy cansados” y, sin embargo, aún no es posible contestar a nivel molecular siquiera qué es el cansancio ¹. Se puede definir al sueño a nivel comportamental como un estado de inmovilidad rápidamente reversible, de quiescencia, en el cual se presenta una reducción significativa en la respuesta sensorial y una postura corporal adecuada para el descanso ²⁻⁴. En contraposición, es posible definir a la vigilia como un espectro de estados comportamentales en los que un organismo puede presentar actividad motora y/o cognitiva voluntaria en respuesta a estímulos internos o externos ^{3,5}. Este tipo de comportamientos de actividad y reposo se encuentran en diversos taxones, desde cnidarios hasta aves y mamíferos ⁶.

También es posible definir el sueño mediante el uso de la polisomnografía, técnica que mide simultáneamente la actividad eléctrica encefálica (electroencefalograma; EEG), la actividad eléctrica muscular (electromiograma; EMG), y otras variables como pueden ser los movimientos oculares, la frecuencia respiratoria, los ronquidos, entre otras ^{3,7,8}. Mediante esta técnica es posible categorizar el sueño en sus dos grandes estados: el sueño de movimientos oculares rápidos (REM; por sus siglas en inglés correspondientes a *rapid eye movement*) y el sueño no-REM (NREM) ^{2,9,10}.

A nivel polisomnográfico, la vigilia se caracteriza por presentar un EEG con ondas de alta frecuencia y baja amplitud, y un EMG que evidencia un alto tono muscular. El sueño NREM se caracteriza por presentar un EEG de alta amplitud y baja frecuencia, con una predominancia de ondas del rango de frecuencia delta (0.5 – 4 Hz) y la presencia de husos de sueño (9 – 12 Hz), conjuntamente con un EMG de reducida actividad. Por último, el sueño REM presenta un EEG de baja amplitud y alta frecuencia, similar a lo observado en la vigilia, pero presenta atonía en la mayoría de los músculos esqueléticos, junto con los movimientos oculares rápidos que lo caracterizan ^{3,11}. Importante para este trabajo, en el caso de las ratas, al utilizar la polisomnografía es posible subclasificar el sueño NREM en sueño ligero (LS; por sus siglas en inglés correspondientes a *light sleep*), y sueño de ondas lentas (SWS; *slow wave sleep*). Asimismo, se pueden identificar otros estadios particulares, como las transiciones del sueño NREM a REM (IS, *intermediate stage*).

1.2. Funciones y mecanismos regulatorios del sueño

El sueño presenta un rol esencial en muchas funciones fisiológicas, como ser su participación en el desarrollo, conservación energética, depuración cerebral de residuos, regulación metabólica, modulación de la respuesta inmune, consolidación de memorias, performance y cognición, entre otras ¹²⁻¹⁴.

El tiempo de sueño y su intensidad (amplitud de la frecuencia delta del NREM ¹⁵) están regulados por dos procesos fundamentales que interactúan entre sí, el proceso circadiano (o proceso C) y el proceso homeostático (o proceso S). El proceso C sugiere un reloj biológico endógeno que permite a los animales presentar un ciclo circadiano de actividad y reposo ajustado a las condiciones ambientales, en donde se favorece el sueño en el momento del día más propicio para cada especie, afectando el umbral de inicio y finalización de los episodios de sueño ^{2,16,17}. Por otra parte, el proceso S involucra fenómenos activos característicos de la vigilia que se acumulan a lo largo del día e incrementan la presión al sueño, lo que permite el tránsito progresivo hacia un periodo de reposo. Una vez logrado el sueño, se atraviesa un periodo de descanso hasta que se alcanza un umbral que permite la transición hacia la vigilia, formando así un proceso homeostático autorregulado que permite mantener al sueño dentro de los límites fisiológicos ^{16,18}.

1.3. Alteraciones del sueño y sus consecuencias fisiológicas

Múltiples factores, desde la presencia de enfermedades, el realizar comportamientos motivados, o incluso cuidar de otros individuos, pueden impedir que se elimine correctamente la presión al sueño o que se pierda la sincronía entre los procesos S y C, dando lugar a alteraciones en el sueño ¹⁹⁻²².

Si bien a algunas de las alteraciones se las suele agrupar de forma generalizada bajo el concepto de privación de sueño, estas pueden ser subcategorizadas como privación, restricción o fragmentación de sueño ²³. La privación *per se*, es la ausencia total de sueño durante las 24 horas del día o más (por ejemplo, permanecer todo un día despierto). La restricción, también conocida como privación parcial, implica la reducción del periodo de sueño por debajo de lo requerido por el organismo (por ejemplo, dormir únicamente cinco horas en vez de ocho). Por último, la fragmentación de sueño, que como su nombre lo indica, es la disrupción del sueño debido a despertares continuos a lo largo del periodo de descanso (por ejemplo, levantarse varias veces durante la noche) ²³. Asimismo, estas alteraciones pueden presentarse como un evento puntual (por ejemplo, restricción de sueño aguda; ASR, por sus siglas en inglés correspondientes a *acute sleep restriction*), o perpetuarse a lo largo del tiempo, consolidándose en la vida diaria (restricción de sueño crónica; CSR, por *chronic sleep restriction*) ^{24,25}.

Ahora bien, ¿qué sucede cuando no es posible dormir correctamente? Los efectos de las alteraciones del sueño han sido ampliamente estudiados, en donde se ha reportado una gran variedad de repercusiones fisiológicas, que van desde el rendimiento psicomotor y cognitivo, hasta los niveles plasmáticos de diversas hormonas y factores inmunológicos ²⁶⁻²⁸.

1.3.1. Efectos comportamentales y cognitivos de la falta de sueño

La falta de sueño aumenta la propensión al mismo, es decir, aumenta la probabilidad de que se produzca el sueño ^{25,29,30}. También genera un incremento en la somnolencia, fatiga y confusión cognitiva ^{17,29,31}, y produce disminución de la atención, de la memoria de trabajo y de la memoria a largo plazo ³², así como una disrupción de las funciones verbales ^{33,34} y de la toma de decisiones ^{17,35}. En particular, la restricción de sueño afecta diferentes aspectos de la performance cognitiva durante la vigilia, pero principalmente disminuye el estado de alerta y atención ^{25,36}. En este sentido, Belenky y colaboradores ²⁶ evidenciaron en humanos de entre 24 y 62 años de edad, que dormir solamente siete horas por día alcanzan para observar dichos efectos. Cabe mencionar que los procesos de recuperación cognitiva posteriores a una alteración del sueño parecerían requerir más tiempo luego de una restricción crónica de sueño que luego de una privación total aguda de sueño, lo que sugiere una mayor demanda cognitiva ¹⁷.

1.3.2. Efectos de la falta de sueño sobre el sistema endócrino

La calidad y la duración del sueño afectan significativamente la función hormonal ³⁷⁻⁴⁰. Frente a restricciones de sueño de cuatro horas nocturnas ya se observan cambios hormonales ^{37,39,40}. La privación de sueño es intrínsecamente estresante ⁴¹, por lo que eleva los niveles glucocorticoides sanguíneos tanto en humanos ⁴² como en ratas ^{43,44}, y altera la respuesta adrenocortical a otros factores estresantes ⁴⁵. Otras hormonas también se ven afectadas por el mal descanso ³⁷⁻⁴⁰. Por ejemplo, se evidenció que los niveles plasmáticos de prolactina se encuentran fuertemente vinculados al sueño ^{46,47}, ya que presentan un ritmo sincrónico con el sueño NREM ⁴⁸, mientras que los despertares nocturnos inhiben su liberación ^{40,49}. También se reportó un posible vínculo entre la falta de sueño y otras hormonas, como es el caso de la oxitocina, donde se evidenció un aumento en la concentración plasmática de esta hormona después de una noche de privación total de sueño en mujeres ⁵⁰. Sin embargo, aún quedan estudios por realizar en el área. Cabe mencionar que la mayoría de los trabajos publicados relacionados al estudio de los efectos endocrinos de la falta de sueño fueron realizados en hombres, así como en ratas y ratones macho.

1.3.3. Impactos de la falta de sueño sobre el sistema inmunológico

El sistema inmunológico y el sueño están estrechamente relacionados en sentido bidireccional⁵¹⁻⁵⁴. Algunas citoquinas proinflamatorias, como la interleuquina 1 beta (IL-1 β), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y el interferón alfa (IFN- α), presentan actividad somnógena, lo que incrementa el sueño NREM y la amplitud de las ondas lentas observadas en el EEG durante esta etapa, y sugiere su participación en la regulación normal del sueño⁵⁵⁻⁶⁰. Incluso se ha propuesto a la IL-1 y al TNF- α como mediadores del proceso S, que actúan como promotores de sueño al igual que la adenosina, y participan en la homeostasis del sueño^{59,61}. Los niveles de estas citoquinas también cambian frente a las alteraciones del sueño. Particularmente, la restricción de sueño promueve la secreción de citoquinas proinflamatorias, como IL-1 β , IL-6, IL-17A y TNF- α ⁶²⁻⁶⁵, y reduce la producción de otras citoquinas antiinflamatorias, como la IL-10^{59,66}.

Otros mediadores humorales que también se ven afectados por la privación de sueño son los anticuerpos de la respuesta inmune adaptativa. En particular, la privación de sueño total en ratas produce un aumento de la concentración sérica de inmunoglobulina G (IgG), IgM e IgA⁶⁷, mientras que la privación de REM disminuye los niveles de IgG1 e IgG2a⁶⁸.

Por otra parte, si bien se ha evidenciado que el sistema inmunológico se encuentra bajo regulación circadiana al igual que el sueño^{60,69,70}, es decir que presenta oscilaciones en el número de leucocitos sanguíneos a lo largo del día con un aumento durante el periodo de reposo, el sueño también presenta un rol activo en la regulación de la función inmunitaria celular^{59,60,71}. Particularmente, promueve la recirculación de células inmunes entre órganos linfoides y potencia su actividad^{59,60,71,72}. Por lo tanto, la privación de sueño también se asocia con cambios en la inmunidad celular⁷²⁻⁷⁴. Específicamente, se ha evidenciado que la restricción de sueño tanto en ratones, ratas como en humanos disminuye el recuento de leucocitos en sangre y su migración a los tejidos⁷⁴⁻⁷⁹, y altera la actividad celular y la capacidad fagocítica^{73-75,77,80,81}.

Al igual que la información disponible sobre los efectos de las alteraciones de sueño en el sistema endócrino, la mayoría de la bibliografía disponible sobre los efectos de la falta de sueño sobre la función inmunológica se basan en estudios con hombres o roedores macho, o bien con mujeres o roedores hembra fuera del periodo reproductivo.

1.4. La maternidad y su relación con el sueño

1.4.1. Postparto y comportamiento maternal

Si bien normalmente en durante el transcurso de la vida es posible transitar episodios donde el sueño se ve alterado, existen situaciones fisiológicas particulares que habitualmente conllevan a la falta de sueño permanente y a un mayor desgaste energético, como es el caso del periodo postparto. Dicho periodo se inicia inmediatamente después del parto y se extiende hasta que la madre retorna a un estado fisiológico similar al pregestacional^{82,83}, presentando una duración variable dependiendo de cada especie e individuo. De particular interés para este trabajo, cabe mencionar que el postparto de la rata dura tres semanas, abarcando desde el día del nacimiento hasta el destete, y se lo suele categorizar como postparto temprano (primera semana), medio (segunda semana) y tardío (tercera semana)⁸⁴⁻⁸⁶.

Una de las principales características del periodo postparto es el desarrollo del comportamiento maternal, el cual conforma un conjunto de complejas conductas realizadas por la madre que aumentan la probabilidad de supervivencia de la cría, prestando cuidado a las necesidades de la progenie entre las que se incluyen el proveer de calor, higiene y nutrición, así como protección de depredadores y del ambiente⁸⁷.

En este trabajo en particular, se describirá el comportamiento maternal en la rata, el cual puede dividirse en comportamientos activos (o fase apetitiva) y comportamientos pasivos (o fase consumatoria). Los

comportamientos activos comprenden la construcción del nido, acarreo y agrupamiento de las crías y el lamido de las mismas, mientras que los comportamientos pasivos incluyen principalmente el amamantamiento^{87,88}. La construcción del nido es la formación de un sitio que aporte refugio, calor y contención a la camada. El acarreo y agrupamiento de las crías comprende el acto de sujetar gentilmente a las crías y llevarlas hacia el nido. El lamido incluye el lamido anogenital y el corporal, permitiendo no solo la higiene de las crías, sino también la estimulación de la micción y defecación. Por último, el amamantamiento es el comportamiento que define a los mamíferos como tales y que permite la nutrición temprana de la progenie. Esta conducta comprende la postura de *crouching* o *kyphosis*, en la que la madre se encuentra inmóvil sobre las crías, arqueando su columna y extendiendo sus patas para permitir acomodar a la mayoría de las crías debajo de ella, y la posición supina, en donde la madre se acuesta de lado mientras las crías succionan^{87,89}.

1.4.2. El sueño durante el postparto

Dado que el sueño constituye un periodo de gran fragilidad y vulnerabilidad para los individuos, en el caso de una madre puede significar el riesgo también para su camada⁸⁸. Entonces, ¿qué ocurre con el sueño de las madres durante el postparto?

En humanos, pese a la variedad de metodologías utilizadas para medir la cantidad y calidad del sueño, y a las diferencias culturales intrínsecas de las diferentes poblaciones estudiadas, igualmente se evidencia que las madres presentan el sueño fragmentado⁹⁰⁻⁹⁸. En ratas, diversos trabajos evidencian una disminución del tiempo total de sueño, conjuntamente con una fragmentación del mismo⁹⁹⁻¹⁰². Es sorprendente que efectos similares a los observados en humanos y ratas también se han evidenciados en ratones¹⁰³ e incluso delfines¹⁰⁴, por lo que los reportes de evaluación de sueño durante la maternidad coinciden en que las madres presentan algún tipo de alteración del sueño durante el postparto^{88,90,92,94,95,99,100,103,104}, lo que sugiere que estas alteraciones forman parte natural de la maternidad.

1.4.3. Consecuencias de la falta de sueño durante el postparto

Teniendo en cuenta todos los efectos mencionados previamente frente a la falta de sueño, es esperable observar consecuencias fisiológicas significativas durante el postparto, sin embargo, se han realizado pocos estudios sobre el tema.

Respecto a los efectos comportamentales y cognitivos, se ha evidenciado que una peor calidad de sueño durante el postparto conlleva a una mayor incidencia de trastornos psiquiátricos¹⁰⁵, reportándose una relación entre la falta de sueño y la depresión postparto^{21,106-108}. Asimismo, madres humanas que experimentan mayores perturbaciones de sueño presentan una menor capacidad de comprender las señales emitidas por su bebé¹⁰⁹, mayor ansiedad e irritabilidad^{110,111} y menor paciencia con sus hijos, alterando los sentimientos maternos hacia el niño¹¹², lo que genera consecuencias en el cuidado del mismo. Esto nos lleva a cuestionarnos si la cronicidad de las alteraciones de sueño puede conllevar a un inadecuado comportamiento maternal.

Respecto a los cambios endocrinos frente a la falta de sueño, es importante mencionar los efectos sobre dos de las hormonas fundamentales para el comportamiento maternal y la lactancia, es decir la prolactina y la oxitocina. En este sentido, Okun y colaboradores¹¹³ han evidenciado en madres humanas que cambios en la calidad de sueño no estarían asociados con variaciones en la concentración de prolactina en plasma, y tampoco con las concentraciones de estradiol y cortisol. Estos resultados son coherentes con los de Ruan y colaboradores¹¹⁴, donde no observaron una correlación entre la duración del sueño maternal y los valores de prolactina en sangre. Sin embargo, Gröer y colaboradores¹¹⁵ evidenciaron que mayores niveles de fatiga se correlacionan inversamente con los niveles de prolactina durante el postparto. En el mismo sentido, se

ha evidenciado en ratas que la fatiga durante el postparto genera una disminución de la lactancia por regulación a la baja de la expresión de prolactina y de las vías de señalización dependientes de esta hormona ¹¹⁶. Por lo que los efectos de la falta de sueño sobre la secreción de esta hormona durante el postparto aún son controversiales. Respecto a la oxitocina, pese al rol fundamental de esta hormona durante la lactancia, no es de nuestro conocimiento que existan reportes sobre cambios en su secreción frente a la falta de sueño durante esta etapa, tanto en humanos como en animales no humanos. Existe evidencia sobre la relación entre dicha hormona y el estrés postparto, el cual podría estar asociado a la falta de sueño, en donde se evidencia menores concentraciones de oxitocina en mujeres con síntomas de estrés ¹¹⁷. En este sentido, cabe mencionar la relación entre la falta de sueño y el estrés durante el postparto, en donde se ha evidenciado en humanos una correlación positiva entre el cortisol en suero y la somnolencia ¹¹⁵, y donde una menor calidad de sueño se correlaciona con mayor estrés percibido durante el primer mes postparto ¹¹¹. Esto conlleva a plantear la hipótesis de que el efecto estresante de la falta de sueño durante el postparto pueda generar un incremento sérico de corticosterona y una disminución de oxitocina en la rata.

En relación a la privación de sueño y la lactancia, en madres humanas, una menor calidad de sueño se correlaciona con menor volumen de leche eyectado durante el primer mes del postparto ¹¹¹. Sin embargo, poco se sabe de la relación entre la duración del sueño y la concentración de macronutrientes de la leche ^{114,118}. En particular en la rata, se ha descrito que las eyecciones lácteas ocurrirían únicamente luego de un sueño NREM ¹¹⁹⁻¹²¹. Trabajos como el de Sutherland y colaboradores ¹²⁰ muestran que las eyecciones de leche en ratas lactantes anestesiadas ocurren principalmente frente a un EEG sincronizado previo (característica del sueño NREM). Por su parte, Lincoln y colaboradores ¹¹⁹ observaron que 10 segundos antes de la eyección de leche la hembra lactante presenta un EEG sincronizado o en transición hacia estar sincronizado, tanto en ratas anestesiadas como no anestesiadas. También muestran que un periodo prolongado de actividad del EEG de forma desincronizada se correspondía con un retraso en las eyecciones de leche, concluyendo que existiría una “compuerta neural” que permitiría las eyecciones de leche y la cual estaría inhabilitada durante la vigilia ¹¹⁹. Sin embargo, dado que las ratas precisan un período de quietud para iniciar tanto las posturas de amamantamiento como también el sueño, y que las ratas principalmente duermen mientras amamantan ¹⁰¹, es de esperar que las eyecciones ocurran asociadas al sueño. En este sentido, Lincoln y colaboradores discuten que igualmente habría que tener cierta precaución al momento de asociar las eyecciones al sueño, ya que una rata durante el periodo de amamantamiento también puede presentar un EEG desincronizado ¹¹⁹, junto con que las eyecciones de leche son inhibidas por activación simpática, por lo que no se podría descartar que los estímulos que generan vigilia en los experimentos mencionados pudieran ser considerados como estresantes ^{119,122}. Voloschin y Tramezzani ¹²¹ observaron que, si se priva a la madre de sueño mediante manipulación manual leve (GH, por sus siglas del inglés *gentle handling*) durante 30 minutos, la hembra lactante es incapaz de eyectar leche, concluyendo que es necesario el sueño de ondas lentas previo a las eyecciones lácteas. Sin embargo, como se mencionará más adelante, este método de privación es considerado sumamente estresante, lo que lleva al cuestionamiento de que si utilizando otros métodos de privación de sueño menos aversivos podrían evidenciarse otros efectos.

Por último, en relación con los efectos inmunológicos de la falta de sueño durante el postparto, cabe mencionar que existe muy poca bibliografía al respecto. Se ha reportado que madres humanas con mayores niveles de somnolencia y fatiga presentan más síntomas de infección, los cuales también se presentan en sus bebés ¹¹⁵. Asimismo, la concentración de IgA de la leche materna se correlaciona con la concentración de prolactina en leche, mientras que el estrés, la fatiga y estados de ánimo negativos se asocian con menores concentraciones de prolactina en muestras de leche ¹¹⁵. Por lo que se podría esperar que, frente a la falta de sueño, cambie la concentración de prolactina y con ello se vea afectada la concentración de anticuerpos en leche. En humanos, la IgA es el principal isotipo de anticuerpo transferido a través de la leche, mientras que la IgG ocupa cerca del 2%. Sin embargo, en ratas, la IgG representa cerca del 70% del contenido

de anticuerpos totales de la leche ^{123,124}. Estos anticuerpos son transferidos desde la sangre materna a la leche durante la lactancia temprana, y son transportados desde el intestino de la cría hacia la sangre, contribuyendo al reservorio sérico temprano de IgG ¹²⁵⁻¹²⁸. Por lo que, surge el cuestionamiento de que si frente a cambios en el sueño existirán alteraciones en la concentración sérica de anticuerpos maternos, que a su vez condicionen la transferencia de estos a las crías a través de la leche e impacten finalmente en sus niveles en sangre.

Por otra parte, se ha reportado que madres humanas que presentan mayores niveles de somnolencia diurna y fatiga también presentan mayores síntomas de infección y niveles más alto de IL-1 β ^{115,129}. También se ha observado que no habría diferencias significativas en las concentraciones de IL-6 e IL-10 entre mujeres con o sin insomnio durante el postparto ¹³⁰, pero que cinco o menos horas de sueño por día durante el primer año del postparto se asocia a niveles elevados de IL-6 ¹³¹. Asimismo, se ha evidenciado en vacas lactantes que, si no se les permite adoptar la postura de descanso necesaria para el sueño, se promueve la expresión de citoquinas inflamatorias, como la IL-6 y TNF- α ¹³². Por lo que parecería que las alteraciones de sueño podrían estar promoviendo un estado proinflamatorio también durante el postparto.

1.5. Métodos de privación de sueño en animales de experimentación

Se han desarrollado diversos modelos en ratas para privar el sueño, como el GH, un método clásico sumamente utilizado que involucra la estimulación táctil de las vibrisas o leves toques en el cuerpo con un pincel ¹²¹. Otras metodologías colocan a los animales en pequeñas plataformas rodeadas de agua (*flower pot*) ^{133,134}, giratorias o en continuo movimiento ¹³⁴. En particular, el GH es considerado una metodología estresante, aumentando los niveles plasmáticos de corticosterona ¹³⁴. En este sentido, a diferencia de la privación de sueño en humanos, la privación de sueño en animales de laboratorio es involuntaria y generalmente involucra la exposición repetida a estímulos o entornos aversivos y estresantes ^{133,134}, generando que la interpretación de los resultados sea difícil de adjudicar sólo a la falta de sueño ¹³⁵. Asimismo, la metodología utilizada para evitar el sueño también afecta cómo éste es recuperado posteriormente, por lo que los efectos de la deuda de sueño no dependerían únicamente de la duración de la vigilia previa, sino también de la calidad de la misma ^{133,136,137}. Por otra parte, en la literatura disponible, tanto de humanos como de animales no humanos, predominan los estudios de privación aguda de sueño de 72 y hasta 96 horas, o restricciones crónicas de sueño de 20 horas diarias, generando resultados sumamente extremos para la fisiología y que tal vez no se condicen con las restricciones de sueño evidenciadas en la sociedad actual ^{24,25,135}.

Por último, a pesar de que la fisiología del sueño difiere entre machos y hembras, la mayoría de la literatura disponible sobre los efectos de la privación de sueño toma en cuenta únicamente la fisiología del macho, siendo escasa la bibliografía sobre sus efectos en las hembras ¹³⁸. Además, si bien existen trabajos durante la preñez ¹³⁹⁻¹⁴³, como se mencionó previamente, la bibliografía es sumamente escasa durante el postparto ¹⁰⁰. Posiblemente, esto se deba a que las metodologías disponibles para privar de sueño son demasiado aversivas para ser aplicadas durante este periodo. Por ejemplo, sería imposible utilizar las plataformas rodeadas de agua para privar a una madre de sueño mientras se encuentra cuidando a sus crías. En este sentido, parece imperioso buscar nuevas técnicas que permitan tener una mejor aproximación a los efectos de la falta de sueño, como por ejemplo la activación de circuitos promotores de vigilia mediante quimiogenética ¹⁴⁴ o mediante estimulación eléctrica profunda (DBES, por *Deep Brain Electrical Stimulation*), lo cual no requiere la manipulación aversiva del animal constantemente ^{135,145,146}. Pese a ser poco utilizada, la estimulación eléctrica del sistema reticular activador ascendente o de otras áreas también promotoras de vigilia, parecería ser una buena alternativa ^{135,147}, debido a su accesibilidad y a que parecería representar un modelo menos invasivo para el normal desarrollo del comportamiento maternal, lo que

podría conducir a una mejor aproximación a las consecuencias de la restricción de sueño durante el postparto.

2. Justificación de trabajo

Dado que la rata es capaz de amamantar y dormir al mismo tiempo, encontrándose en sueño NREM la mayor parte del tiempo que amamanta¹⁰¹, surge la interrogante de si existirá una correlación entre el tiempo que invierte la hembra amamantando y el tiempo que duerme, y si dicha correlación influye en la cantidad de leche eyectada.

Por otra parte, la rata es en el único animal en el que se ha reportado que, para producir una eyección de leche, la succión por parte de las crías debe ser precedida por un episodio de SWS en la madre; la eyección no ocurre si las crías succionan durante la vigilia, el REM, o incluso si se priva de sueño utilizando GH¹¹⁹⁻¹²¹. Estas características no se observan en otras especies, como el conejo¹⁴⁸, el cerdo¹⁴⁹, y el humano^{150,151}. Se plantea el cuestionamiento de que si el sueño NREM es imprescindible para la eyección láctea, o si utilizando otro tipo de métodos diferentes al GH para restringir el sueño, como la DBES, se podrían evidenciar eyecciones de leche en ratas privadas de sueño.

Asimismo, dada la importancia vital que presenta tanto la lactancia como el correcto descanso para los mamíferos, sumado a las alteraciones del sueño evidenciadas durante el postparto^{90-101,104} y la poca información disponible sobre sus efectos, cabe preguntarse qué sucederá si se adicionan otras alteraciones de sueño no relacionadas con el cuidado materno a las alteraciones intrínsecas de la maternidad. Sumado a ello, dado que las perturbaciones de sueño parecerían no ser un evento puntual, sino que se mantienen durante todo el postparto^{92-95,97,99-101,152}, cabe preguntarse si los efectos de la falta de sueño puedan verse incrementados si las alteraciones de sueño se perpetúan en el tiempo. Específicamente, se plantea el cuestionamiento sobre qué consecuencias tendrá sobre los comportamientos maternos, la cantidad y características de la leche eyectada, las hormonas fundamentales para el normal amamantamiento y comportamiento materno, como la oxitocina y prolactina, así como hormonas participantes en la respuesta de estrés, como la corticosterona. También resulta pertinente cuestionar cómo se afectarán distintos parámetros de la función inmunológica materna, tanto humoral (anticuerpos y citoquinas), como celular (recuento leucocitario en sangre de células del sistema inmune innato y adaptativo). Por último, dado que incluso pequeños cambios en el entorno o en el comportamiento materno pueden alterar el desarrollo de la descendencia¹⁵³⁻¹⁵⁷, surge la interrogante de si la restricción de sueño materno puede afectar el vínculo inmunológico entre la madre y la cría, variando los anticuerpos en leche y/o los parámetros inmunológicos de la cría a nivel de las poblaciones leucocitarias.

3. Hipótesis

3.1. Hipótesis general

La restricción de sueño materno durante el postparto presenta un impacto en distintos parámetros fisiológicos en la madre y las crías, y dichos efectos dependen de la metodología y del tiempo de restricción aplicado.

3.2. Hipótesis de trabajo

Se hipotetiza que:

Existe una relación entre el sueño y la lactancia, en el sentido que las ratas que duermen más tiempo eyectan más leche, esperando una correlación positiva entre la cantidad de sueño NREM y los diferentes parámetros del amamantamiento.

La falta de sueño no es un impedimento para las eyecciones de leche.

Los efectos observados por la falta de sueño son dependientes de la metodología empleada. Específicamente, se hipotetiza que la restricción de sueño con GH genera alteraciones en el comportamiento materno que no son evidenciadas con DBES.

La restricción de sueño de la madre durante el postparto impacta sobre el cuidado de las crías, y los efectos dependen del tiempo de la intervención (restricción crónica o aguda).

Las propiedades nutricionales de la leche se ven afectadas por la restricción del sueño, y por las características de la intervención (restricción crónica o aguda de sueño).

Los niveles de prolactina, corticosterona y oxitocina maternos varían según la duración de la restricción de sueño.

Los parámetros inmunológicos maternos en sangre y leche se ven afectados por la cantidad de días de restricción.

La restricción del sueño materno puede impactar en parámetros inmunológicos de las crías.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Estudiar la relación entre el sueño materno y el amamantamiento en condiciones basales, y con la adición de restricción de sueño durante el postparto, abarcando aspectos comportamentales, hormonales e inmunológicos y nutricionales.

4.2. Objetivos específicos

Analizar si existe alguna correlación entre el tiempo que la rata permanece en cada etapa del ciclo sueño-vigilia con el tiempo que invierte amamantando, el número de eyecciones de leche y la cantidad de leche eyectada.

Comparar los efectos de la privación de sueño a ratas madre mediante DBES y GH sobre diferentes parámetros del amamantamiento.

Determinar los efectos de la restricción de sueño aguda y crónica durante el postparto temprano en ratas sobre: el comportamiento maternal; la eyección de leche, su composición nutricional y de anticuerpos; hormonas (prolactina, oxitocina y corticosterona) y parámetros inmunológicos (recuentos celulares, anticuerpos y citoquinas) en sangre materna, y en sangre de las crías (recuentos celulares e IgG).

5. Materiales y métodos

Para el desarrollo de los objetivos se realizaron tres series experimentales independientes:

1. Relación entre sueño, amamantamiento y leche eyectada
2. Privación de sueño con GH y DBES
3. Efectos de la restricción de sueño aguda y crónica durante el postparto

La Tabla 1 resume las condiciones generales de cada experimento.

5.1. Animales de experimentación

Se utilizaron un total de 72 ratas hembra Wistar (260-310 g) primíparas y sus crías, con la siguiente distribución según cada experimento:

- 38 entre los días 4-7 posparto (PPD4-7, nacimiento = día 0) para el experimento 1;
- 8 entre los días PPD12-15 para el experimento 2;
- 26 entre los días PPD5-9 para el experimento 3.

Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (protocolo número 070151-000008). Se tomaron las medidas adecuadas para minimizar el dolor, la incomodidad o el estrés de los animales. Todas las actividades se llevaron a cabo en conformidad con la "Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio" (8ª edición, National Academy Press, Washington D. C., 2011) ¹⁵⁸.

Dos días previos al parto, las hembras preñadas fueron alojadas individualmente en cajas de registro transparentes (40×30×20 cm) que contenían viruta como material para construir el nido. Los animales fueron colocados a temperatura controlada (22 ± 1 °C) en una caja de Faraday a prueba de sonido y electromagnéticamente aislada con cables conectores para los registros bioeléctricos. Tenían libre acceso a comida y agua, y se encontraban bajo un ciclo luz/oscuridad donde el zeitgeber de tiempo (ZT) 0–12 marcaba la fase de luz del día. En el día PPD1, las camadas se igualaron a ocho crías, cuatro hembras y cuatro machos por madre.

5.2. Implante de electrodos y adquisición de señales bioeléctricas

Los procedimientos quirúrgicos fueron similares a los descritos en estudios previos de nuestro grupo ^{159,160}. En el día PPD1 (para el experimento 1 y 3) o PPD9 (para el experimento 2), las ratas madre fueron anestesiadas con una mezcla de ketamina/xilacina/maleato de acepromazina (80/2.8/2.0 mg/kg, i.p. para el experimento 1 y 2; 90/2.8/2.0 mg/kg, i.p. para el experimento 3). La dosis de anestesia fue ajustada para el experimento 3, ya que las ratas provenían de una camada exógena al bioterio de Facultad de Medicina que respondían ligeramente diferente a la anestesia. Luego de anestesiadas, fueron posicionadas en el aparato estereotáxico e implantadas para el registro polisomnográfico. Se colocaron pequeños tornillos como electrodos para registro de EEG cortical de forma unilateral en las siguientes áreas: corteza frontal (AP = +3.0, ML = 2.0; desde Bregma), corteza parietal (AP = -4.0, ML = 3.0), corteza occipital (AP = -7.0, ML = 3.0) y cerebelo (AP = -11.0, ML = 0.0; como electrodo de referencia) ¹⁶¹. Además, se implantaron dos electrodos en los músculos del cuello para registrar el EMG, y dos tornillos de acero inoxidable se fijaron al cráneo como anclajes. Conjuntamente, para el experimento 2 y 3, se colocó un electrodo bipolar de nicrome trenzado (550 μ m) en el tegmento pedúnculo pontino (PPT; AP = -7.5, ML = 2.0 y H = 8.0 mm [desde la superficie del cráneo] ¹⁶¹) como electrodo de estimulación, presentando una separación entre ambos extremos de 0.5 mm. Todos los electrodos se soldaron a un conector y se fijaron al cráneo utilizando acrílico dental.

