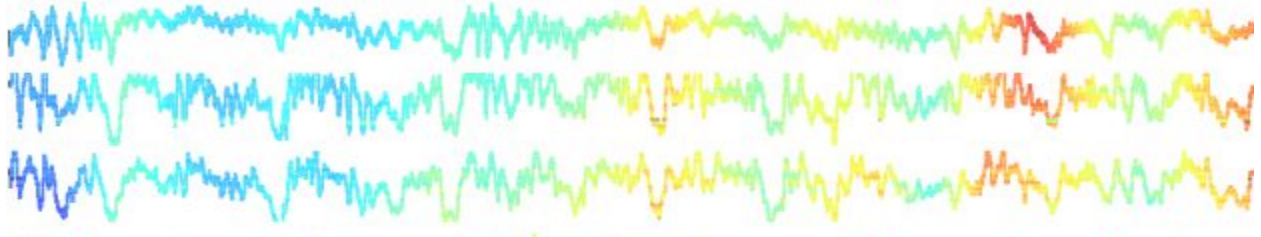


# Impacto de la privación de sueño en la potencia espectral del electroencefalograma de la rata



Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas  
Opción Neurociencias  
PEDECIBA  
UdelaR

**Lic. Lucía Osorio**

Orientadora: Dra. Alicia Costa  
Co-orientador: Dr. Pablo Torterolo

Laboratorio de Neurobiología del Sueño  
Departamento de Fisiología  
Facultad de Medicina  
UdelaR

# Índice

<b>Resumen</b>	<b>4</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>5</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>6</b>
1.1 Ciclo sueño-vigilia	7
El electroencefalograma	8
1.1.1 Mecanismos de generación de la vigilia, el sueño y su regulación	9
1.1.2 EEG de la rata durante la fase de luz y oscuridad	10
1.2 Privación de sueño	12
1.2.1 Efectos cognitivos de la privación de sueño	13
1.2.2 Efectos de la privación de sueño sobre la actividad eléctrica cerebral	14
<b>2. Hipótesis y objetivos</b>	<b>16</b>
2.1 Hipótesis de trabajo:	16
2.2 Objetivo general:	16
2.3 Objetivos específicos:	16
<b>3. Materiales y métodos</b>	<b>17</b>
3.1 Animales	17
3.2 Procedimiento quirúrgico	17
3.3 Protocolo experimental	19
3.4 Análisis de datos	20
3.5 Tratamiento estadístico	20
<b>4. Resultados</b>	<b>22</b>
4.1 Variaciones de la actividad eléctrica cerebral durante las fases de luz y oscuridad	22
4.1.1 Vigilia	22
4.1.2 Sueño NREM	26
4.1.3 Sueño REM	30
4.2 Privación de sueño	34
4.3 Período post-privación	41
4.3.1 Vigilia	41
4.3.2 Sueño NREM	45
4.3.3 Sueño REM	49
<b>5. Discusión</b>	<b>54</b>
5.1 Variaciones del EEG durante el ciclo luz-oscuridad	54
5.2 El EEG durante la privación de sueño	56

5.3 El EEG durante el rebote de sueño	56
5.4 Consideraciones técnicas	57
<b>6. Conclusiones</b>	<b>59</b>
<b>7. Perspectivas</b>	<b>59</b>
<b>8. Bibliografía</b>	<b>61</b>
<b>9. Contribuciones</b>	<b>68</b>
Presentaciones en eventos	68
Producción bibliográfica	68

# Resumen

El ciclo sueño-vigilia se caracteriza por la alternancia entre tres estados comportamentales bien definidos: vigilia, sueño No REM (NREM) o sueño lento, y sueño REM. La supresión o reducción del sueño genera importantes efectos negativos para la salud. Tanto para estudiar estos efectos, así como para develar las funciones del sueño, se utilizan diversos procedimientos de privación de sueño en modelos animales.

El objetivo de este trabajo fue estudiar cómo varía la potencia espectral del electroencefalograma en el rango de frecuencias de 1 a 200 Hz, en condiciones basales (comparando fase de luz y oscuridad), durante la privación total de sueño, y en el período post-privación. Para esto, utilizando la rata como modelo animal, se realizaron registros polisomnográficos, implantando de manera crónica electrodos de registro a nivel del bulbo olfatorio derecho y bilateralmente a nivel de la corteza motora primaria, somatosensitiva primaria y visual secundaria. A su vez, un electrodo de referencia se implantó a nivel del cerebelo. Para medir la actividad muscular se implantaron dos electrodos a nivel de los músculos del cuello. Los registros fueron realizados en un régimen de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, y se extendieron por 48 horas ininterrumpidas. Durante las primeras 24 horas se registró el período basal, seguido de 6 horas de privación de sueño utilizando la técnica de “gentle handling” y posteriormente un período de 18 horas de post-privación.

Los resultados muestran que el perfil electroencefalográfico de los tres estados comportamentales estudiados varía en relación a la fase de luz/oscuridad. Comparados con la media de las 24 horas basales, tanto la vigilia, sueño NREM y sueño REM muestran un aumento pronunciado en los valores de potencia de las altas frecuencias (gamma, 30-100 Hz; *high frequency oscillations* -HFO-, 100-200 Hz) en la fase de oscuridad con respecto a la fase de luz. La vigilia durante la privación de sueño muestra los cambios más evidentes en HFO, donde se observa un descenso con respecto a la vigilia del período basal. En el período post-privación existió un aumento del tiempo que los animales pasaron en sueño NREM y en REM. En los tres estados descendió la potencia relativa a las 24 horas basales para las bandas gamma y HFO, especialmente en las primeras seis horas. Esto fue acompañado de un aumento en la potencia de la banda delta (1 a 4 Hz), siendo significativo para NREM en las primeras seis horas.

Se concluye que tanto la vigilia como el sueño (NREM y REM) tienen características electrográficas diferentes dependiendo del momento del día en que se presenten, y las mismas se ven afectadas durante la privación de sueño y el período post-privación.

# Abreviaturas

EEG = electroencefalograma

EMG = electromiograma

EOG = electrooculograma

REM = sueño REM

NREM = sueño NREM o sueño de ondas lentas

SD = privación de sueño (del inglés "*sleep deprivation*")

SWA = actividad de ondas lentas (del inglés "*slow waves activity*")

HFO = oscilaciones de altas frecuencias (del inglés "*high frequency oscillations*")

# 1. Introducción

La vida tal como la conocemos ha evolucionado en un planeta que está en constante rotación, en donde se presenta una alternancia previsible de fases de luz y oscuridad en períodos de 24 horas. Como consecuencia, los animales han desarrollado sistemas biológicos que presentan oscilaciones circadianas (del latín *circa*, que significa “alrededor de”, y *dies*, que significa “día”). Estos ritmos o ciclos circadianos se observan, por ejemplo, en la temperatura corporal, secreción hormonal, actividad metabólica, y el ciclo de sueño/vigilia. Estos ritmos son regulados por un marcapasos maestro que se encuentra en el núcleo supraquiasmático (Meijer & Rietveld, 1989). Este núcleo bilateral, localizado en el hipotálamo anterior, regula aspectos fisiológicos y comportamentales con el fin de optimizar el control del medio interno y preparar al sujeto a un mundo externo que cambia en forma periódica y predecible, concepto que se denomina homeostasis predictiva (Burdakov, 2019).

## 1.1 Ciclo sueño-vigilia

El ciclo sueño-vigilia en mamíferos se caracteriza por la alternancia entre tres estados comportamentales: la vigilia, el sueño NREM y el sueño REM (Carskadon & Dement, 2005). Durante la vigilia hay una óptima interacción con el medio ambiente que permite el desarrollo de diversos comportamientos necesarios para la supervivencia. En los seres humanos, la vigilia se acompaña de consciencia tanto del ambiente como de procesos internos (hambre, sed, etc.). La actividad del electroencefalograma (EEG) durante la vigilia se caracteriza por la presencia de relativa alta frecuencia y baja amplitud (activación o desincronización cortical). El EEG durante la vigilia está caracterizado por ondas rápidas de bajo voltaje, y en ratas se destaca el ritmo theta (5-10 Hz) que se registra en cortezas posteriores durante la vigilia activa (Young et al., 1978).

Durante el sueño existe una importante disminución de la interacción con el medio ambiente que se manifiesta por un aumento del umbral para la reacción a los estímulos externos, acompañado de una disminución en la actividad somato-motora. Además, los animales adoptan una posición distintiva para conservar el calor. La importancia del sueño se desprende de la conservación del mismo a lo largo de la evolución (Campbell & Tobler, 1984). En humanos, en las etapas más profundas del sueño NREM, la actividad cognitiva (es decir, los sueños o actividad onírica) es mínima (Pace-Schott, 2005). El EEG de sueño

NREM es reconocible, tanto en seres humanos como en roedores, por la ocurrencia de ondas lentas (0.5 a 4 Hz) de gran amplitud, y eventos electrográficos de 0.5 a 2 segundos de duración conocidos como husos de sueño, que tienen una frecuencia intra-evento de 10 a 15 Hz. Durante el sueño NREM aumenta la actividad del sistema parasimpático, determinando cambios característicos en la actividad visceral; por ejemplo, desciende la frecuencia cardíaca.

El sueño REM ocurre periódicamente y es siempre precedido por el sueño NREM. Aunque el sueño REM es una etapa de sueño profundo (alto umbral para despertar por un estímulo sensorial), el EEG es similar al de vigilia, por lo que este estado también se denomina "sueño paradójico". Este se caracteriza por movimientos oculares rápidos, atonía muscular y cambios físicos en actividad vegetativa. Los sueños (actividad onírica) ocurren principalmente durante este estado (Pace-Schott, 2005). En la rata, el sueño REM está caracterizado por una actividad theta regular y prominente (Borbély et al., 1984; Young et al., 1978).

## El electroencefalograma

El descubrimiento de la actividad eléctrica en el cerebro, determinó que Hans Berger en el año 1929 sentara las bases para el desarrollo de la electroencefalografía (Berger, 1930), la cual se convirtió en una herramienta esencial para el monitoreo de la actividad cerebral tanto en el entorno clínico como en investigación.

El EEG es un registro de voltaje en función del tiempo, producido por la actividad de poblaciones de neuronas piramidales de la corteza cerebral. El EEG se registra mediante electrodos colocados sobre el cuero cabelludo (en registros estándar en seres humanos), o sobre la corteza cerebral en modelos animales (estrictamente sería un electrocorticograma). Según la posición de los electrodos se registra la actividad de distintas regiones corticales.

Las oscilaciones registradas pueden ser descompuestas en sus diferentes componentes de frecuencias. Existen rangos de frecuencias definidos, denominados con letras griegas y que tienen implicancias funcionales particulares. El criterio de bandas de frecuencias utilizados en esta Tesis es el siguiente:

- Delta: 0.5 a 4 Hz
- Theta: 5 a 10 Hz
- Sigma: 10 a 15 Hz
- Beta: 15 a 30 Hz

- Gamma: 30 a 100 Hz
- “*High Frequency Oscillations*”, HFO: 100 a 200 Hz

## Polisomnografía

La polisomnografía (PSG) es la herramienta más importante para estudiar el sueño. La misma combina el registro del EEG, de la actividad muscular (EMG) y el registro de los movimientos de los ojos o electrooculograma (EOG). A estos se les pueden agregar otros registros bioeléctricos como el electrocardiograma y la actividad respiratoria.

La clasificación de los diferentes estados de sueño se denomina estadificación. Desde el 2007 la estadificación de sueño en humanos se realiza de acuerdo a las definiciones de la American Academy of Sleep Medicine (Iber, 2007), con un estado de vigilia, tres fases de sueño NREM (N1 a N3) y el sueño REM. La PSG también se puede adaptar para modelos animales, como lo realizamos en la presente Tesis.

### 1.1.1 Mecanismos de generación de la vigilia, el sueño y su regulación

El ciclo sueño-vigilia está regulado por un proceso circadiano (proceso C) y un proceso homeostático (proceso S) (Borbély & Achermann, 1999). Los humanos muestran un claro período de vigilia consolidada durante el día y de sueño durante la noche, resultado de la interacción entre la presión homeostática para sueño que se acumula a medida que transcurre el día y una señal circadiana que promueve la vigilia durante la fase de luz y el sueño durante la noche (Achermann et al., 1993; Mistlberger, 2005).

Los sistemas neurales críticos para la generación y el mantenimiento de la vigilia se los conoce como sistemas activadores (Tortero & Vanini, 2010; Vanini & Tortero, 2021). Estos están compuestos por grupos neuronales que utilizan distintos neurotransmisores (acetilcolina y diversas monoaminas) y neuromoduladores (hipocretinas/orexinas). Sus somas están localizados en la formación reticulada meso-pontina, hipotálamo pósterolateral y cerebro basal anterior (BF). Todos ellos proyectan al tálamo y/o corteza cerebral, produciendo activación cortical. La actividad de todas las neuronas activadoras y la liberación de sus neurotransmisores al espacio sináptico, es máxima durante la vigilia y disminuye durante el sueño NREM.

Neuronas del área preóptica (POA) del hipotálamo, especialmente de su región ventrolateral (VLPO) son críticas en la generación y mantenimiento del sueño NREM (Pace-Schott, 2005). Estas neuronas aumentan su frecuencia de disparo durante el sueño NREM. La estimulación eléctrica del POA induce sueño NREM; gran parte de estas



neuronas de POA son GABAérgicas, y proyectan en forma monosináptica a los sistemas activadores disminuyendo su actividad. La disminución de actividad de los sistemas activadores determina que se generen ondas lentas y los husos de sueño por la actividad sincronizada de neuronas talámicas y corticales (Tortero & Vanini, 2010). A su vez, las neuronas de los sistemas activadores inhiben las neuronas del POA. En otras palabras, las neuronas promotoras de vigilia y sueño NREM presentan inhibición recíproca entre ellas; este diseño en que una estructura apaga a la otra, se ha modelado estructuralmente a semejanza de lo que ingeniería eléctrica se denomina interruptor “flip-flop” (Saper et al., 2010).

Es importante señalar que, durante la vigilia, poblaciones de neuronas en la corteza cerebral pueden mostrar un perfil de activación similar al sueño NREM con consecuencias negativas para el rendimiento. Esto está producido por un fenómeno homeostático restringido a un sector que se denomina sueño local (Guillaumin et al., 2018; Vyazovskiy et al., 2011).

Las redes neuronales necesarias para la generación y mantenimiento del sueño del REM se encuentran en la formación reticulada meso-pontina. De hecho, las mismas neuronas meso-pontinas que juegan un rol en el mantenimiento de la vigilia, también lo tienen en la generación del sueño REM. Mientras que neuronas colinérgicas de esta región se activan durante el sueño REM (neuronas REM “on”), las neuronas monoaminérgicas se apagan durante este estado (neuronas REM “off”); es decir que estas neuronas tienen que inhibirse para que el sueño REM se genere (Vanini & Tortero, 2021).

### **1.1.2 EEG de la rata durante la fase de luz y oscuridad**

A diferencia de los humanos, los roedores muestran un fuerte componente ultradiano durante el sueño, con ciclos de sueño de corta duración, tanto en la fase de luz o reposo, como la fase activa de oscuridad (sueño polifásico). A pesar de estas diferencias, la teoría de homeostasis de sueño parece aplicarse tanto a sueño polifásico en roedores como a sueño monofásico en humanos, dado que en ambos se tiende a recuperar el sueño perdido luego de una privación (rebote de sueño) (Deboer, 2013).

El ritmo ultradiano del ciclo sueño-vigilia que presenta el modelo animal utilizado en el presente trabajo de Tesis (*Rattus norvegicus*) permite estudiar las características que presentan los distintos estados comportamentales (vigilia, sueño NREM y REM) en diferentes momentos del ciclo luz-oscuridad.

A pesar que existen diferentes estudios que han analizado el EEG en la vigilia y el sueño en respuesta a diversos tratamientos, los mismos se centran en las frecuencias hasta 30 Hz, no tomando en cuenta las bandas de frecuencias gamma y HFO (por ej. Borbély et al., 1984). En nuestro laboratorio se han estudiado estas bandas de frecuencias durante la vigilia y el sueño (Castro et al., 2013, 2014; Cavelli et al., 2015, 2017), y se evaluó globalmente la influencia del ciclo luz-oscuridad en las mismas (Mondino et al., 2020). Sin embargo, un análisis minucioso hora a hora de todo este ciclo donde se cubra el espectro completo de frecuencias (0-200 Hz) se encuentra aún pendiente y es lo que se abordará en el presente trabajo de Tesis.

## Potencia espectral

La densidad espectral de la potencia del EEG nos indica el peso de los componentes de frecuencia de la señal. Matemáticamente, para una señal  $x(t)$ , su potencia espectral es definida como:

$$P_x(f) = |x(f)|^2$$

donde

$$x(f) = \int_{-\infty}^{+\infty} x(t)e^{2\pi ift} dt$$

es la transformada de Fourier de  $x$ . En la práctica, es calculada mediante la transformada rápida de Fourier (FFT por su sigla en inglés). El algoritmo moderno de FFT fue desarrollado por Cooley y Tukey en 1965 (Cooley & Tukey, 1965), incrementando la velocidad computacional del análisis de Fourier, simplificando su complejidad. Para estimar la densidad espectral de la potencia comúnmente se utiliza el algoritmo de Welch, el cual reduce significativamente el ruido. Este método se basa en estimar la potencia espectral en ventanas de tiempo pequeñas, empleando la FFT, y luego promediando los resultados para obtener una mejor estimación (lo cual reduce componentes no estacionarios). Es importante notar que estas ventanas pequeñas son usualmente multiplicadas por una función de ventanas (por ej: funciones de Hamming, Hanning o Slepian) para reducir la distorsión producida por los bordes de las ventanas. El resultado es una representación de la distribución de la energía o la amplitud de una señal en sus

diferentes componentes de frecuencia. La potencia del EEG en una frecuencia dada refleja el grado de sincronización local de potenciales extracelulares en esa frecuencia (Buzsáki et al., 2012).

## 1.2 Privación de sueño

Los efectos negativos de la interrupción de sueño son muy conocidos, y numerosos trabajos han documentado sus consecuencias (por ejemplo: Aldabal & Bahammam, 2011; Baglioni et al., 2011; Colavito et al., 2013; Durmer & Dinges, 2005; Meerlo et al., 2008; Rechtschaffen et al., 1999; Spiegel et al., 2009). Procedimientos experimentales de privación de sueño (SD), tanto en humanos como en modelos animales han sido ampliamente utilizados para develar varios aspectos de la función del sueño en sí misma, así como también para estudiar los efectos de la pérdida de sueño en el funcionamiento del cerebro a nivel molecular, celular, fisiológico y cognitivo.

El primer reporte experimental en privación de sueño (SD) fue realizado en perros a fines del siglo XIX (de Manacéine, 1894), mientras que Patrick y Gilbert (1896) hicieron el primer estudio de SD en humanos. Estos y otros estudios pioneros representaron los primeros intentos experimentales de relacionar el sueño con centros neuronales, y sugieren que el sueño cumple una función vital y que el cerebro puede ser afectado por la falta del mismo (Bentivoglio & Grassi-Zucconi, 1997; Everson et al., 1989). En las siguientes décadas, el perro como modelo animal de SD fue progresivamente sustituido por el gato y luego éste por roedores, siendo la rata y el ratón los animales más utilizados en la actualidad.

Existe una variedad de paradigmas de SD que consisten en evitar parcial o completamente la ocurrencia de sueño en un organismo. La privación total de sueño se refiere a evitar episodios de sueño globalmente. Por su parte, la privación selectiva a REM busca evitar episodios de sueño REM, conservando el sueño NREM. De acuerdo a su extensión en el tiempo, se denomina privación aguda de sueño cuando evitan el sueño por al menos 1 período (en el caso de humanos, 1 noche), mientras que se considera privación crónica de sueño cuando mantiene al individuo sin dormir o con sueño reducido por un período prolongado de tiempo (días, semanas). En la presente Tesis se estudia la privación total y aguda de sueño.

Dada la regulación homeostática del sueño, la SD tiene como consecuencia una acumulación progresiva de “deuda de sueño” que resulta en esfuerzos cada vez mayores

para mantener la vigilia con el correr del tiempo. Con la excepción del insomnio inducido por drogas, la SD experimental en humanos es comúnmente generada por el involucramiento del sujeto en una variedad de actividades que ayudan a mantener los niveles de vigilancia suficientes para evitar el sueño. Una contribución crucial en el mantenimiento de los sujetos en vigilia es la motivación, relacionada con la necesidad de cumplir con determinada tarea (estudio, trabajo). Además, los sujetos saben por adelantado sobre la duración del experimento y están conscientes del resultado benigno de la experiencia. Estas consideraciones son muy relevantes cuando la comparamos con la SD en animales de laboratorio. Por definición, la SD experimental en humanos es un procedimiento “gentil”, no amenazante, aunque no por esto desprovista de un cierto grado de estrés inevitable, asociado a la falta de sueño. Por su parte, los protocolos de SD en animales inevitablemente están contaminados por un grado de estrés mayor vinculado a la novedad e incertidumbre que provocan. Esto es un factor a considerar en la interpretación de los resultados.