Se administró una dosis única de ketoprofeno (5 mg/kg, s.c.) antes de la cirugía. Al finalizar la misma, la herida quirúrgica fue limpiada con solución salina estéril al 0.9% y se aplicó un antibiótico tópico (Crema 6A, Labyes). Finalmente, se administró una única dosis de antibiótico (ceftriaxona 60 mg/kg; i.p.) y solución salina estéril al 0.9% (10 ml/kg, s.c.) una única vez para prevenir la deshidratación durante la recuperación.

Durante la cirugía, se mantuvieron las crías en la caja materna bajo una lámpara de calor. Inmediatamente finalizada la misma, cada madre fue reunida con sus crías en dicha caja ^{162,163}.

Para los registros polisomnográficos, las señales bioeléctricas se amplificaron ($\times 1000$), filtraron (0.1–500 Hz), muestrearon (1024 Hz, 16 bits) y almacenaron para su análisis posterior utilizando el software Spike 2 (Cambridge Electronic Design).

5.3. Diseño y sesiones experimentales

5.3.1. Experimento 1: Relación entre sueño, amamantamiento y leche eyectada

Se utilizaron registros basales de experimentos previos de nuestro grupo, publicados y sin publicar ^{159,160,162,163}. Dichos registros presentaban el mismo protocolo experimental para cada sesión, variando únicamente algunos parámetros del tipo de cirugía realizada: del total de registros basales (38), 21 ratas se encontraban implantadas con cánulas bilaterales para inyección intracerebral ($n=14$ en el área preóptica media, $n=7$ en el área preóptica ventrolateral) al mismo tiempo del implante para registro de EEG; las 17 ratas restantes solo se encontraban implantadas para EEG. Solo los registros que presentaron parámetros habituales de sueño y comportamiento maternal fueron incluidos en el presente trabajo.

Todos los registros fueron hechos durante la fase de luz del ciclo entre PPD4-7, sin perturbar a los animales. Antes de cada sesión experimental (ZT 3), las crías eran removidas de la caja materna y colocadas bajo una lámpara de calor por tres horas. Una vez completado el periodo de separación maternal, las crías eran pesadas y devueltas a la caja materna. Inmediatamente después, realizamos un registro de cuatro horas de comportamiento maternal y polisomnografía (ZT 6-10). Al final del registro, pesamos toda la camada nuevamente (Figura 1A).

5.3.2. Experimento 2: Privación de sueño con GH y DBES

Todos los experimentos se realizaron durante la fase de luz del ciclo, entre PPD12-15. Se realizó un registro basal el día anterior al inicio de las sesiones experimentales para corroborar que todos los parámetros de sueño y los comportamientos maternos fueran adecuados. Las ratas fueron sometidas al siguiente protocolo de cuatro días de forma contrabalanceda: sesión control con crías (*control with pups*, CWP), sesión control sin crías (*control without pups*, CWOP), privación de sueño con *gentle handling* (GH) y privación de sueño con *deep brain electrical stimulation* (DBES).

La Figura 1B ilustra las sesiones experimentales, las cuales consistieron en tres horas de privación de sueño (o periodo control; ZT 6 - 9) seguido de una hora de recuperación del sueño (o periodo de recuperación control; ZT 9 - 10). Se registró la polisomnografía y el comportamiento maternal durante las cuatro horas y se pesó la camada tres veces durante cada sesión: inmediatamente antes del inicio de la sesión experimental, al finalizar el periodo de privación de sueño, y al final del periodo de recuperación de sueño.

Específicamente, cada protocolo consistió en lo siguiente:

1) CWP: Las madres podían dormir libremente durante toda la sesión con libre interacción entre madre y crías.

2) CWOP: Las madres podían dormir libremente durante toda la sesión, pero no podían interactuar con las crías durante las tres horas del periodo control de privación de sueño (las crías eran colocadas bajo una

lámpara de calor y luego se devolvían a la caja materna para el periodo de recuperación de sueño). Este grupo se implementó para determinar el porcentaje de cambio de peso de la camada sin ingesta de leche (más detalles sobre este parámetro serán descritos más adelante).

3) GH: Las madres fueron privadas de sueño durante tres horas, con libre interacción entre madre y crías. Una vez completadas las tres horas de privación, no se perturbaba a la madre y su camada durante la hora restante. El GH consistió en estímulos táctiles suaves utilizando un pincel, aplicados únicamente para revertir cualquier signo de sueño observado en el EEG ¹²¹. Cuando el EEG superaba y el EMG se encontraba por debajo de un umbral establecido por el investigador para cada rata, se interpretaba que la rata se encontraba en sueño NREM. Al ocurrir esto, se aplicaba de forma manual los estímulos con el pincel hasta que el EEG permanecía desincronizado por al menos 10 segundos ^{121,134}.

4) DBES: Las madres fueron privadas de sueño durante tres horas, presentando libre interacción entre madre y crías, y completadas las tres horas de privación, no se perturbaba a la madre y su camada durante la hora de recuperación de sueño. La privación de sueño se basó en estímulos eléctricos aplicados a través de los electrodos en el PPT conectados a un estimulador de voltaje (Grass S88 Stimulator). Los estímulos eléctricos consistieron en trenes de 10 pulsos cuadrados de voltaje de 1 ms de duración de entre 5-10 V con una duración del tren de 100 ms. Para determinar el inicio del sueño en cada rata, se analizaba el EEG en la corteza occipital (mayor cantidad de ondas lentas y con amplitudes más altas en comparación con la vigilia) y el EMG (amplitud reducida en comparación con la vigilia). Cuando el EEG superaba y el EMG se encontraba por debajo de un umbral establecido por el investigador para cada rata, se interpretaba que la rata se encontraba en sueño NREM. Al ocurrir esto, se enviaban los pulsos eléctricos mediante el software Spike 2 (Cambridge Electronic Design) de forma manual. Cuando los signos de sueño persistían, se invertía la polaridad de los electrodos, y eventualmente se ajustaba el voltaje durante la sesión experimental hasta que el EEG permanecía desincronizado por al menos 10 segundos ¹⁴⁶. Durante cada pulso aplicado, se evidenciaron cambios sutiles en el comportamiento, principalmente un despertar conductual, como la apertura de ojos y un aumento en el tono muscular observado en el EMG.

5.3.3. Experimento 3: Efectos de la restricción de sueño aguda y crónica durante el postparto

Todos los registros se realizaron durante la fase de luz del ciclo (de ZT 3 a ZT 9.5) durante cinco días, entre PPD5-9. Antes del inicio de las sesiones experimentales, se llevó a cabo un registro basal para corroborar que todos los parámetros de sueño y comportamiento materno fueran adecuados.

Las ratas madre fueron asignadas aleatoriamente a uno de los tres grupos independientes: grupo CSR (privación de sueño todos los días, n = 8), grupo ASR (privación de sueño solo en el PPD9, n = 8) o grupo control (C; libre ciclo sueño-vigilia durante todas las sesiones, n = 10). Una visión general del diseño experimental se ilustra en la Figura 1C. Todas las madres de los tres grupos experimentales fueron registradas diariamente. Específicamente, cada sesión consistió en un período experimental de seis horas y media de registro polisomnográfico, durante el cual la rata fue restringida de sueño durante seis horas o se le permitió dormir libremente, según el grupo asignado (Figura 1C); inmediatamente después se evaluó el comportamiento materno durante 30 minutos (período de evaluación materno), mientras se continuaba registrando el ciclo sueño-vigilia, pero sin restricción de sueño en ningún grupo experimental.

Los procedimientos de restricción del sueño mediante DBES se llevaron a cabo de forma similar a lo descrito para el experimento 2, la diferencia radica en que los pulsos eléctricos se enviaron de forma automática. Previo al inicio de las sesiones experimentales se evaluaron los parámetros de estimulación para cada animal. El investigador establecía en el software Spike 2 (Cambridge Electronic Design) el umbral para el EEG y el EMG, de forma tal que, si el EEG superaba y el EMG se encontraba por debajo de dicho

umbral, el software podría posteriormente interpretar que la rata se encontraba en sueño NREM. De esta forma, durante las sesiones experimentales, los pulsos eléctricos se enviaban automáticamente mediante el script OSD4 de dicho software cada vez que el animal entraba en NREM.

Quince minutos antes de finalizar el período de restricción de sueño, la camada fue retirada, pesada y mantenida bajo una lámpara de calor hasta ser devuelta a la caja materna al inicio del período de evaluación maternal. La camada fue pesada tres veces en cada sesión: inmediatamente antes del inicio de la sesión experimental, al finalizar el período de restricción de sueño y al término período de evaluación maternal. El esquema de las sesiones experimentales se muestra en la Figura 1D.

Al final de todas las sesiones experimentales (PPD9), las madres fueron anestesiadas con una mezcla de ketamina/xilacina/acepromazina maleato (90/2.8/2.0 mg/kg, i.p.) para la toma de muestras de leche y sangre. Posteriormente, se realizó la eutanasia de las crías mediante decapitación y de las madres mediante exanguinación cardíaca.

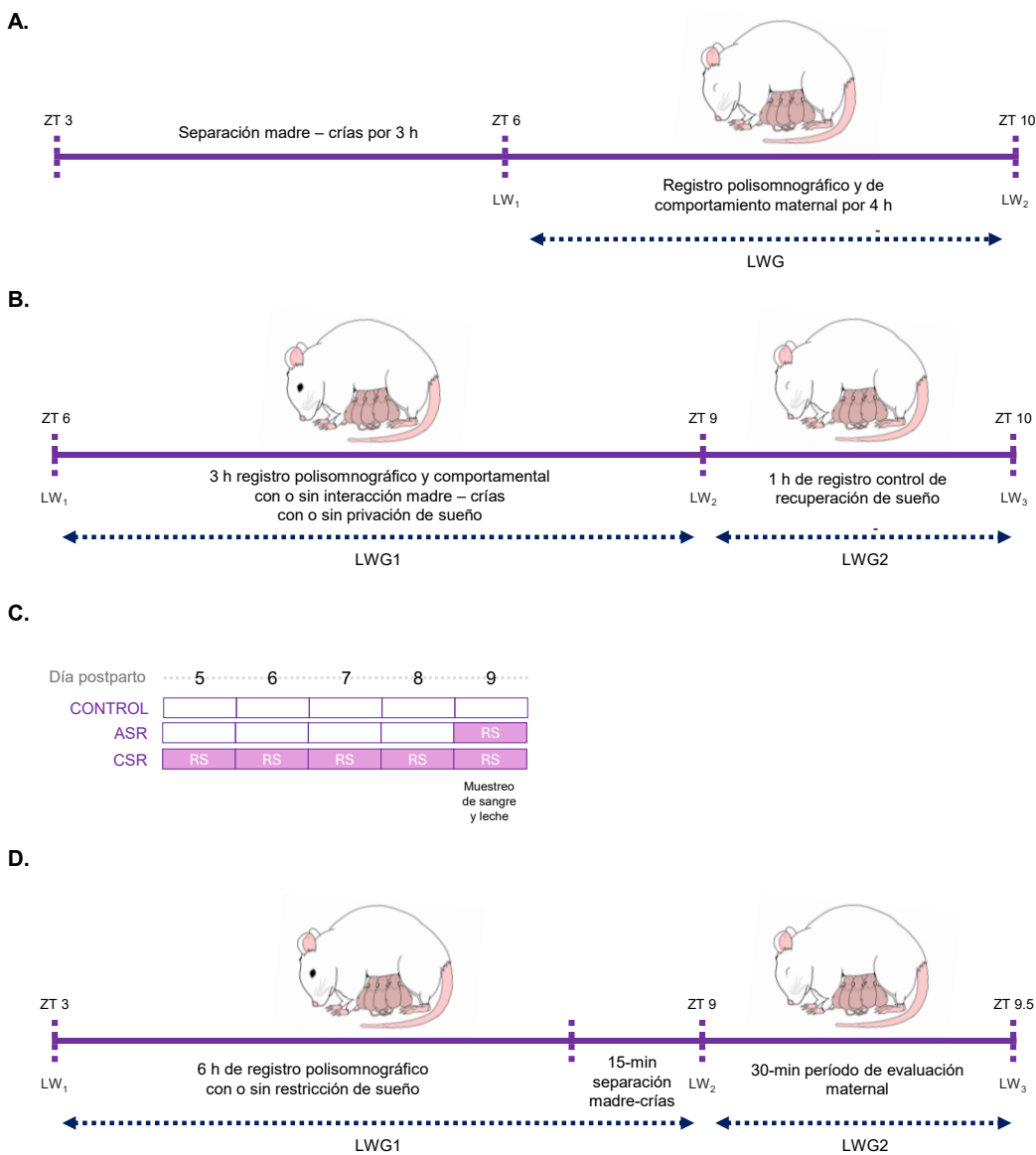


Figura 1. Diseño y sesiones experimentales. Las figuras muestran las sesiones experimentales correspondientes al experimento 1 (A), al experimento 2 (B) y al experimento 3 (C-D). ZT, zeitgeber time; LW, pesado de crías; LWG, ganancia de peso de las crías; CWP, control con crías; CWOP, control sin crías; GH, *gentle handling*; DBES, *deep brain electrical stimulation*; RS, restricción de sueño; ASR, restricción de sueño aguda; CSR, restricción de sueño crónica.

5.3.3.1. Muestreo de leche materna

El proceso de ordeño de las ratas madre se realizó únicamente el último día experimental (PPD9), después de las sesiones experimentales, en las que las madres fueron anestesiadas y ordeñadas. Para ello, localizamos las glándulas mamarias de la región abdominal¹⁶⁴ y masajeamos suavemente cada glándula para estimular la eyección de leche. La leche se recolectó en un tubo utilizando una micropipeta y se mantuvo fría hasta el final de la extracción. La cantidad de leche obtenida por madre varió entre 250 μL y 900 μL en un período máximo de ordeño de 40 minutos.

Para recolectar las muestras de leche y permitir simultáneamente la alimentación de las crías, se cubrieron cuatro pezones de la madre con cinta leuco, evitando así tanto la utilización de oxitocina^{165,166}, como la separación entre la madre y las crías durante las sesiones¹⁶⁴. Las madres fueron previamente adaptadas al leuco colocándolo en cada sesión experimental.

5.3.3.2. Muestreo de sangre

Se recolectó la sangre de las madres inmediatamente después del procedimiento de ordeño, aún bajo anestesia, mediante exanguinación a través de una punción intracardiaca (2 ± 0.5 mL por rata)¹⁶⁷. Las muestras de sangre de las crías se obtuvieron mediante decapitación (0.5 ± 0.1 mL por cría).

Se colocó parte de la sangre de las madres y crías en tubos que contenían citrato de sodio al 4% manteniendo una relación 1:10. El resto de la sangre se mantuvo fría (4°C) en tubo seco durante toda la noche hasta la centrifugación al siguiente día. Las muestras se centrifugaron a 2500 g durante 15 minutos a 4°C y el suero se alicuotó y almacenó a -80°C hasta su análisis.

5.4. Análisis electrofisiológicos y comportamentales

5.4.1. Parámetros de sueño y vigilia

Los estados de vigilia (W), LS, SWS, IS y sueño REM se determinaron en intervalos de 5 segundos con criterios estándar^{159,160,168}. Se analizó el tiempo invertido en W, LS, SWS, IS, NREM (LS + SWS), REM y el tiempo total de sueño (*total sleep time*, TST) durante el tiempo total del registro. Además, para el experimento 2, se determinaron el número y la duración de los episodios de cada estado y las latencias de NREM y REM durante el periodo de recuperación de sueño (inicio de NREM o REM: primer episodio ≥ 20 s). En el caso del experimento 3, se analizó el tiempo total de cada estado para las últimas sesiones experimentales (PPD9) durante el tiempo total de registro y para cada hora por separado.

5.4.2. Comportamiento maternal

El comportamiento de las madres fue registrado utilizando una cámara digital conectada al software Spike 2 (CED, Cambridge, UK) y posteriormente analizado de manera similar a estudios previos de nuestro grupo^{159,160,163}.

Para el experimento 1 solamente se analizó el tiempo de amamantamiento.

Para el experimento 2, los comportamientos maternos de las 4 horas de registro fueron clasificados en intervalos de 5 segundos según las siguientes categorías: 1) activos en contacto con las crías (la madre realiza comportamientos maternos activos [acarrear, lamidos corporales/anogenitales, acomodo de las crías en el nido] u otros comportamientos activos [acicalarse, comer, beber] mientras está en contacto con las crías); 2) amamantamiento (incluye posturas de *crouching* y supina); 3) sin contacto con las crías (todos los comportamientos que realiza mientras está lejos de las crías [por ejemplo, beber, comer o dormir])^{87,160,162,163,169}. Se calculó el tiempo, la frecuencia y la duración de los episodios de las tres categorías anteriormente mencionadas. Además, se determinó la latencia para iniciar el comportamiento de

amamantamiento durante el periodo de recuperación de sueño (inició del amamantamiento: primer episodio ≥ 2 min).

Para el experimento 3, se evaluaron los comportamientos maternos en tiempo real mediante observación directa durante un período de 30 minutos inmediatamente después del período de privación de sueño o control^{159,160,170}. Luego de separar a las crías de la madre durante los últimos 15 minutos del período de restricción de sueño o control, las crías fueron devueltas a la caja materna y dispersadas en el lado opuesto al nido, donde se midió la latencia para reagrupar a toda la camada nuevamente en el nido. Se cuantificaron los eventos de los siguientes comportamientos maternos activos: acarreo de las crías al nido, *mouthing* (reubicación de una cría dentro del nido), lamidos (corporales y anogenitales) y olfateo de las crías. Cada vez que la madre iniciaba un comportamiento diferente del anterior, o cuando mantenía el mismo comportamiento por más de diez segundos, se cuantificaba como un evento nuevo. Además, se calculó el cuidado materno total, definido como la suma de todos los eventos de los diferentes comportamientos maternos activos¹⁷¹.

También se midió la latencia y el tiempo total dedicado a: *hover over* (comportamientos maternos en el nido sin ser amamantamiento), amamantamiento (posturas de *crouching* y supina) y fuera del nido. Basándonos en los resultados preliminares, donde evidenciamos que la privación del sueño fragmenta los comportamientos maternos, consideramos el inicio de cada comportamiento cuando se realizaba por al menos 30 segundos, en lugar de los 2 minutos comúnmente utilizados por otros grupos de investigación^{169,172,173} y en trabajos previos de nuestro grupo^{159,162,163,170}. Además, se registró la cantidad de eventos de ingesta de alimentos y de agua y de acalamiento realizados por la madre. Cualquier comportamiento que no se iniciara o completara dentro de los 30 minutos de prueba recibió una latencia de 30 minutos.

5.4.3. Evaluación de la eyección de leche

Se cuantificó el número de eyecciones de leche en los experimentos 1 y 2. Para evitar métodos invasivos que pudieran generar estrés adicional en la madre y alterar el sueño, el número de eyecciones de leche se cuantificó de manera indirecta mediante el comportamiento de *stretching* de las crías^{174,175}.

5.5. Ensayos bioquímicos

5.5.1. Cantidad y composición de la leche

La cantidad de leche eyectada se cuantificó en los tres experimentos. Dicho parámetro también fue medido indirectamente utilizando el aumento de peso de las crías (*litter weight gain*, LWG; por sus siglas en inglés)^{159,160,176,177}, el cual se calculó y expresó como el porcentaje de incremento de peso para el experimento 1 y 2: $(\text{peso final [g]} - \text{peso inicial [g]}) \times 100 / \text{peso inicial [g]}$; y como incremento en gramos para el experimento 3: $\text{peso final [g]} - \text{peso inicial [g]}$ (Figura 1A-B y D). Para el experimento 1 se calculó un único LWG, entre el inicio y el final de las cuatro horas de registro (Figura 1A). Para el experimento 2 y 3, se calcularon dos LWG: entre el inicio y el final del periodo de privación de sueño (LWG₁), y entre el inicio y el final del periodo de recuperación de sueño o de evaluación maternal (LWG₂; Figura 1B y D).

Para el experimento 3, se analizó el contenido de macronutrientes de la leche materna¹⁷⁸. El contenido de grasa y el aporte energético se analizaron mediante el método de crematocrito¹⁷⁹. Para ello, se llenaron por capilaridad tubos de vidrio (75 × 1.5 mm de diámetro externo) con aproximadamente 70 μL de leche, se obturó un extremo con plasticina y se centrifugaron en una centrífuga de hematocrito durante 15 minutos a 12,000 g. Se midió en cada tubo la longitud total de la columna de leche y la fracción de grasa (mm). El crematocrito se calculó como el porcentaje de la longitud de la fracción de grasa¹⁷⁹. La concentración de grasa se expresó en g/100 ml de leche (%) utilizando la fórmula: $[0.1 \times (\text{crematocrito [\%]} - 0.59) / 0.146]$ ¹⁸⁰.

Los contenidos de proteínas y carbohidratos se analizaron en la fase acuosa de la leche, obtenida mediante la centrifugación de la leche entera durante 30 minutos a 15.000 rpm y 4°C. La concentración de proteínas se determinó mediante el método del ácido bicinconínico (BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific)¹⁸¹ según indicaciones del fabricante. Los resultados se expresaron en base a una curva estándar de seroalbúmina bovina en un rango 1.63 - 100 ug/ml diluida en buffer fosfato salino (PBS). Las muestras a valorar también se diluyeron en PBS según las diluciones 1:2000 y 1:4000.

La concentración de carbohidratos se determinó mediante el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) de la siguiente manera: para 100 ml de reactivo DNS, primero se generó la solución A, disolviendo 1 g de DNS en 20 ml de NaOH 2 N. Luego se generó la solución B, mezclando 30 g de tartrato de sodio y potasio en 50 ml de agua destilada. Posteriormente, se agregó la solución A sobre la solución B, y agua destilada hasta lograr los 100 ml de reactivo, calentando y vortexeando la solución hasta la disolución completa¹⁸². Para realizar el ensayo se mezclaron 200 µL de fase acuosa de cada muestra con 200 µL del reactivo; se calentó en baño a 100°C por 5 minutos y luego se enfrió en hielo. Por último, se transfirieron 100 µL de cada muestra a la microplaca y se midió la absorbancia a 540 nm. Los resultados se expresaron en base a una curva estándar de D-lactosa (Sigma, 61345), en un rango 0.20 - 6.25 mg/ml¹⁸³. Tanto las muestras a valorar (diluidas 1:20) como la curva estándar se diluyeron en agua destilada.

El contenido energético de cada muestra de leche se estimó utilizando factores de conversión para cada macronutriente: 9.0 kcal/g para lípidos, 4.0 kcal/g para carbohidratos y 4.0 kcal/g para proteínas¹⁸⁴.

5.5.2. Cuantificación hormonal

Para el experimento 3, se analizó la concentración de prolactina, oxitocina y corticosterona en suero materno. Las muestras se analizaron por duplicado y triplicado por ensayos de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), utilizando los siguientes kits comerciales de acuerdo con las especificaciones del fabricante: prolactina (ref AB272780; Abcam), oxitocina (ref. LS-F4411; LSBio) y corticosterona (ref. ADI-900-097; Enzo Life Science). Los rangos de concentración de las curvas estándar para cada hormona fueron las siguientes: prolactina 2 - 1000 ng/ml; oxitocina 12.34 - 1000 ng/ml; corticosterona 32 - 20000 pg/ml. Las muestras se analizaron sin diluir para la determinación de prolactina, y se diluyeron para oxitocina (1:4 y 1:8) y corticosterona (1:50, 1:100 y 1:200) en el buffer de dilución suministrado en el kit.

5.5.3. Cuantificación de citoquinas

Para el experimento 3, se analizó la concentración de IL-17A e IL-6 en suero materno mediante kits de ELISA. Las medidas fueron realizadas de acuerdo con las siguientes especificaciones:

La concentración de IL-6 se determinó mediante un ELISA sándwich. Primero, se sensibilizaron placas de 96 pocillos de máxima absorción (Nunc™) con 50 µL por pocillo de un anticuerpo primario específico para IL-6 (BD Biosciences, Cat N° 550644), diluido 1:400 en PBS 100 mM y pH 9, por incubación durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente, se realizaron tres lavados con PBS-Tween 0.1%. A continuación, se bloqueó con 100 µL por pocillo de PBS-Gelatina 1%, incubando por 1 hora a 37 °C. Tras el bloqueo, se efectuaron otros tres lavados con PBS-Tween 0.1%.

Luego, se colocaron las muestras y las soluciones diluidas de IL-6 recombinante (BD Biosciences Cat N° 557008) para la curva de calibración (12.6 - 2000 pg/mL), incubando por 1 hora a 37 °C. Nuevamente, se realizaron tres lavados con PBS-Tween 0.1%. Posteriormente, se añadió el anticuerpo secundario anti-IL-6 conjugado a biotina (BD Cat N° 550642), diluido 1:500 en PBS-Tween 0.1%- Gelatina 1%, y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Luego, se realizaron tres lavados adicionales con PBS-Tween 0.1%.

Finalmente, se incubó con estreptavidina peroxidasa (Biolegend Cat N° 405210) diluida 1:1000 durante 1 hora a 37°C y se realizaron cinco lavados adicionales con PBS-Tween 0.1%. Para revelar, se añadieron 200

μL de una solución de o-Phenilendiamina dihidrocloruro (OPD, 0,5 mg/mL) y H_2O_2 al 0,12% en buffer citrato-fosfato 0,1 M pH 5. La reacción se detuvo con 25 μL de HCl 3 M. Por último, se midió la absorbancia a 492 nm y se calculó la concentración de IL-6 a partir de la curva de calibración.

La concentración de IL-17A se determinó mediante un kit de ELISA comercial (MAX™ Deluxe Set Rat IL-17A de Biolegend, Cat N° 437904) siguiendo las indicaciones del fabricante. Los resultados se expresaron en base a una curva estándar en un rango 15.63 - 2000 pg/mL, preparada en su diluyente correspondiente según instrucciones del kit.

No se realizaron diluciones de las muestras para ningún análisis de citoquinas.

5.5.4. Cuantificación de inmunoglobulinas

Para el experimento 3, se analizó la concentración de IgG e IgG2a en suero y en fase acuosa de la leche materna, y la concentración de IgG en suero de las crías.

En el caso de las crías, la IgG total se midió en suero en un *pool* de muestras separadas por género, de cuatro hembras y cuatro machos por cada madre. Para dichas mediciones se emplearon ELISAs caseros previamente estandarizados en el laboratorio ¹⁸⁵. Las medidas fueron realizadas de acuerdo con las siguientes especificaciones:

Se sensibilizaron placas de unión fuerte de 96 pocillos de alta absorción (Greiner bio-one, Frickenhausen, Alemania) durante toda la noche a 4°C con 100 μL por pocillo del anticuerpo de captura correspondiente: anti-IgG de rata obtenido en cabra (R5130, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) o anti-IgG2a de rata obtenido en ratón (553918, BD Pharmingen, NJ, USA), en las diluciones 1:1000 y 1:200 en PBS respectivamente. Tras descartar el contenido, las placas se lavaron con PBS-Tween20 0,05% y se bloquearon con 200 μL por pocillo de una solución de PBS-Gelatina 1% durante 1 hora a 37°C. Posteriormente, tras nuevos lavados, se incubaron 100 μL por pocillo de las diluciones adecuadas de los estándares y las muestras en PBS-1% Gelatina-0.05% Tween-20 durante dos horas a 37°C. Las diluciones empleadas para la medición de IgG fueron las siguientes: leche [1:25.000 y 1:50.000], suero materno [1:200.000 y 1:400.000] y suero de crías [1:100.000 y 1:200.000]. Para IgG2a, las diluciones fueron: leche [1:1000 y 1:2000] y suero materno [1:12.000]. Se utilizaron IgG purificada de rata e IgG2, 553992 (BD Pharmingen) como curvas estándar, en diluciones seriadas desde 150 ng/ml y 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectivamente.

Para la detección, se incubaron 100 $\mu\text{L}/\text{pocillo}$ del conjugado correspondiente durante 1 hora a 37°C. Para la detección de IgG total, se utilizó anti IgG de rata conjugado a peroxidasa de rábano (HPR), producido en conejo (A5795, Sigma-Aldrich), diluido 1:4000. Para la detección de IgG2a, se utilizó un anticuerpo específico biotilnado producido en ratón (553894, BD Pharmingen) diluido 1:100, seguido de una incubación con una solución de extravidina acoplada a peroxidasa (ExtrAvidin-HRP E2886 Sigma-Aldrich) diluida 1:3000. Después de los lavados con PBS-Tween 0.05%, la reacción colorimétrica se desarrolló añadiendo 100 $\mu\text{L}/\text{pocillo}$ de la solución sustrato: 0,1 mg/ml de 3,3,5,5-tetrametilbenzidina (TMB) y 50 μL de H_2O_2 al 1%. La reacción se detuvo con 1N H_2SO_4 y las densidades ópticas se registraron a 450 nm utilizando un espectrofotómetro de placas ELISA (LabSystems, Multiskan MS).

5.5.5. Parámetros hematológicos y recuento diferencial leucocitario

Para el experimento 3, se analizó la composición de células sanguíneas en madres y crías. Se realizó el hemograma completo de sangre anticoagulada con el fin de cuantificar los glóbulos rojos y las diferentes poblaciones de glóbulos blancos (linfocitos, neutrófilos, monocitos, eosinófilos y basófilos). Se utilizó un analizador hematológico automático (BC-5000 Vet, Mindray, China). Para los tres grupos experimentales, se realizó el hemograma en todas las muestras individuales de las madres, y en las correspondientes a entre cuatro a ocho crías (2-4 hembras y 2-4 machos) de cada madre, seleccionadas aleatoriamente.

5.6. Análisis estadísticos

Para el experimento 1 y 2, se realizó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk test y, dado que los datos siguieron una distribución normal, se presentan como media \pm error estándar (SEM). Para el experimento 1, las correlaciones se analizaron utilizando el coeficiente de correlación de Pearson y luego se realizó una regresión lineal simple para algunas variables seleccionadas. Para el experimento 2, las diferencias estadísticas entre grupos se evaluaron mediante un ANOVA de medidas repetidas de una vía, seguido del test de Tukey como *post hoc*. Las diferencias dentro de los grupos se evaluaron utilizando la prueba t de Student. El criterio utilizado para descartar la hipótesis nula fue $p < 0.05$.

Para el experimento 3, los datos que no siguieron una distribución normal (prueba de normalidad Shapiro-Wilk test) se presentan como mediana \pm SIQR (rango semi-intercuartil). Las diferencias entre grupos se evaluaron mediante el test de Mann-Whitney para comparaciones por pares (para PPD5-8, donde solo se analizaron CRS y control) y el test de Kruskal-Wallis con el test de Dunn como *post hoc* (para la determinación en PPD9, cuando se evaluaron todos los grupos).

Los datos que sí siguieron una distribución normal se presentaron como media \pm SEM. Las diferencias se evaluaron mediante el test de T (para PPD5-8) y ANOVA de una vía con la prueba de Tukey como *post hoc* (para PPD9). Los anticuerpos y los parámetros hematológicos de las crías se analizaron mediante ANOVA de dos vías, considerando la condición experimental (Control, ASR o CSR) y el sexo como factores, seguido de Tukey test como *post hoc*. Para evaluar la relación entre variables, se realizaron matrices de correlación de Spearman. El criterio para rechazar las hipótesis nulas fue $p < 0.05$ y todos los cálculos estadísticos se realizaron en GraphPad Prism 10, Dotmatics.

Tabla 1. Resumen de las condiciones generales de cada experimento

Experimento	N madres	Día de implante	Tipo restricción	Tiempo de privación/recuperación	Registro comportamental/electrofisiológico	Muestras biológicas
1	38	PPD1	no	no	4h entre los días PPD 4-7	no
2	8	PPD9	GH y DBES agudo	3 horas / 1 hora	PPD 12 -15	no
3	26	PPD1	DBES agudo y crónico	6 horas / 30 min ASR 1 día PPD9 CSR días PPD5 a PPD9	PPD 5 - 9	PPD9 Sangre madre y crías Leche

6. Resultados

6.1. Experimento 1: Relación entre sueño, amamantamiento y leche eyectada.

Los resultados de los experimentos 1 y 2 se encuentran incluidos en la publicación “Is sleep critical for lactation in rat?” Peña, F. et al. *Physiol. Behav.* 258, 114011 (2023). DOI: [10.1016/j.physbeh.2022.114011](https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2022.114011), anexada a la tesis.

En primer lugar, se analizó la correlación entre el tiempo que los animales invierten en las diferentes etapas del ciclo sueño-vigilia con los distintos parámetros del amamantamiento. El tiempo total registrado para cada parámetro se detalla en la Tabla 2. Como se muestra en la Figura 2A, el tiempo de amamantamiento se correlacionó negativamente con el estado de W ($p = 0.00005$), positivamente con el LS ($p = 0.00063$), el sueño NREM ($p = 0.00013$) y el sueño REM ($p = 0.00045$), y mostró una tendencia a correlacionarse positivamente con el SWS, aunque no alcanzó la significancia estadística ($p = 0.082$). No se encontró ninguna correlación significativa entre el tiempo de amamantamiento y el tiempo en IS ($p = 0.738$). Con el fin de examinar con mayor profundidad el efecto del tiempo en sueño sobre el tiempo de amamantamiento, se realizó una regresión lineal simple entre ambos. Los resultados de la regresión lineal simple mostraron una relación positiva significativa entre el tiempo total de sueño y el tiempo de amamantamiento ($F(1,36) = 21.14$; $p = 0.000051$). La pendiente del modelo (0.5848) indica que, por cada minuto adicional que la rata permanece dormida, el tiempo de amamantamiento aumenta aproximadamente 0.58 minutos (IC 95%: 0.327, 0.843), explicando el 37% de la variabilidad ($R^2 = 0.37$; Figura 2B).

Tabla 2. Media \pm error estándar de los parámetros de sueño-vigilia y amamantamiento de las 38 ratas utilizadas para los análisis de correlación.

Parámetro	Unidad	Media \pm SEM
W	(min)	97.17 \pm 3.87
	(%)	40.49 \pm 1.61
LS	(min)	31.52 \pm 1.91
	(%)	13.13 \pm 0.79
SWS	(min)	88.49 \pm 2.84
	(%)	36.87 \pm 1.18
IS	(min)	6.33 \pm 0.64
	(%)	2.64 \pm 0.27
REM	(min)	16.48 \pm 1.05
	(%)	6.87 \pm 0.44
TST	(min)	142.8 \pm 3.87
Amamantamiento	(min)	173.2 \pm 3.72
Eyecciones de leche	(eventos)	19.13 \pm 0.68
LWG	(%)	5.92 \pm 0.25

W, vigilia; LS, sueño ligero; SWS, sueño de ondas lentas; IS, estado intermedio; TST, tiempo total de sueño.

No se observó ninguna correlación significativa entre los estados de vigilia o las etapas de sueño con el número de eyecciones de leche ni con el LWG (Figura 2A). Tampoco se evidenció ninguna correlación entre los parámetros de amamantamiento (tiempo de amamantamiento, LWG y número de eyecciones de leche (Figura 2A).

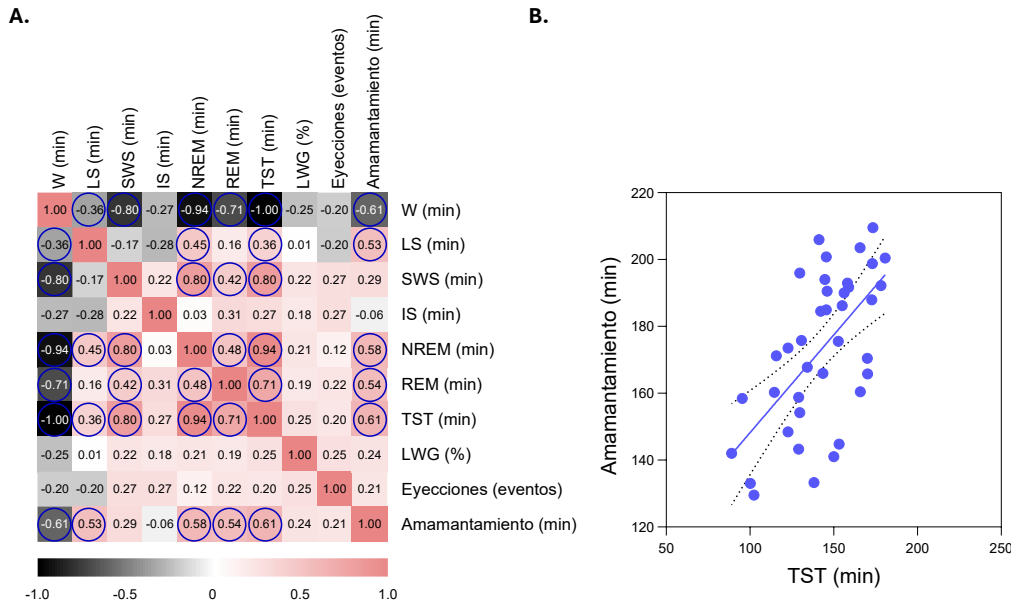


Figura 2. Relación entre el ciclo sueño vigilia y el amamantamiento.

Las figuras detallan la relación estadística entre las diferentes variables medidas. **A.** La figura corresponde a una matriz de correlación de Pearson representada por un *heatmap*, la cual detalla la relación entre los parámetros observados del ciclo sueño-vigilia y del amamantamiento. Los cuadros negros representan correlaciones negativas (Pearson $r < 0$), los cuadros blancos corresponden a ausencia de correlaciones

(Pearson $r = 0$), y los cuadros rosas a correlaciones positivas (Pearson $r > 0$). Los círculos azules denotan significancia estadística ($p < 0.05$). **B.** La gráfica se corresponde a la regresión lineal simple entre el tiempo de amamantamiento y el tiempo total de sueño. W, vigilia; LS, sueño ligero; SWS, sueño de ondas lentas; IS, estado intermedio; TST, tiempo total de sueño; LWG, ganancia de peso de las crías.

6.2. Experimento 2: Privación de sueño con GH y DBES

6.2.1. Parámetros de sueño y vigilia

La privación de sueño se logró de forma exitosa utilizando ambas técnicas, DBES y GH (Tabla 3). No se encontraron diferencias estadísticas en ningún parámetro de sueño o vigilia al comparar ambos métodos de privación.

Se evidenciaron diferencias significativas en los parámetros de sueño y vigilia entre los grupos durante el período de recuperación de sueño en comparación con el grupo CWOP (Tabla 4). En particular, el grupo CWOP presentó mayor tiempo de vigilia en comparación con DBES y una mayor frecuencia de episodios de W en comparación con GH y CWP. Además, el tiempo de LS fue mayor en CWOP en comparación con GH y DBES, y la frecuencia de episodios de LS fue más alta al compararlo con los valores de GH. Finalmente, el grupo CWOP presentó menos tiempo de SWS en comparación con DBES y GH, y menos TST en comparación con el grupo DBES.

Tabla 3. Parámetros de sueño y vigilia durante el periodo de privación de sueño (tres horas), utilizando gentle handling (GH) y deep brain electrical stimulation (DBES).

	CWP	CWOP	DBES	GH	ANOVA F	p
W						
Tiempo (min)	73.16 ± 5.45	70.69 ± 5.99	165.60 ± 2.76 **** #####	162.10 ± 4.21 **** #####	129.10	0.000
Duración de los episodios (min)	0.69 ± 0.09	0.96 ± 0.18	1.44 ± 0.19	3.90 ± 2.66	1.23	0.305
Frecuencia (episodios/hora)	36.92 ± 2.70	27.46 ± 2.75	44.75 ± 7.80	50.17 ± 10.83	2.07	0.171
LS						
Tiempo (min)	17.46 ± 1.26	12.98 ± 1.52	12.34 ± 1.91	14.59 ± 3.15	1.20	0.329
Duración de los episodios (min)	0.12 ± 0.00	0.12 ± 0.00	0.10 ± 0.00 ** #	0.10 ± 0.00 **	12.34	0.001
Frecuencia (episodios/hora)	49.96 ± 3.08	36.42 ± 3.53	41.63 ± 6.37	46.75 ± 9.88	0.87	0.434
SWS						
Tiempo (min)	76.08 ± 4.32	76.91 ± 5.25	2.04 ± 0.88 **** #####	3.26 ± 1.25 **** #####	184.20	0.000
Duración de los episodios (min)	0.63 ± 0.03	0.91 ± 0.11	0.10 ± 0.00 **** #####	0.10 ± 0.02 **** #####	53.27	0.000
Frecuencia (episodios/hora)	40.71 ± 2.43	30.00 ± 3.20	6.71 ± 2.86 *** #	11.04 ± 4.26 *** #	22.75	0.000
IS						
Tiempo (min)	3.68 ± 0.91	4.77 ± 0.58	0.00 ± 0.00 * ###	0.00 ± 0.00 * ###	18.82	0.001
Duración de los episodios (min)	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.00 ± 0.00 **** #####	0.00 ± 0.00 **** #####	173.10	0.000
Frecuencia (episodios/hora)	8.38 ± 2.16	10.63 ± 1.06	0.00 ± 0.00 * #####	0.00 ± 0.00 * #####	18.94	0.002
REM						
Tiempo (min)	9.63 ± 2.84	14.66 ± 2.11	0.00 ± 0.00 * ###	0.00 ± 0.00 * ###	16.00	0.001
Duración de los episodios (min)	0.59 ± 0.11	0.70 ± 0.06	0.00 ± 0.00 ** #####	0.00 ± 0.00 ** #####	38.88	0.000
Frecuencia (episodios/hora)	4.92 ± 1.57	7.13 ± 0.97	0.00 ± 0.00 ###	0.00 ± 0.00 ###	12.89	0.005
TST						
Tiempo (min)	106.80 ± 5.45	109.30 ± 5.99	14.39 ± 2.76 **** #####	17.86 ± 4.21 **** #####	129.10	0.0001

Los datos de los grupos están presentados como la media ± error estándar de ocho ratas, comparados utilizando el test de ANOVA de una vía y el test Tukey como post hoc. Los símbolos de * y # denotan diferencias significativas comparadas contra el CWP (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; **** p < 0.0001) y contra el CWOP (#p < 0.05; ## p < 0.01; ### p < 0.001; #### p < 0.0001). CWP, control con crías; CWOP, control sin crías; W, vigilia; LS, sueño ligero; SWS, sueño de ondas lentas; IS, estado intermedio; TST, tiempo total de sueño.

Tabla 4. Parámetros de sueño y vigilia durante el periodo de recuperación de sueño (una hora) después de la privación de sueño utilizando gentle handling (GH) y deep brain electrical stimulation (DBES).

	CWP	CWOP	DBES	GH	ANOVA	
					F	p
W						
Tiempo (min)	29.32 ± 3.59	36.35 ± 2.46	21.19 ± 2.82 **	21.31 ± 3.92	4.553	0.026
Duración de los episodios (min)	0.90 ± 0.18	0.79 ± 0.08	0.70 ± 0.10	0.79 ± 0.24	0.275	0.711
Frecuencia (episodios/hora)	37.38 ± 4.16 *	47.38 ± 3.46	31.50 ± 3.84	31.25 ± 2.19 *	5.574	0.034
LS						
Tiempo (min)	5.92 ± 0.71	6.59 ± 0.43	4.30 ± 0.40 *	3.97 ± 0.24 **	6.968	0.011
Duración de los episodios (min)	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.00	0.12 ± 0.00	0.11 ± 0.00	3.320	0.068
Frecuencia (episodios/hora)	48.00 ± 5.04	53.50 ± 2.25	37.13 ± 4.10	36.88 ± 2.40 **	4.772	0.043
SWS						
Tiempo (min)	22.01 ± 2.64	15.60 ± 1.92	29.96 ± 1.72 **	29.77 ± 2.76 *	8.005	0.003
Duración de los episodios (min)	0.60 ± 0.05	0.41 ± 0.04	0.94 ± 0.09	0.84 ± 0.05	0.235	0.972
Frecuencia (episodios/hora)	37.25 ± 4.65	37.63 ± 2.42	33.25 ± 2.53	35.63 ± 3.42	0.360	0.685
IS						
Tiempo (min)	1.41 ± 0.42	0.40 ± 0.23	1.47 ± 0.51	1.71 ± 0.50	2.444	0.119
Duración de los episodios (min)	0.16 ± 0.04	0.06 ± 0.02	0.18 ± 0.03	0.14 ± 0.03	2.901	0.081
Frecuencia (episodios/hora)	8.38 ± 2.49	2.88 ± 1.49	8.00 ± 2.71	9.63 ± 2.81	1.793	0.207
REM						
Tiempo (min)	1.35 ± 0.58	1.06 ± 0.70	3.08 ± 1.20	3.24 ± 0.85	1.530	0.256
Duración de los episodios (min)	0.31 ± 0.13	0.30 ± 0.19	0.39 ± 0.12	0.55 ± 0.15	0.521	0.605
Frecuencia (episodios/hora)	2.63 ± 0.93	1.25 ± 0.62	5.13 ± 1.90	5.25 ± 1.60	1.997	0.178
TST						
Tiempo (min)	30.68 ± 3.59	23.66 ± 2.46	38.81 ± 2.82**	38.69 ± 3.92	4.553	0.026
Latencia al NREM (min)	8.20 ± 2.40	8.16 ± 1.83	5.46 ± 1.61	3.87 ± 0.78	1.476	0.262
Latencia al REM (min)	43.60 ± 7.16	48.35 ± 5.83	41.84 ± 6.82	36.91 ± 6.23	0.550	0.600

Los datos de los grupos están presentados como la media ± error estándar de ocho ratas, comparados utilizando el test de ANOVA de una vía y el test Tukey como post hoc. Los símbolos de * denotan diferencias significativas comparadas contra el CWOP (* p < 0.05; ** p < 0.01). CWP, control con crías; CWOP, control sin crías; W, vigilia; LS, sueño ligero; SWS, sueño de ondas lentas; IS, estado intermedio; TST, tiempo total de sueño.

6.2.2. Eyecciones de leche

En la Figura 3A se evidencian los efectos de la privación de sueño sobre la frecuencia de eyecciones de leche, donde se observan diferencias significativas entre los grupos (F = 8.25; p = 0.006). Específicamente, los análisis *post hoc* evidenciaron una disminución en la frecuencia de eyecciones de leche durante la privación de sueño con GH (1.04 ± 0.44) en comparación con CWP (3.63 ± 0.43; p = 0.019) y DBES (2.79 ± 0.39; p = 0.032). No se observaron diferencias significativas entre DBES y CWP (p = 0.494) en este parámetro. Durante el período de recuperación de sueño (Figura 3B), la frecuencia de eyecciones de leche no difirió significativamente entre los grupos (F = 2.904; p = 0.069).

También comparamos la frecuencia de eyecciones de leche intragrupo (GH, DBES y CWP), entre el periodo de privación y el de recuperación de sueño. La frecuencia de eyecciones fue más alta durante el

período de recuperación de sueño en comparación con el de privación utilizando ambas técnicas de privación (DBES [$p = 0.015$, $t = 3.188$]; GH [$p = 0.002$, $t = 5.067$]). Como se esperaba, no se observaron diferencias significativas durante el CWP ($p = 0.209$, $t = 1.382$).

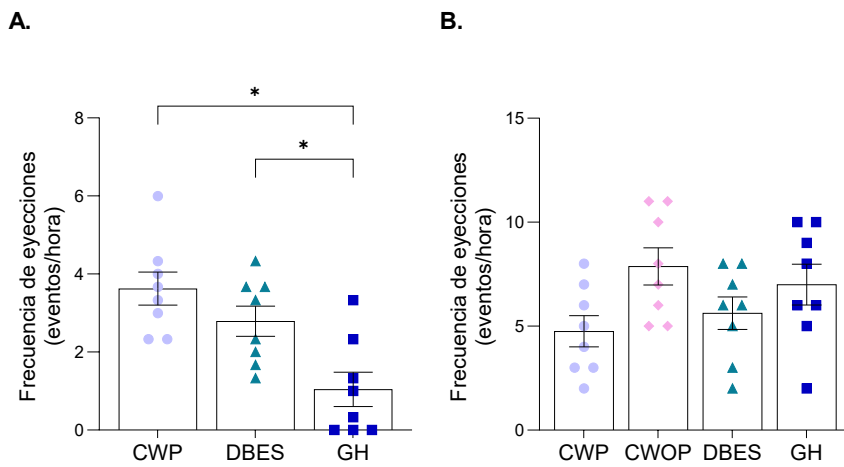


Figura 3. Efectos de la privación de sueño sobre las eyecciones de leche. Las gráficas muestran la frecuencia de eyecciones de leche durante el periodo de tres horas de privación de sueño (A) y el sucesivo periodo de recuperación de sueño (B), con *gentle handling* (GH) y *deep brain electrical stimulation* (DBES), y dos grupos control (con y sin crías [CWP y CWOP respectivamente]). Los datos se presentan como la media \pm el error estándar medio de ocho ratas comparadas usando el test de ANOVA de una vía junto con el test de Tukey como *post hoc*. Los símbolos de asteriscos (*) representan las diferencias significativas ($p < 0.05$).

6.2.3. Cantidad de leche eyectada

El cambio porcentual de peso de las crías (LWG, %) se evaluó como parámetro indirecto de la cantidad de leche eyectada. En la Figura 4A se muestra que el LWG difirió significativamente entre los grupos durante el periodo de privación de sueño ($F = 15.860$; $p = 0.001$). Específicamente, el promedio disminuyó significativamente en el grupo GH (-0.77 ± 0.44) en comparación con el CWP (1.30 ± 0.20 ; $p = 0.016$); y en el grupo CWOP (-0.83 ± 0.09) en comparación con CWP ($p = 0.00003$) y con el grupo DBES (0.89 ± 0.23 ; $p = 0.0003$).

También se observaron cambios en LWG entre los grupos durante el periodo de recuperación de sueño ($F = 5.743$; $p = 0.016$; Figura 4B). En particular, se evidenció un aumento del LWG al comparar los valores del grupo GH (1.91 ± 0.51) con los de CWP (0.88 ± 0.35 ; $p = 0.014$). El LWG en el grupo CWOP (2.71 ± 0.48) también aumentó en comparación con el grupo CWP ($p = 0.010$). No se encontraron diferencias entre DBES (1.14 ± 0.32) y CWP ($p = 0.965$).

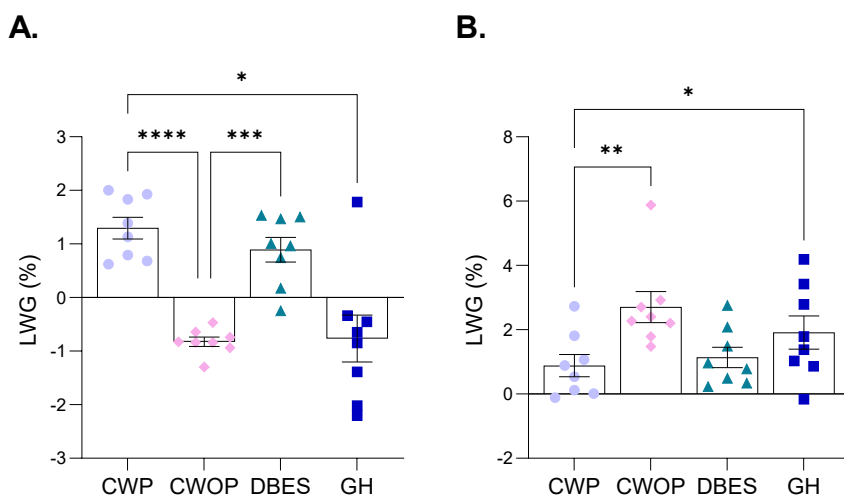


Figura 4. Efectos de la privación de sueño sobre la cantidad de leche eyectada. Las gráficas muestran la cantidad de leche eyectada representada como el aumento de peso de las crías (LWG) durante el periodo de tres horas de privación de sueño (A) y el sucesivo periodo de recuperación de sueño (B), con *gentle handling* (GH) y *deep brain electrical stimulation* (DBES), y dos grupos control (con y sin crías [CWP y CWOP respectivamente]). Los datos se presentan como la media \pm el error estándar medio de ocho ratas comparadas usando el test de ANOVA de una vía junto con el test de Tukey como *post hoc*. Los símbolos de asteriscos (*) representan las diferencias significativas (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$).

Por otra parte, al comparar el LWG intragrupo entre el período de privación y recuperación de sueño, se observó un aumento de la cantidad de leche eyectada en los grupos GH ($t = 3.16$, $p = 0.016$) y CWOP ($t = 7.11$, $p = 0.0002$). No se evidenciaron diferencias significativas en el grupo CWP ($t = 0.98$, $p = 0.359$) ni en el grupo DBES ($t = 0.52$, $p = 0.620$).

6.2.4. Comportamiento maternal.

Se evaluó el comportamiento materno durante el periodo de privación y de recuperación de sueño. La Figura 5 ilustra los cambios en el comportamiento materno (“maternograma”) de dos ratas madre representativas de cada grupo experimental durante las cuatro horas de registro. Se muestra la variación del comportamiento materno en tres estados principales: amamantamiento, activo en contacto con las crías, y comportamientos sin contacto con las crías.

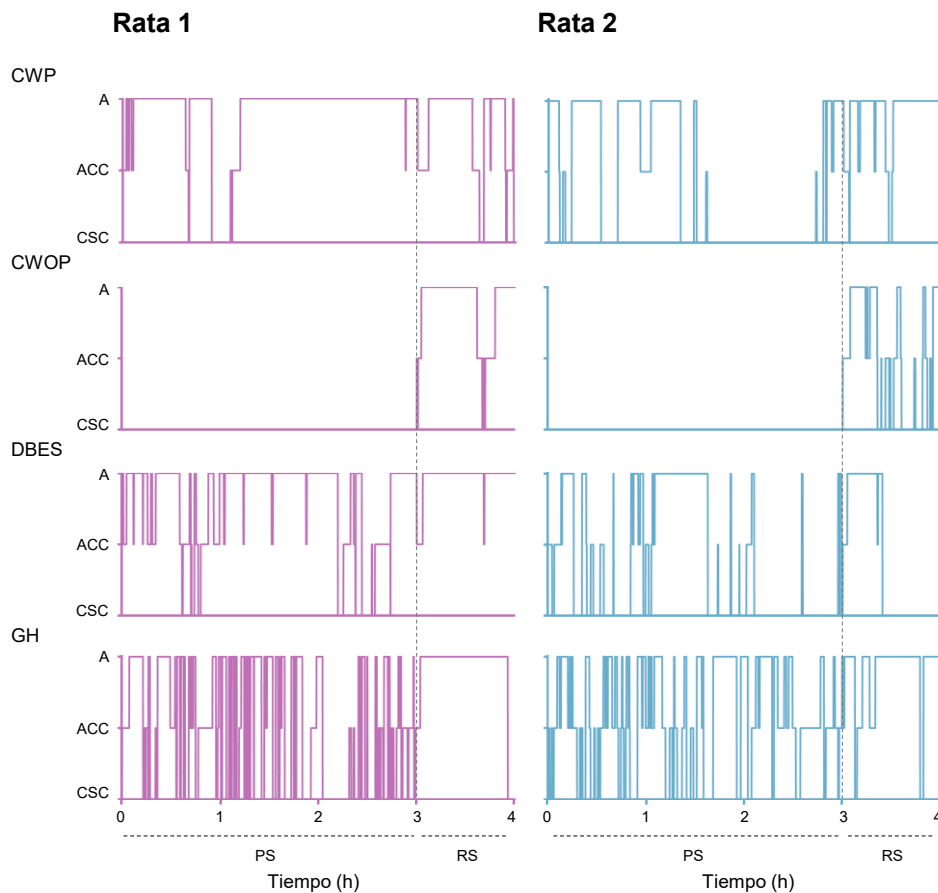


Figura 5. Maternogramas representativos durante la privación de sueño. Las gráficas muestran las variaciones en el comportamiento materno durante las cuatro horas de las sesiones experimentales en dos ratas representativas (R1, izquierda; R2, derecha). Clasificamos el comportamiento en épocas de 5 segundos, utilizando tres estados (amamantamiento [A]; comportamientos activos con las crías [ACC]; comportamientos sin contacto con las crías [CSC]). La línea punteada vertical gris indica el final del periodo de privación de sueño (PS) y el inicio del periodo de recuperación de sueño (RS).

La Tabla 5 detalla las variaciones en el comportamiento materno durante el período de privación de sueño. La frecuencia de los comportamientos maternos aumentó durante ambos procedimientos de privación de sueño. Específicamente, en el grupo GH aumentó la frecuencia de todos los comportamientos maternos en comparación con los valores de control. La frecuencia de amamantamiento y de comportamientos activos en contacto con las crías también aumentó en el grupo DBES en comparación con los valores de control, aunque en menor medida que durante el GH.

Tabla 5. Comportamientos de la madre durante el periodo de privación de sueño usando gentle handling (GH) y deep brain electrical stimulation (DBES).

	CWP	DBES	GH	ANOVA		
				F	p	
<i>Comportamientos sin contacto de crías</i>						
Tiempo (min)	40.55 ± 14.10	57.61 ± 13.88	55.76 ± 8.44	0.489	0.621	
Duración de los episodios (min)	7.71 ± 2.92	5.84 ± 1.57	3.55 ± 0.86	1.195	0.321	
Frecuencia (episodios/hora)	2.13 ± 0.33	3.54 ± 0.69	6.83 ± 1.62 *	6.650	0.027	
<i>Activos en contacto con crías</i>						
Tiempo (min)	25.59 ± 5.47	30.94 ± 4.32	41.47 ± 5.24	2.735	0.124	
Duración de los episodios (min)	2.60 ± 0.28	1.67 ± 0.14 *	1.41 ± 0.11 *	8.937	0.007	
Frecuencia (episodios/hora)	3.21 ± 0.52	6.13 ± 0.71 **#	9.67 ± 0.76 ***	32.040	0.000	
<i>Amamantamiento</i>						
Tiempo (min)	113.90 ± 11.33	91.45 ± 13.98	82.77 ± 8.42	1.700	0.221	
Duración de los episodios (min)	14.70 ± 2.15	6.54 ± 1.21 *	3.84 ± 0.74 *	14.120	0.002	
Frecuencia (episodios/hora)	2.75 ± 0.27	5.17 ± 0.57 **#	8.38 ± 1.01 **	18.380	0.001	

Los datos de los grupos están presentados como la media ± error estándar de ocho ratas, comparados utilizando el test de ANOVA de una vía y el test Tukey como post hoc. Los símbolos de * denotan diferencias significativas comparadas contra el CWP (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001) y los de # indican diferencias significativas comparadas contra el GH (# p < 0.05). CWP, control con crías; CWOP, control sin crías; GH, gentle handling; DBES, deep brain electrical stimulation.

Durante el período de recuperación de sueño, la mayoría de los comportamientos maternos analizados no variaron entre los grupos, excepto por un incremento en el tiempo de los comportamientos activos en contacto con las crías al comparar CWOP con GH y DBES (Tabla 6).

Tabla 6. Comportamientos de la madre durante el periodo de recuperación de sueño.

	CWP	CWOP	DBES	GH	ANOVA	
					F	p
<i>Comportamientos sin contacto de crías</i>						
Tiempo (min)	3.64 ± 1.03	6.75 ± 2.75	11.19 ± 4.47	5.23 ± 1.77	1.421	0.276
Duración de los episodios (min)	1.51 ± 0.46	1.25 ± 0.41	6.47 ± 4.26	3.19 ± 1.67	1.063	0.352
Frecuencia (episodios/hora)	2.50 ± 0.50	4.38 ± 1.27	2.63 ± 0.60	2.25 ± 0.75	1.124	0.345
<i>Activos en contacto con crías</i>						
Tiempo (min)	10.84 ± 1.83	18.10 ± 2.51	6.85 ± 1.23 *	5.92 ± 1.65 *	7.96	0.003
Duración de los episodios (min)	2.22 ± 0.21	2.42 ± 0.36	1.72 ± 0.18	2.17 ± 0.35	1.409	0.274
Frecuencia (episodios/hora)	5.00 ± 1.25	7.50 ± 3.50	4.50 ± 1.38	2.00 ± 2.00	6.269	0.012
<i>Amamantamiento</i>						
Tiempo (min)	45.52 ± 2.77	35.15 ± 3.77	41.96 ± 4.10	48.85 ± 2.57	3.037	0.064
Duración de los episodios (min)	24.67 ± 6.79	10.27 ± 2.17	23.77 ± 5.79	30.88 ± 7.26	2.295	0.157
Frecuencia (episodios/hora)	3.13 ± 0.74	4.00 ± 0.46	2.38 ± 0.50	2.38 ± 0.53	1.796	0.202
Latencia (min)	7.09 ± 2.46	7.54 ± 2.24	9.03 ± 2.26	3.97 ± 0.84	1.379	0.283

Los datos de los grupos están presentados como la media ± error estándar de ocho ratas, comparados utilizando el test de ANOVA de una vía y el test Tukey como post hoc. Los símbolos de * denotan diferencias significativas comparadas contra el CWOP (* p < 0.05). CWP, control con crías; CWOP, control sin crías; GH, gentle handling; DBES, deep brain electrical stimulation.

6.3. Experimento 3: Efectos de la restricción de sueño aguda y crónica durante el postparto

Parte de los resultados del experimento 3 se encuentran incluidos en la publicación “Acute and chronic sleep restriction differentially modify maternal behavior and milk macronutrient composition in the postpartum rat.” Peña F et al. *Physiol Behav.* (2024) DOI:10.1016/j.physbeh.2024.114522, anexada a la tesis; mientras que los demás resultados forman parte del manuscrito “Differential effects of postpartum sleep restriction on maternal and offspring immunity in the rat” Peña F et al., el cual se encuentra bajo revisión en la revista *Brain, Behavior, and Immunity*.

6.3.1. Restricción de sueño

En la Figura 6 se muestran las variaciones del ciclo sueño y vigilia durante el período de seis horas de restricción del sueño (Figura 6A y C) y durante el periodo de evaluación maternal (Figura 6B) durante la última sesión de todos los grupos (PPD9). Se logró exitosamente la restricción de sueño utilizando DBES, observándose un TST de $22.44 \pm 1.91\%$ con ASR, $15.94 \pm 1.91\%$ con CSR y $56.27 \pm 2.73\%$ durante el control ($F=95.34$; $p < 0.0001$). Los episodios de sueño correspondieron principalmente a LS, sin episodios de sueño REM: del $22.44 \pm 1.91\%$ de TST con ASR, $60.50 \pm 9.17\%$ correspondió a LS y $39.50 \pm 9.17\%$ a SWS; del $15.94 \pm 1.91\%$ con CSR, $68.69 \pm 7.42\%$ correspondió a LS y $31.31 \pm 7.42\%$ a SWS; mientras que del $56.27 \pm 2.73\%$ del control, $17.92 \pm 1.88\%$ correspondió a LS, $63.57 \pm 1.90\%$ a SWS, y $11.31 \pm 2.07\%$ a REM (Figura 6A).

No se observaron diferencias en la W y en los parámetros de sueño durante el período de evaluación maternal, mostrando un TST de $49.83 \pm 5.95\%$ con ASR, $39.78 \pm 12.74\%$ con CSR y $45.44 \pm 7.77\%$ durante el control ($F = 0.30$; $p = 0.749$; Figura 6B).

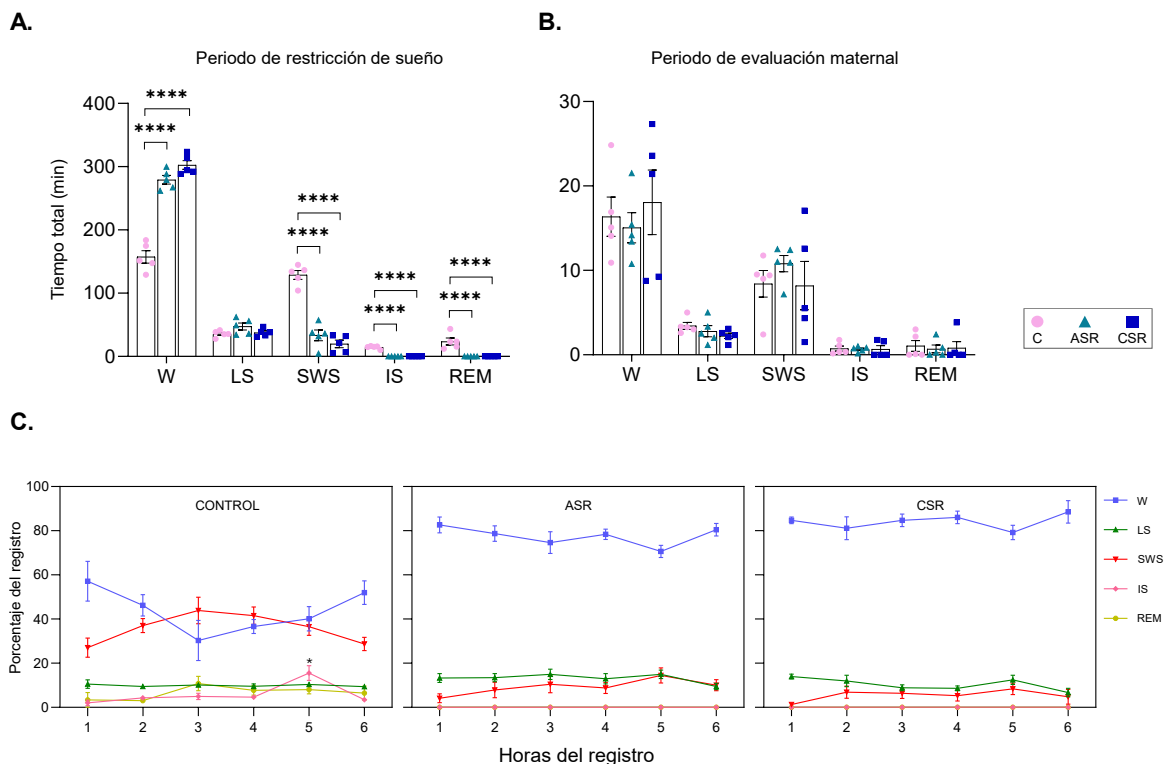


Figura 6. Restricción de sueño a través de las sesiones experimentales. Los gráficos muestran el tiempo total en sueño y vigilia durante las seis horas de restricción del sueño (A) y durante el período de evaluación maternal (B) en el PPD9; y el porcentaje del tiempo de registro invertido en cada etapa del ciclo sueño-vigilia hora por hora durante las seis horas de registro (C). Los datos se presentan como media \pm error estándar de cinco ratas, comparados mediante el test de ANOVA de una vía con la prueba de Tukey como *post hoc*. Los símbolos * indican diferencias significativas en comparación con el grupo C (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$). W, vigilia; LS, sueño ligero; SWS, sueño de ondas lentas; IS, etapa intermedia.