Revel et al (2009) realizó una revisión de veintinueve métodos para privar de sueño a ratas y ratones. Algunos ejemplos son modelos relacionados al estrés como cambios ambientales, incomodidad, modelos farmacológicos, genéticos, etc. Uno de los métodos más populares en roedores (y el método que se utilizó en este trabajo) es el procedimiento de “*gentle handling*” (GH), basado en una interacción directa del experimentador con el animal, el cual se mantiene despierto mediante estímulos suaves. Para esto los experimentos son realizados por investigadores con quienes los animales están familiarizados desde antes del procedimiento, y se los mantiene en sus cajas de alojamiento durante todo el protocolo de SD. El GH requiere una presencia física constante por parte de los investigadores quienes monitorean activamente en la PSG el estado de vigilancia de los animales, y los estimulan lo mínimo necesario para mantenerlos despiertos (mediante la presentación de estímulos novedosos y/o estímulos auditivos o somestésicos), siempre que se observen indicios comportamentales de somnolencia como adoptar una postura de sueño y/o signos en el EEG de entrada al sueño.

### **1.2.1 Efectos cognitivos de la privación de sueño**

La privación de sueño tiene efectos tanto globales como específicos sobre diversas funciones cognitivas. Los efectos más reportados incluyen una reducción en la atención y la vigilancia (Lim & Dinges, 2008), y una mayor variabilidad en las respuestas conductuales (Killgore et al., 2006). Esto se relaciona con el funcionamiento alterado de

las cortezas de asociación prefrontal dorsolateral y parietales (Chee et al., 2008; Thomas et al., 2000). En los procesos cognitivos que se basan en la atención y la vigilancia sostenida, la privación del sueño parece tener un efecto degradante global (Goel et al., 2009; Lim & Dinges, 2008, 2010). La privación del sueño también altera el procesamiento afectivo normal, posiblemente a través del debilitamiento de los sistemas inhibidores prefrontales que permiten que los sistemas emocionales (límbico) funcionen relativamente sin control, sin la modulación adecuada o la integración efectiva de la emoción (Chuah et al., 2006). Esta desregulación afectiva en última instancia conduce a un sesgo emocional negativo en el estado de ánimo, la percepción y la memoria, tolerancia a la frustración reducida y dificultad para usar las emociones para informar de forma adaptativa la toma de decisiones (Daniela et al., 2010; Killgore et al., 2006). Varios estudios han demostrado que muchos de estos déficits permanecen incluso cuando el estado de alerta y la vigilancia se restablecen o se mantienen con estimulantes como la cafeína, lo que sugiere que hay efectos específicos de la pérdida del sueño en la cognición más allá de los introducidos por la disminución del estado de alerta y la atención (Killgore et al., 2006). Sin embargo, los mecanismos mediante los cuales la privación del sueño afecta las funciones ejecutivas superiores no están completamente identificados.

### **1.2.2 Efectos de la privación de sueño sobre la actividad eléctrica cerebral**

Tanto en humanos como en otros animales durante el procedimiento de privación de sueño la vigilia presenta alteraciones en su perfil electroencefalográfico, mostrando una mayor actividad en la banda theta y delta respectivamente (Franken, Dijk, et al., 1991; Lorenzo et al., 1995).

Luego de una pérdida total de sueño, el organismo intenta compensarla mediante dos estrategias: la cantidad de tiempo en sueño y la profundidad del mismo. En las horas posteriores a una SD la duración tanto del sueño NREM como REM se elevan por encima de los niveles basales correspondientes. Esta regulación homeostática es un hallazgo consistente en diferentes especies y métodos de privación de sueño (Deboer & Tobler, 1994; Franken et al., 1991; Hasan et al., 2012).

Otro aspecto de regulación homeostática es la profundidad del sueño, que se traduce en el EEG como un aumento en la amplitud de las ondas lentas (<5 Hz, o banda delta) durante el sueño NREM posterior a la privación (Blake & Gerard, 1937; Ferrara et al., 1999; Neckelmann & Ursin, 1993; Rosa & Bonnet, 1985; Williams et al., 1964). Luego de un aumento inicial, la actividad de ondas lentas (SWA) del sueño NREM

disminuye gradualmente a medida que el sueño progresa. También fue establecida en algunas especies de mamíferos la existencia de una relación “dosis/respuesta” entre la duración de la vigilia previa y la subsecuente SWA en NREM, generando el concepto de que la SWA refleja la necesidad acumulada de sueño.

Específicamente, en el modelo animal de la presente Tesis, se ha mostrado un aumento de SWA en el período posterior a la SD, incluso en SD de menos de 24 hs (Borbély et al., 1984; Borbely & Neuhaus, 1979; Endo et al., 1997; Franken et al., 1991; Friedman et al., 1978; Mistlberger et al., 1983). Tobler et al. (1986) mostraron que la SD impacta en la incidencia de las ondas lentas y sus amplitudes reportando un aumento en la potencia de la banda delta en el sueño subsiguiente. También se ha demostrado que la SD genera un aumento del tiempo de sueño REM (rebote) durante el período post-privación, incluso mostrando un aumento proporcional a la cantidad de sueño REM perdido durante la privación (Endo et al., 1997).

En la revisión realizada para la presente Tesis no se encontraron trabajos que aborden el efecto de la SD en las frecuencias altas (>30 Hz) del EEG. Y dado que se ha postulado la importancia de las oscilaciones de altas frecuencias en las funciones cognitivas (Rieder et al., 2011; Tort et al., 2008, 2013; Uhlhaas et al., 2009, 2011), el objetivo de la presente Tesis incluye estudiar cómo se afectan las mismas durante y luego de un protocolo de SD.

## **2. Hipótesis y objetivos**

### **2.1 Hipótesis de trabajo:**

- La composición espectral del EEG en vigilia, sueño NREM y sueño REM varían según los estados ocurran en fase de luz o fase de oscuridad.
- Durante la SD, el espectro de potencias del EEG será diferente a la vigilia basal.
- El efecto de la SD se extenderá luego de culminada la misma y su impacto podrá observarse tanto en vigilia, sueño NREM y sueño REM en todo el espectro de potencias del EEG.

### **2.2 Objetivo general:**

Utilizando la rata como modelo animal, estudiar el efecto del ciclo luz-oscuridad y la privación total y aguda de sueño sobre la potencia espectral de las distintas bandas de frecuencias del EEG.

### **2.3 Objetivos específicos:**

1. Estudiar las características del perfil electroencefalográfico de la vigilia, el sueño NREM y el sueño REM a lo largo del período de 24 horas, en un ambiente con ciclo luz-oscuridad 12:12.
2. Analizar el perfil de la actividad cortical de la vigilia forzada durante el procedimiento de privación de sueño.
3. Evaluar las características electrocorticales del sueño y la vigilia durante el período post privación de sueño.

## 3. Materiales y métodos

### 3.1 Animales

Se utilizaron 7 ratas Wistar macho, con un peso de  $300 \pm 25$ g. Los animales fueron suministrados por la Unidad de Reactivos para Biomodelos de Experimentación (URBE) de la Facultad de Medicina. Los procedimientos experimentales fueron hechos de acuerdo a la *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (8th edition, National Academy Press, Washington, DC, 2010) y el protocolo utilizado en este trabajo de Tesis fue aprobado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA, número de protocolo 070153-000332-16, Facultad de Medicina, Universidad de la República). Se tomaron todas las medidas adecuadas para minimizar dolor, molestias y estrés de los animales, y se realizaron todos los esfuerzos posibles para utilizar la mínima cantidad de animales necesarios para obtener resultados con valor estadístico.

### 3.2 Procedimiento quirúrgico

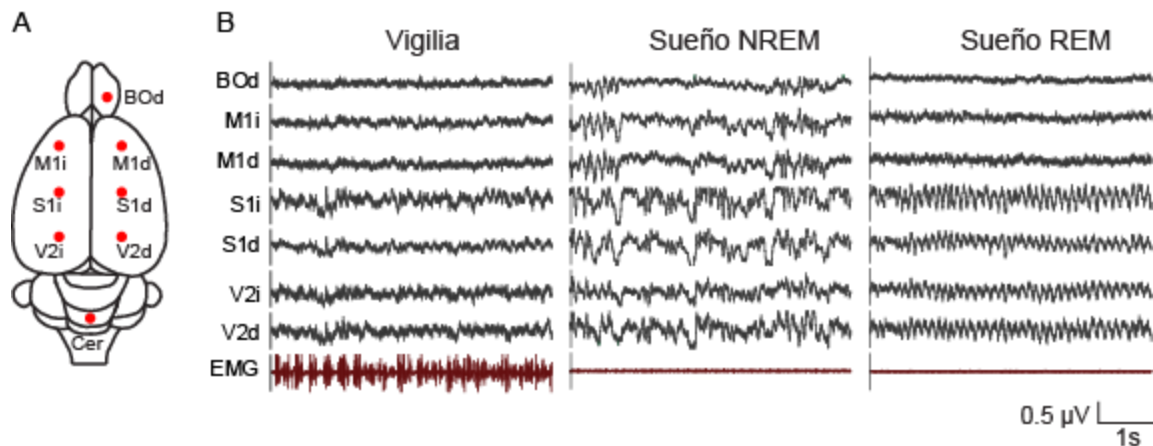
Los animales fueron implantados de manera crónica con electrodos para registro polisomnográfico. La anestesia utilizada fue una mezcla de ketamina-xilacina-acepromacina (90 mg/kg; 5 mg/kg, 2 mg/kg, respectivamente) administrada por vía intraperitoneal. Una vez constatada la ausencia de reflejos, las ratas fueron posicionadas en el aparato estereotáctico. Se expuso el cráneo y se realizaron craneotomías para introducir los electrodos (tornillos de acero inoxidable de 1 mm de diámetro), de manera tal que su extremo inferior estuviera en contacto con la superficie cortical (por encima de la duramadre). El posicionamiento de los electrodos se demuestra en la Figura 1A. Los electrodos fueron colocados en el bulbo olfatorio (BO: L -1 mm, AP +8.5 mm, de acuerdo al atlas de Paxinos & Watson, 2006), bilateralmente en la corteza motora primaria (M1: L  $\pm$  2.5 mm, AP +2.5 mm), corteza somatosensitiva primaria (S1: L  $\pm$  2.5 mm, AP -2.5 mm) y corteza visual secundaria (V2: L  $\pm$  2.5 mm, AP -7.5 mm). Nótese que los electrodos bilaterales fueron colocados equidistantes lateralmente a la línea media. Un electrodo de referencia común fue colocado a nivel del cerebelo. Para registrar el EMG se insertaron dos electrodos flexibles en los músculos de la nuca. Los electrodos fueron conectados a una ficha que fue fijada al cráneo con acrílico dental.

Una vez finalizada la cirugía se administró una dosis de analgésico (Ketoprofeno, 1 mg/kg, intramuscular) y de antibiótico (20 mg de penicilina intraperitoneal); ambos fueron



repetidos a las 24 y 48 hs posteriores a la cirugía. Los márgenes de la herida fueron curados con antibióticos tópicos aplicados diariamente por 4 días (incluido el día de la cirugía).

Luego de la cirugía los animales permanecieron una semana en su caja de alojamiento en la cámara de registro a modo de adaptación previa al comienzo del experimento.



**Figura 1. Posición de los electrodos y registros polisomnográficos.** A) Esquema representando la posición de los siete electrodos de registro implantados (BOd = bulbo olfatorio derecho, M1i = corteza motora primaria izquierda, M1d = corteza motora primaria derecha, S1i = corteza somatosensorial primaria izquierda, S1d = corteza somatosensorial primaria derecha, V2i = corteza visual secundaria izquierda, V2d = corteza visual secundaria derecha). El electrodo de referencia fue ubicado en el cerebelo (Cer). B) Registros polisomnográficos de los 3 estados estudiados: vigilia, sueño NREM y sueño REM. Nótese en la vigilia un predominio de actividad rápida acompañada por alta actividad muscular, mientras que durante el sueño NREM se observa una actividad más lenta con presencia de husos de sueño que son eventos típicos de este estado. En el sueño REM se aprecia una actividad rápida en el EEG, ritmo theta en las cortezas posteriores y pérdida de tono muscular.

### 3.3 Protocolo experimental

Los animales fueron alojados individualmente en cajas transparentes (40x30x20 cm) con un colchón de viruta, en un ambiente con temperatura controlada (21-24°C) y aislamiento acústico. Se mantuvieron en un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, comenzando la fase de luz (50 lux) a las 08:00, con agua y comida a disposición en todo momento. El encendido de la luz se considera como el “*Zeitgeber time*” cero o ZT0. “*Zeitgeber*” es un término alemán utilizado en cronobiología que se puede traducir como sincronizador (en forma literal, dador de tiempo), y que se utiliza como para denominar a cualquier clave exógena que puede provocar la sincronización de un ritmo endógeno; en nuestro caso, la luz.

Aproximadamente 12 horas previo al comienzo del registro se conectó al animal al dispositivo de registro a través de un conector con rotor, lo cual le permitía al animal moverse libremente en toda la superficie de la caja. Los registros basales comenzaron en ZT0 del primer día y fueron grabados de manera continua por 48 horas. Una vez cumplidas las primeras 24 horas de registro (ZT 0 del día 2) se comenzó el protocolo de 6 hs de privación de sueño total por “*gentle handling*” (Tobler, Deboer, & Fischer, 1997) . También se registraron las 18 horas posteriores a la privación donde los animales pudieron dormir libremente.

Las señales bioeléctricas fueron amplificadas (x1000) y filtradas (0.1 Hz y 200 Hz). La actividad de todos los canales fue obtenida y almacenada en una computadora utilizando una tarjeta conversora National Instruments de 16 bits, con una frecuencia de muestreo de 1024 Hz, a través del software DASyLab (Measurement Computing).

La estadificación de los registros fue realizada de manera manual en épocas de 10 segundos. La vigilia fue definida como una actividad de ondas rápidas de bajo voltaje en la corteza frontal, con la aparición de ritmo theta en la corteza occipital y actividad EMG relativamente alta. El sueño NREM se identificó por una actividad de ondas lentas (0.5-4 Hz) de alta amplitud y husos de sueño en cortezas frontales, parietales y occipitales, acompañado de un descenso de la actividad EMG. El sueño REM fue definido como ondas rápidas de bajo voltaje a nivel frontal, un ritmo theta regular en las cortezas parietales y occipitales, y un EMG silente a excepción de ocasionales mioclonias (Figura 1B).

### 3.4 Análisis de datos

El porcentaje de tiempo en vigilia, sueño NREM y sueño REM resulta del análisis polisomnográfico hora por hora y se describe como la media  $\pm$  error estándar, expresados en porcentaje del tiempo del registro.

Para el análisis del espectro de potencia de cada canal del EEG, se utilizó la función de Welch en Matlab (ventana Hamming, tamaño de ventana 10 segundos, solapado de 2.5 segundos, frecuencia de muestreo 1024 Hz, resolución 0.5 Hz).

Para realizar los espectrogramas de potencia, se promedió el valor de potencia de tal manera que para cada frecuencia y para cada hora se obtuvo un valor. A su vez, se convirtieron estos valores a Z score. Es decir, a cada uno se le restó la media de las potencias de las 24 horas basales para esa frecuencia, y se lo dividió entre el desvío estándar de ese mismo período (24 horas basales) para esa misma frecuencia. Esto permitió determinar cuán alejado se encuentra ese valor de la media de las 24 hs basales. En los espectrogramas se utilizó un filtro de medias para lograr un suavizado en la imagen (promedia cada punto con el punto vecino en las 4 dimensiones).

En todas las figuras se utilizó el promedio de todos los animales y un promedio de todos los electrodos (gran media), incluyendo la corteza del bulbo olfatorio derecho (archicortex).

Los artefactos que se observan en la frecuencia de 50 Hz y sus armónicos son debido a la interferencia introducida por la corriente alterna (no utilizamos filtros notch). Para todos los análisis se descartaron las épocas con artefactos de movimiento.

### 3.5 Tratamiento estadístico

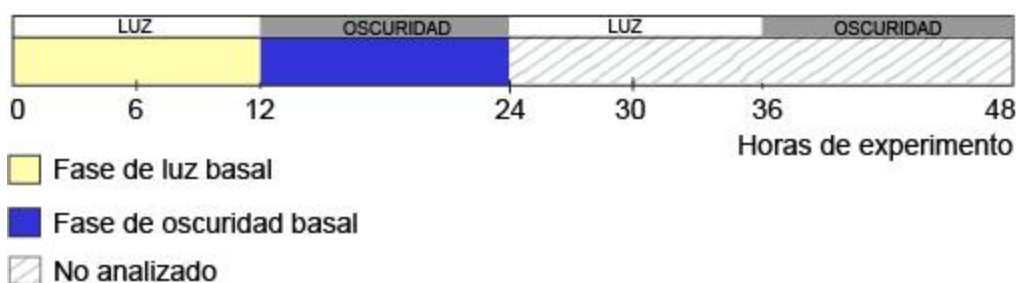
En cada sección se realizaron dos tipos de análisis para las potencias, un análisis de la potencia relativa a la media de las 24 horas basales, cuyos valores se transformaron a z-score (mostrados en figuras de espectrogramas). Tomando como destacables los valores que se diferencian de la media en por lo menos 2 desvíos estándar ( $z\text{-score} > 2$  o  $< -2$ ). El segundo análisis es una comparación de las potencias absolutas para cada banda de frecuencias, hora a hora. En este caso se realizaron test de t de Student de muestras pareadas a dos colas, tomando como estadísticamente significativos los valores de  $p < 0.05$ .

Para determinar la significancia estadística de las diferencias en la cantidad de tiempo en cada estado también se realizaron test de t de Student de muestras pareada a dos colas, tomando como estadísticamente significativos los valores de  $p < 0.05$ .

## 4. Resultados

### 4.1 Variaciones de la actividad eléctrica cerebral durante las fases de luz y oscuridad

En esta sección, correspondiente al Objetivo Específico 1, se analiza el perfil electrocortical de los diferentes estados comportamentales (vigilia, sueño NREM y sueño REM) en fase de luz y en fase de oscuridad. Para eso se registró en forma continua y se analizan las 24 horas basales (Figura 2) donde no se realizó ningún tipo de manipulación a los animales.



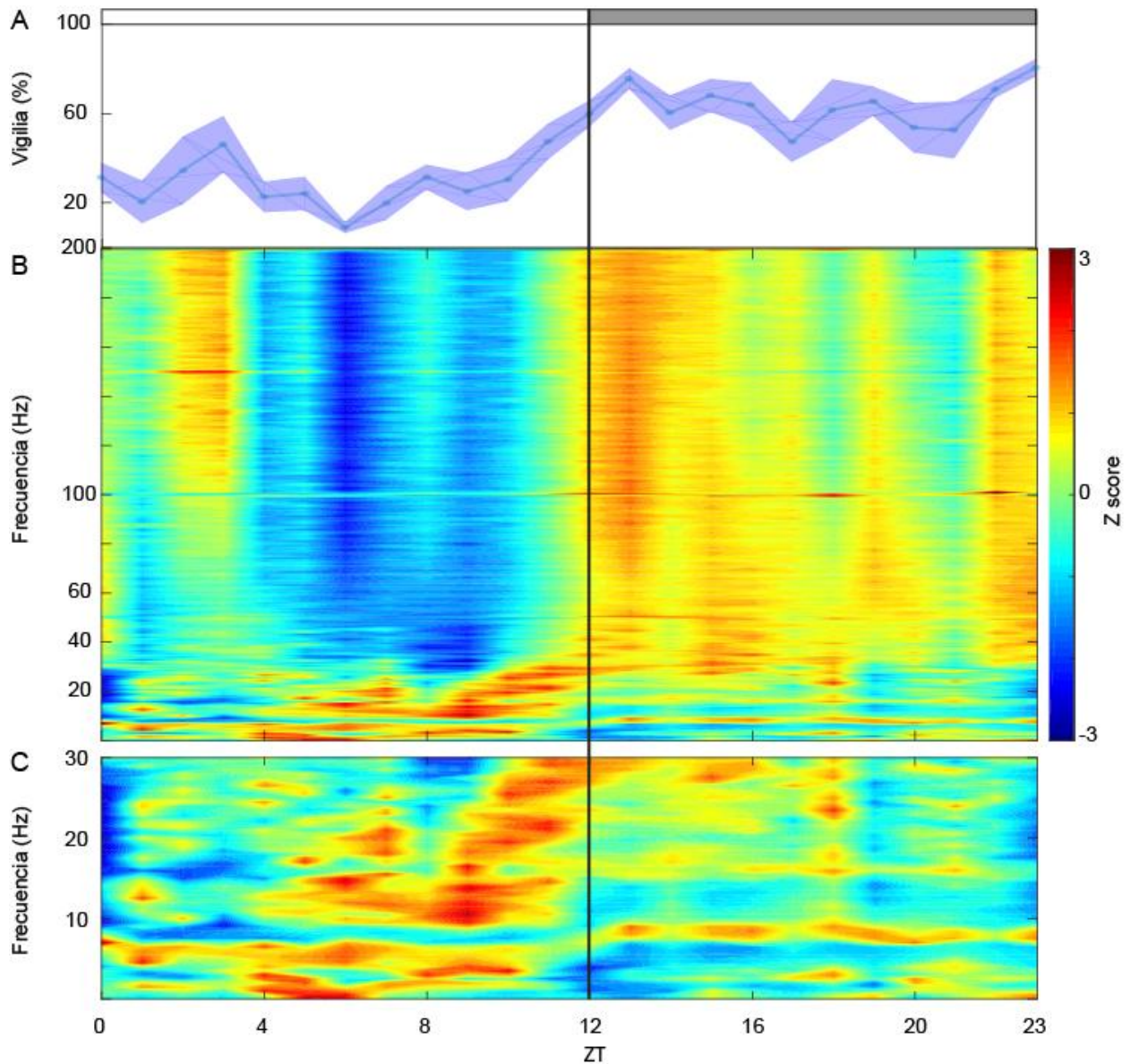
**Figura 2. Diagrama de los registros analizados para el Objetivo Específico 1.** En esta figura se ilustra el tiempo analizado para este objetivo. Este corresponde al registro basal en las primeras 24 hs de experimento. En amarillo se señalan las 12 horas de luz, y en azul las 12 horas de oscuridad. El registro correspondiente a las horas señaladas con líneas oblicuas no se analizó en esta sección.

#### 4.1.1 Vigilia

El porcentaje de tiempo que los animales permanecieron en vigilia fue mayor durante la fase de oscuridad ( $63.7 \pm 9.9\%$ ) que durante la fase de luz ( $29.1 \pm 10.9\%$ ); esta diferencia es estadísticamente significativa ( $p = 0.00005$ ). En la Figura 3A se representa el porcentaje de vigilia en cada hora.

El análisis de la potencia relativa a la media de las 24 horas (transformadas a z-score, Figura 3B) muestra que hay marcadas diferencias entre la fase de luz y oscuridad en todo el espectro de frecuencias. Las altas frecuencias ( $> 30$  Hz) presentan los valores más bajos entre ZT4 y ZT10 (fase de luz), y los máximos de ZT12 a ZT16 (fase de oscuridad). Éstas diferencias se pueden apreciar cuando se analizan por separado las

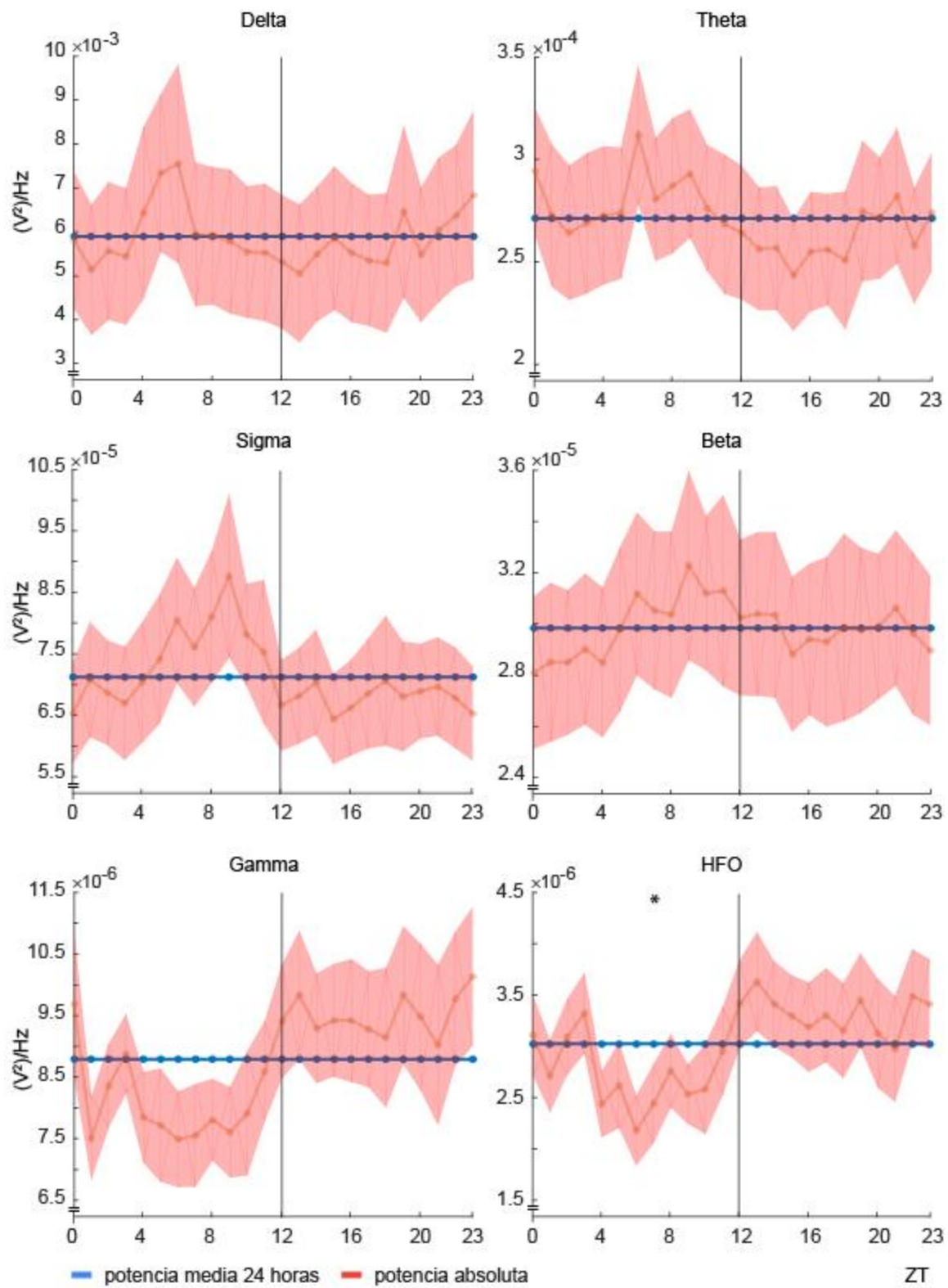
potencias absolutas de cada banda de frecuencias en relación con la media de las 24 horas (Figura 4). Tanto en la banda gamma como en las HFO aumenta la potencia y se mantiene por encima de la media durante toda la fase de oscuridad, mientras que en la fase de luz se mantienen predominantemente por debajo (llegando a valores estadísticamente significativos para HFO en ZT7). Es interesante notar que este aumento se empieza a dar una hora antes del apagado de la luz y sigue progresando una vez instalada la oscuridad.



**Figura 3. Espectrograma de potencia relativa en vigilia. A)** Porcentaje de tiempo en vigilia durante las 24 horas, representado como la media (línea sólida) y el error estándar

(sombreado). La barra superior indica la fase de luz y oscuridad. **B)** Espectrograma del z-score de las potencias relativas en vigilia. La línea negra vertical indica el comienzo de la fase de oscuridad. **C)** Ampliación de B mostrando la banda de frecuencias de 0 a 30 Hz. ZT0 = 8AM. Los paneles B y C comparten la misma escala de colores.

Las bajas frecuencias (< 30 Hz) también muestran perfiles diferentes para ambas fases (Figura 3C). A nivel de la banda delta, theta, sigma y beta se destaca un aumento de la potencia entre ZT4 y ZT12, pero estos valores no llegan a ser estadísticamente significativos (Figura 4).



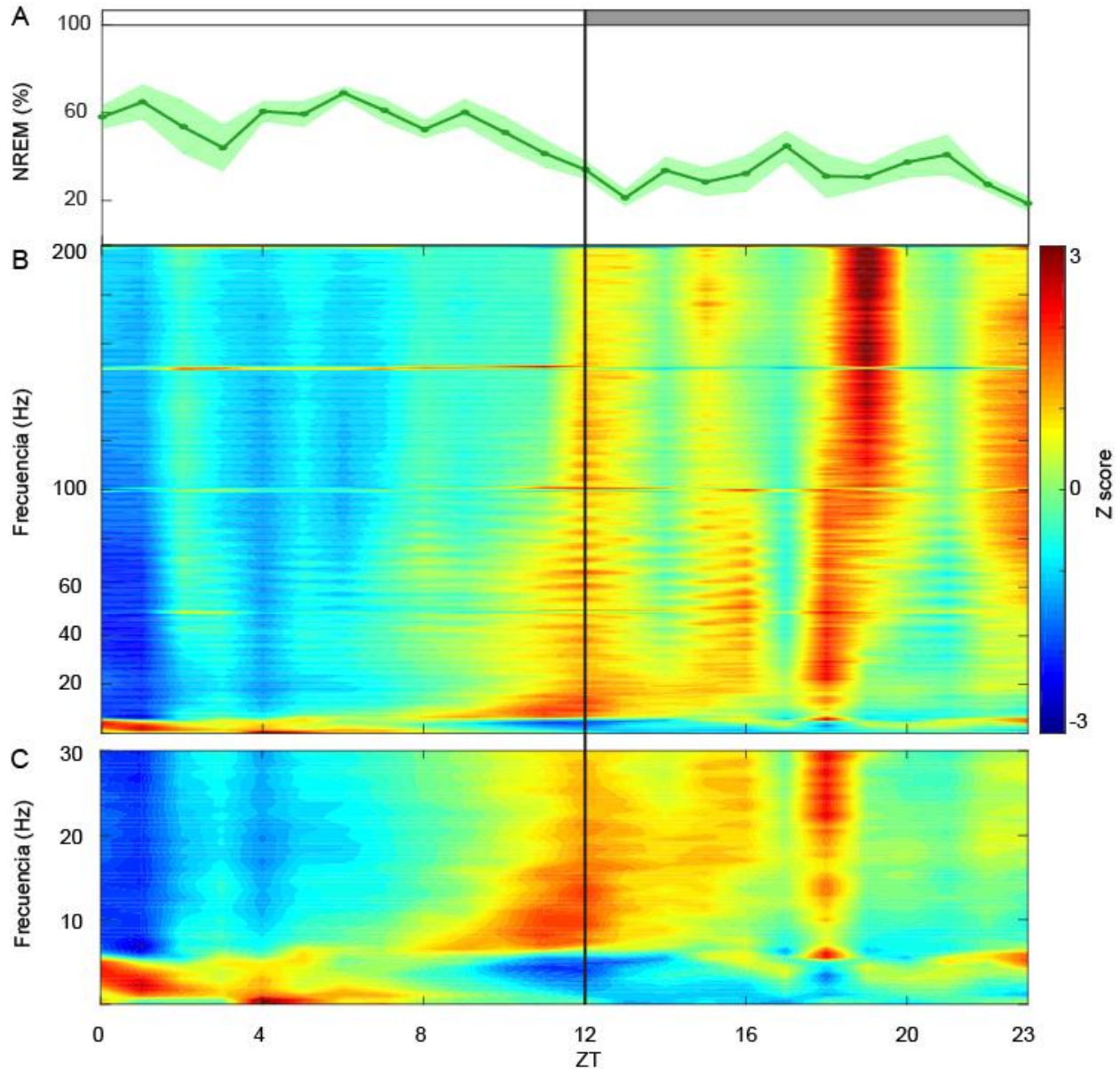


**Figura 4. Comparación de potencia absoluta para cada banda de frecuencia con respecto a la media de las 24 horas.** La línea azul indica la potencia media de las 24 horas basales para cada banda de frecuencia. En rojo la potencia de cada banda de frecuencia representada como la media (línea sólida) y error estándar (sombreado). Línea negra vertical indica el comienzo de la fase de oscuridad. El asterisco indica que la diferencia entre ambas fue estadísticamente significativa (test t de Student para muestras pareadas,  $p < 0.05$ ).  $n = 7$ , se muestra el promedio de todos los electrodos.

#### 4.1.2 Sueño NREM

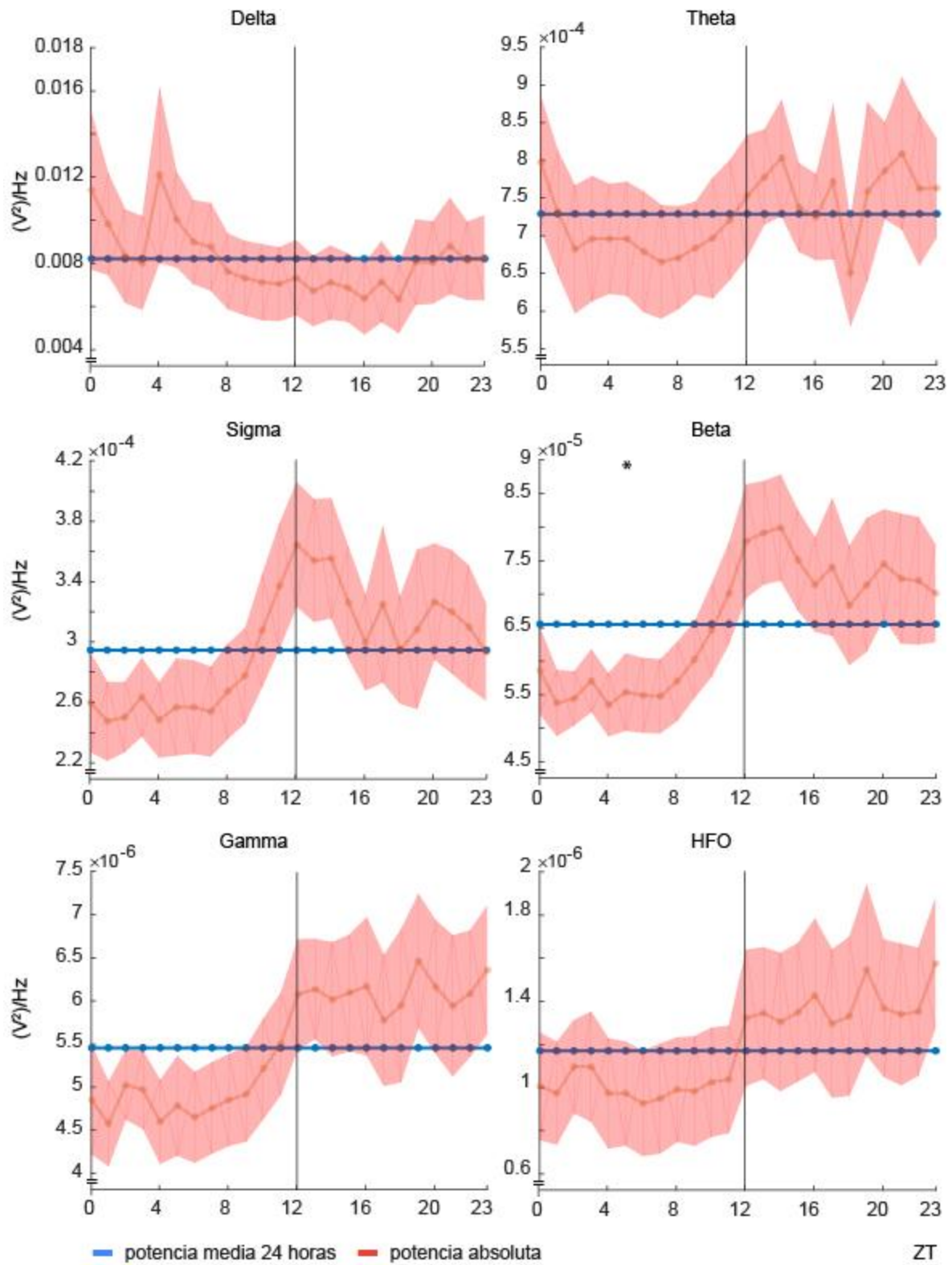
El porcentaje en sueño NREM fue mayor en la fase de luz ( $56.3\% \pm 8.1$ ) que en la de oscuridad ( $31.7\% \pm 7.4$ ); esta diferencia es estadísticamente significativa ( $p=0.0001$ ). En la Figura 5A se representa el porcentaje de sueño NREM en cada hora.

La potencia en el sueño NREM también muestra diferencias marcadas a lo largo de las 24 horas (Figura 5B). Al igual que en la vigilia las frecuencias altas tienen valores inferiores de potencia relativa en casi todas las horas de la fase de luz, con un progresivo aumento que se da alrededor de la hora de inicio de la fase de oscuridad. Este aumento progresivo también se hace evidente al comparar la potencia absoluta por banda con respecto a la media (de esa banda) en las 24 horas (Figura 6). Se observa como las frecuencias desde sigma hasta HFO tienen una dinámica temporal muy similar, permaneciendo con valores por debajo de la media en casi toda la fase de luz (llegando la banda beta a la significancia en ZT5) y aumentando paulatinamente a partir de ZT8, hasta alcanzar valores por encima de la media con la llegada de la fase de oscuridad (sin llegar a niveles estadísticamente significativos).



**Figura 5. Espectrograma de potencia relativa en sueño NREM. A)** Porcentaje de tiempo en sueño NREM durante las 24 horas, representado como la media (línea sólida) y el error estándar (sombreado). La barra superior indica la fase de luz y oscuridad. **B)** Espectrograma del z-score de las potencias relativas en vigilia. La línea negra vertical indica el comienzo de la fase de oscuridad. **C)** Ampliación de B mostrando la banda de frecuencias de 0 a 30 Hz. ZT0 = 8AM. Los paneles B y C comparten la misma escala de colores.

La potencia de la banda delta de frecuencias muestra una dinámica con valores por encima de la media en las primeras horas de la fase de luz (con picos no estadísticamente significativos en ZT0 y en ZT5), para luego caer y mantenerse por debajo en las primeras 8 horas de la fase de oscuridad. La frecuencia sigma, asociada a los husos de sueño, muestra un máximo en las horas de transición entre fase de luz y oscuridad.

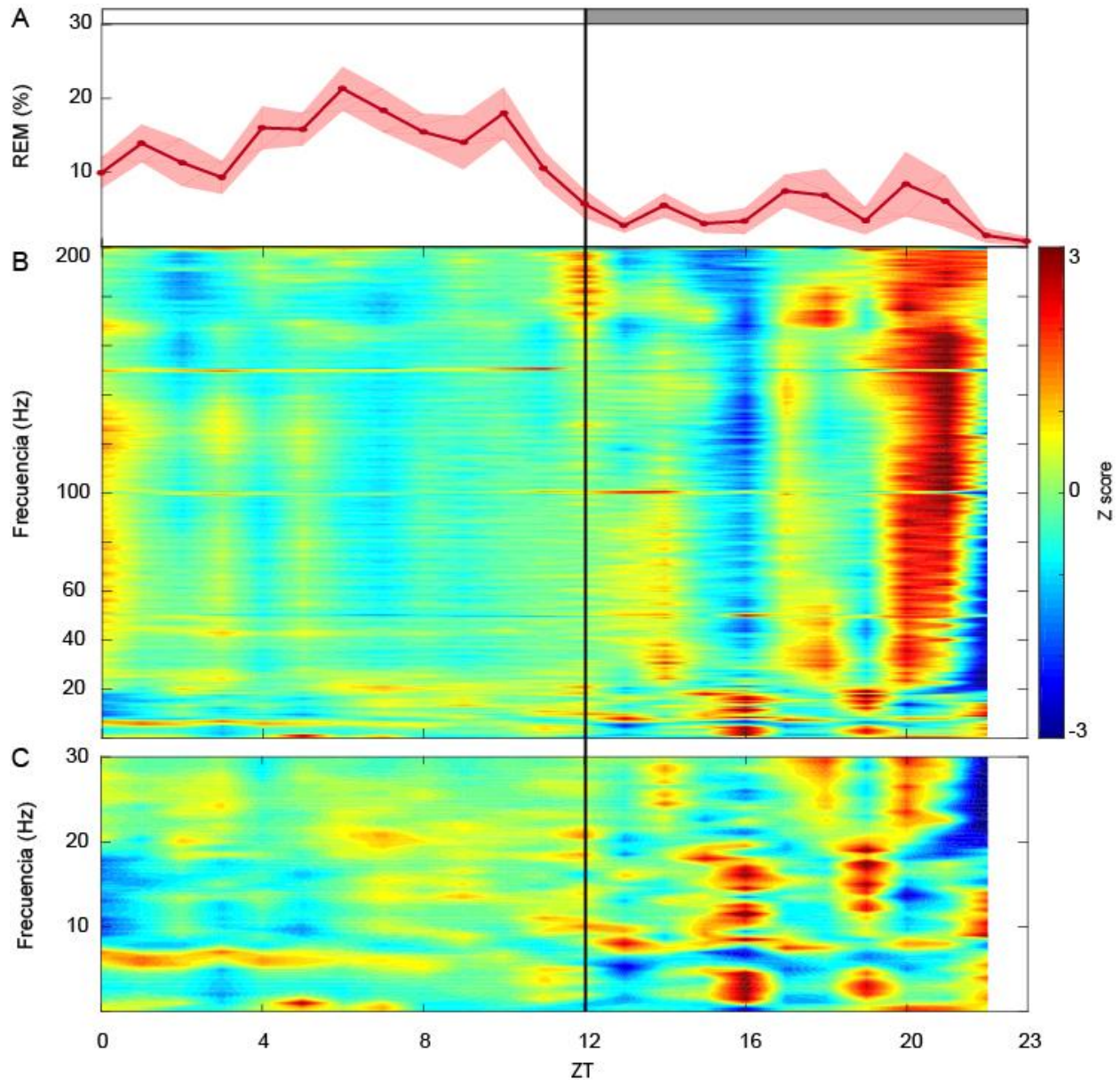


**Figura 6. Comparación de potencia absoluta para cada banda de frecuencia.** La línea azul indica la potencia media de las 24 horas basales para cada banda de frecuencia. En rojo la potencia de cada banda de frecuencia representada como la media (línea sólida) y error estándar (sombreado). Línea negra vertical indica el comienzo de la fase de oscuridad. Las horas indicadas con asterisco indican que la diferencia entre ambas fue estadísticamente significativa (test t de Student para muestras pareadas, entre ratas,  $p < 0.05$ ).  $n = 7$ , se muestra el promedio de todos los electrodos.