En la Figura 6C se muestran las diferencias hora a hora en W, LS, SWS, IS y REM durante las seis horas del periodo de restricción del sueño o control. En general, no se evidenciaron diferencias intragrupo para cada estado de sueño/vigilia durante el registro, lo que indicaría que el porcentaje de cada estado no cambia a lo largo de las seis horas en cada grupo. Solo observamos un ligero aumento en el porcentaje de IS durante la quinta hora en el grupo control ($p = 0.019$; $F = 8.42$).

6.3.2. Comportamiento maternal

Las Tablas 7 y 8 y la Figura 7 muestran los efectos de la restricción del sueño sobre los comportamientos maternos observados durante los 30 minutos del período de evaluación maternal. Los tiempos de los comportamientos maternos se vieron ligeramente alterados tras la restricción del sueño. Específicamente, en el PPD9 aumentó la latencia de reunión de la camada después de la CSR en comparación con la ASR ($p = 0.029$) pero no en comparación con el control ($p = 0.659$; Tabla 7). Asimismo, la latencia al *hover over* disminuyó significativamente después de la CSR en el PPD6. No se observaron diferencias entre los grupos en el tiempo total de *hover over*, amamantamiento o fuera del nido (Tabla 8).

Tabla 7. Efectos de la restricción de sueño en las latencias a los comportamientos maternos durante el periodo de evaluación maternal.

	Latencia (min):			
	Reunión de la camada	Hover over	Amamantamiento	Fuera del nido
PPD5				
Control	3.67 ± 6.90	5.23 ± 1.88	9.05 ± 9.01	10.75 ± 13.53
CSR	1.81 ± 3.48	3.28 ± 1.08	11.60 ± 5.64	30.00 ± 12.86
Estadístico	26.50	26.00	38.00	34.00
p	0.245	0.237	0.900	0.610
PPD6				
Control	1.33 ± 1.03	2.54 ± 1.02	9.01 ± 4.25	22.54 ± 12.88
CSR	1.02 ± 1.22	1.45 ± 0.46 *	6.53 ± 8.08	3.15 ± 10.71
Estadístico	31.00	14.00	25.00	22.00
p	0.459	0.021	0.203	0.110
PPD7				
Control	0.87 ± 2.57	1.52 ± 0.84	9.58 ± 3.86	30.00 ± 12.06
CSR	1.24 ± 8.33	3.12 ± 3.80	11.52 ± 7.01	3.63 ± 11.72
Estadístico	27.50	22.50	37.00	27.00
p	0.284	0.126	0.829	0.240
PPD8				
Control	0.76 ± 0.60	2.11 ± 1.00	11.68 ± 4.77	10.41 ± 12.82
CSR	1.54 ± 5.84	2.10 ± 2.13	9.38 ± 7.62	9.47 ± 13.57
Estadístico	28.00	37.50	33.50	37.00
p	0.304	0.847	0.590	0.827
PPD9				
Control	0.98 ± 1.19	1.56 ± 2.21	11.10 ± 3.87	3.90 ± 6.16
ASR	0.58 ± 0.32	2.28 ± 1.60	9.71 ± 3.37	6.23 ± 14.31
CSR	2.85 ± 11.51 #	2.15 ± 2.34	13.28 ± 7.67	10.71 ± 12.89
Estadístico	6.70	1.54	0.75	2.19
p	0.035	0.463	0.687	0.335

Los datos de latencia están presentados como la mediana ± el rango semi-intercuartil usando el test de Mann-Whitney para los días PPD5-8 y el test de Kruskal-Wallis seguido de por el test de Dunn como post hoc en el PPD9. Los símbolos de * denotan

diferencias comparadas contra el grupo control ($p < 0.05$), y los # contra el grupo ASR ($p < 0.05$). ASR, restricción de sueño aguda; CSR, restricción de sueño crónica; PPD, día de postparto.

Tabla 8. Efectos de la restricción de sueño sobre la duración de los comportamientos maternos durante el periodo de evaluación maternal.

	Hover over	Duración (min)	
		Amamantamiento	Fuera del nido
PPD5			
Control	11.67 ± 2.28	11.35 ± 2.58	6.98 ± 0.96
CSR	6.71 ± 1.59	17.91 ± 2.31	5.38 ± 1.25
Estadístico	1.70	1.84	1.03
p	0.109	0.084	0.319
PPD6			
Control	10.25 ± 1.33	13.54 ± 2.35	6.22 ± 2.23
CSR	9.89 ± 2.21	14.45 ± 3.41	5.67 ± 2.32
Estadístico	0.14	0.23	0.17
p	0.887	0.824	0.867
PPD7			
Control	8.95 ± 1.57	12.29 ± 2.39	8.75 ± 3.12
CSR	9.35 ± 1.93	11.61 ± 2.57	9.03 ± 3.21
Estadístico	0.16	0.19	0.06
p	0.872	0.849	0.951
PPD8			
Control	10.44 ± 1.56	12.32 ± 2.15	7.24 ± 2.02
CSR	6.62 ± 1.48	15.65 ± 2.88	7.72 ± 3.20
Estadístico	1.74	0.95	0.13
p	0.101	0.359	0.896
PPD9			
Control	10.24 ± 2.06	14.50 ± 2.31	5.26 ± 0.88
ASR	7.55 ± 0.86	18.43 ± 1.70	4.02 ± 1.06
CSR	6.85 ± 2.18	13.69 ± 3.15	9.47 ± 3.30
Estadístico	0.98	1.01	2.05
p	0.390	0.381	0.152

La duración de cada comportamiento está presentada como la media ± error estándar usando el T-test entre los días PPD5-8, y el test de ANOVA de una vía seguido de por el test de Dunn como post hoc para el PPD9. ASR, restricción de sueño aguda; CSR, restricción de sueño crónica; PPD, día de postparto.

También disminuyó el número de lamidos corporales (en PPD5, PPD8 y PPD9) y de lamidos anogenitales (en PPD9) después de la CSR en comparación con el control (Figura 7B y D). El cuidado materno total también disminuyó en PPD8 y PPD9 después de la CSR en comparación con el control (Figura 7F). Con el fin de examinar en profundidad el efecto de los días de restricción de sueño recibidos sobre el comportamiento materno, se realizaron regresiones lineales simples para el cuidado materno total, así como para los lamidos corporales y anogenitales (Figura 7G-I). Los resultados mostraron una tendencia lineal negativa significativa en función de los días de restricción de sueño, tanto para el cuidado materno total (pendiente del modelo = -6,697; $R^2 = 0.32$; $p = 0.002$; Figura 7G), como para los lamidos corporales (pendiente del

modelo = $-3,762$; $R^2 = 0.26$; $p = 0.007$; Figura 7H), y los lamidos anogenitales (pendiente del modelo = $-2,859$; $R^2 = 0.30$; $p = 0.004$; Figura 7I).

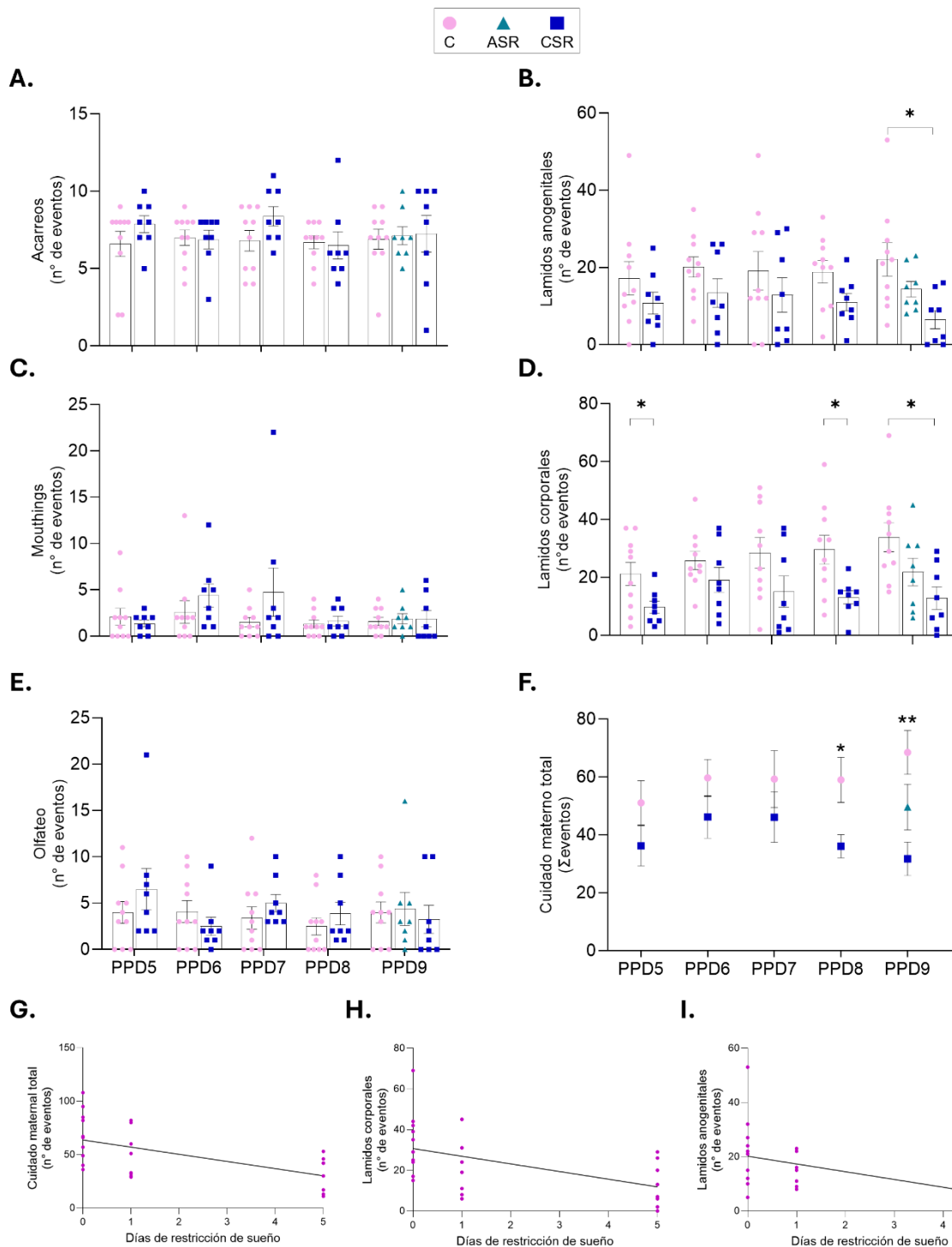


Figura 7. Comportamientos maternos durante el período de evaluación maternal luego de la restricción aguda y crónica de sueño. Los gráficos muestran las variaciones en el comportamiento maternal a lo largo de cinco días posparto (PPD5-9) durante 30 minutos después de la restricción aguda de sueño (ASR), la restricción crónica de sueño (CSR) y el grupo control (C). **A-E.** Número de eventos de comportamientos maternos. **F.** Cuidado materno total, calculado como la suma de todos los eventos de comportamientos maternos activos. **G-H.** Regresiones lineales simples de los comportamientos maternos medidos durante el PPD9 en función de la cantidad de días de restricción de sueño. Los datos se presentan como media \pm error estándar, analizados mediante test de t entre PPD5-8 y ANOVA de una vía con test de Tukey como post hoc en PPD9. Los datos de PPD5-8 del grupo ASR no se muestran ni se incluyeron en el análisis. Los símbolos * indican diferencias significativas en comparación con el grupo C (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

La Tabla 9 muestra las conductas de autocuidado materno durante los 30 minutos del período evaluación maternal, incluyendo alimentación, bebida y acicalamiento. Se observó una reducción en el comportamiento de beber agua después de la ASR en comparación con el control ($p = 0.024$) en el PPD9, y un aumento en la conducta de alimentación después de la CSR en comparación con el control ($p = 0.007$) en el PPD7.

Tabla 9. Efectos de la restricción de sueño en los comportamientos de autocuidado de la madre durante el periodo de evaluación maternal.

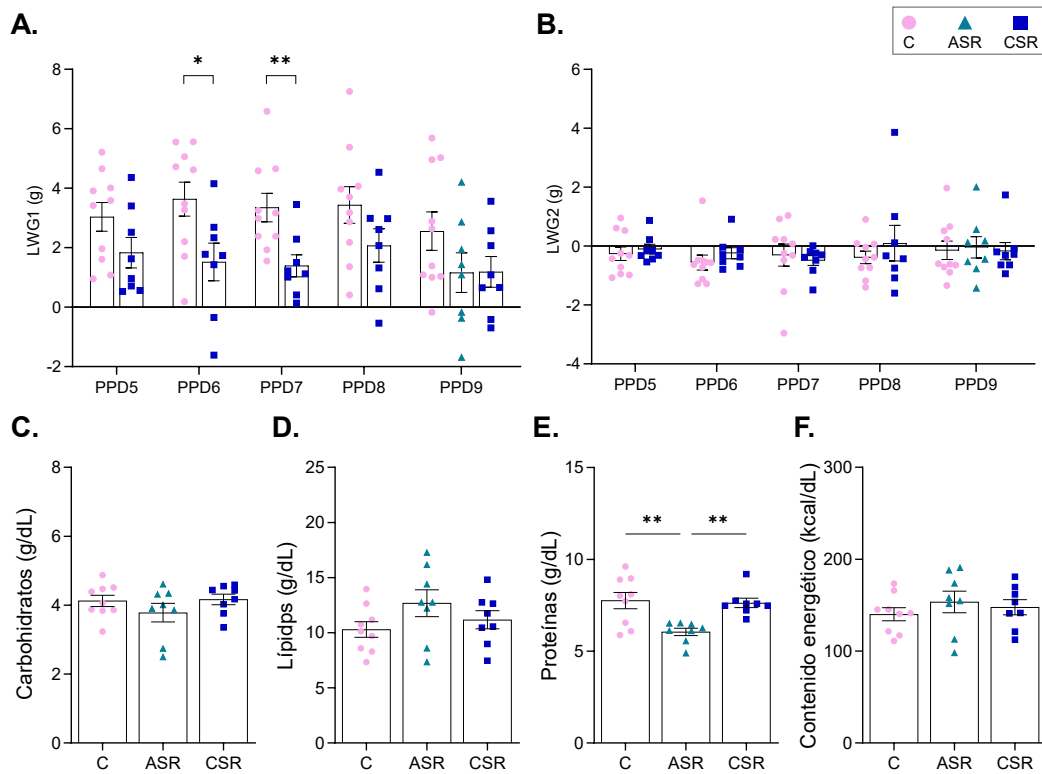
	Alimentarse	Beber (número de eventos/30 min)	Acicalamiento
PPD5			
Control	7.50 ± 13.00	0.50 ± 1.63	12.00 ± 9.75
CSR	0.00 ± 0.38	2.50 ± 3.75	14.00 ± 9.75
Estadístico	22.00	33.00	28.50
p	0.082	0.533	0.326
PPD6			
Control	2.00 ± 6.75	0.50 ± 2.13	22.50 ± 7.00
CSR	0.00 ± 6.63	0.00 ± 3.25	14.00 ± 8.75
Estadístico	30.50	37.50	23.50
p	0.395	0.837	0.152
PPD7			
Control	0.00 ± 0.25	0.00 ± 1.00	20.50 ± 6.63
CSR	11.50 ± 11.63*	0.50 ± 1.00	17.00 ± 6.50
Estadístico	12.00	33	31.50
p	0.007	0.537	0.471
PPD8			
Control	5.00 ± 8.38	1.00 ± 2.50	15.00 ± 5.63
CSR	2.00 ± 2.88	1.00 ± 3.00	22.00 ± 11.50
Estadístico	27.50	38.50	34
p	0.272	0.906	0.615
PPD9			
Control	4.00 ± 9.00	4.00 ± 2.00	22.00 ± 5.25
ASR	0.00 ± 6.00	0.00 ± 0.38*	12.50 ± 6.50
CSR	8.00 ± 15.38	1.50 ± 2.38	14.50 ± 8.75
Estadístico	2.65	7.04	3.07
p	0.266	0.030	0.216

Los datos están presentados como la mediana ± el rango semi-intercuartil usando el test de Mann-Whitney entre los días PPD5-8 y el test de Kruskal-Wallis seguido de por el test de Dunn como post hoc para el PPD9. Los símbolos de * denotan diferencias comparadas contra el grupo control ($p < 0.05$). ASR, restricción de sueño aguda; CSR, restricción de sueño crónica; PPD, día de postparto.

6.3.3. Cantidad de leche eyectada y su contenido de macronutrientes

Como se muestra en la Figura 8A, durante la CSR, el LWG1 se redujo significativamente en comparación con el grupo control durante el PPD6 ($t = 2.48$; $p = 0.025$) y PPD7 ($t = 3.07$; $p = 0.007$). No se encontraron diferencias durante el período de evaluación maternal (Figura 8B).

Los efectos de la restricción de sueño sobre la composición de la leche se muestran en las Figuras 8C-G. Se evidenciaron cambios significativos en el contenido de proteínas de la leche entre grupos ($F = 8.17$; $p = 0.002$), observándose una disminución del contenido proteico después de ASR en comparación con el grupo control ($p = 0.004$) y con el grupo de CSR ($p = 0.009$). No se encontraron diferencias en el contenido de carbohidratos ($F = 1.09$, $p = 0.356$) lípidos ($F = 1.73$, $p = 0.200$) y contenido energético ($F = 0.55$, $p = 0.583$) entre grupos.



energético analizados en el PPD9. Los datos se presentan como media ± error estándar, analizados mediante el test de t para PPD5-8 y ANOVA de una vía con test de Tukey como *post hoc* en PPD9. Los símbolos * indican diferencias significativas entre grupos (* p < 0.05; ** p < 0.01).

6.3.4. Niveles de hormonas en suero materno

No se observaron diferencias significativas en la concentración de oxitocina entre los grupos ($F = 0.81$; $p = 0.458$; Figura 9A). Respecto a las concentraciones de corticosterona, no se observaron diferencias significativas entre grupos ($F = 0.78$; $p = 0.470$; Figura 9B). Respecto a las concentraciones de prolactina, no fue posible cuantificar exitosamente dicha hormona en el suero de todas las ratas, logrando un $n = 5$ para el grupo control, $n = 2$ para el ASR y $n = 3$ para el CSR.

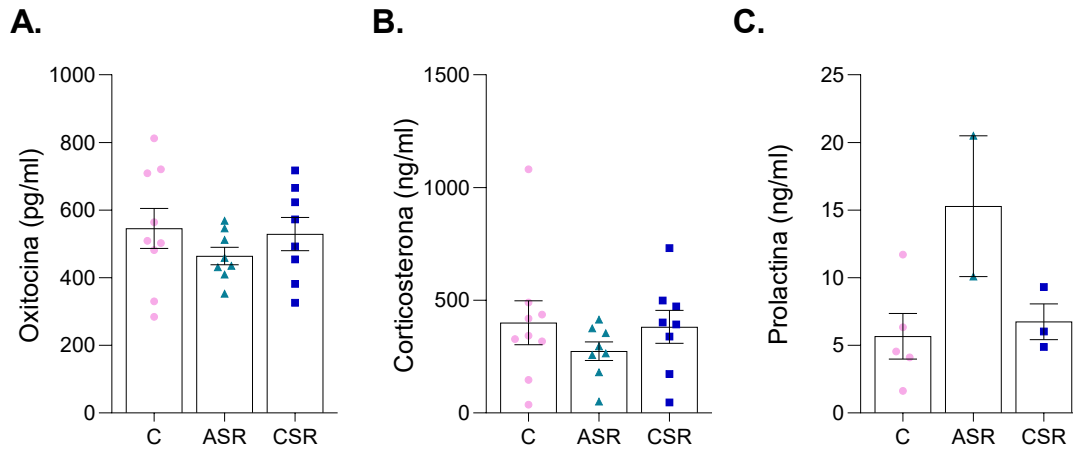


Figura 9. Concentraciones de hormonas séricas maternas luego de la restricción de sueño. Los gráficos muestran los valores de oxitocina (A), corticosterona (B) y prolactina (C) del suero de las madres de los grupos bajo restricción aguda de sueño (ASR), restricción crónica de sueño (CSR) y control (C) durante el último día postparto (PPD9). Los datos se presentan como media \pm error estándar, analizados mediante ANOVA de una vía con test de Tukey como *post hoc*.

6.3.5. Parámetros inmunológicos humorales de ratas madre y crías

En la Figura 10 se ilustra el efecto de la ASR y la CSR sobre los niveles de anticuerpos y citoquinas proinflamatorias. No se observaron diferencias significativas en los niveles de IgG tanto en suero materno ($F = 2.65$; $p = 0.094$) como en leche ($F = 2.13$; $p = 0.143$) entre los grupos (Figura 10A-B). Tampoco se evidenciaron diferencias significativas entre grupos en los niveles de IgG2a en suero materno ($F = 0.10$; $p = 0.904$; Figura 10D) ni en leche ($F = 0.17$; $p = 0.845$; Figura 10E).

No se observaron diferencias significativas entre grupos en los niveles de IL-17A ($F = 0.30$; $p = 0.747$; Figura 10F) e IL-6 en suero materno ($H = 0.35$; $p = 0.841$; Figura 10G).

Respecto a las crías, el ANOVA de dos vías evidenció un efecto significativo de la condición experimental ($p = 0.032$). Específicamente, los niveles séricos de IgG fueron menores en las crías macho de madres ASR ($5560 \pm 734 \mu\text{g/mL}$) en comparación con el grupo control ($8666 \pm 463 \mu\text{g/mL}$; $p = 0,025$; Figura 10C). Aunque el efecto se evidenció solo en las crías macho, el ANOVA de dos vías no mostró un efecto significativo del sexo ($p = 0.513$) ni una interacción sexo \times condición experimental ($p = 0.386$).

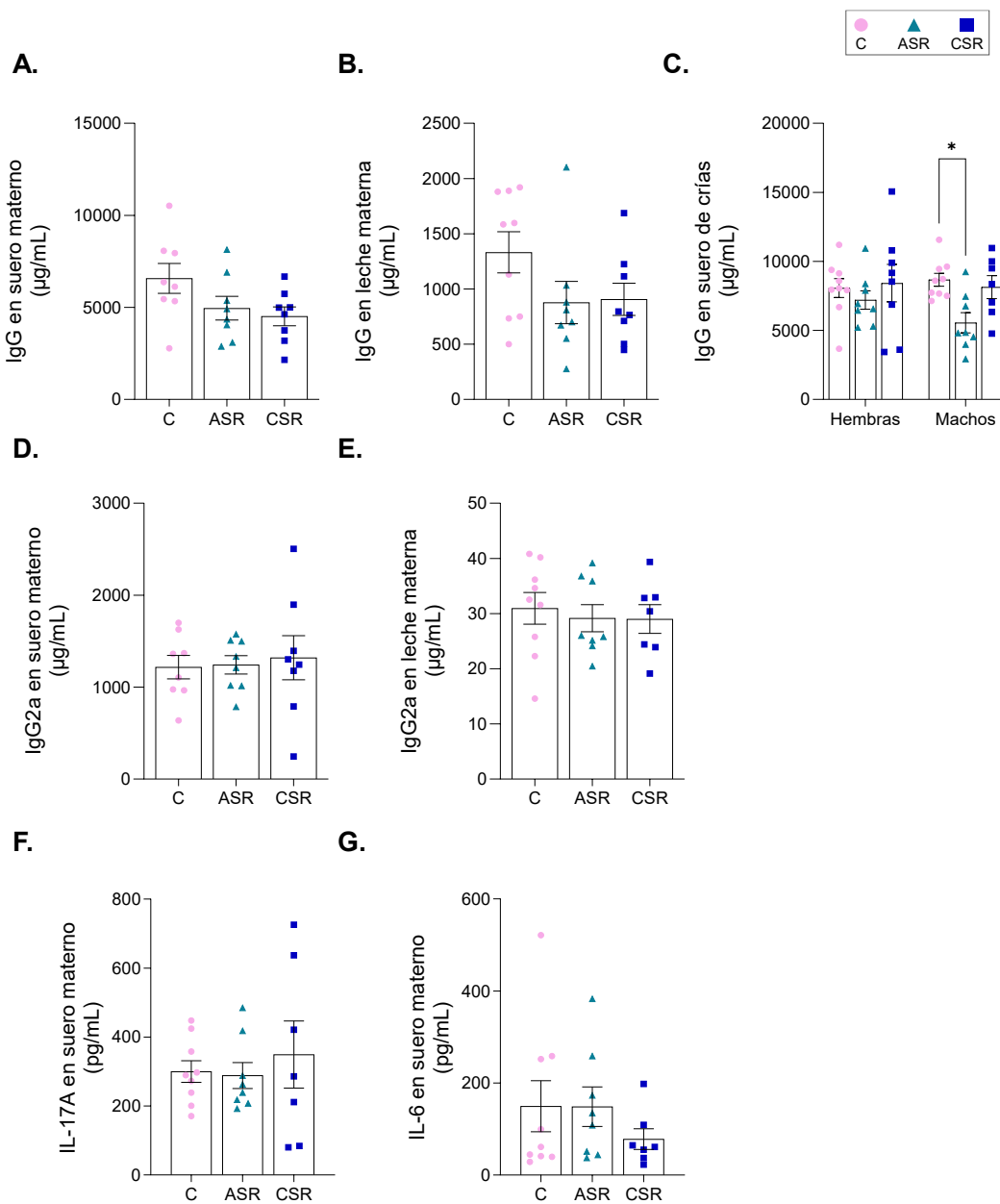


Figura 10. Efectos de la restricción de sueño materno sobre los parámetros inmunológicos en el suero y en la leche de madres y crías (PPD9). Los gráficos muestran las variaciones en la concentración de: IgG en el suero de las madres (A), en la leche materna (B) y en el suero de las crías (C); IgG2a en el suero de las madres (D) y en la leche materna (E); IL-17A (F) e IL-6 en el suero de las madres (G) de muestras obtenidas durante el PPD9. En el caso de las crías, la IgG total se midió en suero en un *pool* de muestras separadas por género, de cuatro hembras y cuatro machos por cada madre. Los datos de se presentan como media ± error estándar. Los datos de IgG, IgG2a e IL-17A fueron analizados mediante ANOVA de una vía con test de Tukey como *post hoc*, mientras que los datos de IL-6 fueron analizados mediante el test de Kruskal-Wallis con el test de Dunn como *post hoc*.

6.3.6. Parámetros hematológicos de ratas madre y crías

Los efectos de la restricción de sueño materna sobre los parámetros hematológicos de las madres se muestran en la Tabla 10 y la Figura 11, mientras que la Tabla 11 y la Figura 12 muestran los efectos en las crías.

No se encontraron diferencias significativas en los parámetros hematológicos maternos entre grupos (Tabla 10; Figura 11). Respecto a las crías, el ANOVA de dos vías evidenció un efecto significativo de la condición experimental (control, ASR o CSR) sobre el recuento total de leucocitos ($p = 0.001$), presentando mayores valores las hembras del grupo CSR (6.50 ± 1.03) que las del grupo control (3.61 ± 0.45 ; $p = 0.011$) y que las del grupo ASR (4.17 ± 0.62 ; $p = 0.041$; Figura 12A). Los machos mostraron una tendencia similar (CSR: 5.92 ± 0.85 ; control: 3.74 ± 0.37 ; $p = 0.059$; Figura 12A). El aumento de leucocitos se debió principalmente a los linfocitos, en los que también se evidenció un efecto significativo de la condición experimental ($p = 0.0003$), siendo el recuento linfocitario de las hembras del grupo CSR (4.10 ± 0.58) mayor

que el control (2.28 ± 0.25 ; $p = 0.004$) y que el ASR (2.80 ± 0.38 ; $p = 0.040$; Figura 12G); y el recuento linfocitario de los machos CSR (3.81 ± 0.42) mayor que el control (2.44 ± 0.25 ; $p = 0.029$; Figura 12G).

Como aproximación para evaluar el efecto de los días de restricción de sueño recibidos por la madre sobre el número de linfocitos en sangre de las crías, se realizaron regresiones lineales simples entre los recuentos de linfocitos y los días de restricción de sueño (Figura 12H-I). Los resultados mostraron una relación positiva entre el recuento de linfocitos en las crías y los días de restricción de sueño materna tanto en hembras (pendiente = 0.3515; $R^2 = 0.33$; $p = 0.005$) como en machos (pendiente = 0.2582; $R^2 = 0.34$; $p = 0.003$).

El ANOVA de dos vías evidenció un efecto de la condición experimental sobre el recuento total de neutrófilos ($p = 0.026$), aunque el *post hoc* no fue significativo. Los demás parámetros sanguíneos no mostraron diferencias significativas ni en madres ni en crías, y los análisis de leucocitos basados en el sexo de las crías tampoco fueron significativos (Tabla 11). Además, se calculó la relación neutrófilos-linfocitos como otro indicador de estrés¹⁸⁶. En cuanto a los parámetros maternos, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos control (0.39 ± 0.09), ASR (0.55 ± 0.04) y CSR (0.36 ± 0.06 ; $p = 0.123$; $F = 2.33$; Figura 11G). Con respecto a las crías, tampoco se encontraron diferencias significativas entre los grupos en las hembras (C: 0.31 ± 0.05 ; ASR: 0.25 ± 0.04 ; CSR: 0.27 ± 0.03 ; Figura 12F), ni en los machos (C: 0.29 ± 0.04 ; ASR: 0.25 ± 0.04 ; CSR: 0.26 ± 0.03 ; Figura 12F), sin efectos significativos de la condición experimental ($p = 0.444$), sexo ($p = 0.753$) ni interacción ($p = 0.973$).

Tabla 10. Efectos de la restricción de sueño sobre los parámetros inmunológicos celulares maternos.

Parámetro	Unidad	Control	ASR	CSR	Estadístico	p-valor
Neutrófilos	%	23.06 ± 4.05	30.31 ± 1.27	22.09 ± 2.10	2.63	0.097
Linfocitos	%	67.48 ± 5.00	55.92 ± 2.26	65.49 ± 3.71	2.67	0.094
Monocitos	%	7.13 ± 1.85	10.81 ± 1.44	9.49 ± 1.94	1.19	0.324
Eosinófilos	%	2.16 ± 0.46	2.47 ± 0.94	2.66 ± 0.48	0.13	0.877
Basófilos	%	0.20 ± 0.06	0.51 ± 0.13	0.29 ± 0.06	3.04	0.071
Eritrocitos	10 ⁶ /μL	4.85 ± 0.21	4.81 ± 0.15	4.74 ± 0.30	0.07	0.937
Hematocrito	%	31.98 ± 1.32	32.81 ± 0.90	30.88 ± 1.56	0.57	0.575
Hemoglobina	g/dL	10.99 ± 0.33	11.23 ± 0.24	10.77 ± 0.46	0.44	0.653
MCV	fL	65.94 ± 2.04	68.63 ± 2.29	65.93 ± 1.25	0.64	0.538
MCH	pg	22.83 ± 0.69	23.39 ± 0.60	21.88 ± 0.50	1.51	0.246
MCHC	g/L	347.5 ± 10.03	343.3 ± 5.10	335.6 ± 3.83	0.70	0.507
RDW-CV	%	23.86 ± 1.87	24.98 ± 2.00	25.81 ± 1.78	0.26	0.772
RDW-SD	fL	67.35 ± 6.05	72.89 ± 8.22	72.96 ± 6.40	0.22	0.801
Plaquetas	10 ³ /μL	814.0 ± 142.2	728.6 ± 101.6	677.1 ± 84.87	0.37	0.700
MPV	fL	7.31 ± 0.26	6.98 ± 0.35	7.16 ± 0.32	0.30	0.747
PDW	%	17.33 ± 0.38	17.03 ± 0.30	17.10 ± 0.36	0.22	0.802
PCT	%	0.55 ± 0.10	0.54 ± 0.09	0.49 ± 0.07	0.11	0.893

Los resultados corresponden a los parámetros hematológicos de ratas madres de muestras obtenidas en el postparto día 9. Los datos se presentan como media ± SEM usando el test de ANOVA de una vía con el test de Tukey como *post hoc*. ASR, restricción de sueño aguda; CSR, restricción de sueño crónica; MCV, volumen corpuscular medio; MCH, hemoglobina corpuscular media; MCHC, concentración de hemoglobina corpuscular media; RDW-CV, coeficiente de variación de la distribución de los glóbulos rojos; RDW-SD desviación estándar de la distribución de los glóbulos rojos; MPV, volumen plaquetario medio; PDW, ancho de distribución de las plaquetas; PCT, plaquetocrito.

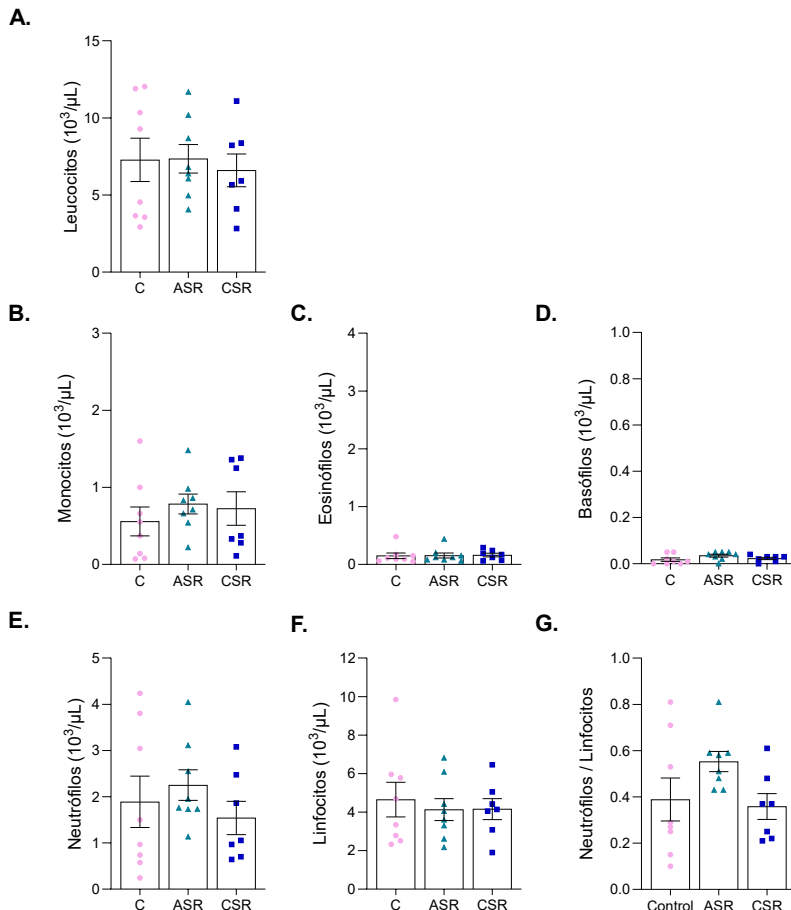


Tabla 11. Efectos de la restricción de sueño maternal sobre los parámetros hematológicos de las crías hembra y macho.

Parámetro	Sexo	Condición experimental			ANOVA de dos vías:		
		Control	ASR	CSR	Condición experimental (p-valor)	Sexo (p-valor)	Interacción (p-valor)
Neutrófilos (%)	Hembra	19.07 ± 2.21	16.54 ± 1.87	17.02 ± 1.46	0.501	0.785	0.977
	Macho	18.17 ± 2.13	16.42 ± 2.29	16.76 ± 1.14			
Linfocitos (%)	Hembra	66.25 ± 2.90	68.85 ± 3.06	63.78 ± 2.19	0.254	0.642	0.865
	Macho	65.78 ± 2.48	69.94 ± 3.13	66.33 ± 2.45			
Monocitos (%)	Hembra	7.21 ± 1.74	8.77 ± 1.42	8.49 ± 2.40	0.948	0.901	0.742
	Macho	8.59 ± 1.93	8.01 ± 1.27	7.35 ± 1.51			
Eosinófilos (%)	Hembra	6.07 ± 1.54	4.64 ± 1.91	9.24 ± 3.62	0.183	0.834	0.977
	Macho	6.01 ± 2.03	4.48 ± 1.11	8.28 ± 2.80			
Basófilos (%)	Hembra	1.39 ± 0.12	1.20 ± 0.21	1.48 ± 0.49	0.567	0.772	0.872
	Macho	1.45 ± 0.16	1.15 ± 0.17	1.28 ± 0.20			
Eritrocitos (10 ⁶ /μL)	Hembra	2.25 ± 0.29	2.60 ± 0.05	2.27 ± 0.44	0.651	0.570	0.886
	Macho	2.50 ± 0.28	2.58 ± 0.16	2.43 ± 0.36			
Hematocrito (%)	Hembra	20.08 ± 2.55	23.77 ± 0.32	19.85 ± 4.01	0.351	0.173	0.751
	Macho	22.26 ± 2.48	24.83 ± 0.32	24.25 ± 2.06			
Hemoglobina (g/dL)	Hembra	7.82 ± 0.68	9.07 ± 0.15	8.43 ± 1.11	0.287	0.181	0.714
	Macho	8.62 ± 0.58	9.20 ± 0.12	9.49 ± 0.53			
MCV (fL)	Hembra	89.23 ± 1.05	92.87 ± 1.88	83.86 ± 5.52	0.092	0.789	0.943
	Macho	88.90 ± 1.92	90.70 ± 1.70	83.99 ± 5.86			
MCH (pg)	Hembra	37.05 ± 3.53	35.03 ± 0.86	71.20 ± 24.69	0.109	0.921	0.737
	Macho	35.96 ± 2.55	44.89 ± 11.01	58.91 ± 21.84			
MCHC (g/L)	Hembra	415.43 ± 39.78	377.44 ± 6.08	981.07 ± 309.80	0.100	0.928	0.938
	Macho	405.67 ± 29.86	505.69 ± 133.20	923.44 ± 508.45			
RDW-CV (%)	Hembra	29.11 ± 3.17	24.01 ± 1.37	34.18 ± 5.84	0.134	0.632	0.601
	Macho	30.12 ± 4.63	24.40 ± 2.11	28.42 ± 3.86			
RDW-SD (fL)	Hembra	106.46 ± 12.54	90.24 ± 6.70	114.49 ± 12.94	0.226	0.558	0.538
	Macho	110.97 ± 18.64	89.27 ± 8.76	94.36 ± 7.45			
Plaquetas (10 ³ /μL)	Hembra	739.21 ± 196.91	534.84 ± 98.04	1121.07 ± 98.04	0.060	0.791	0.909
	Macho	853.91 ± 275.52	620.08 ± 71.52	1060.58 ± 71.52			
MPV (fL)	Hembra	8.61 ± 0.32	8.49 ± 0.32	8.57 ± 0.52	0.694	0.751	0.733
	Macho	8.81 ± 0.38	8.43 ± 0.40	8.12 ± 0.50			
PDW (%)	Hembra	18.58 ± 0.38	18.84 ± 0.43	18.17 ± 0.42	0.328	0.967	0.897
	Macho	18.38 ± 0.36	18.89 ± 0.42	18.35 ± 0.43			
PCT (%)	Hembra	0.47 ± 0.05	0.40 ± 0.07	0.70 ± 0.08	0.278	0.777	0.063
	Macho	0.54 ± 0.11	0.51 ± 0.07	0.46 ± 0.06			

Los resultados corresponden a los parámetros hematológicos de las crías hembra y macho de madres privadas de sueño o bajo registros control. Los datos fueron obtenidos en el posparto día 9 y se presentan como media ± SEM usando el test de ANOVA de dos vías con el test de Tukey como post hoc. ASR, restricción de sueño aguda; CSR, restricción de sueño crónica; MCV, volumen corpuscular medio; MCH, hemoglobina corpuscular media; MCHC, concentración de hemoglobina corpuscular media; RDW-CV, coeficiente de variación de la distribución de los glóbulos rojos; RDW-SD

desviación estándar de la distribución de los glóbulos rojos; MPV, volumen plaquetario medio; PDW, ancho de distribución de las plaquetas; PCT, plaquetocrito.

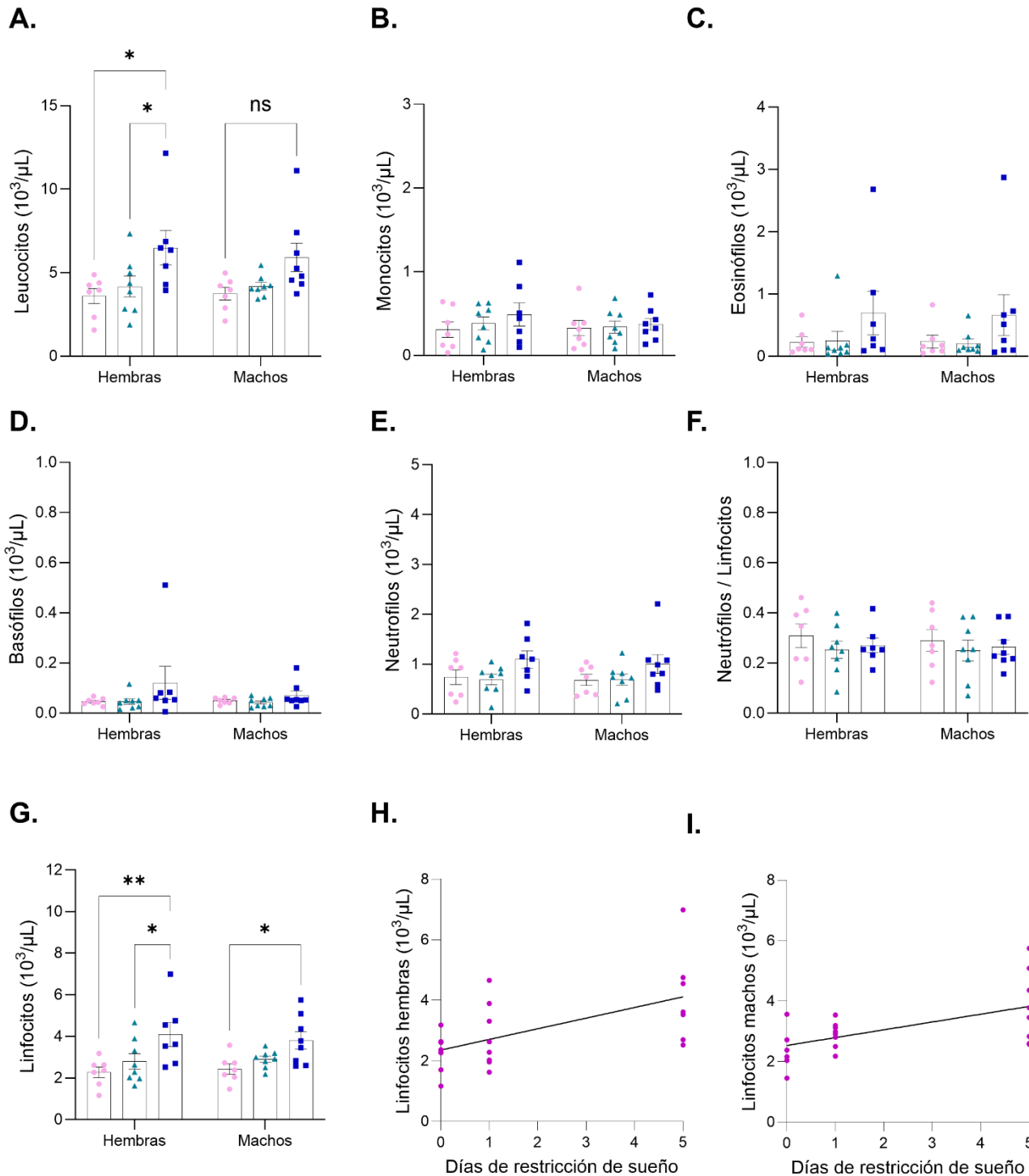


Figura 12. Parámetros inmunológicos celulares de las crías hembra y macho después de la restricción aguda y crónica de sueño materna. A-E. Los gráficos muestran las variaciones en el recuento de leucocitos (A), monocitos (B), eosinófilos (C), basófilos (D) y neutrófilos (E) en la sangre de crías hembra y macho en el día 9 posparto (PPD9). F. El gráfico muestra la relación entre el recuento de neutrófilos y linfocitos total. G. El gráfico muestra las variaciones en el recuento de linfocitos en la sangre. H-I. Regresiones lineales simples de los recuentos linfocitarios medidos durante el PPD9 en función de la cantidad de días de restricción de sueño materna para crías hembra (H) y macho (I). Los valores corresponden al análisis de entre 2-4 crías hembras por madre. Los datos se expresan como media \pm error estándar analizados mediante ANOVA de dos vías con el test de Tukey como *post hoc*. C, control; ASR, restricción aguda de sueño; CSR, restricción crónica de sueño.

6.3.7. Correlaciones de variables

En base a la relación fisiológica que existe entre los sistemas endócrino e inmunológico y los componentes de la leche, así como el vínculo inmunológico entre la rata madre y la cría a través de los anticuerpos y del comportamiento maternal, se realizaron análisis de correlación de Spearman entre estos parámetros medidos en el PPD9. Debido al volumen de datos presente en las matrices de Spearman, solamente se describen las correlaciones en que dicha relación entre las variables presenta alguna relevancia fisiológica o podría colaborar a explicar los resultados obtenidos.

Macronutrientes de la leche y componentes inmunológicos y hormonales en sangre materna.

Dado que las hormonas séricas influyen en la composición de la leche materna, así como pueden ser transferidas a la leche al igual que los anticuerpos desde la sangre, se investigó una posible correlación entre estos parámetros maternos. Para el caso del contenido de macronutrientes de la leche, se evidenció una correlación positiva entre la cantidad de proteína en leche y la oxitocina en sangre, tanto para el grupo control ($p = 0.017$) como para el ASR ($p = 0.046$), pero perdiéndose en el CSR ($p = 0.197$). También se observó que únicamente en el grupo control el contenido proteico se correlacionó con la IgG en leche ($p = 0.043$) y con la IgG2a en suero materno ($p = 0.001$).

IgG sérica de las crías y anticuerpos en la leche y suero materno.

En cuanto a la concentración de IgG en el suero de las crías, se observó una correlación positiva con la IgG en leche en hembras ($p = 0.025$) y con la IgG2a en leche, tanto en machos ($p = 0.017$) como en hembras ($p = 0.006$), solamente en el grupo control.

En cuanto a las correlaciones entre los anticuerpos en sangre de las crías y materno, se correlacionaron significativamente los niveles de IgG en todos los grupos, aunque con diferencias según el sexo de las crías. Mientras que en el grupo control la correlación positiva se evidenció solo con las crías macho ($p = 0.046$), en los grupos con restricción de sueño la correlación se observó con las crías hembra ($p = 0.002$) para ASR y para CSR ($p = 0.037$).

Linfocitos de las crías y hormonas maternas

En cuanto al recuento leucocitario de las crías, se observó que la concentración de linfocitos en las crías macho se correlacionó en forma positiva con la corticosterona sérica materna en el grupo CSR ($p = 0.011$) mientras que se correlacionó de forma negativa en el grupo control ($p = 0.034$) y presentó una tendencia a correlacionar de forma negativa también en el ASR ($p = 0.058$). También se evidenció una correlación positiva entre la concentración de linfocitos en las crías hembra y la cantidad de leche eyectada únicamente en el grupo control ($p = 0.033$).

6.4. Resumen de resultados

6.4.1. Experimento 1: Relación entre sueño, amamantamiento y leche eyectada

- A mayor tiempo de sueño, mayor tiempo de amamantamiento, pero no mayor cantidad de eyecciones o cantidad de leche.
- Los parámetros de amamantamiento (tiempo, cantidad de leche eyectada y número de eyecciones) no se correlacionan entre sí

6.4.2. Experimento 2: Privación de sueño con GH y DBES

- Disminuyó la frecuencia de eyecciones de leche durante la privación de sueño con GH.

- No hubo diferencias en la cantidad de eyecciones de leche entre DBES y CWP durante el periodo de privación.
- Durante el período de recuperación de sueño, la frecuencia de eyecciones de leche no difirió significativamente entre los grupos.
- El grupo CWOP presentó más vigilia y sueño ligero durante el periodo de recuperación de sueño en comparación con otros grupos.
- Usando ambas técnicas de privación, aumentó la frecuencia de eyecciones durante el período de recuperación de sueño en comparación con el de privación (análisis intragrupo).
- La cantidad de leche eyectada disminuyó en el grupo GH y el CWOP durante las tres horas de privación.
- Aumentó la cantidad de leche eyectada en el grupo GH y el CWOP durante el período de recuperación de sueño.
- No se encontraron diferencias en la cantidad de leche eyectada entre DBES y CWP.
- En los análisis intragrupo, aumentó la cantidad de leche eyectada en los grupos GH y CWOP durante la recuperación de sueño, pero no en los grupos CWP y DBES.
- La frecuencia de los comportamientos maternos aumentó con ambos procedimientos de privación de sueño.
- Durante el período de recuperación de sueño, la mayoría de los comportamientos maternos analizados no variaron entre los grupos.

6.4.3. Experimento 3: Efectos de la restricción de sueño aguda y crónica durante el postparto

La Tabla 12 resume los resultados obtenidos en el experimento 3.

Tabla 12. Resumen de resultados obtenidos en el experimento 3

Parámetro	Comportamiento maternal						
	Lamidos anogenitales	Lamidos corporales	Cuidado total	Reunión de la camada	Hover over	Amamantamiento	Fuera del nido
ASR	=	↓ PPD5	=	=	=	=	=
CSR	↓ PPD6	↓ PPD6y9	↓ ↓ PPD8y9	↑	=	=	=

Parámetro	Otros comportamientos		
	Comer	Beber	Acicalarse
ASR	=	↓	=
CSR	↑ PPD7	=	=

Parámetro	Leche materna					
	Cantidad de leche	Carbohidratos	Lípidos	Proteínas	Contenido calórico	Proporción de macronutrientes
ASR	=	=	=	↓	=	↓ proteínas, ↑ grasas
CSR	↓ PPD6y7	=	=	=	=	=

Parámetro	Hormonas maternas		
	Oxitocina	Corticosterona	Prolactina
ASR	=	=	?
CSR	=	=	?

Parámetro	IgG		IgG2a		IL-17		IL-6	
	Suero materno	Leche	Suero de crías	Suero materno	Leche	Suero materno	Suero materno	Leche en crías
ASR	=	=	↓ machos	=	=	=	=	=
CSR	=	=	=	=	=	=	=	=

Parámetro	Glóbulos blancos maternos						
	Leucocitos	Neutrófilos	Linfocitos	Monocitos	Eosinófilos	Basófilos	Relación N/L
ASR	=	=	=	=	=	=	=
CSR	=	=	=	=	=	=	=

Parámetro	Otros parámetros hematológicos maternos										
	Hematocrito	Hemoglobina	MCV	MCH	MCHC	RDW-CV	RDW-SD	Plaquetas	MPV	PDW	PCT
ASR	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
CSR	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=

Parámetro	Glóbulos blancos de crías						
	Leucocitos	Neutrófilos	Linfocitos	Monocitos	Eosinófilos	Basófilos	Relación N/L
ASR	=	=	=	=	=	=	=
CSR	↑ hembras	=	↑ hembras y machos	=	=	=	=

Parámetro	Otros parámetros hematológicos de crías										
	Hematocrito	Hemoglobina	MCV	MCH	MCHC	RDW-CV	RDW-SD	Plaquetas	MPV	PDW	PCT
ASR	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
CSR	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=

Resumen de los datos de las variables medidas durante el experimento 3. ASR, restricción de sueño aguda; CSR, restricción de sueño crónica; PPD, día de postparto.

7. Discusión

En el presente trabajo se evaluó la relación entre el sueño y el amamantamiento; se investigó cómo diferentes metodologías de privación de sueño aplicadas a ratas lactantes afectan el comportamiento maternal y la lactancia. También se evidenciaron los efectos comportamentales, nutricionales, hormonales e inmunológicos de la adición de restricción de sueño aguda o crónica a las alteraciones del sueño maternas intrínsecas al postparto.

Los principales hallazgos del presente trabajo incluyen una correlación positiva entre el tiempo que permanece la rata madre en la mayoría de las etapas del sueño y el tiempo que invierte amamantando a sus crías, no observándose dicha correlación con las eyecciones de leche ni con la cantidad de leche eyectada. Asimismo, se evidenció que las madres fueron capaces de eyectar leche a pesar de estar privadas de sueño; y que el comportamiento maternal, las eyecciones de leche y la cantidad de leche eyectada se vieron más afectados cuando la privación de sueño ocurrió con GH. Por otro lado, se evidenció que la restricción de sueño crónica produjo deficiencias en los comportamientos maternos y fluctuaciones en la cantidad de leche eyectada; mientras que la restricción de sueño aguda generó una disminución del contenido proteico de la leche. Asimismo, se evidenció que, si bien la restricción de sueño no afectó los parámetros inmunológicos y hormonales maternos analizados, sí se vieron afectados los parámetros humorales y celulares en las crías.

7.1. El sueño y el amamantamiento correlacionaron a nivel comportamental

Los resultados indican que, a mayor tiempo en sueño, mayor es el tiempo dedicado al amamantamiento. Esta relación positiva entre el tiempo total que la rata madre invierte durmiendo y amamantando es consistente con trabajos previos de nuestro laboratorio, en donde se reportó que las ratas madre duermen mientras amamantan^{88,101}. Estos comportamientos comparten características comunes que facilitan su ocurrencia: el animal debe permanecer tranquilo, encontrar una postura cómoda o característica^{2,187}, una temperatura adecuada (tanto en su entorno o en el nido^{187,188}), así como bajos estímulos externos para permitir el sueño¹⁸⁹ y probablemente también para permitir la lactancia. En este sentido, la succión de las crías estimula a la madre a permanecer en el nido y adoptar posturas de amamantamiento, típicamente inhibiendo todos los comportamientos activos^{187,190}. Por lo que, se hipotetiza que la estimulación sensorial de las crías al succionar promueve las condiciones que facilitan ambas conductas.

En base a la literatura existente, la cual describe que las eyecciones de leche en la rata solo ocurren después de un período de sueño NREM¹¹⁹⁻¹²¹, la hipótesis planteada fue que la ocurrencia de eyecciones debería aumentar si las ratas madres invierten más tiempo en sueño NREM. Sin embargo, no se encontró ninguna correlación entre las etapas del sueño con la cantidad de leche eyectada ni con el número de eyecciones de leche. Interesantemente, tampoco se evidenció una correlación entre el tiempo de amamantamiento y el cambio de peso de las crías, ni con los eventos de eyecciones de leche, lo que sugiere que un aumento en el tiempo de amamantamiento como comportamiento no implicaría necesariamente más cantidad de leche eyectada. Esto es consistente con el hecho de que la lactancia trasciende la nutrición, proporcionando también cuidado, calor y contención a las crías^{87,191-194}, lo que conlleva a plantear la idea de que existiría un ensamble comportamental entre el sueño y el amamantamiento, pero no necesariamente nutricional. Los resultados obtenidos pusieron en cuestionamiento lo descrito en la literatura acerca de que la falta de sueño podría generar una ausencia de eyecciones lácteas¹¹⁹⁻¹²¹, generando el planteamiento del segundo experimento.

7.2. Ambas intervenciones, *gentle handling* y *deep brain electrical stimulation*, fueron efectivas para privar de sueño

Se logró con éxito la privación de sueño, tanto mediante las tres horas con GH y DBES en el experimento 2, como las seis horas con DBES en el experimento 3, presentando en ambos casos mínimas entradas al sueño. Específicamente, durante los periodos de privación de sueño, los episodios de NREM correspondieron principalmente a LS y no se llegó a alcanzar el sueño REM. En la literatura se describe que pueden ocurrir episodios de sueño utilizando la mayoría de las metodologías de privación disponibles^{135,195-197}. Por ejemplo, Everson¹⁹⁸ evidenció un 10% de sueño al privar a ratas con plataformas rotatorias; mientras que Onk y colaboradores¹³⁵ observaron cerca de un 3% de sueño NREM durante sus procedimientos. En el experimento 3, tampoco se evidenciaron cambios en los porcentajes de cada estado durante el periodo de restricción de sueño, indicando que la metodología continúa siendo funcional a lo largo de las seis horas de registro.

Trabajos previos han demostrado mayores cambios tras la privación de sueño a los observados en el presente estudio, con aumentos del SWS y REM durante el periodo de recuperación de sueño^{135,199,200}. En particular, Onk y colaboradores¹³⁵ observaron un rebote de SWS y REM tras seis horas de privación de sueño utilizando GH en comparación con DBES autoadministrado, aunque evaluaron períodos de recuperación de sueño más prolongados de los analizados en el presente trabajo. Los datos del presente trabajo sugieren que media o una hora no son suficientes para detectar la recuperación de sueño, ya que la rata lactante podría requerir más tiempo debido al cuidado de las crías. Por ello, no puede descartarse que, con un análisis más extenso, se hubiera observado un rebote. Tampoco se analizó la potencia de las ondas

lentas durante la recuperación, por lo que tampoco es posible descartar que, si bien no se observaron cambios en los tiempos totales de sueño, tal vez se trate de un sueño más profundo. Dentro de los objetivos a futuro se encuentra indagar más en este aspecto. Pese a lo discutido, cabe mencionar que Tóth y colaboradores ¹⁰⁰ evidenciaron que, tras cuatro horas de privación de sueño mediante GH a hembras lactantes y ciclantes, prácticamente no hay recuperación de sueño en las 20 horas siguientes a la privación durante el postparto, mientras que en hembras ciclantes sí lo hay. Lo que los autores discuten coincide con lo planteado en este trabajo, y es que tal vez no se observa una recuperación de sueño debido a la presencia de las crías, representando un estímulo muy fuerte para la madre, la cual dedicaría más tiempo a cuidar de la camada que a dormir. Dentro de los estudios a futuro, se planea realizar experimentos de privación evaluando la recuperación del sueño con y sin la presencia de la camada.

En el experimento 2, en el grupo CWOP se observó un aumento en los valores de vigilia durante el período de recuperación de sueño en comparación con los demás grupos. Asimismo, este grupo presentó más tiempo en LS y menos tiempo en SWS en comparación con GH y DBES. El hecho de que la madre estuviera separada de las crías durante tres horas conllevó a que, durante el periodo de recuperación de sueño (que a su vez fue su reencuentro con la camada), ésta dedicara más tiempo al cuidado activo de las crías, evidenciado por el aumento del tiempo de comportamientos maternos activos durante dicho período, lo que resultó en un aumento del tiempo en vigilia.

7.3. La privación de sueño generó déficits en los comportamientos maternos

Utilizando ambas técnicas de privación de sueño en el experimento 2, observamos que la mayoría de los comportamientos maternos se vieron fragmentados durante el periodo de privación en comparación con el CWP, sugiriendo un cuidado inadecuado de la progenie. Sin embargo, la fragmentación fue mayor con GH en comparación con DBES. Estas diferencias no afectaron el período de recuperación de sueño, lo que sugiere que dichas alteraciones no serían críticas.

Tomando todo en conjunto, se considera que la hipótesis de que la falta de sueño no sería un impedimento para las eyecciones de leche, pero que la metodología empleada para privar de sueño determinaría los efectos observados, y que la restricción de sueño con GH podría generar alteraciones en el comportamiento materno que no serían evidenciadas con DBES, fue confirmada. La técnica de DBES permitió que las ratas madre presentaran la mayoría de los valores indistinguibles de los valores de CWP a lo largo de toda la sesión experimental. Por el contrario, los distintos parámetros maternos durante GH se asemejan más a cuando las madres estuvieron sin las crías (CWOP), sugiriendo que, durante la privación con GH, las ratas no serían capaces de amamantar adecuadamente. Por lo tanto, pese a que DBES incluye la implantación de un electrodo profundo y la estimulación eléctrica constante, sumado a que genera ciertas alteraciones en la lactancia, igualmente parece ser una opción menos deletérea que el GH para privar de sueño a ratas durante el postparto. A partir de los resultados obtenidos tras una privación aguda de tres horas, surge la interrogante sobre los efectos de una restricción de sueño más prolongada.

En el experimento 3, la mayoría de las deficiencias en el comportamiento materno se observaron hacia el final de los días de restricción de sueño con CSR. Asimismo, se evidenció una relación lineal negativa significativa entre los comportamientos maternos y el número de días de privación, sugiriendo que las deficiencias en los comportamientos maternos se incrementan en función de la cantidad de días de restricción de sueño recibidos. Es de amplio conocimiento que la privación de sueño conlleva déficits en el rendimiento motor y deterioro cognitivo tanto en humanos ^{23,201-206} como en ratas ²⁰⁷. Por lo que, a pesar de tener la oportunidad de recuperarse entre sesiones, la deuda de sueño se acumula a lo largo de los días de restricción crónica, al igual que los déficits cognitivos y de rendimiento ²⁰⁸⁻²¹⁰. En el diseño experimental de

este trabajo, aunque se permitió que la madre recuperara el sueño durante 18 horas después de cada sesión de privación, ciertos comportamientos maternos se vieron alterados hacia el final de los días de restricción. Estos resultados sugieren que cinco días de restricción generan una acumulación de deterioro cognitivo que conduce a déficits en el comportamiento materno con el paso de los días. Esto es apoyado por los resultados previamente discutidos de Tóth y colaboradores ¹⁰⁰, ya que durante el postparto prácticamente hay recuperación de sueño en las horas siguientes a la privación. Los déficits maternos podrían deberse a una menor capacidad para percibir y comprender con precisión las señales de las crías, junto con una disminución en la habilidad de responder de manera adecuada. En este sentido, efectos similares han sido documentados en humanos ¹⁰⁹, probablemente como consecuencia de déficits en la memoria de trabajo, la atención y/o las funciones ejecutivas ^{32,109,211,212}.

Si bien existe una acumulación de carencias en el desempeño materno hacia el final de la restricción de sueño crónica, la madre continuó cuidando a las crías, aunque en menor medida. Este deterioro podría afectar distintos aspectos de la fisiología de las crías en la adultez. Se ha evidenciado que más lamidos y amamantamiento materno se correlaciona con una menor expresión de ARNm de la hormona liberadora de corticotropina, una mayor retroalimentación negativa de los glucocorticoides y una reducción de las respuestas al estrés en la adultez de las crías, y que estos comportamientos se transmiten entre generaciones, heredándose también frente a madres adoptivas ²¹³. Por lo tanto, una disminución en los lamidos debido a la restricción de sueño durante el desarrollo de la progenie podría presentar consecuencias en la adultez. En futuros experimentos se planea explorar este aspecto.

Curiosamente, el lamido corporal se vio alterado desde el primer día de privación (PPD5) en el grupo de restricción de sueño crónica, pero no en el primer (y único) día de privación en el grupo de restricción de sueño aguda (PPD9). Se hipotetiza que esta diferencia podría deberse al nivel de desarrollo de las crías o a la experiencia materna. Sin embargo, no es posible descartar que el estrés generado por la restricción de sueño en el primer día de la sesión experimental (en el grupo de restricción de sueño crónica) haya sido mayor que el mismo procedimiento realizado después de cuatro días de adaptación a la manipulación (en la restricción de sueño aguda). Para resolver esto sería necesario implementar un protocolo diferente.

En cuanto al tiempo que la madre dedicó a las crías después de la restricción de sueño, no se encontraron diferencias entre grupos en el tiempo de amamantamiento ni en el tiempo de *hover over*. Asimismo, el tiempo invertido fuera del nido tampoco cambió. Tampoco se encontró un efecto acumulativo de la restricción de sueño a lo largo de los días en estas variables. Por lo que, si bien los comportamientos maternos se ven afectados, parecería que el tiempo que le dedica activamente a las crías se mantiene.

Estos resultados respaldan la hipótesis planteada, de que la restricción de sueño de la madre durante el postparto impacta sobre el cuidado de las crías, y los efectos dependen del tiempo de la intervención (restricción crónica o aguda).