### 4.1.3 Sueño REM

De los tres estados comportamentales que se analizan el sueño REM es el que se presenta en menor cantidad a lo largo de las 24 horas. El porcentaje de tiempo en este estado durante la fase de oscuridad ( $4.6 \pm 2.4\%$ ) con respecto a la fase de luz ( $14.5 \pm 3.7\%$ ), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p = 0.0008$ ). En la Figura 7A se representa el porcentaje de sueño REM en cada hora. Nótese que durante la última hora ninguno de los animales presentó sueño REM.

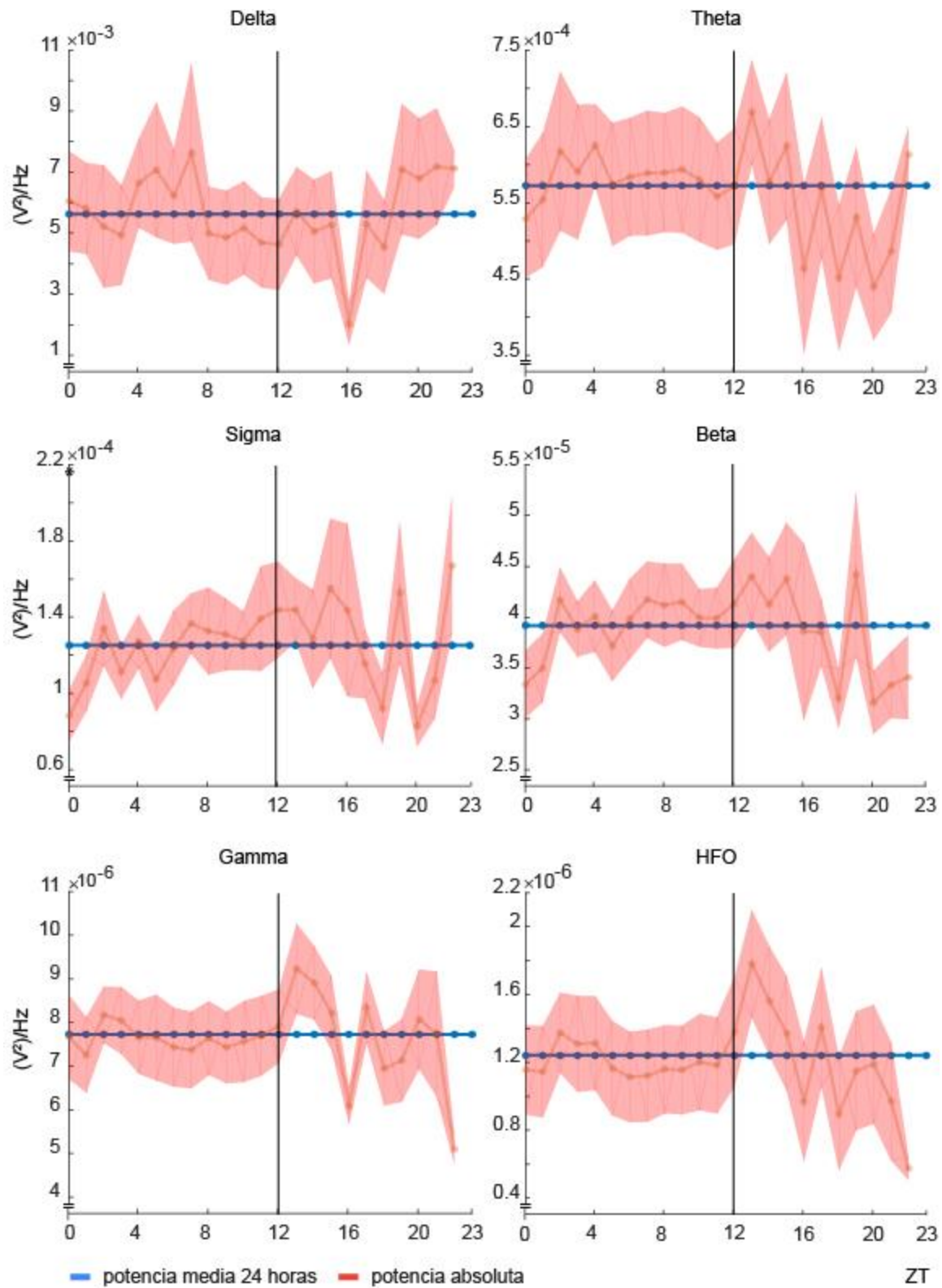




**Figura 7. Espectrograma de potencia relativa en sueño REM. A)** Porcentaje de tiempo en vigilia durante las 24 horas, representado como la media (línea sólida) y el error estándar (sombreado). La barra superior indica la fase de luz y oscuridad. **B)** Espectrograma del z-score de las potencias relativas en sueño REM. La línea negra vertical indica el comienzo de la fase de oscuridad. **C)** Ampliación de B mostrando la banda de frecuencias de 0 a 30 Hz. ZT0 = 8AM. Los paneles B y C comparten la misma escala de colores.

A pesar de que el mayor porcentaje de sueño REM ocurre durante la fase de luz, es durante la fase de oscuridad donde se pueden observar los cambios más prominentes en

el espectrograma de potencias (Figura 7 B). En general, durante la fase de luz las frecuencias fluctúan en el entorno de la media (Figura 7C). En la banda theta se ve un leve aumento que se extiende desde el comienzo de fase de luz hasta aproximadamente ZT4, mientras que en la banda delta los aumentos de la potencia relativa se encuentran comprendidos entre la hora ZT4 y ZT6. Durante la fase de oscuridad los fenómenos más prominentes de la potencia relativa en las altas frecuencias ( $> 30$  Hz) son por un lado el descenso en ZT16 y un gran aumento en las altas frecuencias durante ZT20. Las frecuencias menores a 20 Hz presentan claros aumentos esporádicos en ZT16 y ZT19. Cuando se analizan las frecuencias por bandas (Figura 8) se puede observar claramente el cambio en la dinámica de las diferentes bandas de frecuencias una vez se instala la fase de oscuridad, con una gran variabilidad hora por hora, siendo las variaciones más marcadas en ZT16 y ZT20 en las altas frecuencias. Durante el sueño REM no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las bandas de frecuencia.

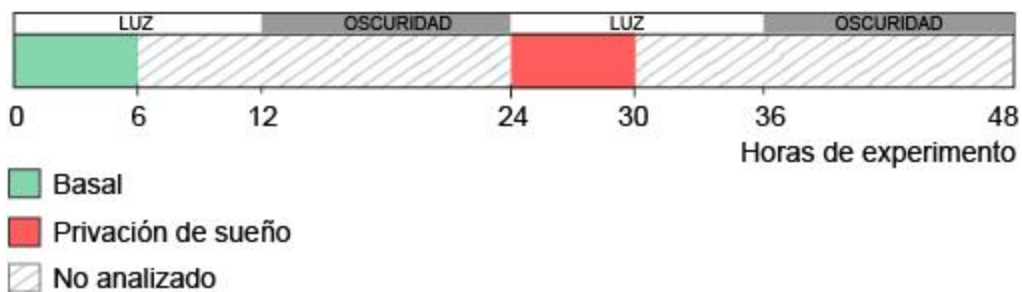




**Figura 8. Comparación de potencia absoluta para cada banda de frecuencia.** La línea azul indica la potencia media de las 24 horas basales para cada banda de frecuencia. En rojo la potencia de cada banda de frecuencia representada como la media (línea sólida) y error estándar (sombreado). Línea negra vertical indica el comienzo de la fase de oscuridad. El asterisco indica que la diferencia entre ambas fue estadísticamente significativa (test t de Student para muestras pareadas, entre ratas,  $p < 0.05$ ).  $n = 7$ , se muestra el promedio de todos los electrodos.

## 4.2 Privación de sueño

El procedimiento de privación de sueño se realizó durante 6 horas ininterrumpidas a partir de ZT0 del segundo día de experimento. Esto produjo una vigilia forzada y constante en los animales. Para el Objetivo Específico 2 se comparó la potencia espectral del EEG durante la privación con la vigilia basal durante el mismo período de tiempo (Figura 9).

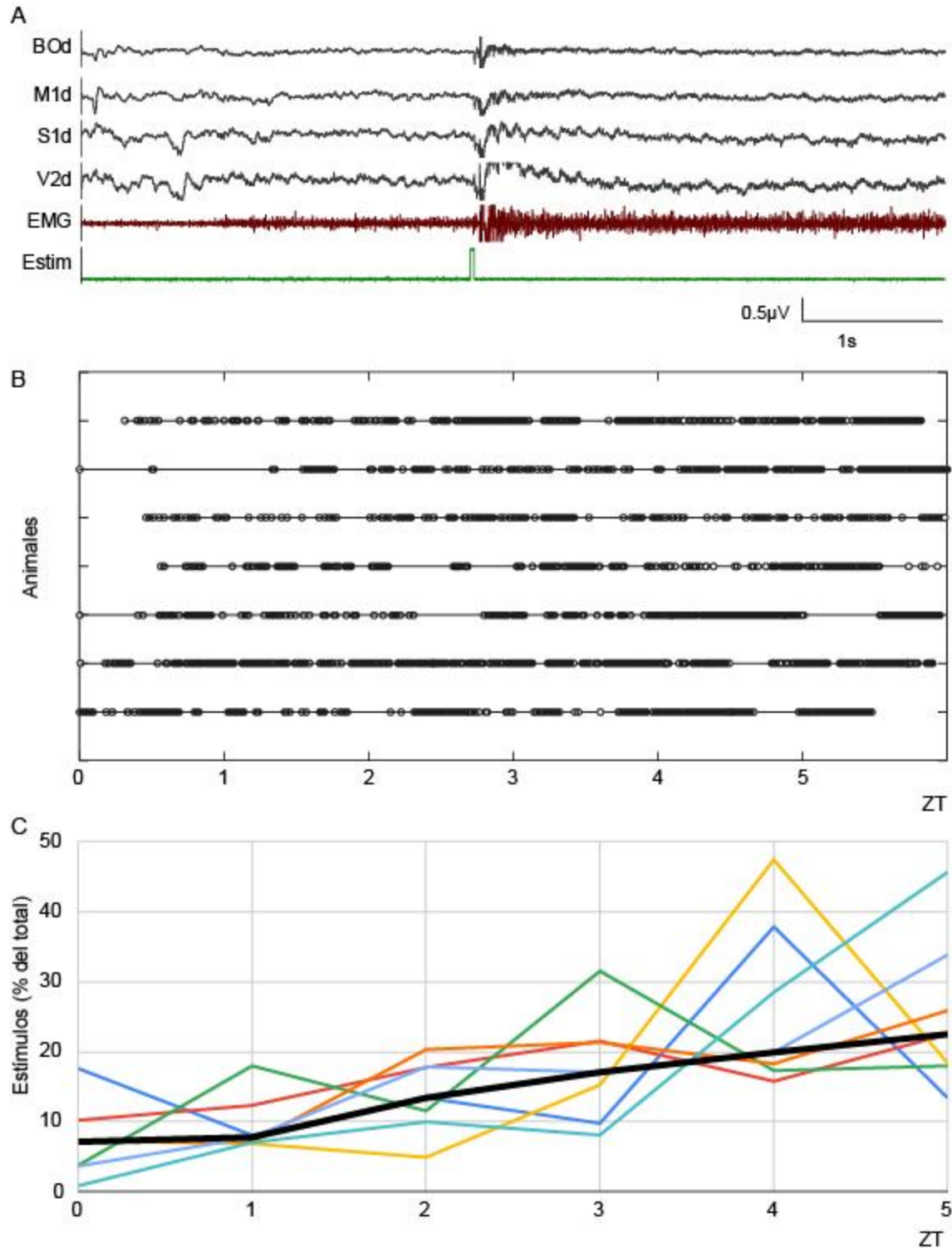


**Figura 9. Diagrama de los registros analizados para el Objetivo Específico 2.** En esta figura se muestran las ventanas de tiempo analizadas en esta sección. Se analizaron la vigilia de las primeras 6 horas basales (en verde), y las 6 horas de vigilia durante la privación de sueño (en rojo). Para este análisis no se utilizó el registro de las horas señaladas con líneas oblicuas.

Durante el procedimiento de privación de sueño se monitoreó en tiempo real la PSG de los animales, para aplicar estímulos en los momentos necesarios y evitar episodios de sueño. En la Figura 10A se muestra un ejemplo de registro durante la privación de

sueño donde se puede observar un enlentecimiento de la actividad en las cortezas, así como una baja actividad muscular en el EMG. Se puede apreciar en el momento que se realiza el estímulo cómo cambia la actividad tanto de las cortezas (apareciendo el ritmo theta característico de la vigilia activa en las cortezas posteriores) como del EMG.

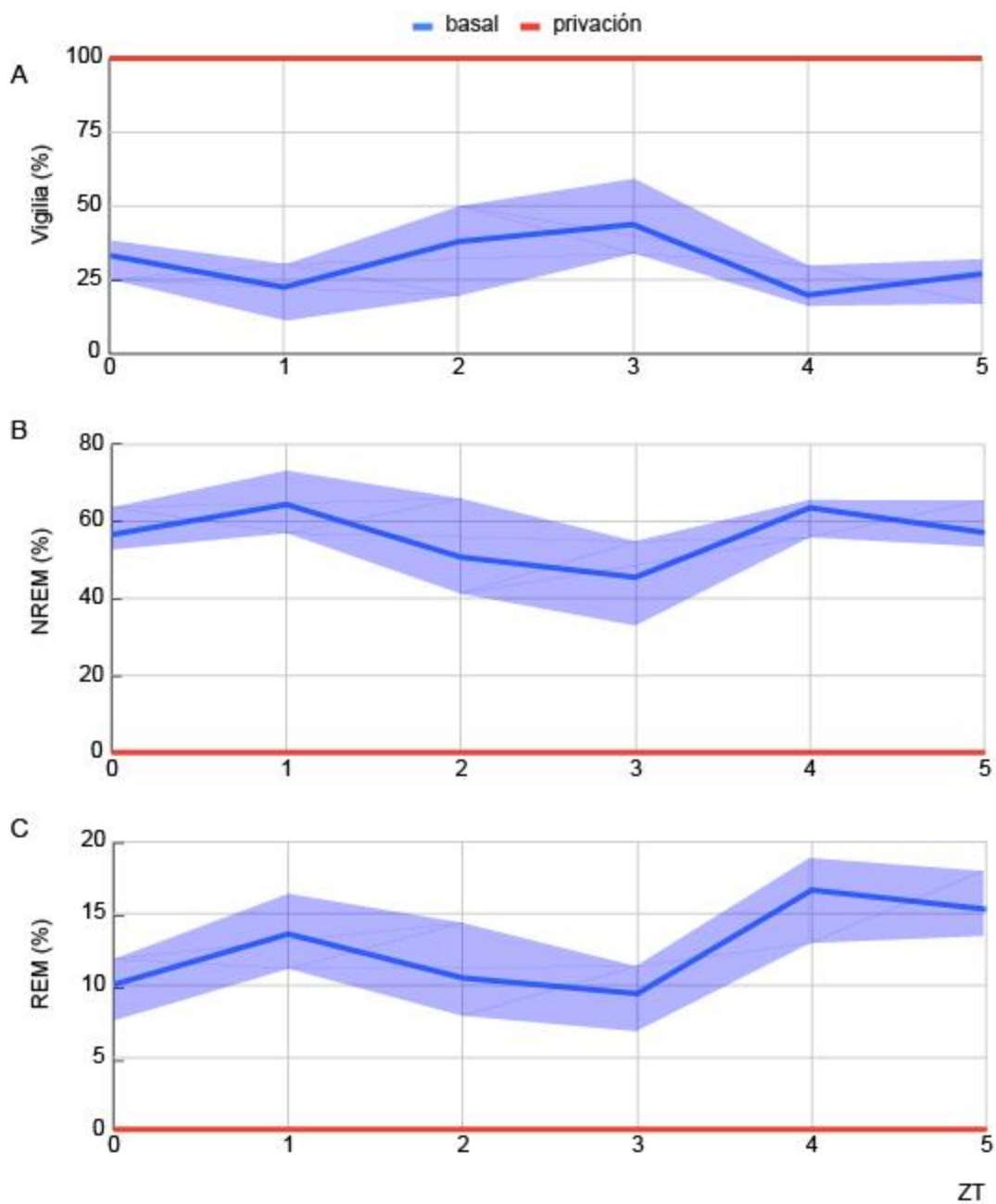
Con el correr de las horas los animales mostraron cada vez más predisposición por el sueño, lo cual se tradujo en un aumento en la cantidad de estímulos aplicados (Figura 10B). En la Figura 10C se muestra el porcentaje de los estímulos totales aplicados en cada hora para cada animal (líneas de colores). La línea negra muestra la mediana, evidenciando el aumento progresivo y sostenido de la cantidad de estímulos necesarios para mantener a los animales despiertos.



**Figura 10. Estímulos durante la privación de sueño.** A) Ejemplo de registro polisomnográfico de un animal durante la privación de sueño. Se muestran el electrograma del bulbo olfatorio (BOd), corteza motora primaria (M1d), corteza somatosensorial primaria (S1d) y corteza visual secundaria (V2d) y el EMG. El canal marcado como “Estim”

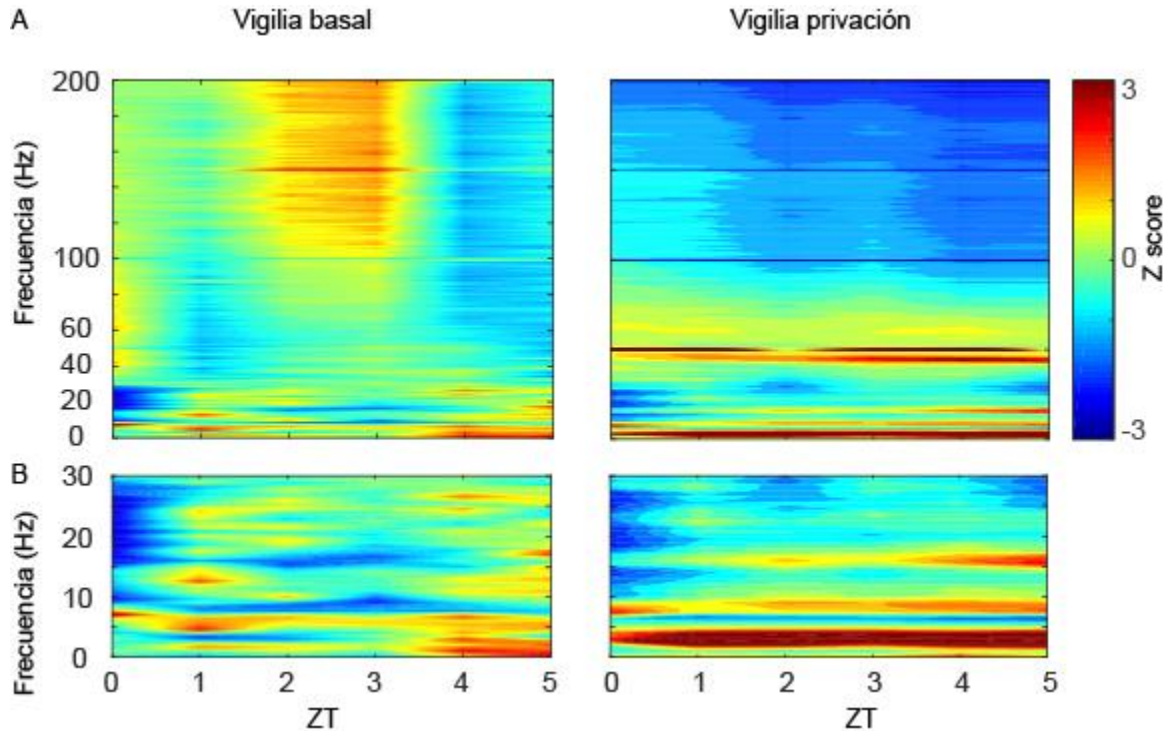
muestra un pulso cuadrado que indica el momento de la aplicación del estímulo (*“gentle handling”*). **B)** Cantidad de estímulos aplicados durante las 6 horas de privación de sueño en cada uno de los animales. Cada círculo representa un estímulo. **C)** Porcentaje de los estímulos totales administrados a cada animal en cada hora de experimento. Cada trazo es un animal. La línea negra corresponde a la mediana.