7.4. La cantidad de leche se vio afectada por la restricción de sueño, dependiendo de la metodología empleada y de los días de restricción

En el experimento 2, aunque se registraron eyecciones en la mayoría de las madres, se redujeron considerablemente durante el período de privación de sueño mediante GH, incluso tres de las ocho madres analizadas no presentaron eyecciones, lo que resultó en un aumento compensatorio durante el período de recuperación de sueño. En particular, tanto la frecuencia de las eyecciones de leche como el peso de la camada disminuyeron en comparación con el CWP durante la privación de sueño con GH, lo que sugiere una reducción en la cantidad de leche transferida a las crías. Esta disminución concuerda parcialmente con la literatura existente, que indica que las eyecciones de leche deben ser precedidas por un episodio de sueño NREM ¹¹⁹⁻¹²¹, y que la privación de sueño previene las eyecciones de leche ¹²¹. Sin embargo, mientras que

Voloschin y Tramezzani ¹²¹ privaron de sueño a las ratas madre durante 30 minutos utilizando dicha técnica, en el presente estudio se extendió el período de privación de sueño a tres horas y se utilizaron diferentes procedimientos para privar. Esta diferencia en la duración del procedimiento podría explicar la discrepancia relativa entre los resultados actuales con GH y la literatura existente. En este sentido, períodos prolongados de estrés tienden a generar habituación al mismo ²¹⁴, por lo que, considerando la privación de sueño como una situación estresante en sí misma ²¹⁵⁻²¹⁷, y al GH como una metodología particularmente estresante ¹³⁴, tal vez períodos más largos de privación es lo que permiten que ocurra igualmente la eyección de leche por habituación, tanto a la falta de sueño como al estímulo empleado para generarla.

Contrario al procedimiento de GH, los parámetros de eyección de leche no mostraron diferencias durante la privación de sueño usando DBES respecto al CWP. Estas diferencias entre las metodologías de privación ponen en cuestionamiento si el concepto de que el sueño es un requisito previo para la eyección de leche en las ratas madre es preciso. En este sentido, aunque la privación de sueño mediante GH es una metodología ampliamente utilizada, se basa en estímulos físicos repetidos para prevenir el sueño, los cuales podrían ser potencialmente aversivos para las madres al cuidado de sus crías ^{135,137,218}. Otras metodologías, como las plataformas rodeadas de agua o la presentación de estímulos novedosos, no son compatibles con la presencia de las crías, ya que estas podrían caer al agua o se podría afectar la interacción madre-cría por la intervención constante. En contraste, la DBES permite la privación de sueño sin interferencias adicionales en la diada madre-cría. Por lo que, como se mencionó previamente, si bien es necesaria la cirugía estereotáxica, la anestesia y la estimulación eléctrica, igualmente parece ser una metodología más adecuada para privar de sueño durante el postparto en comparación a la estimulación táctil con un pincel.

En el experimento 3, al igual que lo evidenciado en el experimento 2, un solo día de restricción de sueño con DBES no afectó la cantidad de leche eyectada. Sin embargo, en el grupo de privación crónica, el peso de la camada disminuyó entre los PPD6-7 y pareció recuperarse posteriormente. Dentro de los posibles mecanismos involucrados, se hipotetiza que la deuda de sueño debida a la restricción crónica del mismo podría estar causando alguna alteración endocrina ^{219,220} que, tras la habituación a este procedimiento, podría regresar a niveles cercanos a los basales, llevando a una reducción en la cantidad de leche eyectada solo a mitad de los días de restricción. Para indagar más sobre los posibles mecanismos involucrados, se podría analizar en sangre materna el nivel de las hormonas que participan directamente en la síntesis y eyección de la leche (prolactina y oxitocina) durante cada día de restricción de sueño. Asimismo, varios estudios han demostrado una correlación entre el estrés materno con la producción y la eyección de leche ²²¹⁻²²⁵, pero los efectos estresantes específicamente asociados a la restricción de sueño en relación con la eyección de leche han sido poco estudiados. En este sentido, en madres humanas, una menor calidad del sueño se correlaciona con un menor volumen de leche eyectada y con un mayor nivel de estrés materno percibido durante el primer mes posparto ¹¹¹. Por lo tanto, también sería interesante determinar durante cada día de restricción el nivel de hormonas involucradas en la respuesta al estrés como la corticosterona.

Por otra parte, en el grupo de restricción crónica de sueño, evidenciamos una correlación negativa entre el comportamiento de beber agua de la madre durante la última media hora de la sesión experimental y el peso de las crías en el PPD9. Esto presenta una contradicción a nivel nutricional, dada la relación de dependencia que presenta la lactancia de la hidratación ²²⁶, sin embargo, tiene sentido a nivel comportamental, ya que al estar realizando otras tareas fuera del nido, amamanta menos a las crías y, por tanto, eyecta menos leche. No se descarta la posibilidad de analizar el comportamiento de tomar agua durante las 6 horas de privación, ya que podría ser diferente al observado durante la media hora de recuperación. También hubiera sido interesante medir la cantidad de agua consumida y no únicamente el comportamiento.

7.5. La restricción de sueño aguda disminuyó el aporte proteico de la leche

Se evidenció que un único período de seis horas de restricción de sueño en el PPD9 redujo el contenido de proteínas de la leche, siendo este el primer estudio en demostrar que la falta de sueño afecta la composición de la leche¹⁷⁸. Recientemente, estos efectos fueron también observados en humanos¹¹⁸. Varios trabajos han evidenciado que tanto el estrés físico como el mental afectan la composición de la leche, no solo durante el período posparto^{181,223,227-229}, sino también durante el embarazo^{225,230,231}. En este último caso, el estrés prenatal se ha asociado con una mayor cantidad de leche eyectada, una duración más prolongada de la lactancia exclusiva^{225,230} y un aumento en la cantidad de ácidos grasos de cadena corta en la leche²³¹.

Particularmente durante el período posparto en vacas, el estrés térmico produce una disminución en la producción de leche y en su contenido de proteínas, especialmente de caseína^{223,227,232}. En humanos, se ha observado que madres con un mayor nivel de estrés percibido presentaron un mayor aporte de los aminoácidos que forman parte de las proteínas de la leche (no así de aminoácidos libres), luego de un mes posparto, aunque no se conocen las implicancias fisiológicas de estas diferencias²³³. Por su parte, Chiba et al.¹⁸¹ demostraron un aumento en los niveles de noradrenalina y una disminución de β -caseína en la leche de ratones estresados. Además, observaron que el tratamiento con noradrenalina reduce la expresión de β -caseína en células epiteliales mamarias humanas¹⁸¹. Dado que la activación simpática autónoma y el aumento en la liberación de noradrenalina son consecuencias de las alteraciones del sueño⁴¹, se plantea la hipótesis de que la activación simpática inducida por la restricción de sueño aguda podría ser responsable de la reducción en el contenido de proteínas en la leche. Por otro lado, Ruan et al.¹¹⁴ no encontraron una correlación entre los macronutrientes en la leche materna y la duración del sueño en humanos durante los meses 2-4 ni 5-7 postparto, lo que sugiere que la cantidad de sueño no parece afectar la composición nutricional de la leche. Sin embargo, Yang y colaboradores¹¹⁸ evidenciaron en humanos que las alteraciones del sueño se correlacionan con una menor concentración de α -lactoalbúmina, osteopontina y κ -caseína en la leche durante el postparto temprano (día 42), pero no al tercer mes de postparto. Como se discutió anteriormente, la habituación a los efectos estresantes de la restricción de sueño podría permitir el mantenimiento de una nutrición adecuada para las crías.

Además de los aspectos nutricionales, la leche materna es también una fuente de componentes bioactivos, entre ellos los que tienen actividad inmunológica como los anticuerpos que forman parte de la fracción proteica de la fase acuosa^{234,235}. El aporte de anticuerpos pueden variar según diversas condiciones psicoemocionales maternas; en este sentido, se ha evidenciado en humanos una correlación negativa entre la IgA presente en la leche materna y estados de ansiedad, depresión, tensión y fatiga^{229,236}. En el presente trabajo, se observó una correlación positiva significativa entre el contenido de IgG de la leche y el contenido proteico de la misma en el grupo control, sin embargo, dicha correlación se pierde frente a la restricción de sueño. Esta falta de correlación, sumado a que no se observaron cambios significativos en la concentración de IgG en leche luego de la privación, sugiere que pueden existir cambios cualitativos en la composición de la leche que involucren a otras proteínas.

Teniendo en cuenta esto, se hipotetiza que la falta de sueño está generando cambios no solo en la cantidad, sino también en el tipo de proteínas que llegan a la leche. Asimismo, como continuación del proyecto, se está llevando a cabo un análisis transcriptómico de la glándula mamaria, que nos podría eventualmente guiar en los parámetros fisiológicos que podrían estar cambiando y poder caracterizar en forma precisa qué proteínas en la leche están siendo modificadas frente a la restricción de sueño.

Asimismo, dada la relación entre la lactancia y la hidratación, así como la sensibilidad del tejido mamario a los cambios en la osmolaridad^{226,237,238}, no se descarta la posibilidad de que los cambios en la composición

de la leche puedan estar relacionados con la reducción del consumo de agua observada después de la restricción de sueño aguda durante la última media hora de registro, si bien no se observó una correlación entre estas variables. Además, como se discutió previamente, para obtener una mejor aproximación a las variaciones en la hidratación materna se podría medir el consumo de agua total utilizando mamaderas graduadas, así como evaluar el comportamiento de ingesta de agua durante las seis horas de privación. Esto será tenido en cuenta para futuros experimentos.

Por otra parte, se evidenció una correlación positiva entre la oxitocina en suero materno y las proteínas lácteas, tanto en el grupo control como después de la restricción de sueño aguda, lo que podría sugerir que la oxitocina podría estar involucrada en los cambios en la composición de la leche observados después de la privación. En este sentido, no hay suficiente literatura disponible sobre los efectos de la oxitocina endógena en el contenido proteico^{239,240}, pero la administración de oxitocina induce cambios en la concentración de proteínas de la leche en función de la dosis utilizada^{239,241,242}. Particularmente en vacas, la administración de oxitocina durante la lactancia produce una disminución de la caseína y otras proteínas del suero, como inmunoglobulinas, albúmina sérica, y lactoalbúminas²³⁹.

Teniendo en cuenta estos resultados, se confirma la hipótesis de que la restricción de sueño modifica la composición nutricional de la leche materna, lo cual podría tener impacto en su valor nutricional y/o sobre la fisiología de la cría, si disminuyeran proteínas con valor funcional.

7.6. La restricción de sueño aguda o crónica no se asoció a cambios significativos en los niveles maternos de oxitocina y corticosterona

No se evidenciaron cambios significativos en los parámetros hormonales maternos después de la restricción de sueño aguda o crónica. En cuanto a los niveles de oxitocina, hay poca información disponible sobre su relación con el sueño. Schuh-Hofer y colaboradores⁵⁰ evidenciaron en mujeres un aumento en la concentración plasmática de oxitocina después de una noche de privación total de sueño. Por otro lado, el tratamiento con oxitocina provoca en ratas hembra y macho un retraso en el inicio del sueño y promueve la vigilia tranquila a expensas de suprimir la vigilia activa, el sueño NREM y REM^{243,244}. Sin embargo, a pesar del papel crucial de la oxitocina durante la lactancia, ninguno de los estudios publicados se realizó en hembras en etapa posparto, por lo que se requiere más investigación en esta área. Dado que los niveles de oxitocina en la hembra durante la lactancia son sustancialmente diferentes, tanto en el patrón de liberación como en sus concentraciones²⁴⁵⁻²⁴⁷, posiblemente su relación con el sueño pueda ser diferente a los hallazgos que existen en la literatura.

En cuanto a la concentración de corticosterona, las alteraciones del sueño suelen estar asociadas con un aumento en la actividad del eje hipotalámico-pituitario-adrenal, lo que lleva a un incremento en los niveles circulantes de hormonas del estrés^{43,44,248}. Sin embargo, en humanos, una restricción crónica del sueño de 5-6 horas por noche durante una semana parece no alterar la liberación de corticosteroides^{249,250}, lo cual es consistente con las observaciones del presente trabajo en rata. En este caso, se aplicó una restricción leve del sueño, permitiendo que las madres durmieran sin interrupciones durante las 18 horas restantes de cada día. Esto podría haber generado un escenario menos severo y, probablemente, haber dado lugar a efectos más sutiles. Asimismo, debido a las diversas mediciones que se planificaron realizar, se decidió en el diseño del protocolo experimental que las extracciones se realizaran luego de obtener las muestras de leche, generando que el animal fuera manipulado por 40 minutos bajo anestesia antes de obtener la muestra. Esto pudo generar un aumento de la liberación de corticosterona de forma aguda, enmascarando las variaciones entre grupos. Pese a ello, los resultados concuerdan con valores evidenciados previamente en la bibliografía²⁵¹. Para medir en forma más precisa la respuesta al estrés, se debería haber extraído las muestras de sangre inmediatamente luego de anestesiar al animal, así como haber realizado

otras mediciones de parámetros de estrés, como medir hormona liberadora de corticotropina y noradrenalina. Además, para evaluar los cambios en los niveles de estrés a través de la corticosterona, sería más adecuado someter al animal a alguna situación de estrés luego de la restricción de sueño ⁴⁵. Sin embargo, esto también involucraría otro tipo de protocolos que eran incompatibles con los objetivos planteados.

En cuanto a los niveles de prolactina, debido a limitaciones metodológicas, no fue posible cuantificar esta hormona en el suero de todas las ratas. Esto se debió a que el kit de ELISA utilizado no logró la sensibilidad requerida para detectar esta hormona en todas las muestras, aunque no es posible descartar la posible degradación de las mismas. En este sentido, dentro de los objetivos para el futuro próximo se encuentra la realización de nuevos ensayos con otras técnicas, como análisis multiparamétricos con citometría de flujo Multiplex y/o ELISAs de ultra sensibilidad.

7.7. La restricción de sueño materno alteró los niveles de anticuerpos séricos en las crías, sin modificar los parámetros inmunológicos maternos en sangre

No se evidenciaron cambios en la concentración de inmunoglobulinas e interleuquinas maternas frente a la restricción de sueño. Respecto a la ausencia de cambios en la concentración de IgG total e IgG2a en suero materno, cabe mencionar que la información sobre los efectos del sueño en el sistema inmune humoral es muy escasa, con resultados controversiales y abarcando condiciones que no se corresponden con el periodo postparto ⁵⁹.

En este sentido, se demostró que la privación total de sueño en humanos durante 24 horas produce un aumento de IgG, IgA, IgM ²⁵². Sin embargo, otro estudio no evidenció cambios en las concentraciones de IgG, IgA e IgM frente a dos días de privación total de sueño, solamente una disminución de IgA si la privación era únicamente de sueño REM ²⁵³. En estudios en animales, específicamente en ratas macho totalmente privadas de sueño, se evidenció un aumento en los niveles de IgG, en particular de IgG2a, así como de IgM e IgA ¹⁹⁸, pese a que la mayoría de los cambios se observaron recién a partir del décimo día de privación.

En este sentido, se considera que la ausencia de cambios en el presente trabajo pueda deberse por un lado al protocolo empleado, en donde seis horas de restricción de sueño por uno o cinco días podrían no ser suficientes para generar efectos significativos en las madres. Resulta de vital importancia evidenciar que restricciones más sutiles que las empleadas clásicamente en los laboratorios no generan cambios en los anticuerpos estudiados, ya que estos resultados podrían reflejar de manera más ajustada lo que sucede en los humanos, donde difícilmente se produzca una privación total de sueño y aún más por más de un día. Por otra parte, tal vez estas diferencias puedan atribuirse a la propia fisiología de la hembra durante la maternidad. Dado que no se han estudiado estos parámetros durante el período postparto, los resultados también podrían sugerir que el umbral para el cambio en la expresión y/o secreción de los anticuerpos luego de una privación de sueño podría ser más elevado. En este sentido, según la evidencia disponible, este es el primer trabajo que estudia los efectos de la falta de sueño en la concentración de anticuerpos de las madres durante el postparto.

Por otra parte, tampoco se evidenciaron cambios en la concentración sérica materna de las interleuquinas proinflamatorias medidas, IL-6 e IL-17A. La IL-6 es una citoquina asociada a la duración y calidad del sueño, presentando un pico de secreción junto con el inicio del sueño y un rol promotor del mismo ^{59,254-257}. La privación total de sueño o la privación selectiva de REM genera un incremento en la secreción de esta interleuquina ²⁵⁷⁻²⁶⁰. En este sentido, Hu y colaboradores ²⁶¹ evidenciaron en ratones un aumento de la

IL-6 después de 36 horas de privación total, así como el aumento de otros factores humorales proinflamatorios como la IL-1, el TNF- α ; mientras que Yehuda y colaboradores²⁶⁰ demostraron que, en ratas macho, la privación de sueño REM por 72 horas aumenta tanto la IL-6, como la IL-17A, además de la IL-1 y TNF- α .

En relación a la etapa postparto, se evidenció que no hay diferencias significativas en las concentraciones de IL-6 entre mujeres con o sin insomnio¹³⁰, pero cinco o menos horas de sueño por día y menor calidad de sueño durante este período se asocia a niveles elevados de esta citoquina^{131,262}. Por lo que, se considera que las diferencias con los resultados del presente trabajo podrían atribuirse al protocolo empleado que, como fue discutido previamente, consiste en aplicar sólo seis horas de restricción de sueño, permitiéndoles una recuperación de 18 horas entre sesiones durante la restricción crónica.

Por último, cabe aclarar que el objetivo de evaluar los niveles de IL-6 e IL-17 se basó en que además de tener efectos proinflamatorios, participan en la respuesta inmune adaptativa. También sería de interés cuantificar citoquinas con un mayor potencial proinflamatorio como son la IL-1 y TNF- α , que también se ven alteradas con el sueño^{53,58,61}, ya que tal vez presenten una respuesta diferente a la restricción.

Por otra parte, pese a no haber evidenciado cambios en la concentración de IgG sérica materna, ni en la leche, se observó una disminución de la IgG en el suero de las crías macho de madres que fueron sometidas a restricción aguda de sueño. Al día de hoy, no hay reportes previos que demuestren cambios en la concentración de anticuerpos en crías de madres privadas de sueño. Sin embargo, existe información sobre los efectos del estrés materno en la respuesta inmunológica sérica de las crías^{263,264}. En ratas, el estrés materno prenatal produce una disminución de la IgG en las crías²⁶³. Teniendo en cuenta que la privación de sueño es una situación estresante en sí misma²¹⁵⁻²¹⁷, se considera que alguno de los cambios evidenciados en los parámetros maternos frente a la restricción aguda pueda estar influenciando de forma selectiva a las crías, así como otros parámetros que no se determinaron.

Específicamente, se hipotetiza que la disminución del contenido proteico en leche luego de la privación aguda de sueño podría estar reflejando algún cambio en la inmunidad transferida. Pese a que no se evidenció una correlación entre el contenido proteico total de la leche y la IgG de las crías, no es posible descartar que sea la variación de alguna otra proteína bioactiva la que esté mediando este efecto, actuando como regulador de la concentración de IgG en la progenie. Por ejemplo, impactando en el transporte de IgG de la leche a la sangre a través de la pared intestinal²⁶⁵, ya que en el PPD9 la producción autónoma es mínima y la IgG sérica deriva en gran parte de la leche¹⁵⁷. Interesantemente, solo se evidenció una correlación positiva entre la IgG en leche y la IgG en suero de las crías en el grupo control. En contraste, estas correlaciones no se observaron en los grupos con restricción aguda o crónica, lo que sugiere que la privación de sueño podría estar afectando el transporte de la IgG de la leche a la sangre.

En cuanto a las diferencias observadas entre hembras y machos respecto a los niveles de IgG, está reportado que las crías presentan diferencias en las respuestas inmunológicas fisiológicas en función de su género²⁶⁶⁻²⁷⁰. En paralelo, es de amplio conocimiento que las ratas madre actúan de manera desigual con sus crías machos y hembras, por ejemplo, invierten más tiempo lamiendo a la cría macho que a la hembra^{271,272}. Por lo tanto, una posible explicación a estos efectos inmunológicos podría ser el comportamiento maternal diferencial según el sexo de las crías. Si bien no se observaron diferencias significativas en el cuidado maternal total, ni en los lamidos corporales y anogenitales en el grupo de restricción de sueño aguda respecto al control, se observó una tendencia significativa a la disminución de estos comportamientos en función de la cantidad de días de restricción recibidos. Si bien el análisis estadístico de los niveles de IgG entre machos y hembras no reveló diferencias significativas, la disminución de IgG por

restricción de sueño materna no fue evidenciada en las crías hembra, sugiriendo una mayor susceptibilidad en los machos a la falta de sueño de su madre, ya sea por tener mayor sensibilidad o por una reducción específica en el lamido de los machos. Por lo tanto, sería interesante evaluar el comportamiento maternal luego de una restricción de sueño aguda y crónica teniendo en cuenta el sexo de las crías. Asimismo, los cambios en el comportamiento materno evidenciados corresponden a la última media hora de la sesión experimental, por lo que sería interesante evaluar el comportamiento materno durante el periodo de restricción de sueño.

Por último, desde el punto de vista de la fisiología del transporte de anticuerpos desde la leche a la sangre en el intestino delgado, es interesante considerar que está involucrado el receptor neonatal para la región Fc de las IgG (FcRn) y que su expresión es regulado por hormonas como algunos corticosteroides, cuyos niveles podrían variar dependiendo del sexo de la cría ^{265,273}. Estudiar el nivel de expresión de este receptor en el tejido intestinal de las crías podría contribuir a dilucidar los mecanismos implicados.

7.8. El recuento de leucocitos totales y linfocitos fue afectado en las crías de madres sometidas a restricción crónica de sueño, en ausencia de alteraciones maternas

No se observaron cambios frente a la restricción de sueño en los parámetros hematológicos maternos, ni diferencias significativas entre los grupos en el recuento celular total ni en el relativo de las poblaciones de leucocitos, ni en los parámetros asociados a los eritrocitos y plaquetas. En este sentido, se ha reportado en hombres que la restricción de sueño a cuatro horas por día durante tres a cinco días altera la composición sanguínea de glóbulos blancos, aumentando la carga de neutrófilos, monocitos y linfocitos ²⁷⁴⁻²⁷⁶. En ratas macho, la restricción de sueño por 18 horas diarias durante 21 días genera una disminución en el conteo leucocitario total, debido a una disminución en la carga linfocitaria ²⁷⁷. Pese a la información disponible sobre los efectos en hombres y machos, prácticamente no hay literatura disponible sobre los efectos de la falta de sueño en estos parámetros en hembras de ninguna especie, y mucho menos durante el postparto. Gröer y colaboradores ¹¹⁵ correlacionaron los índices de somnolencia, fatiga e infección obtenidos mediante cuestionarios, y reportaron que madres con mayores niveles de somnolencia y fatiga presentan más síntomas de infección, aumentando dichos síntomas también en sus hijos. Sin embargo, no hay reportes directos sobre los cambios en la cantidad y/o proporción de glóbulos blancos frente a la falta de sueño.

Estos antecedentes llevan a plantear la hipótesis de que tal vez las diferencias evidenciadas en nuestro trabajo puedan deberse a la fisiología particular del periodo de postparto, durante el cual las madres serían capaces de adaptarse a una alteración adicional de sueño, ya sea presentando un umbral mayor para las variaciones leucocitarias luego de una privación de sueño, o bien pudiendo recuperarse rápidamente en las 18 horas sin restricción. Teniendo en cuenta que las alteraciones del sueño son una característica intrínseca a la maternidad, presentar un estado proinflamatorio persistente debido a la falta de sueño no sería beneficioso para la madre ni para la cría.

Sin embargo, pese a no evidenciar cambios maternos, se observó un aumento en el recuento absoluto de leucocitos totales, y en particular de linfocitos, en la sangre de las crías. Particularmente, tanto las crías macho como hembra de madres que fueron sometidas a la restricción de sueño crónica presentaron un mayor número de linfocitos en comparación con el grupo control. Junto con ello, se evidenció una relación lineal positiva significativa entre los días de intervención a los que fueron sometidas las madres y los recuentos linfocitarios de su progenie; sugiriendo un impacto acumulativo de los días de restricción de sueño materno sobre la función inmune de las crías.

No hay literatura previa que demuestre los efectos de la privación de sueño materna en los parámetros hematológicos de las crías, aunque existen trabajos que describen los efectos del estrés maternal sobre

dichos parámetros en el periodo prenatal²⁷⁸⁻²⁸³. En este sentido, la mayoría de los artículos publicados, independientemente de la especie estudiada (humanos, ratas o chanchos), reportan una disminución en los linfocitos de las crías en función del estrés materno durante la preñez, en particular de la población de linfocitos T CD4²⁷⁸⁻²⁸². En contraste, un trabajo describió un efecto proinflamatorio en las crías de ratas madre que fueron sometidas a estrés durante la preñez, observando un aumento de los linfocitos circulantes durante la adultez de las crías²⁸⁴. En este sentido, si bien no se encontraron diferencias entre los niveles de corticosterona materna entre los grupos experimentales, es llamativa la correlación positiva entre la corticosterona sérica materna y la concentración de linfocitos en la sangre de las crías. Estos resultados pueden sugerir un posible impacto del estrés materno sobre el sistema inmune de las crías. Sería interesante determinar los niveles de hormonas en el suero de las crías, lo cual permitiría indagar más sobre esta hipótesis.

Por otra parte, en condiciones de homeostasis, se ha reportado que el sueño tanto en mujeres como en hombres promueve selectivamente la migración de linfocitos T hacia los ganglios linfáticos (*homing*)^{70,79}, favoreciendo la residencia de estas células en los tejidos linfoides para desempeñar su función durante el reposo^{59,70,285}. En cambio, la privación de sueño afecta la expresión de moléculas de adhesión de los linfocitos involucradas en la migración a los tejidos, disminuyendo su capacidad migratoria y aumentando su concentración en sangre^{79,286}. En este sentido, Martínez-Albert et al.⁷⁹ demostraron que el sueño incrementa la migración de células T dirigida por CCL19, una quimiocina esencial para el tráfico de linfocitos²⁸⁷, y que esta migración es promovida por la hormona del crecimiento y la prolactina⁷⁹. Dado que estas hormonas son afectadas por la falta de sueño^{46,47,49}, la restricción crónica materna podría estar impactando sobre la migración de los linfocitos de las crías a través de mediadores transferidos por la leche, que podrían ser alguna de estas hormonas u otros^{288,289}.

7.9. Se necesitan más estudios para evaluar el efecto estresante de la restricción de sueño

No se evidenciaron cambios significativos en los niveles séricos de corticosterona entre grupos, sumado a que tampoco se evidenciaron cambios en la relación entre neutrófilos y linfocitos, tanto en madres como en crías. Clásicamente se ha medido la respuesta a eventos estresantes mediante los corticoides, en particular mediante la medición de corticosterona en roedores, ya que la exposición a estresores activa el eje hipotálamo-pituitario-adrenal culminando en la liberación de esta hormona^{290,291}. Sin embargo, debido a que los corticosteroides están influenciados por múltiples factores^{186,291,292}, su uso como marcador de estrés crónico es más complejo de determinar¹⁸⁶. En este sentido, la relación neutrófilos/linfocitos ha sido caracterizada como un posible indicador de estrés crónico¹⁸⁶. En los resultados del presente trabajo no se evidenciaron cambios en este parámetro entre los grupos, lo que sugeriría junto con lo observado para la corticosterona, que el estrés de la restricción de sueño no sería tan prominente, o al menos no estaría afectando los parámetros medidos. Sin embargo, debido a lo discutido en las secciones previas, puede asumirse que existe un factor estresante en estos procedimientos, el cual se acumula a lo largo del tratamiento. Por este motivo, podrían realizarse mediciones adicionales para evaluar dicho efecto, como la determinación de niveles de catecolaminas o de precursores y metabolitos del eje hipotálamo-pituitario-adrenal. Asimismo, se podrían realizar test comportamentales para evaluar la respuesta al estrés en las ratas madre con restricción de sueño. Por otra parte, en el marco del proyecto actualmente en desarrollo, que constituye la continuación del presente trabajo, se están evaluando posibles cambios transcriptómicos y epigenéticos en el hipotálamo de las madres y crías de estos grupos experimentales. Dichos análisis proporcionarán una guía para identificar los parámetros afectados y profundizar en los mecanismos implicados.

7.10. Consideraciones técnicas

En el presente trabajo, el número de eyecciones de leche se cuantificó de forma indirecta a través del comportamiento de *stretching* de las crías. Esto fue originalmente reportado por Vorherr et al.²⁹³, y luego descrito por Lincoln et al.¹⁷⁴ y Drewett et al.^{175,294}. Además, la cantidad de leche eyectada también fue medida de forma indirecta mediante el aumento del peso de la camada, medición que fue previamente definida por Lincoln et al.¹⁷⁴ y es ampliamente utilizada^{159,160,162,163,169,177}. Ambas medidas indirectas se emplearon para evitar procedimientos invasivos que pudieran generar estrés adicional y afectar la interpretación de los resultados.

En el grupo CWOP del experimento 2, donde las crías permanecieron separadas de su madre, se acumuló orina y heces, lo que podría haber causado un ligero aumento en el peso de la camada en la segunda medición⁸⁷. Sin embargo, esta acumulación pareció ser mínima, ya que el peso de este grupo se redujo entre la primera y la segunda medición.

La restricción de sueño mediante DBES, una metodología desarrollada por Moruzzi y Magoun en gatos¹⁴⁵ y posteriormente implementada en ratas²⁹⁵, parece ser una opción menos estresante que el GH durante el período posparto¹⁷⁰. Sin embargo, este procedimiento podría generar efectos no deseados, incluyendo impactos directos sobre los parámetros analizados. No obstante, los cambios observados fueron en el mismo sentido, pero mucho menores que empleando otras técnicas de privación del sueño como el GH¹⁷⁰. Esto sugiere que los hallazgos del presente estudio se deban a la privación de sueño en sí misma y no a la metodología empleada.

La mayoría de los estudios utilizan privación total de sueño, y en general por varios días, para evaluar sus consecuencias²⁹⁶⁻²⁹⁸. Esto desafía la fisiología del individuo de forma tal que es esperable que una gran cantidad de variables estén alteradas. Por otro lado, si bien en la sociedad actual la restricción de sueño crónica es algo habitual^{299,300}, no es muy común una privación total y menos aún por período de días. En el presente trabajo se realizó una restricción leve de sueño, permitiendo que las ratas durmieran libremente durante las 18 horas restantes de cada período de 24 horas. Este enfoque podría representar una situación menos desafiante, lo que probablemente conduzca a efectos más sutiles. Sin embargo, los resultados podrían reflejar con mayor precisión lo que ocurre de manera natural en animales humanos y no humanos. Por lo tanto, este trabajo sienta las bases traslacionales para futuros estudios en mujeres durante el postparto.

Si bien no es posible descartar posibles efectos de la anestesia y el tiempo de extracción sobre la composición de la leche, los parámetros hormonales e inmunológicos, resulta poco probable que cualquier cambio evidenciado entre los grupos pueda atribuirse a estos factores, ya que las dosis de anestesia y el protocolo temporal fueron idénticos para todas las madres en los tres grupos experimentales.

Una fortaleza de este trabajo radica en no haber utilizado inyecciones de oxitocina exógena para la extracción de las muestras de leche, dado que la mayoría de los estudios emplean oxitocina en protocolos similares^{165,166}.

Una limitante que se presentó durante la ejecución del trabajo fue la cantidad insuficiente de sangre de las crías para poder determinar en paralelo todos los parámetros en la díada madre-cría. En particular, para la determinación de hormonas se requerían volúmenes mayores a los disponibles, condicionando la selección de algunos ensayos.

Por último, si bien el número poblacional por variable es un poco reducido para los cálculos estadísticos de las matrices de correlación de Spearman, los resultados de dichas correlaciones brindan una guía hacia donde continuar con nuevos experimentos, ayudando a plantear nuevas hipótesis.

8. Observaciones finales

8.1. Conclusiones

Considerando los resultados obtenidos, se sugiere que el sueño y el amamantamiento compartirían características conductuales comunes para su generación, pero el sueño no estaría directamente involucrado en el proceso fisiológico de eyección de leche; en cambio, la rata lactante necesitaría estar en un estado de quietud o tranquilidad para poder amamantar que puede o no incluir sueño.

Se plantea que las ratas madre son capaces de eyectar leche incluso frente a la falta de sueño, aunque las características de dichas eyecciones dependen del método utilizado para la privación. Asimismo, si bien conlleva sus propios efectos adversos, la DBES constituye una mejor metodología para estudiar las consecuencias de la privación de sueño durante el período posparto en ratas.

Si bien las alteraciones del sueño son una característica común durante el período posparto^{92,95,99,101,104,151}, otros factores no relacionados directamente con la maternidad pueden ser una fuente adicional de interrupciones del sueño. En este sentido, múltiples factores que afectan el bienestar materno también regulan la lactancia y modifican la composición de la leche, incluyendo situaciones de estrés^{221,222,224,301,302}, entre las cuales la restricción del sueño podría ser una de ellas^{41,216}. Por lo que, se plantea la hipótesis de que debe existir una habituación a la restricción de sueño crónica que permita mantener la nutrición de las crías, dado que el deterioro en la lactancia parece recuperarse con el paso de los días de restricción del sueño.

Después de la restricción de sueño crónica, ciertos comportamientos maternos activos se reducen, pero no desaparecen por completo. Esto sugiere que las crías representan un incentivo altamente gratificante^{303,304} y que, bajo estas condiciones, la motivación materna podría superar la necesidad fisiológica de dormir. De esta manera, las madres lactantes con restricción de sueño serían capaces de combinar sus propias necesidades de descanso con el cuidado constante de sus crías, aunque no de manera tan efectiva como las del grupo control.

La restricción de sueño materna alteró los niveles de anticuerpos séricos y linfocitos en las crías, sin modificar los parámetros inmunológicos maternos, lo que sugiere que, aunque los efectos de la restricción del sueño en las madres parecen ser más sutiles, sus consecuencias se manifiestan de manera más pronunciada en la descendencia, siendo las crías macho particularmente susceptibles.

8.2. Las madres, ¿guerreras contra la falta de sueño?

No se evidenciaron cambios hormonales maternos, lo cual discrepa con lo evidenciado en la literatura frente a la privación de sueño para animales no lactantes^{37,38,40,48,50,113,114}. Tampoco se observaron diferencias significativas en los niveles de IL-17A e IL-6 en suero materno, lo cual también discrepa con lo evidenciado^{62-64,131,257,260,262}. Por otra parte, no se evidenciaron cambios en los parámetros hematológicos maternos, también diferente a lo reportado en la literatura sobre los efectos de la privación de sueño sobre el sistema inmune por fuera de la etapa del postparto^{73,75-77,79-81}. Sumado a ello, tampoco se evidenciaron cambios en la relación entre neutrófilos y linfocitos. Sin embargo, se evidenciaron cambios en la composición nutricional de la leche, en el comportamiento materno y en diferentes parámetros inmunológicos de las crías. Esto sugiere que habría parámetros que son capaces de adaptarse a la falta de sueño mientras que otros no.

Todo esto conduce a discutir, primero, sobre la falta de información específica para la etapa postparto. La maternidad constituye una condición fisiológica singular, por lo que comparar los resultados obtenidos con los valores observados en otras etapas de la vida, o incluso en individuos machos, no parecería ser la

opción más adecuada. Resulta imperioso que se continúe investigando durante esta etapa. Segundo, dado que todas las madres presentan algún tipo de alteración del sueño durante el postparto^{90-101,103,104}, sugiriendo una condición sumamente conservada, junto con los pocos cambios evidenciados en las variables maternas medidas en este estudio, surge el cuestionamiento de si no existirá algún tipo de adaptación a la falta de sueño durante la maternidad. La bibliografía, realizada sobre todo en base a la fisiología del macho, evidencia grandes consecuencias frente a las alteraciones del sueño; sin embargo, estos resultados sugieren que en madres esto no sería así. Por lo tanto, surgen las preguntas: ¿Es la hembra más resiliente o es el postparto específicamente? Si es específico de las madres, ¿Qué está cambiando? ¿El cerebro se está adaptando a no dormir? ¿Es debido a cambios en los circuitos motivacionales? ¿Es debido al contexto hormonal? ¿Es dependiente del contacto con la cría? ¿Se revierte en algún momento?

De acuerdo con las observaciones realizadas y los resultados de Tóth y colaboradores¹⁰⁰, los cuales muestran que durante el postparto de la rata prácticamente no hay recuperación de sueño tras la privación mientras que en las vírgenes sí la hay, surge el cuestionamiento de si es que las madres se vuelven más resilientes a la falta de sueño gracias a la motivación maternal o es que no pueden recuperar de sueño porque están con las crías^{303,304}. Postulo que tal vez exista una adaptación en los circuitos de sueño y vigilia, restableciendo los *set points* de estas variables para permitir estar más atentas al entorno, despertarse más fácil, y dormir menos o más fragmentado, sin que esto impacte severamente en su bienestar físico, permitiéndoles continuar con el cuidado de la progenie. Las preguntas planteadas previamente son el hincapié para continuar estudiando en esta área una vez finalizado mi doctorado.

9. Perspectivas

Dentro de las perspectivas a corto plazo se encuentran la puesta a punto las mediciones de hormonas mediante otros ensayos, y medir la potencia de las ondas lentas en nuestros registros a fin de evidenciar cambios en la presión al sueño.

Dentro de las perspectivas a mediano y largo plazo se encuentra poder identificar que procesos fisiológicos están cambiando en los circuitos de sueño-vigilia y/o motivación maternos que puedan permitir una adaptación a la falta de sueño.

Otra perspectiva es continuar investigando sobre los efectos de la falta de sueño en el sistema inmunológico de madres y su progenie durante el periodo postparto, abarcando tanto roedores como humanos.

10. Menciones especiales

Las mediciones de macronutrientes de la leche y de inmunoglobulinas fueron realizadas con la ayuda del Dr. Claudio Rodríguez-Camejo y Arturo Pujol en el Laboratorio de Inmunología, Instituto de Higiene “Prof. Arnoldo Berta”, Udelar.

Las mediciones hematológicas fueron una colaboración con el Lic. Anderson Saravia, en la Plataforma de Investigación en Salud Animal del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria “La Estanzuela”.

Las mediciones de citoquinas fueron en colaboración con la Dra. Teresa Freire, en el Laboratorio de Inmunomodulación y Vacunas de la Unidad Académica de Inmunobiología, Facultad de Medicina, Udelar.

Las mediciones de hormonas fueron en colaboración con la Dra. Lucía Zubizarreta en la Unidad Académica de Fisiología, Facultad de Medicina, Udelar.

11. Bibliografía

1. Peng, W. *et al.* Regulation of sleep homeostasis mediator adenosine by basal forebrain glutamatergic neurons. *Science* **369**, eabb0556 (2020).
2. Siegel, J. M. Do all animals sleep? *Trends Neurosci.* **31**, 208–213 (2008).
3. Vanini, G. & Torterolo, P. Sleep-Wake Neurobiology. in *Cannabinoids and Sleep: Molecular, Functional and Clinical Aspects* (eds Monti, J. M., Pandi-Perumal, S. R. & Murillo-Rodríguez, E.) 65–82 (Springer International Publishing, Cham, 2021). doi:10.1007/978-3-030-61663-2_5.
4. Fernandez-Chiappe, F. *et al.* Dopamine Signaling in Wake-Promoting Clock Neurons Is Not Required for the Normal Regulation of Sleep in *Drosophila*. *J. Neurosci.* **40**, 9617–9633 (2020).
5. Scammell, T. E., Arrigoni, E. & Lipton, J. O. Neural Circuitry of Wakefulness and Sleep. *Neuron* **93**, 747–765 (2017).
6. Ungurean, G., van der Meij, J., Rattenborg, N. C. & Lesku, J. A. Evolution and plasticity of sleep. *Curr. Opin. Physiol.* **15**, 111–119 (2020).
7. Rundo, J. V. & Downey, R. Polysomnography. *Handb. Clin. Neurol.* **160**, 381–392 (2019).
8. Torterolo, P. *et al.* Chapter 2 - Polysomnography in humans and animal models: basic procedures and analysis. in *Methodological Approaches for Sleep and Vigilance Research* (ed. Murillo-Rodríguez, E.) 17–32 (Academic Press, 2022). doi:10.1016/B978-0-323-85235-7.00010-7.
9. Dement, W. & Kleitman, N. Cyclic variations in EEG during sleep and their relation to eye movements, body motility, and dreaming. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* **9**, 673–690 (1957).
10. Aserinsky, E. & Kleitman, N. Regularly Occurring Periods of Eye Motility, and Concomitant Phenomena, During Sleep. *Science* **118**, 273–274 (1953).

11. Carskadon, M. & Dement, W. Normal Human Sleep: An Overview. Principles and Practice of Sleep Medicine. M.H. Kryger (Ed.). *WB Saunders Phila.* 3–13 (1989).
12. Zielinski, M. R., McKenna, J. T. & McCarley, R. W. Functions and Mechanisms of Sleep. *AIMS Neurosci.* **3**, 67 (2016).
13. Miletínová, E. & Bušková, J. Functions of Sleep. *Physiol. Res.* **70**, 177 (2021).
14. Simon, K. C., Nadel, L. & Payne, J. D. The functions of sleep: A cognitive neuroscience perspective. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **119**, e2201795119 (2022).
15. Vanini, G. & Torterolo, P. Sleep-Wake Neurobiology. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1297**, 65–82 (2021).
16. Borbély, A. A. A two process model of sleep regulation. *Hum. Neurobiol.* **1**, 195–204 (1982).
17. Alhola, P. & Polo-Kantola, P. Sleep deprivation: Impact on cognitive performance. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* **3**, 553–567 (2007).
18. Borbély, A. The two-process model of sleep regulation: Beginnings and outlook. *J. Sleep Res.* **31**, e13598 (2022).
19. Tucker, P., Leineweber, C. & Kecklund, G. Comparing the acute effects of shiftwork on mothers and fathers. *Occup. Med. Oxf. Engl.* **71**, 414–421 (2021).
20. Kecklund, G. & Axelsson, J. Health consequences of shift work and insufficient sleep. *BMJ* **355**, i5210 (2016).
21. Dørheim, S. K., Bondevik, G. T., Eberhard-Gran, M. & Bjorvatn, B. Sleep and Depression in Postpartum Women: A Population-Based Study. *Sleep* **32**, 847–855 (2009).
22. Kalil, A., Dunifon, R., Crosby, D. & Su, J. H. Work Hours, Schedules, and Insufficient Sleep Among Mothers and Their Young Children. *J. Marriage Fam.* **76**, 891–904 (2014).
23. Reynolds, A. C. & Banks, S. Total sleep deprivation, chronic sleep restriction and sleep disruption. in *Progress in Brain Research* (eds Kerkhof, G. A. & Dongen, H. P. A. van) vol. 185 91–103 (Elsevier, 2010).

24. Banks, S. & Dinges, D. F. Chapter 6 - Chronic Sleep Deprivation. in *Principles and Practice of Sleep Medicine (Fifth Edition)* (eds Kryger, M. H., Roth, T. & Dement, W. C.) 67–75 (W.B. Saunders, Philadelphia, 2011). doi:10.1016/B978-1-4160-6645-3.00006-2.
25. Banks, S. & Dinges, D. F. Behavioral and Physiological Consequences of Sleep Restriction. *J. Clin. Sleep Med. JCSM Off. Publ. Am. Acad. Sleep Med.* **3**, 519–528 (2007).
26. Belenky, G. *et al.* Patterns of performance degradation and restoration during sleep restriction and subsequent recovery: a sleep dose-response study. *J. Sleep Res.* **12**, 1–12 (2003).
27. Meerlo, P., Koehl, M., van der Borght, K. & Turek, F. W. Sleep restriction alters the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress. *J. Neuroendocrinol.* **14**, 397–402 (2002).
28. Meerlo, P., Sgoifo, A. & Suchecki, D. Restricted and disrupted sleep: effects on autonomic function, neuroendocrine stress systems and stress responsivity. *Sleep Med. Rev.* **12**, 197–210 (2008).
29. Roehrs, T., Carskadon, M., Dement, W. & Roth, T. Daytime Sleepiness and Alertness. *Principles and Practice of Sleep Medicine. Phila. Saunders* 43–52 (2000).
30. Carskadon, M. A. & Dement, W. C. Nocturnal Determinants of Daytime Sleepiness. *Sleep* **5**, S73–S81 (1982).
31. Johnsson, R. D. *et al.* Sleep loss impairs cognitive performance and alters song output in Australian magpies. *Sci. Rep.* **12**, 6645 (2022).
32. Killgore, W. D. S. Effects of sleep deprivation on cognition. in *Progress in Brain Research* (eds Kerkhof, G. A. & Dongen, H. P. A. van) vol. 185 105–129 (Elsevier, 2010).
33. Quigley, N., Green, J. F., Morgan, D., Idzikowski, C. & King, D. J. The effect of sleep deprivation on memory and psychomotor function in healthy volunteers. *Hum. Psychopharmacol.* **15**, 171–177 (2000).

34. Drummond, S. P. *et al.* Altered brain response to verbal learning following sleep deprivation. *Nature* **403**, 655–657 (2000).
35. Killgore, W. D. S., Balkin, T. J. & Wesensten, N. J. Impaired decision making following 49 h of sleep deprivation. *J. Sleep Res.* **15**, 7–13 (2006).
36. Dorrian, J., Rogers, N. L. & Dinges, D. F. Psychomotor Vigilance Performance: Neurocognitive Assay Sensitive to Sleep Loss. in *Sleep Deprivation* (CRC Press, 2005).
37. Spiegel, K., Tasali, E., Penev, P. & Van Cauter, E. Brief communication: Sleep curtailment in healthy young men is associated with decreased leptin levels, elevated ghrelin levels, and increased hunger and appetite. *Ann. Intern. Med.* **141**, 846–850 (2004).
38. Leproult, R. & Van Cauter, E. Role of sleep and sleep loss in hormonal release and metabolism. *Endocr. Dev.* **17**, 11–21 (2010).
39. Spiegel, K. *et al.* Leptin levels are dependent on sleep duration: relationships with sympathovagal balance, carbohydrate regulation, cortisol, and thyrotropin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**, 5762–5771 (2004).
40. Morgan, D. & Tsai, S. C. Sleep and the Endocrine System. *Sleep Med. Clin.* **11**, 115–126 (2016).
41. Medic, G., Wille, M. & Hemels, M. E. Short- and long-term health consequences of sleep disruption. *Nat. Sci. Sleep* **9**, 151–161 (2017).
42. Leproult, R., Copinschi, G., Buxton, O. & Van Cauter, E. Sleep loss results in an elevation of cortisol levels the next evening. *Sleep* **20**, 865–870 (1997).
43. Tobler, I., Murison, R., Ursin, R., Ursin, H. & Borbély, A. A. The effect of sleep deprivation and recovery sleep on plasma corticosterone in the rat. *Neurosci. Lett.* **35**, 297–300 (1983).
44. Machado, R. B., Tufik, S. & Suchecki, D. Role of Corticosterone on Sleep Homeostasis Induced by REM Sleep Deprivation in Rats. *PLoS ONE* **8**, e63520 (2013).

45. Suchecki, D., Tiba, P. A. & Tufik, S. Paradoxical sleep deprivation facilitates subsequent corticosterone response to a mild stressor in rats. *Neurosci. Lett.* **320**, 45–48 (2002).
46. Sassin, J. F., Frantz, A. G., Kapen, S. & Weitzman, E. D. The nocturnal rise of human prolactin is dependent on sleep. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **37**, 436–440 (1973).
47. Spiegel, K. *et al.* Prolactin secretion and sleep. *Sleep* **17**, 20–27 (1994).
48. Spiegel, K. *et al.* Temporal relationship between prolactin secretion and slow-wave electroencephalic activity during sleep. *Sleep* **18**, 543–548 (1995).
49. Latta, F. *et al.* Sex differences in nocturnal growth hormone and prolactin secretion in healthy older adults: relationships with sleep EEG variables. *Sleep* **28**, 1519–1524 (2005).
50. Schuh-Hofer, S., Eichhorn, N., Grinevich, V. & Treede, R.-D. Sleep Deprivation Related Changes of Plasma Oxytocin in Males and Female Contraceptive Users Depend on Sex and Correlate Differentially With Anxiety and Pain Hypersensitivity. *Front. Behav. Neurosci.* **12**, 161 (2018).
51. Moldofsky, H. Central nervous system and peripheral immune functions and the sleep-wake system. *J. Psychiatry Neurosci. JPN* **19**, 368–374 (1994).
52. Opp, M. R. & Imeri, L. Sleep as a behavioral model of neuro-immune interactions. *Acta Neurobiol. Exp. (Warsz.)* **59**, 45–53 (1999).
53. Irwin, M. Effects of sleep and sleep loss on immunity and cytokines. *Brain. Behav. Immun.* **16**, 503–512 (2002).
54. Irwin, M. R., Olmstead, R. & Carroll, J. E. Sleep Disturbance, Sleep Duration, and Inflammation: A Systematic Review and Meta-Analysis of Cohort Studies and Experimental Sleep Deprivation. *Biol. Psychiatry* **80**, 40–52 (2016).
55. Krueger, J. M., Walter, J., Dinarello, C. A., Wolff, S. M. & Chedid, L. Sleep-promoting effects of endogenous pyrogen (interleukin-1). *Am. J. Physiol.* **246**, R994-999 (1984).

56. Tobler, I., Borbély, A. A., Schwyzer, M. & Fontana, A. Interleukin-1 derived from astrocytes enhances slow wave activity in sleep EEG of the rat. *Eur. J. Pharmacol.* **104**, 191–192 (1984).
57. Opp, M. R., Obal, F. & Krueger, J. M. Interleukin 1 alters rat sleep: temporal and dose-related effects. *Am. J. Physiol.* **260**, R52-58 (1991).
58. Krueger, J. M. & Majde, J. A. Cytokines and sleep. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **106**, 97–100 (1995).
59. Besedovsky, L., Lange, T. & Haack, M. The Sleep-Immune Crosstalk in Health and Disease. *Physiol. Rev.* **99**, 1325–1380 (2019).
60. Barriga-Ibars, C., Rodríguez-Moratinos, A. B., Esteban, S. & Rial, R. V. Interrelations between sleep and the immune status. *Rev. Neurol.* **40**, 548–556 (Invalid date).
61. Krueger, J. M. *et al.* Involvement of cytokines in slow wave sleep. *Prog. Brain Res.* **193**, 39–47 (2011).
62. Vgontzas, A. N. *et al.* Adverse effects of modest sleep restriction on sleepiness, performance, and inflammatory cytokines. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**, 2119–2126 (2004).
63. Taishi, P. *et al.* Sleep-associated changes in interleukin-1beta mRNA in the brain. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* **18**, 793–798 (1998).
64. van Leeuwen, W. M. A. *et al.* Sleep restriction increases the risk of developing cardiovascular diseases by augmenting proinflammatory responses through IL-17 and CRP. *PLoS One* **4**, e4589 (2009).
65. Yehuda, S., Sredni, B., Carasso, R. L. & Kenigsbuch-Sredni, D. REM sleep deprivation in rats results in inflammation and interleukin-17 elevation. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* **29**, 393–398 (2009).
66. Sang, D. *et al.* Prolonged sleep deprivation induces a cytokine-storm-like syndrome in mammals. *Cell* **186**, 5500-5516.e21 (2023).

67. Everson, C. A. Clinical assessment of blood leukocytes, serum cytokines, and serum immunoglobulins as responses to sleep deprivation in laboratory rats. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* **289**, R1054–R1063 (2005).
68. Lahimgarzadeh, R., Vaseghi, S., Nasehi, M. & Rouhollah, F. Effect of multi-epitope derived from HIV-1 on REM sleep deprivation-induced spatial memory impairment with respect to the level of immune factors in mice. *Iran. J. Basic Med. Sci.* **25**, 164–172 (2022).
69. Haus, E. & Smolensky, M. H. Biologic Rhythms in the Immune System. *Chronobiol. Int.* **16**, 581–622 (1999).
70. Lange, T., Luebber, F., Grasshoff, H. & Besedovsky, L. The contribution of sleep to the neuroendocrine regulation of rhythms in human leukocyte traffic. *Semin. Immunopathol.* **44**, 239–254 (2022).
71. Besedovsky, L., Lange, T. & Born, J. Sleep and immune function. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* **463**, 121–137 (2012).
72. Hayashi, M., Shimba, S. & Tezuka, M. Characterization of the molecular clock in mouse peritoneal macrophages. *Biol. Pharm. Bull.* **30**, 621–626 (2007).
73. Irwin, M. *et al.* Partial night sleep deprivation reduces natural killer and cellular immune responses in humans. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **10**, 643–653 (1996).
74. Hahn, J. *et al.* Sleep enhances numbers and function of monocytes and improves bacterial infection outcome in mice. *Brain. Behav. Immun.* **87**, 329–338 (2020).
75. Ingram, L. A., Simpson, R. J., Malone, E. & Florida-James, G. D. Sleep disruption and its effect on lymphocyte redeployment following an acute bout of exercise. *Brain. Behav. Immun.* **47**, 100–108 (2015).

76. Ruiz, F. S., Andersen, M. L., Zager, A., Martins, R. C. S. & Tufik, S. Sleep deprivation reduces the lymphocyte count in a non-obese mouse model of type 1 diabetes mellitus. *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Medicas E Biol.* **40**, 633–637 (2007).
77. Said, E. A. *et al.* Sleep deprivation alters neutrophil functions and levels of Th1-related chemokines and CD4+ T cells in the blood. *Sleep Breath. Schlaf Atm.* **23**, 1331–1339 (2019).
78. Zhang, Y. *et al.* Very-Short-Term Sleep Deprivation Slows Early Recovery of Lymphocytes in Septic Patients. *Front. Med.* **8**, 656615 (2021).
79. Martínez-Albert, E. *et al.* Sleep promotes T-cell migration towards CCL19 via growth hormone and prolactin signaling in humans. *Brain. Behav. Immun.* **118**, 69–77 (2024).
80. Irwin, M. *et al.* Partial sleep deprivation reduces natural killer cell activity in humans. *Psychosom. Med.* **56**, 493–498 (1994).
81. Moldofsky, H., Lue, F. A., Davidson, J. R. & Gorczynski, R. Effects of sleep deprivation on human immune functions. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **3**, 1972–1977 (1989).
82. Chauhan, G. & Tadi, P. Physiology, Postpartum Changes. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2025).
83. Romano, M., Cacciatore, A., Giordano, R. & La Rosa, B. Postpartum period: three distinct but continuous phases. *J. Prenat. Med.* **4**, 22–25 (2010).
84. Fleming, A. S., Korsmit, M. & Deller, M. Rat pups are potent reinforcers to the maternal animal: Effects of experience, parity, hormones, and dopamine function. *Psychobiology* **22**, 44–53 (1994).
85. Wansaw, M. P., Pereira, M. & Morrell, J. I. Characterization of maternal motivation in the lactating rat: Contrasts between early and late postpartum responses. *Horm. Behav.* **54**, 294–301 (2008).

86. Rosenblatt, J. S. Prepartum and Postpartum Regulation of Maternal Behaviour in the Rat. in *Ciba Foundation Symposium 33 - Parent-Infant Interaction* 17–37 (John Wiley & Sons, Ltd, 1975).
doi:10.1002/9780470720158.ch3.
87. Stern, J. M. CHAPTER THREE - Maternal Behavior: Sensory, Hormonal, and Neural Determinants. in *Psychoendocrinology* (eds Brush, F. R. & Levine, S.) 105–226 (Academic Press, Amsterdam, 1989). doi:10.1016/B978-0-12-137952-0.50008-2.
88. Benedetto, L., Peña, F., Rivas, M., Ferreira, A. & Torterolo, P. The Integration of the Maternal Care with Sleep During the Postpartum Period. *Sleep Med. Clin.* **18**, 499–509 (2023).
89. Macrí, S., Mason, G. J. & Würbel, H. Dissociation in the effects of neonatal maternal separations on maternal care and the offspring's HPA and fear responses in rats. *Eur. J. Neurosci.* **20**, 1017–1024 (2004).
90. Bei, B., Coo, S. & Trinder, J. Sleep and Mood During Pregnancy and the Postpartum Period. *Sleep Med. Clin.* **10**, 25–33 (2015).
91. Creti, L. *et al.* Sleep in the Postpartum: Characteristics of First-Time, Healthy Mothers. *Sleep Disord.* **2017**, 8520358 (2017).
92. Hunter, L. P., Rychnovsky, J. D. & Yount, S. M. A selective review of maternal sleep characteristics in the postpartum period. *J. Obstet. Gynecol. Neonatal Nurs. JOGNN* **38**, 60–68 (2009).
93. Manconi, M. *et al.* Sleep and sleep disorders during pregnancy and postpartum: The Life-ON study. *Sleep Med.* **113**, 41–48 (2024).
94. Kenny, S. *et al.* Mothers' and fathers' sleep: Is there a difference between first-time and experienced parents of 6-month-olds? *J. Sleep Res.* **30**, e13238 (2021).
95. Montgomery-Downs, H., Insana, S., Clegg-Kraynok, M. & Mancini, L. Normative longitudinal maternal sleep: The first 4 postpartum months. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **203**, 465.e1–7 (2010).

96. Okun, M. L. & Lac, A. Postpartum Insomnia and Poor Sleep Quality Are Longitudinally Predictive of Postpartum Mood Symptoms. *Psychosom. Med.* **85**, 736–743 (2023).
97. Sivertsen, B., Hysing, M., Dørheim, S. K. & Eberhard-Gran, M. Trajectories of maternal sleep problems before and after childbirth: a longitudinal population-based study. *BMC Pregnancy Childbirth* **15**, 129 (2015).
98. Smith, J. P. & Forrester, R. I. Association between breastfeeding and new mothers' sleep: a unique Australian time use study. *Int. Breastfeed. J.* **16**, 7 (2021).
99. Sivadas, N., Radhakrishnan, A., Aswathy, B. S., Kumar, V. M. & Gulia, K. K. Dynamic changes in sleep pattern during post-partum in normal pregnancy in rat model. *Behav. Brain Res.* **320**, 264–274 (2017).
100. Tóth, A. *et al.* Complete sleep and local field potential analysis regarding estrus cycle, pregnancy, postpartum and post-weaning periods and homeostatic sleep regulation in female rats. *Sci. Rep.* **10**, 8546 (2020).
101. Benedetto, L., Rivas, M., Pereira, M., Ferreira, A. & Torterolo, P. A descriptive analysis of sleep and wakefulness states during maternal behaviors in postpartum rats. *Arch. Ital. Biol.* **155**, 99–109 (2017).
102. Rocha, L. & hoshino, K. Some aspects of the sleep of lactating rat dams. *Sleep Sci* **2**, 88–91 (2009).
103. Komiya, H. *et al.* Sleep/Wake Behaviors in Mice During Pregnancy and Pregnancy-Associated Hypertensive Mice. *Sleep* **41**, (2018).
104. Lyamin, O., Pryaslova, J., Kosenko, P. & Siegel, J. Behavioral aspects of sleep in bottlenose dolphin mothers and their calves. *Physiol. Behav.* **92**, 725–733 (2007).
105. Sharma, V. & Mazmanian, D. Sleep loss and postpartum psychosis. *Bipolar Disord.* **5**, 98–105 (2003).

106. Bhati, S. & Richards, K. A Systematic Review of the Relationship Between Postpartum Sleep Disturbance and Postpartum Depression. *J. Obstet. Gynecol. Neonatal Nurs.* **44**, 350–357 (2015).
107. Okun, M. L. Disturbed Sleep and Postpartum Depression. *Curr. Psychiatry Rep.* **18**, 66 (2016).
108. Posmontier, B. Sleep Quality in Women With and Without Postpartum Depression. *J. Obstet. Gynecol. Neonatal Nurs.* **37**, 722–737 (2008).
109. King, L. S., Rangel, E., Simpson, N., Tikotzky, L. & Manber, R. Mothers' postpartum sleep disturbance is associated with the ability to sustain sensitivity toward infants. *Sleep Med.* **65**, 74–83 (2020).
110. Lee, K. A. Alterations in sleep during pregnancy and postpartum: a review of 30 years of research. *Sleep Med. Rev.* **2**, 231–242 (1998).
111. Carrega, J., Lee, S.-Y., Clark, P., Cranford, J. & Lloyd, S. Impact of the Quality of Postpartum Sleep and its Health Determinants on Human Milk Volume. *MCN. Am. J. Matern. Child Nurs.* **45**, 289–295 (2020).
112. Ran-Peled, D. *et al.* Objective and subjective sleep and caregiving feelings in mothers of infants: a longitudinal daily diary study. *Sleep* **45**, zsac090 (2022).
113. Okun, M. L. *et al.* Changes in sleep quality, but not hormones predict time to postpartum depression recurrence. *J. Affect. Disord.* **130**, 378–384 (2011).
114. Ruan, H. *et al.* Sleep duration of lactating mothers and its relationship with feeding pattern, milk macronutrients and related serum factors: A combined longitudinal cohort and cross-sectional study. *Front. Nutr.* **9**, 973291 (2022).
115. Groër, M. *et al.* Neuroendocrine and immune relationships in postpartum fatigue. *MCN. Am. J. Matern. Child Nurs.* **30**, 133–138 (2005).

116. Zhang, F., Xue, Q., Bai, T., Wu, F. & Yan, S. Postpartum Fatigue and Inhibited Lactation. *Biol. Res. Nurs.* **24**, 128–139 (2022).
117. Cox, E. Q. *et al.* Oxytocin and HPA stress axis reactivity in postpartum women. *Psychoneuroendocrinology* **55**, 164–172 (2015).
118. Yang, C. *et al.* Maternal sleep and psychological status in the postpartum period are associated with functional protein alterations in breast milk:a mother-infant cohort study. *Clin. Nutr. ESPEN* **67**, 510–522 (2025).
119. Lincoln, D. W. *et al.* Sleep: a prerequisite for reflex milk ejection in the rat. *Exp. Brain Res.* **38**, 151–162 (1980).
120. Sutherland, R. C., Juss, T. S. & Wakerley, J. B. Prolonged electrical stimulation of the nipples evokes intermittent milk ejection in the anaesthetised lactating rat. *Exp. Brain Res.* **66**, 29–34 (1987).
121. Voloschin, L. M. & Tramezzani, J. H. Milk ejection reflex linked to slow wave sleep in nursing rats. *Endocrinology* **105**, 1202–1207 (1979).
122. Lincoln, D. W. & Paisley, A. C. Neuroendocrine control of milk ejection. *J. Reprod. Fertil.* **65**, 571–586 (1982).
123. Hurley, W. L. & Theil, P. K. Perspectives on Immunoglobulins in Colostrum and Milk. *Nutrients* **3**, 442–474 (2011).
124. Azagra-Boronat, I. *et al.* Associations of Breast Milk Microbiota, Immune Factors, and Fatty Acids in the Rat Mother–Offspring Pair. *Nutrients* **12**, 319 (2020).
125. Slifka, M. K. & Amanna, I. J. Chapter 9 - Passive Immunization. in *Plotkin’s Vaccines (Eighth Edition)* (eds Orenstein, W., Offit, P., Edwards, K. M. & Plotkin, S.) 100-112.e11 (Elsevier, Philadelphia, 2023). doi:10.1016/B978-0-323-79058-1.00009-8.

126. Appleby, P. & Catty, D. Transmission of immunoglobulin to foetal and neonatal mice. *J. Reprod. Immunol.* **5**, 203–213 (1983).
127. Halliday, R. Prenatal and Postnatal Transmission of Passive Immunity to Young Rats. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **144**, 427–430 (1955).
128. Grases-Pintó, B. *et al.* Rat Milk and Plasma Immunological Profile throughout Lactation. *Nutrients* **13**, 1257 (2021).
129. Corwin, E. J., Bozoky, I., Pugh, L. C. & Johnston, N. Interleukin-1beta elevation during the postpartum period. *Ann. Behav. Med. Publ. Soc. Behav. Med.* **25**, 41–47 (2003).
130. Drozdowicz-Jastrzębska, E. *et al.* Depression, anxiety, insomnia and interleukins in the early postpartum period. *Front. Psychiatry* **14**, (2023).
131. Taveras, E. M., Rifas-Shiman, S. L., Rich-Edwards, J. W. & Mantzoros, C. S. Maternal short sleep duration is associated with increased levels of inflammatory markers at 3 years postpartum. *Metabolism.* **60**, 982–986 (2011).
132. Proudfoot, K. L. *et al.* Effects of acute lying and sleep deprivation on metabolic and inflammatory responses of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* **104**, 4764–4774 (2021).
133. Revel, F. G., Gottowik, J., Gatti, S., Wettstein, J. G. & Moreau, J.-L. Rodent models of insomnia: A review of experimental procedures that induce sleep disturbances. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **33**, 874–899 (2009).
134. Zamore, Z. & Veasey, S. C. Neural consequences of chronic sleep disruption. *Trends Neurosci.* **45**, 678–691 (2022).
135. Oonk, M., Krueger, J. M. & Davis, C. J. Voluntary Sleep Loss in Rats. *Sleep* **39**, 1467–1479 (2016).
136. Ambrosini, M. V., Sadile, A. G., Gironi Carnevale, U. A., Mattiaccio, M. & Giuditta, A. The sequential hypothesis on sleep function. I. Evidence that the structure of sleep depends on the nature of the previous waking experience. *Physiol. Behav.* **43**, 325–337 (1988).