Utilizando éste método se logró mantener con éxito a los animales en vigilia durante las seis horas, evitando completamente episodios de sueño NREM y REM (Figura 11).



**Figura 11. Comparación del porcentaje de tiempo en vigilia, sueño NREM y REM en condiciones basales y durante la privación de sueño. A) Tiempo medio en vigilia. B) Tiempo medio en sueño NREM. C) Tiempo medio en sueño REM. Basal: línea azul. Privación de sueño: línea roja. Representado como la media (línea sólida) y el error estándar (sombreado).**

Cuando se compara el z-score de la potencia durante la privación con la vigilia basal (ambas relativas a la media de las 24 horas basales) se puede observar que durante la privación de sueño las frecuencias mayores a 100 Hz tienen un descenso pronunciado que va aumentando a medida que avanza la privación (Figura 12A). A su vez, en la banda delta se observa un aumento sostenido durante todo el período de la privación de sueño (Figura 12B).



**Figura 12. Espectrograma de potencia relativa en vigilia basal y durante privación de sueño. A)** Espectrograma del z-score de las potencias relativas en vigilia basal (izquierda), vigilia durante la privación de sueño (derecha). **B)** Ampliación de A mostrando la banda de frecuencias de 0 a 30 Hz. ZT0 = 8AM. Los paneles A y B comparten la misma escala de colores.

El aumento en la banda delta durante la privación de sueño con respecto al basal se observa cuando comparamos las potencias absolutas de ambos períodos entre sí, aunque para este tipo de análisis la diferencia no es significativa (Figura 13). Sí es significativo el descenso de la banda HFO durante la privación. El resto de las bandas de frecuencias no son claramente afectadas por la privación.

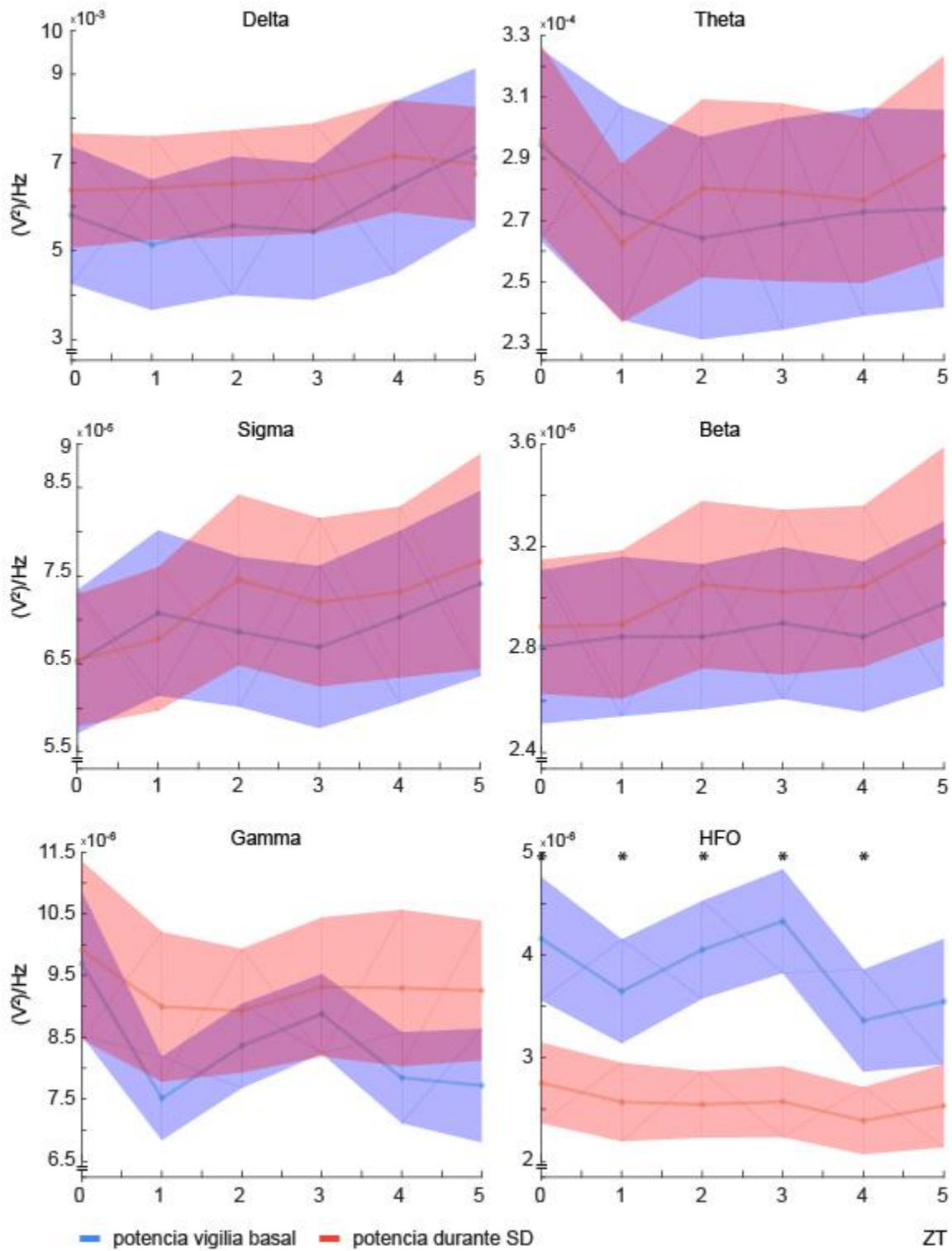


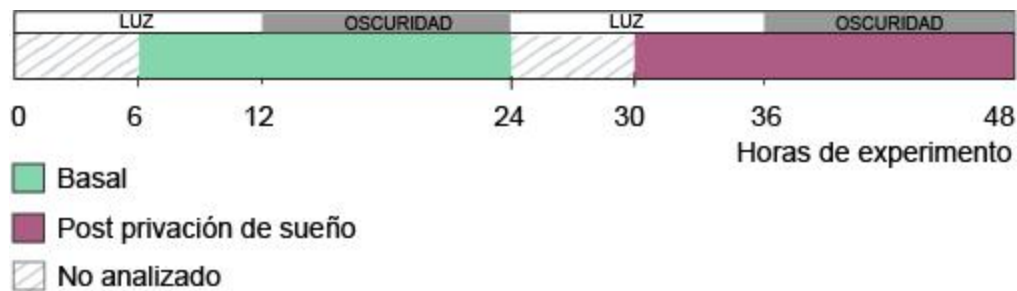
Figura 13. Potencia absoluta durante la vigilia basal y durante la privación de sueño.



Potencias en vigilia basal (en azul) y vigilia durante privación de sueño (en rojo), representado como la media (línea sólida) y error estándar (sombreado). Las horas indicadas con asterisco indican que la diferencia entre ambas fue estadísticamente significativa (test t de Student para muestras pareadas, entre ratas,  $p < 0.05$ ).  $n = 7$ , se muestra el promedio de todos los electrodos.

### 4.3 Período post-privación

Inmediatamente a continuación de la privación de sueño (ZT6) comienza el período de rebote, en donde el animal puede dormir *ad libitum*. El mismo se extiende por las siguientes 18 horas hasta el siguiente ZT0 (Figura 14). Para cumplir con el Objetivo Específico 3, se compara la vigilia, sueño NREM y sueño REM que se generan durante el período post-privación con sus equivalentes del período basal. Debido a dificultades técnicas el número muestral para esta sección se redujo a 6.



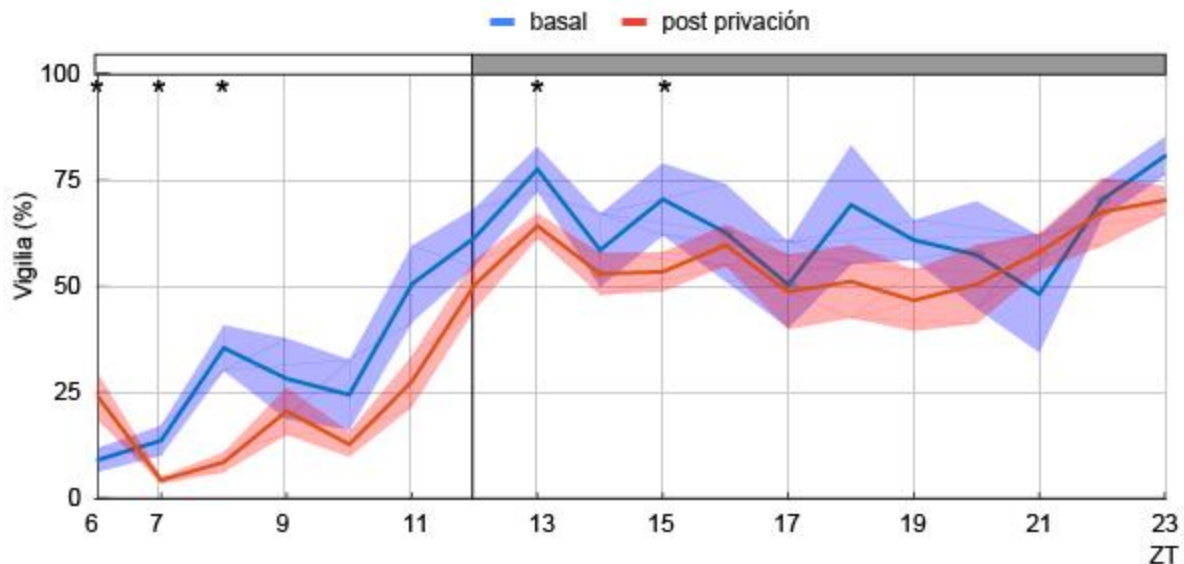
**Figura 14. Diagrama de los registros analizados para el Objetivo Específico 3.** En esta figura se ilustra las horas de registro analizadas para este objetivo. Se analizaron las 18 horas de rebote post-privación de sueño (en morado), y las 18 horas de registro basal correspondiente (en verde). El registro de las horas señaladas con líneas oblicuas no se analizó en esta sección.

#### 4.3.1 Vigilia

Si comparamos el porcentaje de tiempo en vigilia post-privación (promedio  $43 \pm 21$  %) observamos que se redujo con respecto al tiempo en vigilia en condiciones basales



(promedio  $51 \pm 21$  %); esta diferencia fue estadísticamente significativa ( $p = 0.001$ ). En la Figura 15 se representa el porcentaje de vigilia en cada hora que presentan una tendencia a mantenerse por debajo de los valores de vigilia basal durante todo el período, alcanzando valores estadísticamente significativos en ZT7, ZT8, ZT13 y ZT15.

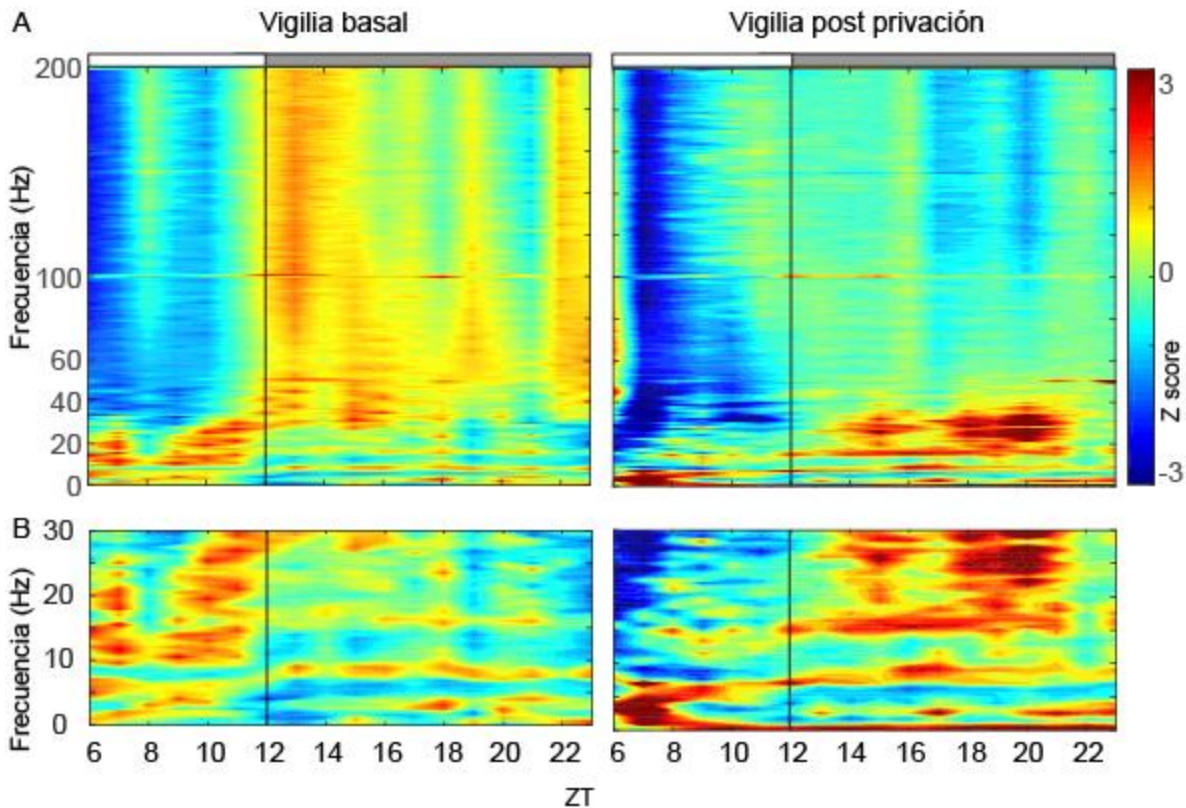


**Figura 15. Porcentaje de tiempo en vigilia durante la privación y durante la vigilia basal.** La línea azul corresponde a las 18 hs basales, mientras que la línea roja a las 18 horas post privación, representado como la media (línea sólida) y el error estándar (sombreado). La línea negra vertical indica el comienzo de la fase oscuridad. Los asteriscos indican las horas en que existe una diferencia estadísticamente significativa (test de t de Student,  $p < 0.05$ ). La barra superior indica la fase de luz y oscuridad. Promedio de todos los animales ( $n=6$ ).

En el espectrograma de potencias se representa el z-score de las potencias relativas a la media de las 24 horas de la vigilia basal y la vigilia post-privación (Figura 16A). Allí se puede observar que el perfil de la vigilia se modifica durante todo el período post-privación. Durante la fase de luz (ZT6 a ZT12) el descenso de la potencia que se veía en el período basal en frecuencias altas ( $>30$  Hz) se profundiza durante el período post-privación. También se observa un descenso de la potencia en la banda sigma y beta durante la fase de luz (Figura 16B), mientras que a nivel de la banda delta se produce un aumento que se extiende durante las 18 horas del periodo post-privación, centrándose en frecuencias menores a 2 Hz a partir de ZT8. En theta se da un aumento similar, muy

notorio en las primeras 2 horas de la fase de luz pero que parece estar sostenido a lo largo de todo el registro aumentando su frecuencia en la fase de oscuridad.

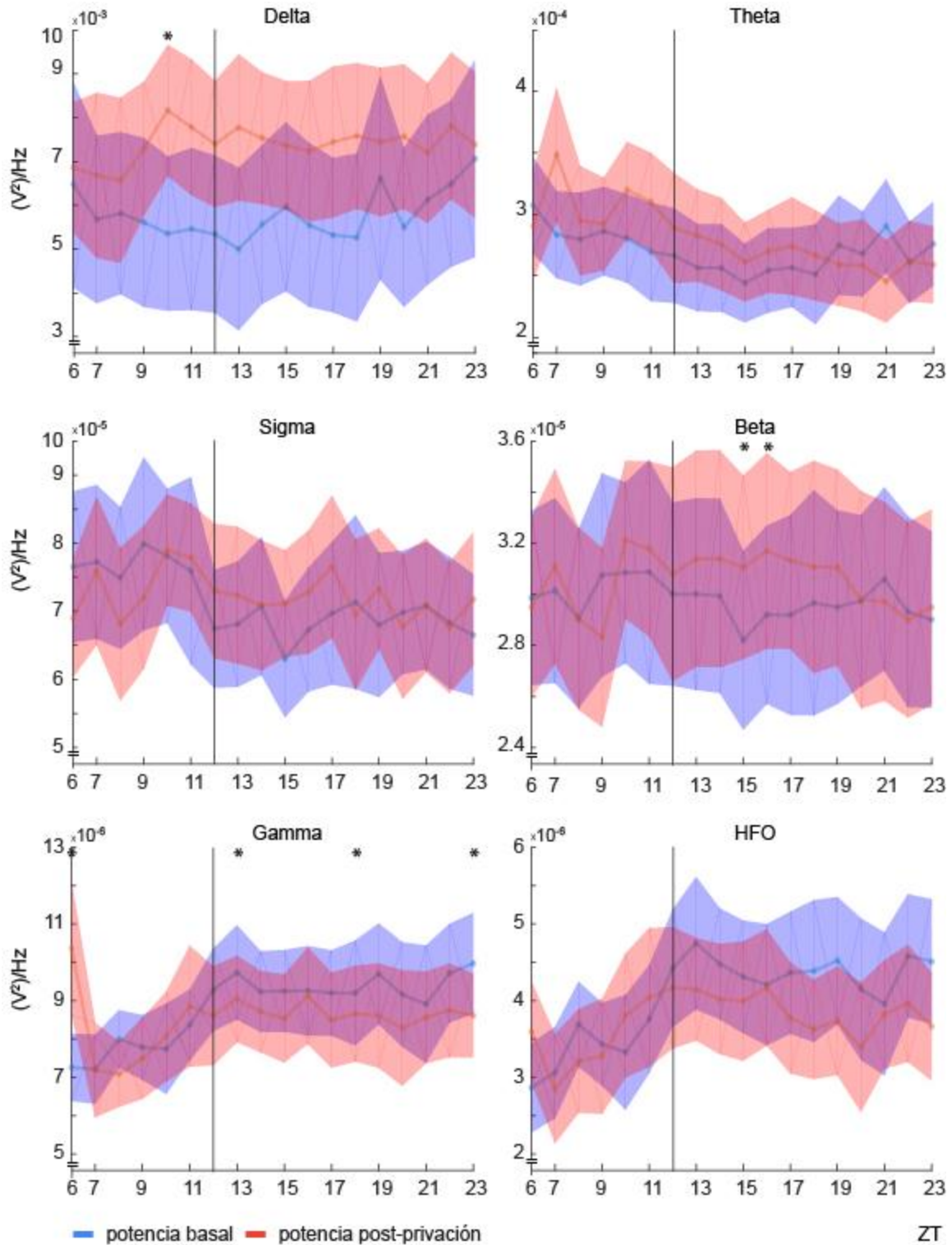
Durante la fase de oscuridad del período post-privación se puede observar un aumento en la banda sigma y beta, que aparece con la llegada de la fase de oscuridad y desaparece en ZT21.



**Figura 16. Espectrograma del z-score de las potencias relativas en vigilia. A)** En la izquierda espectrograma del z-score de las potencias relativas en vigilia durante el período basal, a derecha durante el rebote post-privación de sueño. La línea negra vertical indica el comienzo de la fase de oscuridad. **B)** Ampliación de A mostrando la banda de frecuencias de 0 a 30 Hz. ZT0 = 8AM. Los paneles A y B comparten la misma escala de colores.

Cuando se comparan las potencias absolutas por banda de frecuencia (Figura 17), el aumento de la potencia delta en el período post-privación se hace evidente durante las 18 horas del rebote, alcanzando significancia estadística en ZT10. Theta tiene una tendencia similar, aunque no llega a ser significativa. La banda beta en el período post-privación es mayor que el registro basal durante la fase de oscuridad alcanzando la

significancia en ZT15 y ZT16. A nivel de las frecuencias más altas (gamma y HFO) durante la fase de oscuridad los valores de potencia post-privación se ubican por debajo de los basales, alcanzando la banda gamma la significancia en varios puntos.

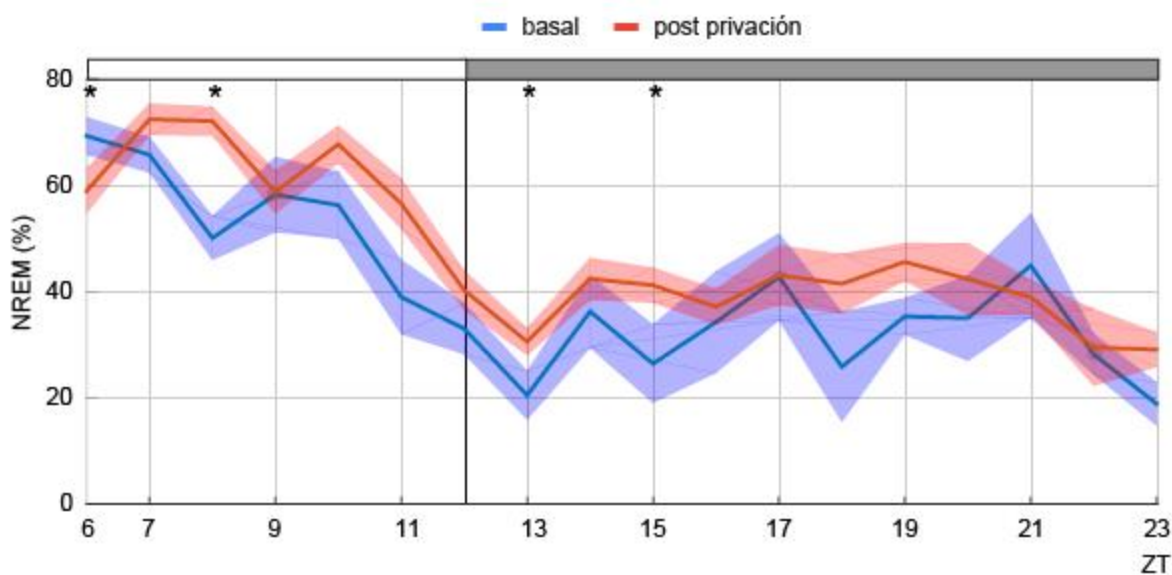


**Figura 17. Potencia absoluta en vigilia basal y vigilia post-privación.** Potencias en vigilia basal (en azul) y en vigilia post-privación de sueño (en rojo), representado como la media (línea sólida) y error estándar (sombreado). La línea negra vertical indica el comienzo de la fase de oscuridad.

Las horas indicadas con asterisco indican que la diferencia entre ambas fue estadísticamente significativa (test t de Student para muestras pareadas,  $p < 0.05$ ). (n = 6, promedio de todos los electrodos)

### 4.3.2 Sueño NREM

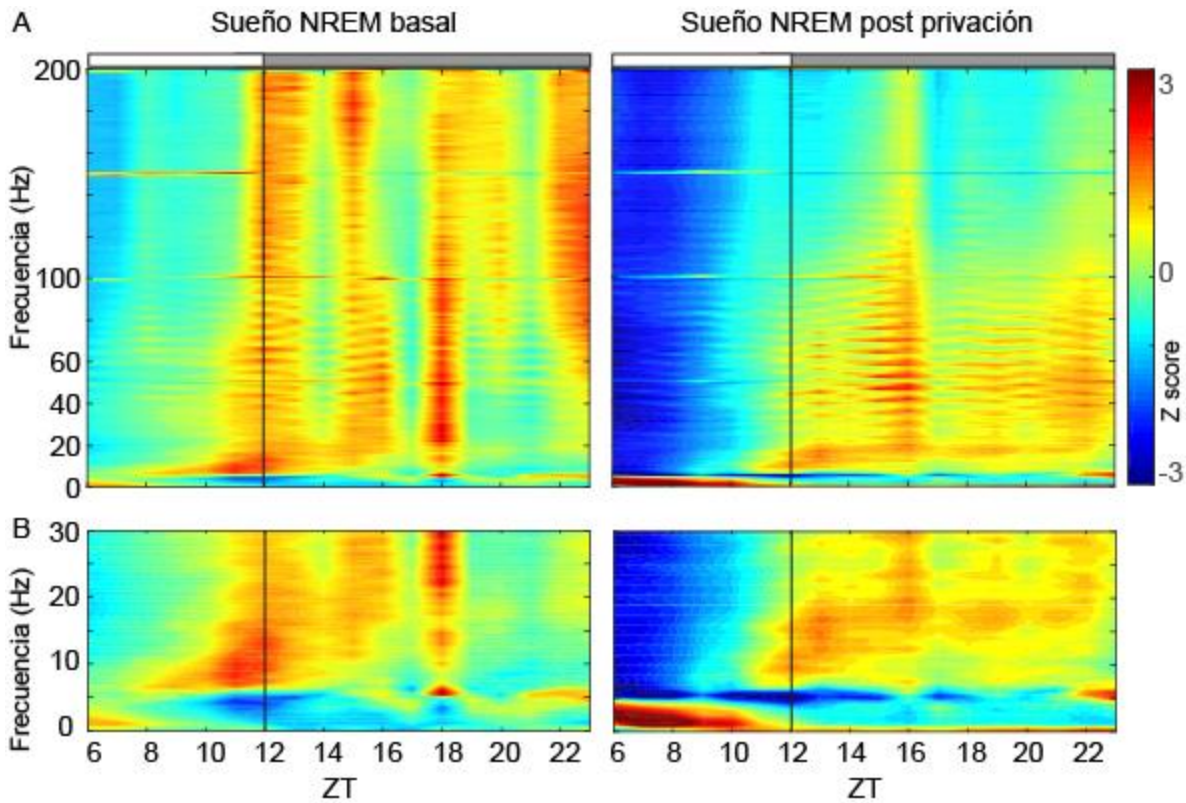
En el período post-privación de sueño se observó un aumento en el porcentaje de tiempo que los animales pasaron en sueño NREM ( $47 \pm 14 \%$ ) en comparación con el mismo período en condiciones basales ( $40 \pm 15 \%$ ), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p = 0.0006$ ). En la Figura 18 se representa el porcentaje de sueño NREM en cada hora. Si se analizan estas diferencias hora por hora podemos notar que en la primera hora del bloque (ZT6) el tiempo de NREM post-privación es menor que el basal, esto se revierte en ZT7 llegando a su máxima diferencia en ZT8 (diferencia estadísticamente significativa). Una vez comenzada la fase de oscuridad la cantidad de tiempo en sueño NREM post-privación baja, pero manteniéndose en valores superiores a los del mismo período basal, siendo su diferencia estadísticamente significativa en ZT13 y 15.



**Figura 18. Porcentaje de tiempo en sueño NREM durante el período post-privación.** La línea azul corresponde a las 18 hs basales, mientras que la línea roja a las 18 horas post-privación, representado como la media (línea sólida) y el error estándar (sombreado). Promedio de todos los animales (n=6). Los asteriscos indican las horas en que existe una diferencia estadísticamente significativa (test de t de Student,  $p < 0.05$ ). La línea negra vertical indica el comienzo de la fase de oscuridad. La barra superior indica la fase de luz y oscuridad.

Las potencias relativas del sueño NREM en el bloque post-privación muestran una tendencia similar a las de la vigilia, con un descenso en las frecuencias de entre 5 y 200 Hz en las primeras 3 horas (Figura 19A). Durante la fase de oscuridad esta tendencia se revierte mostrando una actividad similar a la del período basal en las frecuencias hasta 120 Hz. En la banda delta se puede notar un aumento que se extiende desde el comienzo del rebote hasta ZT10 (Figura 19B).





**Figura 19. Espectrograma del z-score de las potencias relativas en sueño NREM. A)** En la izquierda espectrograma del z-score de las potencias relativas en sueño NREM durante el período basal, a derecha durante el rebote post-privación de sueño. La línea negra vertical indica el comienzo de la fase de oscuridad. **B)** Ampliación de A mostrando la banda de frecuencias de 0 a 30 Hz. ZT0 = 8AM. Los paneles A y B comparten la misma escala de colores.

En una comparación entre las potencias absolutas por bandas de frecuencia se observa claramente cómo la potencia de la banda delta post-privación permanece en valores superiores a los basales prácticamente durante todo el período, alcanzando la significancia estadística durante toda la fase de luz y en varias horas de oscuridad (Figura. 20). Las potencias de la banda theta del período post-privación también son mayores durante las primeras horas post-privación. En la banda de frecuencias HFO por su parte la potencia media permanece en valores por debajo de los de la media basal durante todo el período de rebote post-privación, aunque no llega a valores significativos. La potencia gamma durante en el período post-privación durante la fase de luz se encuentra por debajo de los valores basales, siendo esta diferencia significativa entre ZT7 y ZT9.

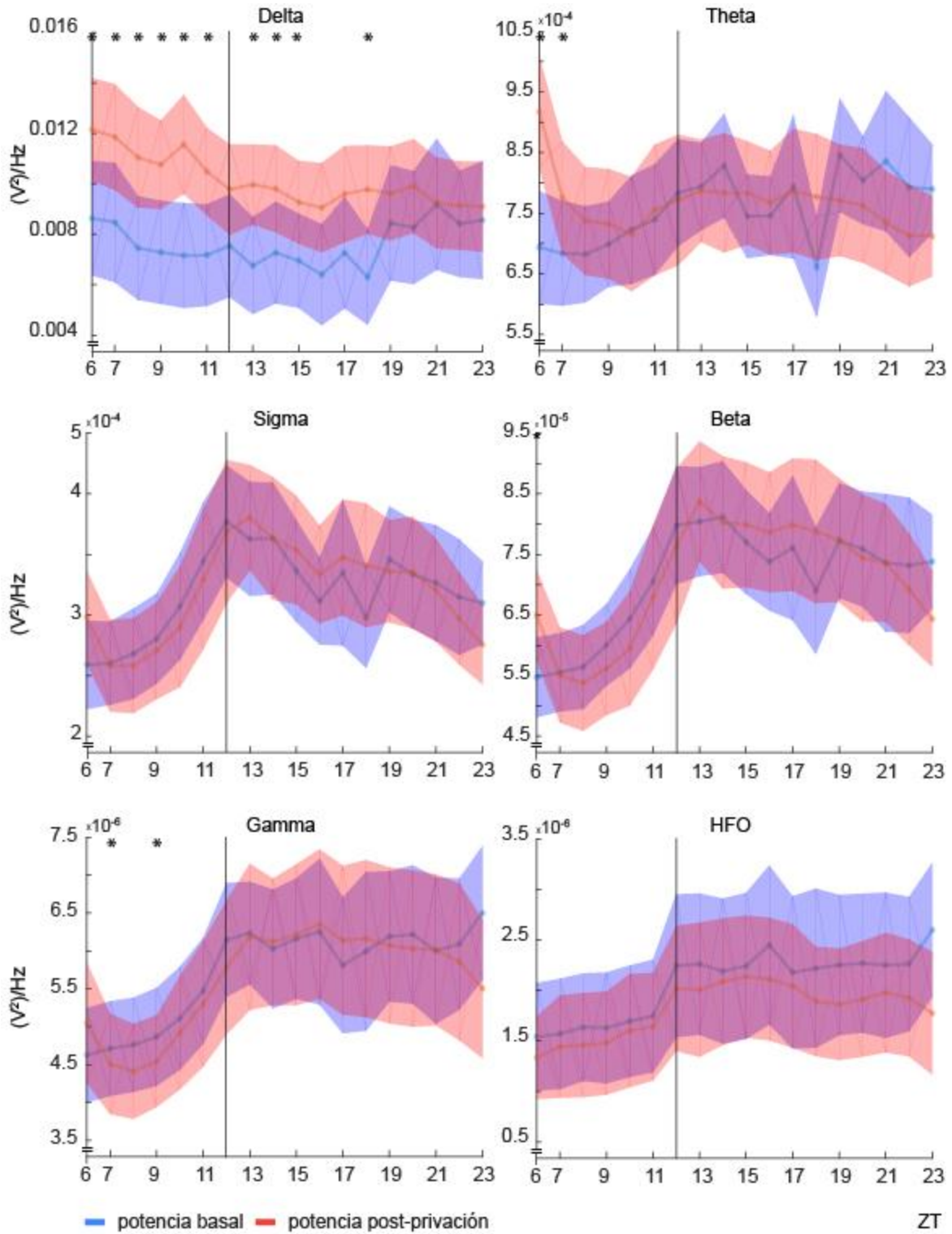
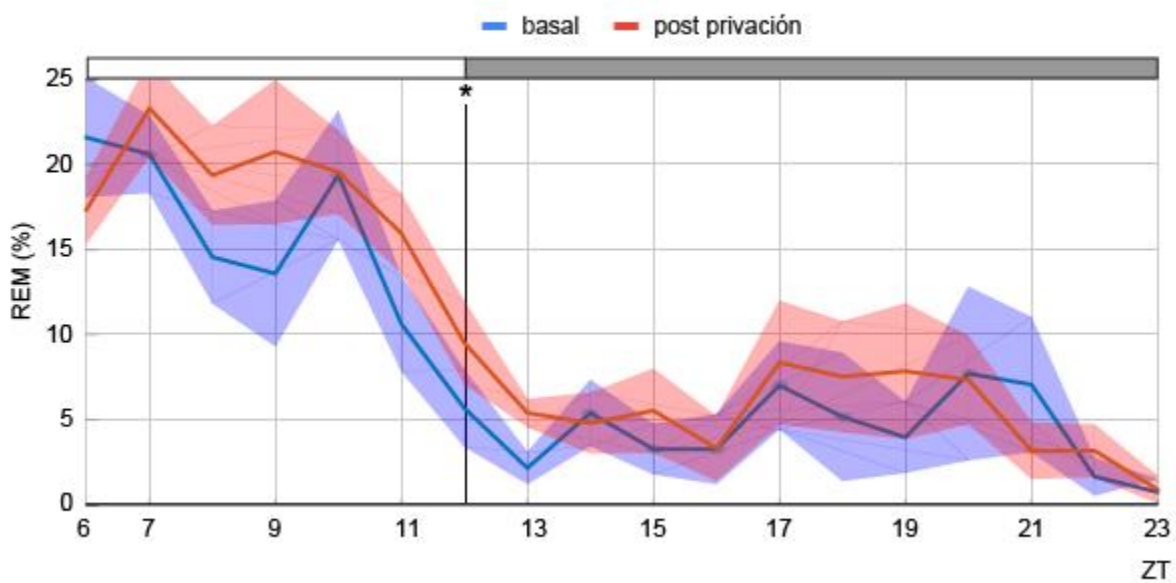


Figura 20. Potencia absoluta en sueño NREM en condiciones basales y durante el rebote de sueño. Potencias en sueño NREM basal (en azul) y post-privación (en rojo),

representado como la media (línea sólida) y error estándar (sombreado). La línea negra vertical indica el comienzo de la fase de oscuridad. Las horas indicadas con asterisco indican que la diferencia entre ambas fue estadísticamente significativa (test t de Student para muestras pareadas,  $p < 0.05$ ). (n = 6, promedio de todos los electrodos)

### 4.3.3 Sueño REM

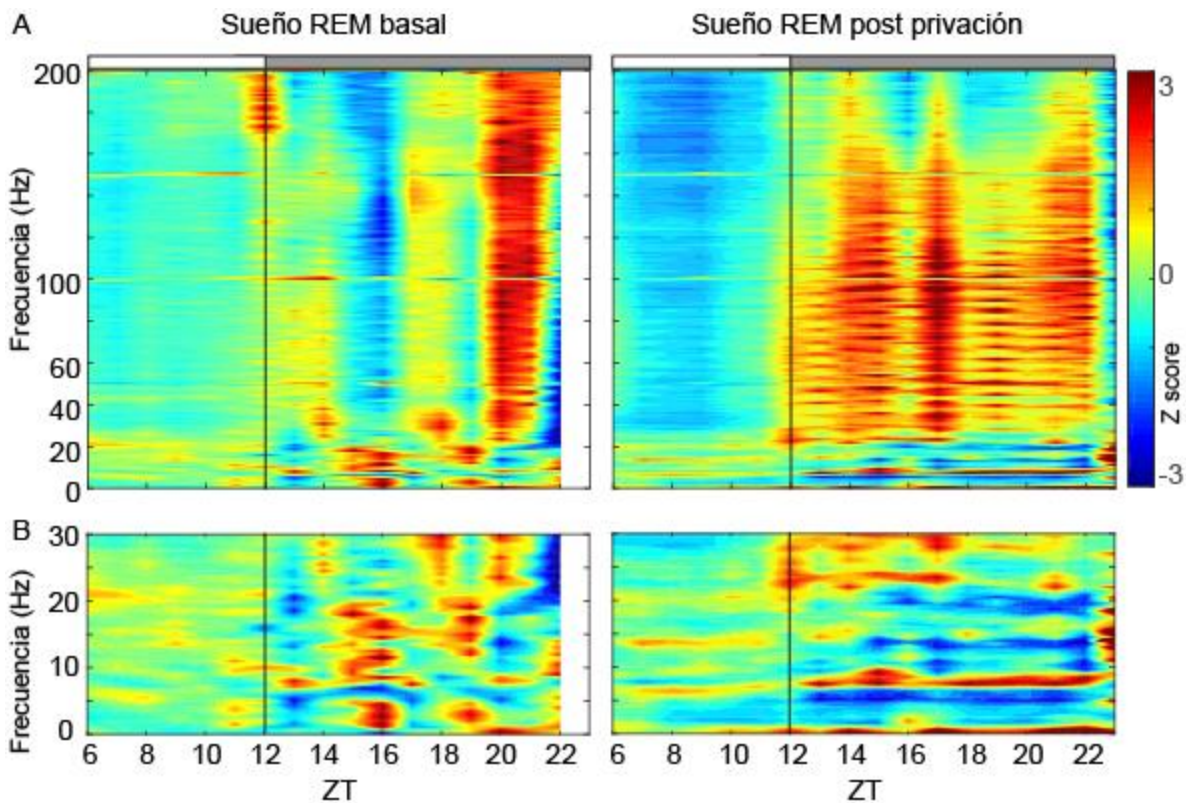
Al comparar el porcentaje de tiempo en REM en el período basal (media  $8.5 \pm 7\%$ ) contra el período post-privación (media  $10.2 \pm 7\%$ ) no se encontró una diferencia significativa. En la figura 21 se observa que el porcentaje de REM durante la post-privación se mantiene a niveles similares al basal, siendo significativamente mayor en ZT12.



**Figura 21. Porcentaje de tiempo en sueño REM.** La línea azul corresponde a las 18 hs basales, mientras que la línea roja 18 horas post privación, representado como la media (línea sólida) y el error estándar (sombreado). Promedio de todos los animales (n=6). Los asteriscos indican las horas en que existe una diferencia estadísticamente significativa (test de t de Student,  $p < 0.05$ ). La línea negra vertical indica el comienzo de la fase de oscuridad. La barra superior indica la fase de luz y oscuridad.



El espectrograma de potencias relativas muestra las principales diferencias entre el período basal y el post-privación durante la fase de oscuridad (Figura 22). Aquí se puede ver que el aumento en las potencias mayores a 20 Hz que se observa en ZT 20 en condiciones basales, se extiende durante toda la fase de oscuridad en el período post-privación (Figura 22A). A su vez existe un aumento en las bandas theta y delta en el período de rebote que abarca toda la fase de oscuridad (Figura 22B).



**Figura 22. Espectrograma del z-score de las potencias relativas en sueño REM. A)** En la izquierda espectrograma del z-score de las potencias relativas en sueño REM durante el período basal, a derecha durante el rebote post-privación de sueño. La línea negra vertical indica el comienzo de la fase de oscuridad. **B)** Ampliación de A mostrando la banda de frecuencias de 0 a 30 Hz. ZT0 = 8AM. Los paneles A y B comparten la misma escala de colores.