137. García-García, F., Beltrán-Parrazal, L., Jiménez-Anguiano, A., Vega-González, A. & Drucker-Colín, R. Manipulations during forced wakefulness have differential impact on sleep architecture, EEG power spectrum, and Fos induction. *Brain Res. Bull.* **47**, 317–324 (1998).
138. Mong, J. A. & Cusmano, D. M. Sex differences in sleep: impact of biological sex and sex steroids. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **371**, 20150110 (2016).
139. Li, J. *et al.* Sleep deprivation during pregnancy leads to poor fetal outcomes in Sprague-Dawley rats. *J. Reprod. Immunol.* **160**, 104166 (2023).
140. Baratta, A. M. *et al.* Acute sleep deprivation during pregnancy in rats: Rapid elevation of placental and fetal inflammation and kynurenic acid. *Neurobiol. Stress* **12**, 100204 (2020).
141. He, W.-T. *et al.* Maternal sleep deprivation disrupts glutamate metabolism in offspring rats. *Zool. Res.* **45**, 1–11 (2024).
142. Alvarenga, T. A., Aguiar, M. F. P., Mazaro-Costa, R., Tufik, S. & Andersen, M. L. Effects of sleep deprivation during pregnancy on the reproductive capability of the offspring. *Fertil. Steril.* **100**, 1752–1757 (2013).
143. Pires, G. N., Andersen, M. L., Giovenardi, M. & Tufik, S. Sleep impairment during pregnancy: possible implications on mother-infant relationship. *Med. Hypotheses* **75**, 578–582 (2010).
144. Holth, J. K. *et al.* The sleep-wake cycle regulates brain interstitial fluid tau in mice and CSF tau in humans. *Science* **363**, 880–884 (2019).
145. Moruzzi, G. & Magoun, H. W. Brain stem reticular formation and activation of the EEG. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* **1**, 455–473 (1949).
146. Lucas, E. A. Effects of five to seven days of sleep deprivation produced by electrical stimulation of the midbrain reticular formation. *Exp. Neurol.* **49**, 554–568 (1975).
147. Détári, L., Kukorelli, T. & Hajnik, T. Long-term sleep deprivation by hypothalamic stimulation in cats. *J. Neurosci. Methods* **49**, 225–230 (1993).

148. Neve, H. A., Paisley, A. C. & Summerlee, A. J. Arousal a prerequisite for suckling in the conscious rabbit? *Physiol. Behav.* **28**, 213–217 (1982).
149. Poulain, D. A., Rodriguez, F. & Ellendorff, F. Sleep is not a prerequisite for the milk ejection reflex in the pig. *Exp. Brain Res.* **43**, 107–110 (1981).
150. Blyton, D. M., Sullivan, C. E. & Edwards, N. Lactation is associated with an increase in slow-wave sleep in women. *J. Sleep Res.* **11**, 297–303 (2002).
151. Nishihara, K., Horiuchi, S., Eto, H., Uchida, S. & Honda, M. Delta and theta power spectra of night sleep EEG are higher in breast-feeding mothers than in non-pregnant women. *Neurosci. Lett.* **368**, 216–220 (2004).
152. Schwarzkopf, N. *et al.* Sueño maternal durante los primeros diez años de vida del niño. (Sin publicar).
153. Lapp, H. E., Salazar, M. G. & Champagne, F. A. Automated maternal behavior during early life in rodents (AMBER) pipeline. *Sci. Rep.* **13**, 18277 (2023).
154. Hofer, M. A. Early relationships as regulators of infant physiology and behavior. *Acta Paediatr. Oslo Nor. 1992 Suppl.* **397**, 9–18 (1994).
155. Sheriff, M. J. & Love, O. P. Determining the adaptive potential of maternal stress. *Ecol. Lett.* **16**, 271–280 (2013).
156. Mateo, J. M. Development, maternal effects, and behavioral plasticity. *Integr. Comp. Biol.* **54**, 841–849 (2014).
157. Sewald, K., Mueller, M., Buschmann, J., Hansen, T. & Lewin, G. Development of hematological and immunological characteristics in neonatal rats. *Reprod. Toxicol.* **56**, 109–117 (2015).
158. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. (National Academies Press (US), Washington (DC), 2011).

159. Benedetto, L. *et al.* Microinjection of the dopamine D2-receptor antagonist Raclopride into the medial preoptic area reduces REM sleep in lactating rats. *Neurosci. Lett.* **659**, 104–109 (2017).
160. Peña, F. *et al.* Sleep and maternal behavior in the postpartum rat after haloperidol and midazolam treatments SPECIAL ISSUE. *Sleep Sci.* (2020) doi:10.5935/1984-0063.20200019.
161. Paxinos, G. & Watson, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates—The New Coronal Set, 5th Edn.* (2004).
162. Benedetto, L. *et al.* Local administration of bicuculline into the ventrolateral and medial preoptic nuclei modifies sleep and maternal behavior in lactating rats. *Physiol. Behav.* **238**, 113491 (2021).
163. Rivas, M. *et al.* Role of Hypocretin in the Medial Preoptic Area in the Regulation of Sleep, Maternal Behavior and Body Temperature of Lactating Rats. *Neuroscience* **475**, 148–162 (2021).
164. Muranishi, Y. *et al.* Method for collecting mouse milk without exogenous oxytocin stimulation. *BioTechniques* **60**, 47–49 (2016).
165. DePeters, E. J. & Hovey, R. C. Methods for collecting milk from mice. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **14**, 397–400 (2009).
166. Rodgers, C. T. Practical aspects of milk collection in the rat. *Lab. Anim.* **29**, 450–455 (1995).
167. JoVE Science Education Database. Investigación con animales de laboratorio. Blood Withdrawal I. *JoVE, Cambridge, MA, (2024)* (2024).
168. Benedetto, L. *et al.* Microinjection of Melanin Concentrating Hormone into the lateral preoptic area promotes non-REM sleep in the rat. *Peptides* **39**, (2012).
169. Stern, J. M. & Johnson, S. K. Ventral somatosensory determinants of nursing behavior in Norway rats. I. Effects of variations in the quality and quantity of pup stimuli. *Physiol. Behav.* **47**, 993–1011 (1990).
170. Peña, F. *et al.* Is sleep critical for lactation in rat? *Physiol. Behav.* **258**, 114011 (2022).

171. Tuncali, I., Sorial, N., Torr, K. & Pereira, M. Positive maternal affect during mother-litter interaction is reduced in new mother rats exhibiting a depression-like phenotype. *Sci. Rep.* **13**, 6552 (2023).
172. Vilela, F. C. & Giusti-Paiva, A. Glucocorticoids disrupt neuroendocrine and behavioral responses during lactation. *Endocrinology* **152**, 4838–4845 (2011).
173. Pereira, M. & Ferreira, A. Demanding pups improve maternal behavioral impairments in sensitized and haloperidol-treated lactating female rats. *Behav. Brain Res.* **175**, 139–148 (2006).
174. Lincoln, D. W., Hill, A. & Wakerley, J. B. The milk-ejection reflex of the rat: an intermittent function not abolished by surgical levels of anaesthesia. *J. Endocrinol.* **57**, 459–476 (1973).
175. Drewett, R. F. & Trew, A. M. The milk ejection of the rat, as a stimulus and a response to the litter. *Anim. Behav.* **26**, 982–987 (1978).
176. Miller, S. M. & Lonstein, J. S. Dopamine d1 and d2 receptor antagonism in the preoptic area produces different effects on maternal behavior in lactating rats. *Behav. Neurosci.* **119**, 1072–1083 (2005).
177. Stern, J. M. & Taylor, L. A. Haloperidol inhibits maternal retrieval and licking, but enhances nursing behavior and litter weight gains in lactating rats. *J. Neuroendocrinol.* **3**, 591–596 (1991).
178. Peña, F. *et al.* Acute and chronic sleep restriction differentially modify maternal behavior and milk macronutrient composition in the postpartum rat. *Physiol. Behav.* **278**, 114522 (2024).
179. Lucas, A., Gibbs, J. A., Lyster, R. L. & Baum, J. D. Creamatocrit: simple clinical technique for estimating fat concentration and energy value of human milk. *Br. Med. J.* **1**, 1018–1020 (1978).
180. Nagasawa, H., Naito, T. & Kataoka, K. Relationship between milk composition and pup's growth in mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N* **191**, 78–81 (1989).
181. Chiba, T. *et al.* Stress-Induced Suppression of Milk Protein Is Involved in a Noradrenergic Mechanism in the Mammary Gland. *Endocrinology* **160**, 2074–2084 (2019).

182. Garriga, M., Almaraz, M. & Marchiaro, A. Determination of reducing sugars in extracts of *Undaria pinnatifida* (harvey) algae by UV-visible spectrophotometry (DNS method) Determinación de azúcares reductores en extractos de alga *Undaria pinnatifida* (harvey) por espectrofotometría UV-visible (método DNS). in (2017).
183. Ongprasert, K. *et al.* Macronutrient, immunoglobulin a and total antioxidant capacity profiles of human milk from 1 to 24 months: a cross-sectional study in Thailand. *Int. Breastfeed. J.* **15**, 90 (2020).
184. Wang, C. D., Chu, P. S., Mellen, B. G. & Shenai, J. P. Creamatocrit and the Nutrient Composition of Human Milk. *J. Perinatol.* **19**, 343–346 (1999).
185. Sánchez, M. B. *et al.* Hyperthyroidism keeps immunoglobulin levels but reduces milk fat and CD11b/c+ cells on early lactation. *Mol. Cell. Endocrinol.* **594**, 112370 (2024).
186. Swan, M. P. & Hickman, D. L. Evaluation of the neutrophil-lymphocyte ratio as a measure of distress in rats. *Lab Anim.* **43**, 276–282 (2014).
187. Stern, J. M. & Lonstein, J. S. Neural mediation of nursing and related maternal behaviors. *Prog. Brain Res.* **133**, 263–278 (2001).
188. Haskell, E. H., Palca, J. W., Walker, J. M., Berger, R. J. & Heller, H. C. The effects of high and low ambient temperatures on human sleep stages. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* **51**, 494–501 (1981).
189. Neckelmann, D. & Ursin, R. Sleep stages and EEG power spectrum in relation to acoustical stimulus arousal threshold in the rat. *Sleep* **16**, 467–477 (1993).
190. Stern, J. M. Somatosensation and Maternal Care in Norway Rats. in *Advances in the Study of Behavior* (eds Rosenblatt, J. S. & Snowdon, C. T.) vol. 25 243–294 (Academic Press, 1996).
191. Croskerry, P. G., Smith, G. K. & Leon, M. Thermoregulation and the maternal behaviour of the rat. *Nature* **273**, 299–300 (1978).

192. Hofer, M. A. Physiological responses of infant rats to separation from their mothers. *Science* **168**, 871–873 (1970).
193. Hofer, M. A. Hidden regulators in attachment, separation, and loss. *Monogr. Soc. Res. Child Dev.* **59**, 192–207 (1994).
194. Woodside, B., Pelchat, R. & Leon, M. Acute elevation of the heat load of mother rats curtails maternal nest bouts. *J. Comp. Physiol. Psychol.* **94**, 61–68 (1980).
195. Lucas, E. A. Effects of five to seven days of sleep deprivation produced by electrical stimulation of the midbrain reticular formation. *Exp. Neurol.* **49**, 554–568 (1975).
196. McCarthy, A. *et al.* Modelling maintenance of wakefulness in rats: comparing potential non-invasive sleep-restriction methods and their effects on sleep and attentional performance. *J. Sleep Res.* **26**, 179–187 (2017).
197. Vishwakarma, L. C., Sharma, B., Singh, V., Jaryal, A. K. & Mallick, H. N. Acute sleep deprivation elevates brain and body temperature in rats. *J. Sleep Res.* **30**, e13030 (2021).
198. Everson, C. A. Clinical assessment of blood leukocytes, serum cytokines, and serum immunoglobulins as responses to sleep deprivation in laboratory rats. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* **289**, R1054–R1063 (2005).
199. Leemburg, S. *et al.* Sleep homeostasis in the rat is preserved during chronic sleep restriction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 15939–15944 (2010).
200. Stephenson, R., Caron, A. M. & Famina, S. Behavioral sleep-wake homeostasis and EEG delta power are decoupled by chronic sleep restriction in the rat. *Sleep* **38**, 685–697 (2015).
201. Pilcher, J. J. & Huffcutt, A. I. Effects of sleep deprivation on performance: a meta-analysis. *Sleep* **19**, 318–326 (1996).
202. Holland, G. J. Effects of limited sleep deprivation on performance of selected motor tasks. *Res. Q.* **39**, 285–294 (1968).

203. Jackson, M. L. *et al.* Deconstructing and reconstructing cognitive performance in sleep deprivation. *Sleep Med. Rev.* **17**, 215–225 (2013).
204. Jackson, M. L. & Van Dongen, H. P. A. Cognitive effects of sleepiness. in *Sleepiness: Causes, Consequences and Treatment* (eds Thorpy, M. J. & Billiard, M.) 72–81 (Cambridge University Press, Cambridge, 2011). doi:10.1017/CBO9780511762697.009.
205. Williamson, A. M. & Feyer, A. M. Moderate sleep deprivation produces impairments in cognitive and motor performance equivalent to legally prescribed levels of alcohol intoxication. *Occup. Environ. Med.* **57**, 649–655 (2000).
206. Banks, S. & Dinges, D. F. Behavioral and physiological consequences of sleep restriction. *J. Clin. Sleep Med. JCSM Off. Publ. Am. Acad. Sleep Med.* **3**, 519–528 (2007).
207. Oonk, M., Davis, C. J., Krueger, J. M., Wisor, J. P. & Van Dongen, H. P. A. Sleep deprivation and time-on-task performance decrement in the rat psychomotor vigilance task. *Sleep* **38**, 445–451 (2015).
208. Dinges, D. F. *et al.* Cumulative sleepiness, mood disturbance, and psychomotor vigilance performance decrements during a week of sleep restricted to 4-5 hours per night. *Sleep* **20**, 267–277 (1997).
209. Guzzetti, J. R. & Banks, S. Dynamics of recovery sleep from chronic sleep restriction. *SLEEP Adv.* **4**, zpac044 (2023).
210. Van Dongen, H. P. A., Maislin, G., Mullington, J. M. & Dinges, D. F. The cumulative cost of additional wakefulness: dose-response effects on neurobehavioral functions and sleep physiology from chronic sleep restriction and total sleep deprivation. *Sleep* **26**, 117–126 (2003).
211. Martin, R. C. B., Bridgett, D. J., Mayes, L. C. & Rutherford, H. J. V. Maternal working memory, emotion regulation, and responsivity to infant distress. *J. Appl. Dev. Psychol.* **71**, 101202 (2020).

212. Floros, O. *et al.* Vulnerability in Executive Functions to Sleep Deprivation Is Predicted by Subclinical Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder Symptoms. *Biol. Psychiatry Cogn. Neurosci. Neuroimaging* **6**, 290–298 (2021).
213. Champagne, F. & Meaney, M. J. Like mother, like daughter: evidence for non-genomic transmission of parental behavior and stress responsivity. *Prog. Brain Res.* **133**, 287–302 (2001).
214. Grissom, N. & Bhatnagar, S. Habituation to repeated stress: Get used to it. *Neurobiol. Learn. Mem.* **92**, 215–224 (2009).
215. Meerlo, P., Koehl, M., Van Der Borght, K. & Turek, F. W. Sleep Restriction Alters the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Response to Stress. *J. Neuroendocrinol.* **14**, 397–402 (2002).
216. Mirescu, C., Peters, J. D., Noiman, L. & Gould, E. Sleep deprivation inhibits adult neurogenesis in the hippocampus by elevating glucocorticoids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 19170–19175 (2006).
217. Pires, G. N., Bezerra, A. G., Tufik, S. & Andersen, M. L. Effects of experimental sleep deprivation on anxiety-like behavior in animal research: Systematic review and meta-analysis. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **68**, 575–589 (2016).
218. Michel, C. & Cabanac, M. Opposite Effects of Gentle Handling on Body Temperature and Body Weight in Rats. *Physiol. Behav.* **67**, 617–622 (1999).
219. Barf, R. P., Desprez, T., Meerlo, P. & Scheurink, A. J. W. Increased food intake and changes in metabolic hormones in response to chronic sleep restriction alternated with short periods of sleep allowance. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **302**, R112-117 (2012).
220. Baumgartner, A. *et al.* Influence of partial sleep deprivation on the secretion of thyrotropin, thyroid hormones, growth hormone, prolactin, luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, and estradiol in healthy young women. *Psychiatry Res.* **48**, 153–178 (1993).

221. Caparros-Gonzalez, R. A. *et al.* Maternal and Neonatal Hair Cortisol Levels and Psychological Stress Are Associated With Onset of Secretory Activation of Human Milk Production. *Adv. Neonatal Care Off. J. Natl. Assoc. Neonatal Nurses* **19**, E11–E20 (2019).
222. Chatterton, R. T. *et al.* Relation of plasma oxytocin and prolactin concentrations to milk production in mothers of preterm infants: influence of stress. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **85**, 3661–3668 (2000).
223. Tao, S. *et al.* Symposium review: The influences of heat stress on bovine mammary gland function. *J. Dairy Sci.* **101**, 5642–5654 (2018).
224. Lim, D.-H. *et al.* Changes in milk production and blood metabolism of lactating dairy cows fed *Saccharomyces cerevisiae* culture fluid under heat stress. *J. Anim. Sci. Technol.* **63**, 1433–1442 (2021).
225. Purcell, R. H. *et al.* Maternal stress and high-fat diet effect on maternal behavior, milk composition, and pup ingestive behavior. *Physiol. Behav.* **104**, 474–479 (2011).
226. Bentley, G. R. Hydration as a limiting factor in lactation. *Am. J. Hum. Biol. Off. J. Hum. Biol. Counc.* **10**, 151–161 (1998).
227. Cowley, F. C., Barber, D. G., Houlihan, A. V. & Poppi, D. P. Immediate and residual effects of heat stress and restricted intake on milk protein and casein composition and energy metabolism. *J. Dairy Sci.* **98**, 2356–2368 (2015).
228. Gao, S. T. *et al.* The effects of heat stress on protein metabolism in lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.* **100**, 5040–5049 (2017).
229. Kawano, A. & Emori, Y. The relationship between maternal postpartum psychological state and breast milk secretory immunoglobulin A level. *J. Am. Psychiatr. Nurses Assoc.* **21**, 23–30 (2015).

230. Ahlqvist-Björkroth, S. *et al.* Initiation and exclusivity of breastfeeding: association with mothers' and fathers' prenatal and postnatal depression and marital distress. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **95**, 396–404 (2016).
231. Kortenesniemi, M. *et al.* Human milk metabolome is associated with symptoms of maternal psychological distress and milk cortisol. *Food Chem.* **356**, 129628 (2021).
232. Lim, D.-H., Kim, T.-I., Park, S.-M., Ki, K.-S. & Kim, Y. Evaluation of heat stress responses in Holstein and Jersey cows by analyzing physiological characteristics and milk production in Korea. *J. Anim. Sci. Technol.* **63**, 872–883 (2021).
233. Juncker, H. G. *et al.* Maternal stress is associated with higher protein-bound amino acid concentrations in human milk. *Front. Nutr.* **10**, 1165764 (2023).
234. Jenness, R. Composition of Milk. in *Fundamentals of Dairy Chemistry* (eds Wong, N. P., Jenness, R., Keeney, M. & Marth, E. H.) 1–38 (Springer US, Boston, MA, 1988). doi:10.1007/978-1-4615-7050-9_1.
235. Jenness, R. Comparative aspects of milk proteins. *J. Dairy Res.* **46**, 197–210 (1979).
236. Groër, M. *et al.* Neuroendocrine and immune relationships in postpartum fatigue. *MCN. Am. J. Matern. Child Nurs.* **30**, 133–138 (2005).
237. Grant, A. C., Gow, I. F., Zammit, V. A. & Shennan, D. B. Regulation of protein synthesis in lactating rat mammary tissue by cell volume. *Biochim. Biophys. Acta* **1475**, 39–46 (2000).
238. Millar, I. D., Barber, M. C., Lomax, M. A., Travers, M. T. & Shennan, D. B. Mammary protein synthesis is acutely regulated by the cellular hydration state. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **230**, 351–355 (1997).
239. HAMEED, A. *et al.* Effect of oxytocin on milk proteins and fatty acid profile in Sahiwal cows during lactation periods. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* **40**, 163–169 (2016).

240. Sadovnikova, A., Wysolmerski, J. J. & Hovey, R. C. Chapter 14 - The Onset and Maintenance of Human Lactation and its Endocrine Regulation. in *Maternal-Fetal and Neonatal Endocrinology* (eds Kovacs, C. S. & Deal, C. L.) 189–205 (Academic Press, 2020). doi:10.1016/B978-0-12-814823-5.00014-3.
241. Allen, J. C. Milk Synthesis and Secretion Rates in Cows with Milk Composition Changed by Oxytocin¹, 2. *J. Dairy Sci.* **73**, 975–984 (1990).
242. Nostrand, S. D., Galton, D. M., Erb, H. N. & Bauman, D. E. Effects of Daily Exogenous Oxytocin on Lactation Milk Yield and Composition. *J. Dairy Sci.* **74**, 2119–2127 (1991).
243. Raymond, J. S., Everett, N. A., Gururajan, A. & Bowen, M. T. Quiet wakefulness: the influence of intraperitoneal and intranasal oxytocin on sleep-wake behavior and neurophysiology in rats. *Sleep* **46**, zsad112 (2023).
244. Lancel, M., Krömer, S. & Neumann, I. D. Intracerebral oxytocin modulates sleep-wake behaviour in male rats. *Regul. Pept.* **114**, 145–152 (2003).
245. Grieb, Z. A. & Lonstein, J. S. Oxytocin interactions with central dopamine and serotonin systems regulate different components of motherhood. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **377**, 20210062 (2022).
246. Tjokroprawiro, B. A., Aldika Akbar, M. I., Luqman, E. M. & Widjiati, W. Profile of maternal serum oxytocin in postpartum and non-pregnant rats. *Vet. Stanica* **54**, 665–672 (2023).
247. Gimpl, G. & Fahrenholz, F. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol. Rev.* **81**, 629–683 (2001).
248. Nollet, M., Wisden, W. & Franks, N. P. Sleep deprivation and stress: a reciprocal relationship. *Interface Focus* **10**, 20190092 (2020).
249. Leproult, R. & Van Cauter, E. Effect of 1 week of sleep restriction on testosterone levels in young healthy men. *JAMA* **305**, 2173–2174 (2011).

250. Pejovic, S. *et al.* Effects of recovery sleep after one work week of mild sleep restriction on interleukin-6 and cortisol secretion and daytime sleepiness and performance. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **305**, E890-896 (2013).
251. Pardo, G. V. E. *et al.* Effects of sleep restriction during pregnancy on the mother and fetuses in rats. *Physiol. Behav.* **155**, 66–76 (2016).
252. Hui, L., Hua, F., Diandong, H. & Hong, Y. Effects of sleep and sleep deprivation on immunoglobulins and complement in humans. *Brain. Behav. Immun.* **21**, 308–310 (2007).
253. Ruiz, F. S. *et al.* Immune alterations after selective rapid eye movement or total sleep deprivation in healthy male volunteers. *Innate Immun.* **18**, 44–54 (2012).
254. Bauer, J. *et al.* Interleukin-6 serum levels in healthy persons correspond to the sleep-wake cycle. *Clin. Investig.* **72**, 315–315 (1994).
255. Vgontzas, A. N. *et al.* Circadian Interleukin-6 Secretion and Quantity and Depth of Sleep. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **84**, 2603–2607 (1999).
256. Redwine, L., Hauger, R. L., Gillin, J. C. & Irwin, M. Effects of sleep and sleep deprivation on interleukin-6, growth hormone, cortisol, and melatonin levels in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **85**, 3597–3603 (2000).
257. Hogan, D., Morrow, J. D., Smith, E. M. & Opp, M. R. Interleukin-6 alters sleep of rats. *J. Neuroimmunol.* **137**, 59–66 (2003).
258. Koreki, A. *et al.* The association between salivary IL-6 and poor sleep quality assessed using Apple watches in stressed workers in Japan. *Sci. Rep.* **14**, 22620 (2024).
259. Walsh, C. P., Lim, A., Marsland, A. L., Ferrell, R. E. & Manuck, S. B. Circulating Interleukin-6 concentration covaries inversely with self-reported sleep duration as a function of polymorphic variation in the glucocorticoid receptor. *Brain. Behav. Immun.* **78**, 21–30 (2019).

260. Yehuda, S., Sredni, B., Carasso, R. L. & Kenigsbuch-Sredni, D. REM sleep deprivation in rats results in inflammation and interleukin-17 elevation. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* **29**, 393–398 (2009).
261. Hu, J. *et al.* Sleep-deprived mice show altered cytokine production manifest by perturbations in serum IL-1ra, TNFa, and IL-6 levels. *Brain. Behav. Immun.* **17**, 498–504 (2003).
262. Christian, L. M., Kowalsky, J. M., Mitchell, A. M. & Porter, K. Associations of postpartum sleep, stress, and depressive symptoms with LPS-stimulated cytokine production among African American and White women. *J. Neuroimmunol.* **316**, 98–106 (2018).
263. Sobrian, S. K., Vaughn, V. T., Bloch, E. F. & Burton, L. E. Influence of prenatal maternal stress on the immunocompetence of the offspring. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **43**, 537–547 (1992).
264. Yeramilli, V., Harper, M., Cheddadi, R. & Martin, C. Maternal prenatal stress modulates antibody levels in offspring. *Clin. Immunol. Commun.* **7**, 27–33 (2025).
265. Jiang, L. *et al.* Characterization of the rat intestinal Fc receptor (FcRn) promoter: transcriptional regulation of FcRn gene by the Sp family of transcription factors. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* **286**, G922–G931 (2004).
266. Yoshimura, S. *et al.* Sex-differences in adrenocortical responsiveness during development in rats. *Steroids* **68**, 439–445 (2003).
267. Kühnemann, S., Brown, T. J., Hochberg, R. B. & MacLusky, N. J. Sex Differences in the Development of Estrogen Receptors in the Rat Brain. *Horm. Behav.* **28**, 483–491 (1994).
268. Rambousek, L. *et al.* Sex differences in methamphetamine pharmacokinetics in adult rats and its transfer to pups through the placental membrane and breast milk. *Drug Alcohol Depend.* **139**, 138–144 (2014).
269. Kosyreva, A. M. *et al.* Sex differences of inflammatory and immune response in pups of Wistar rats with SIRS. *Sci. Rep.* **10**, 15884 (2020).

270. Klein, S. L. & Flanagan, K. L. Sex differences in immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 626–638 (2016).
271. Moore, C. L. & Morelli, G. A. Mother rats interact differently with male and female offspring. *J. Comp. Physiol. Psychol.* **93**, 677–684 (1979).
272. Richmond, G. & Sachs, B. D. Maternal discrimination of pup sex in rats. *Dev. Psychobiol.* **17**, 87–89 (1984).
273. Martín, M. G., Wu, S. V. & Walsh, J. H. Hormonal control of intestinal Fc receptor gene expression and immunoglobulin transport in suckling rats. *J. Clin. Invest.* **91**, 2844–2849 (1993).
274. Boudjeltia, K. Z. *et al.* Sleep restriction increases white blood cells, mainly neutrophil count, in young healthy men: A pilot study. *Vasc. Health Risk Manag.* **4**, 1467–1470 (2008).
275. Lasselin, J., Rehman, J.-U., Åkerstedt, T., Lekander, M. & Axelsson, J. Effect of long-term sleep restriction and subsequent recovery sleep on the diurnal rhythms of white blood cell subpopulations. *Brain. Behav. Immun.* **47**, 93–99 (2015).
276. Axelsson, J. *et al.* Effects of Sustained Sleep Restriction on Mitogen-Stimulated Cytokines, Chemokines and T Helper 1/ T Helper 2 Balance in Humans. *PLoS ONE* **8**, e82291 (2013).
277. Zager, A., Andersen, M. L., Ruiz, F. S., Antunes, I. B. & Tufik, S. Effects of acute and chronic sleep loss on immune modulation of rats. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* **293**, R504–R509 (2007).
278. Couret, D., Jamin, A., Kuntz-Simon, G., Prunier, A. & Merlot, E. Maternal stress during late gestation has moderate but long-lasting effects on the immune system of the piglets. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **131**, 17–24 (2009).
279. Götz, A. A. & Stefanski, V. Psychosocial maternal stress during pregnancy affects serum corticosterone, blood immune parameters and anxiety behaviour in adult male rat offspring. *Physiol. Behav.* **90**, 108–115 (2007).

280. Veru, F., Dancause, K., Laplante, D. P., King, S. & Luheshi, G. Prenatal maternal stress predicts reductions in CD4⁺ lymphocytes, increases in innate-derived cytokines, and a Th2 shift in adolescents: Project Ice Storm. *Physiol. Behav.* **144**, 137–145 (2015).
281. Llorente, E., Brito, M. L., Machado, P. & González, M. C. Effect of prenatal stress on the hormonal response to acute and chronic stress and on immune parameters in the offspring. *J. Physiol. Biochem.* **58**, 143–149 (2002).
282. Mayer, N. *et al.* Immobilization stress responses in adult rats exposed in utero to immobilization. *Stress Health J. Int. Soc. Investig. Stress* **27**, e1-10 (2011).
283. Veru, F., Laplante, David P., Luheshi, Giamal & King, S. Prenatal maternal stress exposure and immune function in the offspring. *Stress* **17**, 133–148 (2014).
284. Vanbesien-Mailliot, C. C. A. *et al.* Prenatal stress has pro-inflammatory consequences on the immune system in adult rats. *Psychoneuroendocrinology* **32**, 114–124 (2007).
285. Newberry, R. Lymphocytes. in *Encyclopedia of Gastroenterology* (ed. Johnson, L. R.) 570–575 (Elsevier, New York, 2004). doi:10.1016/B0-12-386860-2/00459-7.
286. Redwine, L., Dang, J. & Irwin, M. Cellular adhesion molecule expression, nocturnal sleep, and partial night sleep deprivation. *Brain. Behav. Immun.* **18**, 333–340 (2004).
287. Ebert, L. M., Schaerli, P. & Moser, B. Chemokine-mediated control of T cell traffic in lymphoid and peripheral tissues. *Mol. Immunol.* **42**, 799–809 (2005).
288. Torres-Castro, P. *et al.* TGF- β 2, EGF, and FGF21 Growth Factors Present in Breast Milk Promote Mesenteric Lymph Node Lymphocytes Maturation in Suckling Rats. *Nutrients* **10**, 1171 (2018).
289. Grases-Pintó, B. *et al.* Leptin and adiponectin supplementation modifies mesenteric lymph node lymphocyte composition and functionality in suckling rats. *Br. J. Nutr.* **119**, 486–495 (2018).
290. Stratakis, C. A. & Chrousos, G. P. Neuroendocrinology and pathophysiology of the stress system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **771**, 1–18 (1995).

291. Herman, J. P. *et al.* Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical stress response. *Compr. Physiol.* **6**, 603–621 (2016).
292. Rosenbaum, M. D., VandeWoude, S. & Johnson, T. E. Effects of cage-change frequency and bedding volume on mice and their microenvironment. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci. JAALAS* **48**, 763–773 (2009).
293. Vorherr, H., Kleeman, C. R. & Lehman, E. Oxytocin-induced stretch reaction in suckling mice and rats: a semiquantitative bio-assay for oxytocin. *Endocrinology* **81**, 711–715 (1967).
294. Drewett, R. F., Statham, C. & Wakerley, J. B. A quantitative analysis of the feeding behaviour of suckling rats. *Anim. Behav.* **22**, 907–913 (1974).
295. Singh, S. & Mallick, B. N. Mild electrical stimulation of pontine tegmentum around locus coeruleus reduces rapid eye movement sleep in rats. *Neurosci. Res.* **24**, 227–235 (1996).
296. Klumpers, U. M. H. *et al.* Neurophysiological Effects of Sleep Deprivation in Healthy Adults, a Pilot Study. *PLOS ONE* **10**, e0116906 (2015).
297. Mikulincer, M., Babkoff, H., Caspy, T. & Sing, H. The effects of 72 hours of sleep loss on psychological variables. *Br. J. Psychol. Lond. Engl.* 1953 **80 (Pt 2)**, 145–162 (1989).
298. WEBB, W. B. & MICHAEL LEVY, C. Effects of spaced and repeated total sleep deprivation. *Ergonomics* **27**, 45–58 (1984).
299. Bonnet, M. H. & Arand, D. L. We are chronically sleep deprived. *Sleep* **18**, 908–911 (1995).
300. Torterolo, P. *et al.* Calidad de sueño en Uruguay al inicio de la pandemia. *An. Fac. Med.* **10**, (2023).
301. Ogundeji, A. A., Lakew, H., Tesfahuney, W. & Lombard, W. Influence of heat stress on milk production and its financial implications in semi-arid areas of South Africa. *Heliyon* **7**, e06202 (2021).

302. Lim, D.-H., Kim, T.-I., Park, S.-M., Ki, K.-S. & Kim, Y. Evaluation of heat stress responses in Holstein and Jersey cows by analyzing physiological characteristics and milk production in Korea. *J. Anim. Sci. Technol.* **63**, 872–883 (2021).
303. Salais-López, H. *et al.* Maternal Motivation: Exploring the Roles of Prolactin and Pup Stimuli. *Neuroendocrinology* **111**, 805–830 (2021).
304. Olazábal, D. E. *et al.* New theoretical and experimental approaches on maternal motivation in mammals. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **37**, 1860–1874 (2013).