En una comparación directa entre las potencias absolutas (en REM basal y rebote post-privación) se puede ver claramente que la potencia de la banda delta del período de rebote es superior al basal durante las 18 horas del mismo, alcanzando valores significativos en ZT10 (Figura 23). En la banda sigma y beta se observan diferencias durante la fase de oscuridad que no llegan a ser estadísticamente significativas. Las diferencias significativas se dan en la banda theta una vez instaurada la fase de oscuridad, específicamente en ZT14 y ZT17 donde la potencia en el período post-privación es sensiblemente inferior a la del período basal. También se observa un descenso de la potencia gamma en la fase de luz, llegando a ser significativo en ZT7 y ZT10.

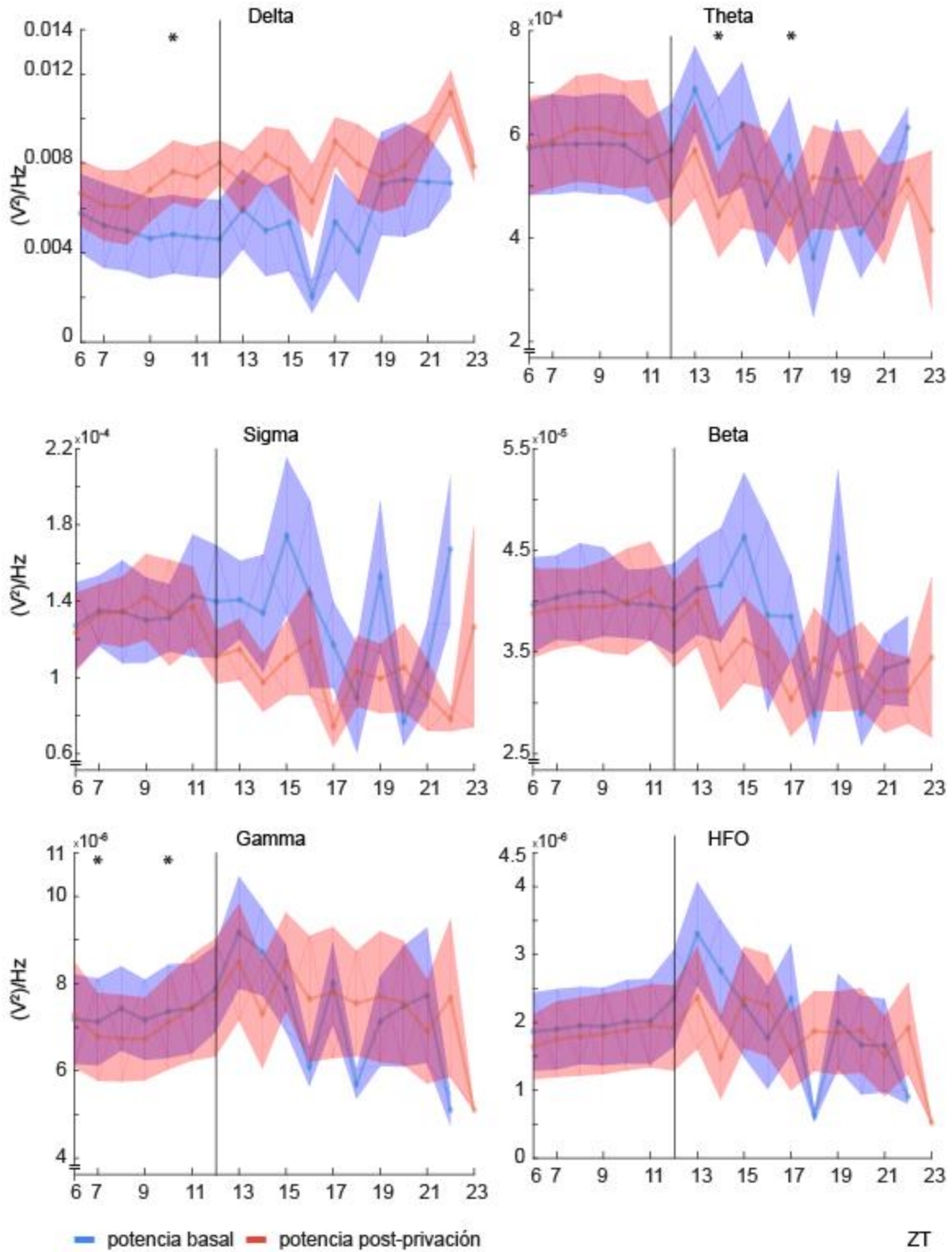


Figura 23. Potencia absoluta en sueño REM en condiciones basales y durante el rebote de sueño.

Potencias en sueño REM basal (en azul) y post-privación (en rojo), representado como la media (línea sólida) y error estándar (sombreado). La línea negra vertical indica el comienzo de la fase de oscuridad. Las horas indicadas con asterisco indican que la diferencia entre ambas fue estadísticamente significativa (test t de Student para muestras pareadas,  $p < 0.05$ ). (n = 6, promedio de todos los electrodos)

## 5. Discusión

En el presente trabajo se analizó por primera vez la potencia de un amplio espectro de frecuencias (1-200 Hz) del EEG de ratas macho, hora por hora, durante 24 horas en condiciones basales, durante la privación aguda total de sueño y durante el período post-privación. Observamos importantes cambios en la actividad eléctrica tanto durante la vigilia como durante los dos estados de sueño. Con respecto a las condiciones basales, resultados preliminares fueron publicados en Osorio et al. (2020) (Contribuciones).

### 5.1 Variaciones del EEG durante el ciclo luz-oscuridad

El primer objetivo fue estudiar las características del perfil electroencefalográfico de la vigilia, el sueño NREM y el sueño REM a lo largo del período de 24 horas. Los resultados muestran que el espectro de potencias de los tres estados comportamentales estudiados varía en relación a la fase de luz/oscuridad. Comparados con la media de las 24 horas basales, tanto la vigilia, sueño NREM y sueño REM muestran un aumento pronunciado en los valores de potencia de las altas frecuencias (gamma/HFO) en la fase de oscuridad con respecto a la fase de luz.

Si bien existen estudios previos donde se mostraron las variaciones diurnas en el EEG de la rata en frecuencias de hasta 30 Hz (Borbély et al., 1984; Grasing & Szeto, 1992; Steinfels et al., 1980), son escasos los trabajos que hayan analizado las bandas gamma y HFO.

Previamente hemos abordado el efecto del ciclo luz-oscuridad mediante otros tipos de análisis (Mondino et al., 2020). Allí se mostraron globalmente las diferencias tanto en vigilia, como sueño REM y NREM en fase de luz con respecto a la fase de oscuridad. Los resultados más significativos se observaron en sueño NREM donde existe un aumento en sigma, beta, gamma y HFO durante la fase de oscuridad.

Los resultados de la presente Tesis profundizan en el estudio de la dinámica temporal de las diferencias entre ambas fases. Nuestros resultados mostraron que la vigilia diurna es heterogénea, con una disminución de la potencia relativa en las frecuencias >30 Hz y brotes de aumento de potencia relativa en los ritmos más lentos. En cambio, la vigilia nocturna fue caracterizada por un aumento aún mayor en las altas frecuencias (>30 Hz). Este aumento en la potencia gamma es característico en los estados o comportamientos que se caracterizan por un procesamiento cognitivo activo en

humanos, y durante la vigilia atenta en animales (Buzsáki et al., 2012; Castro et al., 2013, 2014; Cavelli et al., 2017; Uhlhaas et al., 2009, 2011).

Con respecto al sueño, los resultados de la presente Tesis están alineados con estudios pioneros que mostraron que durante el día se encuentran los valores de potencia más altos para la frecuencia delta durante el sueño NREM, y para theta durante el sueño REM (Rosenberg et al., 1976; Steinfels et al., 1980). Sin embargo, estos estudios estaban limitados a frecuencias hasta 30 Hz. Durante el sueño NREM, en comparación con la noche, la actividad diurna presentó una mayor potencia en frecuencias más lentas (especialmente debajo de 5 Hz), mientras que la potencia de las altas frecuencias fue menor. Por lo tanto, sugiere que el sueño NREM durante el día es más profundo que durante la noche.

En lo que respecta al sueño REM, nuestros resultados mostraron un perfil mayoritariamente homogéneo durante la fase de luz. Lo cual se condice con los resultados de Borbély et al. (1984), que no mostró variaciones claras en la potencia de REM durante el día. Por lo tanto, el sueño REM es un estado altamente estable durante la etapa de luz. Durante la noche el sueño REM muestra en el espectrograma un perfil cambiante con alteraciones entre brotes de bajas <20 Hz y altas 30-200 Hz frecuencias en la actividad electrocortical. Sin embargo, estas alteraciones pueden deberse al hecho de que hay poco tiempo de sueño REM por hora en la fase de oscuridad aumentando la variabilidad de los resultados. De todas formas, nuestros resultados están de acuerdo con los de Steinfels et al. (1980), donde una gran variabilidad del espectro de potencias del EEG fue observada al final de la fase de oscuridad. Finalmente, es notorio que durante la primera mitad de la etapa de luz la frecuencia pico de la banda theta durante REM fue menor que la de la fase de oscuridad, probablemente este hecho puede estar relacionado a un sueño REM más activo durante la noche (Sei & Morita, 1996).

Un dato importante es que durante W y NREM es evidente una correlación negativa entre altas frecuencias (>30 Hz) y bajas frecuencias (mayormente en delta). Este resultado está en concordancia con Maloney et al. (1997) que mostró que la actividad gamma está negativamente correlacionada con la potencia delta independiente de los estados comportamentales.

Es importante destacar que los experimentos fueron realizados en un régimen de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Sin embargo, para poder evaluar el peso del factor circadiano en nuestros hallazgos, es necesario hacer una comparación con registros “*free running*” o de libre curso durante varios días (Stenvers et al., 2016).

## 5.2 El EEG durante la privación de sueño

Nuestro segundo objetivo fue estudiar el impacto de la privación de sueño sobre la actividad cortical, comparándola con la vigilia basal durante el mismo período de la fase de luz. De esta manera podemos descartar posibles influencias circadianas en los cambios observados durante el procedimiento de SD.

Globalmente, el perfil electrográfico de la vigilia durante la SD difiere del de la vigilia registrada en condiciones basales. Durante la SD, en la banda delta encontramos un aumento de la potencia relativa con respecto al período basal, lo cual coincide con resultados existentes tanto en ratas como en humanos (Franken et al., 1991; Friedman et al., 1978; Torsvall, 1987). A su vez, observamos un descenso significativo en la banda HFO durante todo el período de la SD lo cual podría hablar de una vigilia con mayor presión al sueño (Cavelli et al., 2017).

Si bien existió una gran variabilidad interindividual para la cantidad de estímulos que los diferentes animales requerían para mantener la vigilia, conforme avanzaba el curso de la privación pudimos observar un acortamiento en los intervalos inter-estímulo, lo cual nos indica un aumento en la presión para sueño. Este aumento de la presión para sueño puede deberse a un aumento en los niveles de adenosina a lo largo del periodo de privación, lo que provocaría una inhibición de los sistemas activadores y activación de los somnogénicos (Tortero & Vanini, 2010; Vanini & Tortero, 2021). Esto lleva a una disminución del estado de alerta y por ello, tanto la cantidad como la intensidad de los estímulos sensoriales presentados para mantener a los animales despiertos, es cada vez mayor. A su vez, determina la aparición de características electrocorticales de sueño en la vigilia durante la SD, como ser el aumento de la potencia de la banda de frecuencias delta. Es posible que el descenso de las HFO se deba a un mecanismo similar, aunque todavía no existen estudios al respecto.

## 5.3 El EEG durante el rebote de sueño

Nuestro tercer objetivo fue estudiar las características electrocorticales del sueño y la vigilia durante el período post-privación, durante el cual suele ocurrir un rebote de sueño. Al igual que en el objetivo anterior, para evitar la posible influencia del factor circadiano se compararon las mismas horas (ZT) de registro basal y post-privación.

Un punto importante a destacar es que el impacto de 6 hs de privación se observa en el EEG durante las 18 hs post-privación.

Inmediatamente luego de la SD se observa una drástica caída en la cantidad de tiempo en vigilia que presentaron los animales, siendo este tiempo compensado casi en su totalidad por un aumento de sueño NREM. A diferencia de otros estudios donde muestran que el aumento de tiempo en sueño NREM se da principalmente en la fase de oscuridad post-privación (Franken et al., 1991), en nuestros resultados este aumento se presenta de manera bastante uniforme tanto en fase de luz como de oscuridad.

Observamos un rebote muy leve de sueño REM, que solo llega a ser estadísticamente significativo en ZT12. Otros estudios también describieron un rebote de sueño REM (Everson et al., 1989; Franken et al., 1991; Rechtschaffen et al., 1999; Tobler & Borbely, 1986). Dado que el tiempo que los animales transitan este estado es menor, el análisis de este estado es el que más se resiente por el bajo número muestral.

Analizando los valores de potencia, se observa un aumento en la potencia absoluta de la banda delta durante todo el período post-privación tanto en vigilia como en sueño NREM, siendo significativo para NREM en las primeras seis horas. Este cambio en sueño NREM ha sido documentado ampliamente en la bibliografía (Borbély et al., 1984; Rechtschaffen et al., 1999; Tobler & Borbely, 1986), e incluso podría ser tomado como un indicador de la presencia de una regulación homeostática compensatoria a pérdida de sueño generada por la privación (Borbély et al., 1984).

Si bien la actividad de ondas lentas es característica del sueño NREM, también notamos un aumento de actividad delta durante el sueño REM en la fase de oscuridad post-privación. Esto está de acuerdo con hallazgos recientes de actividad delta en sueño REM tanto en roedores como en humanos (Bernardi et al., 2019; Funk et al., 2016).

La potencia en frecuencias más altas, por su parte, descendió en los tres estados durante el resto de la etapa de luz post-privación en comparación con el mismo período basal. Particularmente en sueño NREM la potencia absoluta de las bandas beta, gamma y HFO post-privación se mantuvieron por debajo de los valores basales durante todas las horas restantes de la fase de luz, alcanzando valores estadísticamente significativos en la banda gamma. Esto sugiere un sueño NREM más profundo.

## **5.4 Consideraciones técnicas**

El estudio fue diseñado para 12 animales. Sin embargo, el número total de animales utilizados en este estudio fue siete, salvo en el estudio del período post-privación donde se utilizaron seis. Éste número muestral bajo limita la posibilidad de establecer afirmaciones estadísticas concluyentes.



Los animales utilizados fueron todos machos, sería importante complementar estos datos con un estudio realizado en hembras ya que algunos estudios apuntan a que existen diferencias en la distribución del sueño y de la vigilia entre ambos sexos, así como diferencias en la potencia espectral de las diferentes bandas de frecuencias del EEG (Dib et al., 2021)

El método de privación utilizado ("*gentle handling*") permitió evitar completamente el sueño en todos los animales. Sin embargo, produjo respuestas comportamentales variadas en los diferentes animales. A nivel del EEG la aplicación de cada estímulo generó artefactos que podían durar varios segundos, disminuyendo la cantidad de ventanas de registro útiles, especialmente en las últimas horas de SD donde la cantidad de estímulos fue mayor.

La privación comenzó en todos los casos en ZT0 del segundo día de registro. Dado que la fase de luz es cuando se da un mayor porcentaje de tiempo en sueño, es donde la privación muestra un mayor impacto (Vyazovskiy et al., 2007). Seis horas de SD fue descrita como una cantidad de tiempo adecuada para observar el impacto de la misma en el período post-privación (Tobler & Borbely, 1986).

En todos los casos se analizó la gran media de todos los animales y todas las cortezas, sin detallar los efectos en las cortezas individuales (sección perspectivas). Un estudio detallado por electrodo potencialmente puede disminuir la variabilidad de los datos, aumentando la robustez estadística.

Para el análisis de los datos del EEG se utilizaron dos tipos de análisis complementarios. Mediante espectrogramas analizamos el cambio del z-score de la potencia en relación a la media de las 24 horas basales, lo cual permite visualizar el panorama completo de manera muy ilustrativa. En segundo lugar, se comparó la potencia absoluta de las bandas de frecuencia, lo cual permite hacer comparaciones más directas. Consideramos que el análisis estadístico ganaría robustez si además del análisis de la potencia absoluta se analizara la potencia relativa por bandas (potencia de la banda/potencia total), de esta manera se descarta la influencia de las diferencias en la resistencia de los electrodos (Mondino et al., 2021).

También consideramos necesario emplear un procesamiento que corrija los errores que traen las múltiples comparaciones, pero que también tenga en cuenta la continuidad en el tiempo y en el espectro de frecuencias. El análisis más ajustado, según nuestro punto de vista, podría ser utilizando "*clusters*" de dos dimensiones (tiempo y frecuencia) que permita ubicar bloques de valores significativos de la matriz tiempo-frecuencia. Análisis similares han sido realizados en nuestro laboratorio en los trabajos de Mondino et al. (2020) y Gonzalez et al. (2021).

## 6. Conclusiones

En esta Tesis se analizó la potencia del EEG (hasta 200 Hz) de la vigilia, el sueño NREM y sueño REM durante el ciclo luz-oscuridad, la privación de sueño y el período post-privación. En condiciones basales, las diferencias principales entre la fase de luz y la oscuridad fueron en la vigilia y el sueño NREM donde se observó un mayor actividad de las altas frecuencias en la fase de oscuridad con respecto a la fase de luz.

La vigilia sostenida durante la privación de sueño muestra un perfil electroencefalográfico que se caracteriza principalmente por la presencia de ondas lentas y un descenso en la actividad a nivel de las frecuencias altas que sustentan procesos cognitivos.

A continuación de la privación, se observó un aumento del tiempo de sueño (rebote), tanto en NREM, y en menor grado del sueño REM, junto a una disminución drástica en el tiempo de vigilia en las primeras horas de rebote post-privación. Se observó un aumento de la potencia delta en NREM, acompañado de un descenso de la potencia en las altas frecuencias.

## 7. Perspectivas

Los análisis presentados en esta Tesis fueron realizados utilizando un promedio de todos los animales y todos los electrodos, lo cual nos da una imagen general de las diferencias que podemos encontrar en las comparaciones descritas. Sin embargo, para poder concluir la implicancia funcional de estas diferencias es necesario un análisis más completo, donde se analice en forma independiente las distintas cortezas. Esto nos permitirá analizar cambios en fenómenos locales, que en un promedio general se pierden. En paralelo estamos realizando un análisis de la coherencia espectral, que nos da información de la variación en la sincronización entre cortezas.

Más allá de otros análisis más profundos que se puedan realizar de los datos, por ejemplo de complejidad (González et al., 2020), consideramos interesante realizar una serie experimental donde se prive selectivamente de sueño REM.

## 8. Bibliografía

Achermann, P., Dijk, D.-J., Brunner, D. P., & Borbély, A. A. (1993). A model of human sleep homeostasis based on EEG slow-wave activity: Quantitative comparison of data and simulations. *Brain Research Bulletin*, 31(1-2), 97-113. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(93\)90016-5](https://doi.org/10.1016/0361-9230(93)90016-5)

Aldabal, L., & Bahammam, A. S. (2011). Metabolic, endocrine, and immune consequences of sleep deprivation. *The Open Respiratory Medicine Journal*, 5, 31-43. <https://doi.org/10.2174/1874306401105010031>

Baglioni, C., Battagliese, G., Feige, B., Spiegelhalder, K., Nissen, C., Voderholzer, U., Lombardo, C., & Riemann, D. (2011). Insomnia as a predictor of depression: A meta-analytic evaluation of longitudinal epidemiological studies. *Journal of Affective Disorders*, 135(1-3), 10-19. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2011.01.011>

Bentivoglio, M., & Grassi-Zucconi, G. (1997). The Pioneering Experimental Studies on Sleep Deprivation. *Sleep*, 20(7), 570-576. <https://doi.org/10.1093/sleep/20.7.570>

Berger, H. (1930). Ueber das Elektrenkephalogramm des Menschen. *Journal für Psychologie und Neurologie*.

Bernardi, G., Betta, M., Ricciardi, E., Pietrini, P., Tononi, G., & Siclari, F. (2019). Regional delta waves in human rapid eye movement sleep. *Journal of Neuroscience*, 39(14), 2686-2697.

Blake, H., & Gerard, R. W. (1937). Brain potentials during sleep. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 119(4), 692-703.

Borbély, A. A., & Achermann, P. (1999). Sleep homeostasis and models of sleep regulation. *Journal of biological rhythms*, 14(6), 559-570.

Borbely, A. A., & Neuhaus, H. U. (1979). Sleep-deprivation: Effects on sleep and EEG in the rat. *Journal of comparative physiology*, 133(1), 71-87.

Borbély, A. A., Tobler, I., & Hanagasioglu, M. (1984). Effect of sleep deprivation on sleep and EEG power spectra in the rat. *Behavioural brain research*, 14(3), 171-182.

Burdakov, D. (2019). Reactive and predictive homeostasis: Roles of orexin/hypocretin neurons. *Hypothalamic Control of Homeostasis*, 154, 61-67. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.10.024>

Buzsáki, G., Anastassiou, C. A., & Koch, C. (2012). The origin of extracellular fields and

- currents—EEG, ECoG, LFP and spikes. *Nature reviews neuroscience*, 13(6), 407-420.
- Campbell, S. S., & Tobler, I. (1984). Animal sleep: A review of sleep duration across phylogeny. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 8(3), 269-300.
- Carskadon, M. A., & Dement, W. C. (2005). *Principles and practice of sleep medicine*. 4th edn Philadelphia. Elsevier.
- Castro, S., Cavelli, M., Vollono, P., Chase, M. H., Falconi, A., & Torterolo, P. (2014). Inter-hemispheric coherence of neocortical gamma oscillations during sleep and wakefulness. *Neuroscience letters*, 578, 197-202.
- Castro, S., Falconi, A., Chase, M. H., & Torterolo, P. (2013). Coherent neocortical 40-Hz oscillations are not present during REM sleep. *European Journal of Neuroscience*, 37(8), 1330-1339.
- Cavelli, M., Castro, S., Schwarzkopf, N., Chase, M. H., Falconi, A., & Torterolo, P. (2015). Coherent neocortical gamma oscillations decrease during REM sleep in the rat. *Behavioural brain research*, 281, 318-325.
- Cavelli, M., Castro-Zaballa, S., Mondino, A., Gonzalez, J., Falconi, A., & Torterolo, P. (2017). Absence of EEG gamma coherence in a local activated cortical state: A conserved trait of REM sleep. *Translational Brain Rhythmicity*, 21132017.
- Chee, M. W., Tan, J. C., Zheng, H., Parimal, S., Weissman, D. H., Zagorodnov, V., & Dinges, D. F. (2008). Lapsing during sleep deprivation is associated with distributed changes in brain activation. *Journal of Neuroscience*, 28(21), 5519-5528.
- Chuah, Y. L., Venkatraman, V., Dinges, D. F., & Chee, M. W. (2006). The neural basis of interindividual variability in inhibitory efficiency after sleep deprivation. *Journal of Neuroscience*, 26(27), 7156-7162.
- Colavito, V., Fabene, P. F., Grassi Zucconi, G., Pifferi, F., Lamberty, Y., Bentivoglio, M., & Bertini, G. (2013). Experimental sleep deprivation as a tool to test memory deficits in rodents. *Frontiers in systems neuroscience*, 7, 106.
- Cooley, J. W., & Tukey, J. W. (1965). An algorithm for the machine calculation of complex Fourier series. *Mathematics of computation*, 19(90), 297-301.
- Daniela, T., Alessandro, C., Giuseppe, C., Fabio, M., Cristina, M., & Michele, F. (2010). Lack of sleep affects the evaluation of emotional stimuli. *Brain research bulletin*, 82(1-2), 104-108.
- de Manacéine, M. (1894). Quelques observations experimentales sur l'influence de

l'insomnie absolue. *Arch Ital. Biol.*, 21, 322-325.

Deboer, T. (2013). Behavioral and electrophysiological correlates of sleep and sleep homeostasis. *Sleep, Neuronal Plasticity and Brain Function*, 1-24.

Deboer, T., & Tobler, I. (1994). Sleep EEG after daily torpor in the Djungarian hamster: Similarity to the effects of sleep deprivation. *Neuroscience letters*, 166(1), 35-38.

Dib, R., Gervais, N. J., & Mongrain, V. (2021). A review of the current state of knowledge on sex differences in sleep and circadian phenotypes in rodents. *Neurobiology of Sleep and Circadian Rhythms*, 11, 100068. <https://doi.org/10.1016/j.nbscr.2021.100068>

Durmer, J. S., & Dinges, D. F. (2005). Neurocognitive consequences of sleep deprivation. *Seminars in neurology*, 25(01), 117-129.

Endo, T., Schwierin, B., Borbély, A. A., & Tobler, I. (1997). Selective and total sleep deprivation: Effect on the sleep EEG in the rat. *Psychiatry research*, 66(2-3), 97-110.

Everson, C. A., Bergmann, B. M., & Rechtschaffen, A. (1989). Sleep deprivation in the rat: III. Total sleep deprivation. *Sleep*, 12(1), 13-21.

Ferrara, M., De Gennaro, L., Casagrande, M., & Bertini, M. (1999). Auditory arousal thresholds after selective slow-wave sleep deprivation. *Clinical neurophysiology*, 110(12), 2148-2152.

Franken, P., Dijk, D. J., Tobler, I., & Borbély, A. A. (1991). Sleep deprivation in rats: Effects on EEG power spectra, vigilance states, and cortical temperature. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 261(1), R198-R208.

Franken, P., Tobler, I., & Borbély, A. A. (1991). Sleep homeostasis in the rat: Simulation of the time course of EEG slow-wave activity. *Neuroscience letters*, 130(2), 141-144.

Friedman, L., Bergmann, B. M., & Rechtschaffen, A. (1978). Effects of sleep deprivation on sleepiness, sleep intensity, and subsequent sleep in the rat. *Sleep*, 1(4), 369-391.

Funk, C. M., Honjoh, S., Rodriguez, A. V., Cirelli, C., & Tononi, G. (2016). Local slow waves in superficial layers of primary cortical areas during REM sleep. *Current Biology*, 26(3), 396-403.

Goel, N., Rao, H., Durmer, J. S., & Dinges, D. F. (2009). Neurocognitive consequences of sleep deprivation. *Seminars in neurology*, 29(4), 320.

González, J., Cavelli, M., Castro-Zaballa, S., Mondino, A., Tort, A. B. L., Rubido, N., Carrera, I., & Tortero, P. (2021). EEG Gamma Band Alterations and REM-like Traits Underpin the

Acute Effect of the Atypical Psychedelic Ibogaine in the Rat. *ACS Pharmacology & Translational Science*, 4(2), 517-525. <https://doi.org/10.1021/acsptsci.0c00164>

González, J., Cavelli, M., Mondino, A., Pascovich, C., Castro, S., Rubido, N., & Torterolo, P. (2020). Electrocortical temporal complexity during wakefulness and sleep: An updated account. *bioRxiv*.

Grasing, K., & Szeto, H. (1992). Diurnal variation in continuous measures of the rat EEG power spectra. *Physiology & behavior*, 51(2), 249-254.

Guillaumin, M. C., McKillop, L. E., Cui, N., Fisher, S. P., Foster, R. G., de Vos, M., Peirson, S. N., Achermann, P., & Vyazovskiy, V. V. (2018). Cortical region-specific sleep homeostasis in mice: Effects of time of day and waking experience. *Sleep*, 41(7), zsy079.

Hasan, S., Dauvilliers, Y., Mongrain, V., Franken, P., & Tafti, M. (2012). Age-related changes in sleep in inbred mice are genotype dependent. *Neurobiology of aging*, 33(1), 195-e13.

Iber, C. (2007). The AASM manual for the scoring of sleep and associated events: Rules. *Terminology and Technical Specification*.

Killgore, W. D., Balkin, T. J., & Wesensten, N. J. (2006). Impaired decision making following 49 h of sleep deprivation. *Journal of sleep research*, 15(1), 7-13.

Lim, J., & Dinges, D. (2008). Sleep deprivation and vigilant attention. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1129(1), 305.

Lim, J., & Dinges, D. F. (2010). A meta-analysis of the impact of short-term sleep deprivation on cognitive variables. *Psychological bulletin*, 136(3), 375.

Lorenzo, I., Ramos, J., Arce, C., Guevara, M. A., & Corsi-Cabrera, M. (1995). Effect of Total Sleep Deprivation on Reaction Time and Waking EEG Activity in Man. *Sleep*, 18(5), 346-354. <https://doi.org/10.1093/sleep/18.5.346>

Maloney, K. J., Cape, E. G., Gotman, J., & Jones, B. E. (1997). High-frequency  $\gamma$  electroencephalogram activity in association with sleep-wake states and spontaneous behaviors in the rat. *Neuroscience*, 76(2), 541-555.

Meerlo, P., Sgoifo, A., & Suchecki, D. (2008). Restricted and disrupted sleep: Effects on autonomic function, neuroendocrine stress systems and stress responsivity. *Sleep medicine reviews*, 12(3), 197-210.

Meijer, J. H., & Rietveld, W. J. (1989). Neurophysiology of the suprachiasmatic circadian pacemaker in rodents. *Physiological Reviews*, 69(3), 671-707.

- Mistlberger, R. E. (2005). Circadian regulation of sleep in mammals: Role of the suprachiasmatic nucleus. *Brain research reviews*, 49(3), 429-454.
- Mistlberger, R. E., Bergmann, B. M., Waldenar, W., & Rechtschaffen, A. (1983). Recovery sleep following sleep deprivation in intact and suprachiasmatic nuclei-lesioned rats. *Sleep*, 6(3), 217-233.
- Mondino, A., Cavelli, M., Gonzalez, J., Osorio, L., Castro-Zaballa, S., Costa, A., Vanini, G., & Torterolo, P. (2020). Power and coherence in the EEG of the rat: Impact of behavioral states, cortical area, lateralization and light/dark phases. *Clocks & sleep*, 2(4), 536-556.
- Mondino, A., Hambrecht-Wiedbusch, V. S., Li, D., York, A. K., Pal, D., González, J., Torterolo, P., Mashour, G. A., & Vanini, G. (2021). Glutamatergic Neurons in the Preoptic Hypothalamus Promote Wakefulness, Destabilize NREM Sleep, Suppress REM Sleep, and Regulate Cortical Dynamics. *Journal of Neuroscience*, 41(15), 3462-3478.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2718-20.2021>
- Neckelmann, D., & Ursin, R. (1993). Sleep stages and EEG power spectrum in relation to acoustical stimulus arousal threshold in the rat. *Sleep*, 16(5), 467-477.
- Osorio, L., Mondino, A., Cavelli, M., Gonzalez, J., Torterolo, P., & Costa, A. (2020). EEG power spectrum daily variations in sleep and wakefulness. *Sleep science*, 13(0), 68-73.
- Pace-Schott, E. F. (2005). *The neurobiology of dreaming, Principles and Practice of Sleep Medicine*, Edited by Kryger MH, Roth T, Dement WC. Philadelphia, Elsevier Saunders.
- Patrick, G. T. W., & Gilbert, J. A. (1896). Studies from the psychological laboratory of the University of Iowa: On the effects of loss of sleep. *Psychological Review*, 3(5), 469.
- Rechtschaffen, A., Bergmann, B. M., Gilliland, M. A., & Bauer, K. (1999). Effects of method, duration, and sleep stage on rebounds from sleep deprivation in the rat. *Sleep*, 22(1), 11-31.
- Revel, F. G., Gottowik, J., Gatti, S., Wettstein, J. G., & Moreau, J.-L. (2009). Rodent models of insomnia: A review of experimental procedures that induce sleep disturbances. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 33(6), 874-899.
- Rieder, M. K., Rahm, B., Williams, J. D., & Kaiser, J. (2011). Human gamma-band activity and behavior. *International Journal of Psychophysiology*, 79(1), 39-48.
- Rosa, R. R., & Bonnet, M. H. (1985). Sleep stages, auditory arousal threshold, and body temperature as predictors of behavior upon awakening. *International Journal of Neuroscience*, 27(1-2), 73-83.

- Rosenberg, R. S., Bergmann, B. M., & Rechtschaffen, A. (1976). Variations in slow wave activity during sleep in the rat. *Physiology & behavior*, 17(6), 931-938.
- Saper, C. B., Fuller, P. M., Pedersen, N. P., Lu, J., & Scammell, T. E. (2010). Sleep state switching. *Neuron*, 68(6), 1023-1042.
- Sei, H., & Morita, Y. (1996). Acceleration of EEG theta wave precedes the phasic surge of arterial pressure during REM sleep in the rat. *Neuroreport*, 7(18), 3059-3062.
- Spiegel, K., Tasali, E., Leproult, R., & Van Cauter, E. (2009). Effects of poor and short sleep on glucose metabolism and obesity risk. *Nature Reviews Endocrinology*, 5(5), 253.
- Steinfels, G. F., Young, G. A., & Khazan, N. (1980). Diurnal variations in REM and NREM sleep EEG power spectra in the rat. *Brain research*, 181(2), 425-432.
- Stenvers, D. J., van Dorp, R., Foppen, E., Mendoza, J., Opperhuizen, A.-L., Fliers, E., Bisschop, P. H., Meijer, J. H., Kalsbeek, A., & Deboer, T. (2016). Dim light at night disturbs the daily sleep-wake cycle in the rat. *Scientific Reports*, 6(1), 35662. <https://doi.org/10.1038/srep35662>
- Thomas, M., Sing, H., Belenky, G., Holcomb, H., Mayberg, H., Dannals, R., Wagner Jr, H., Thorne, D., Popp, K., & Rowland, L. (2000). Neural basis of alertness and cognitive performance impairments during sleepiness. I. Effects of 24 h of sleep deprivation on waking human regional brain activity. *Journal of sleep research*, 9(4), 335-352.
- Tobler, I., & Borbely, A. A. (1986). Sleep EEG in the rat as a function of prior waking. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*, 64(1), 74-76.
- Torsvall, L. (1987). Sleepiness on the job: Continuously measured EEG changes in train drivers. *Electroencephalography and clinical Neurophysiology*, 66(6), 502-511.
- Tort, A. B., Kramer, M. A., Thorn, C., Gibson, D. J., Kubota, Y., Graybiel, A. M., & Kopell, N. J. (2008). Dynamic cross-frequency couplings of local field potential oscillations in rat striatum and hippocampus during performance of a T-maze task. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(51), 20517-20522.
- Tort, A. B., Scheffer-Teixeira, R., Souza, B. C., Draguhn, A., & Brankač, J. (2013). Theta-associated high-frequency oscillations (110–160 Hz) in the hippocampus and neocortex. *Progress in neurobiology*, 100, 1-14.
- Tortero, P., & Vanini, G. (2010). Nuevos conceptos sobre la generación y el mantenimiento de la vigilia. *Rev Neurol*, 50(12), 747-758.
- Uhlhaas, P. J., Pipa, G., Neuenschwander, S., Wibral, M., & Singer, W. (2011). A new look at



gamma? High-( $> 60$  Hz)  $\gamma$ -band activity in cortical networks: function, mechanisms and impairment. *Progress in biophysics and molecular biology*, 105(1-2), 14-28.

Uhlhaas, P., Pipa, G., Lima, B., Melloni, L., Neuenschwander, S., Nikolić, D., & Singer, W. (2009). Neural synchrony in cortical networks: History, concept and current status. *Frontiers in integrative neuroscience*, 3, 17.

Vanini, G., & Torterolo, P. (2021). Sleep-Wake Neurobiology. En *Cannabinoids and Sleep* (pp. 65-82). Springer.

Vyazovskiy, V. V., Achermann, P., & Tobler, I. (2007). Sleep homeostasis in the rat in the light and dark period. *Brain research bulletin*, 74(1-3), 37-44.

Vyazovskiy, V. V., Olcese, U., Hanlon, E. C., Nir, Y., Cirelli, C., & Tononi, G. (2011). Local sleep in awake rats. *Nature*, 472(7344), 443-447.

Williams, H. L., Hammack, J. T., Daly, R. L., Dement, W. C., & Lubin, A. (1964). Responses to auditory stimulation, sleep loss and the EEG stages of sleep. *Electroencephalography & Clinical Neurophysiology*.

Young, G. A., Steinfels, G. F., Khazan, N., & Glaser, E. M. (1978). Cortical EEG power spectra associated with sleep-awake behavior in the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 8(1), 89-91.

## 9. Contribuciones

### Presentaciones en eventos

#### XV Latin American Symposium on Chronobiology (2019)

Presentación de posters:

- *“Analysis of electrocorticographic activity in Wistar rats through the sleep-wakefulness cycle”*
- *“Analysis of the electro-cortical activity during sleep deprivation and sleep rebound of the Wistar rat”*

#### II Congreso Nacional de Biociencias 2019 (2019)

Presentación de poster:

- *“Análisis de la actividad eléctrica cortical de la rata Wistar durante la vigilia y el sueño No-REM”*

### Producción bibliográfica

Osorio, L., Mondino, A., Cavelli, M., Gonzalez, J., Torterolo, P., & Costa, A. (2020). EEG power spectrum daily variations in sleep and wakefulness. *Sleep science*, 13(0), 68-73.



# EEG power spectrum daily variations in sleep and wakefulness

Lucía Osorio <sup>1</sup>  
Alejandra Mondino <sup>1,2</sup>  
Matías Cavelli <sup>1,3</sup>  
Joaquín González <sup>1</sup>  
Pablo Torterolo <sup>1</sup>  
Alicia Costa <sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Neurobiología del Sueño,  
Departamento de Fisiología, Facultad de  
Medicina, Universidad de la República,  
Montevideo, Uruguay.

<sup>2</sup>Department of Anesthesiology, University  
of Michigan, Ann Arbor, MI, USA.

<sup>3</sup>Department of Psychiatry, University of  
Wisconsin, Madison, WI, USA.

## ABSTRACT

**Objective:** To study the differences in electrocortical activity during wakefulness (W), NREM and REM sleep throughout the subjective day and night of the rat. **Methods:** 24-hours of continuous polysomnographic recordings were performed on seven male rats, using neocortical superficial electrodes in a 12h light/12h dark condition. The daily variation of the power spectrum (0.1-200 Hz) was analyzed for each behavioral state. **Results:** In comparison to the dark phase, W during the day was characterized by increases in the relative power of frequencies slower than 30 Hz while higher frequencies were lower. NREM sleep showed marked increases in frequencies higher than 20Hz during the night in comparison with the light phase; while the delta band (0.5-4Hz) was prominent in diurnal NREM. While the relative power spectrum of REM sleep was homogeneous during the day, it variates in a complex manner during the night. **Discussion:** Electrocortical EEG profile of W and sleep is highly dependent on the time of the day.

**Keywords:** Rem Sleep; NREM; EEG; Circadian; Rhythm; Delta; Gamma

## Corresponding author:

Alicia Costa  
E-mail: [acosta@fmed.edu.uy](mailto:acosta@fmed.edu.uy)

DOI: 10.5935/1984-0063.20200017

## INTRODUCTION

The sleep-wake cycle is a critical physiological process and one of the most preserved biological rhythms throughout evolution. This cycle is composed of different behavioral states, commonly distinguished by their electrophysiological signatures and behavioral characteristics. These states correspond to wakefulness (W), non-rapid eye movement (NREM) sleep and rapid eye movement (REM) sleep. W and sleep are associated with different brain functional states, which can be captured by electroencephalographic (EEG) signals containing a broad frequency spectrum.

The EEG reflects the interrelated multicomponent activity of numerous cortical and subcortical neuronal ensembles<sup>1</sup>. EEG activity consists of various frequency bands that vary during the sleep-wake cycle in a characteristic fashion. In the rat, the EEG during W is characterized by low voltage fast waves as well as theta rhythm (4.5-9 Hz) in posterior cortices mainly during active W. NREM sleep EEG is recognized by the occurrence of high-amplitude slow waves (0.5 to 4 Hz) and electrographic events of 0.5-2 seconds in duration known as sleep spindles, that have an intra-event frequency of 9-15 Hz<sup>2,3</sup>. EEG during REM sleep shows a high-frequency rhythm that is nested in very regular and prominent theta activity<sup>4,5</sup>.

In contrast to humans, rodents show a strong ultradian component in their sleep, with no single period of consolidated W during the active (night) period or consolidated sleep during the rest (diurnal) period<sup>6</sup>. This polyphasic nature of their sleep-wake cycle allows us to study the features of the EEG during W, NREM and REM sleep at different times of the day.

Previous works in rodents and humans have shown the existence of diurnal variations in the EEG activity at low-frequency bands (up to 30 Hz) (i.e. 7, 2, 8, 9). However, to the best of our knowledge, a continuous recording and analysis of the diurnal variations of the high-frequency bands of the EEG are lacking. Hence, the aim of this report is to convey an initial descriptive analysis of the changes in the EEG power spectra (0.1-200 Hz) of sleep and W occurring at different times of the day. For this purpose, we performed an hour-to-hour analysis of the power spectrum in each behavioral state over a 24h period and illustrate it as the Z-score variation from the mean.

## MATERIAL AND METHODS

### Experimental animals

Seven adults male Wistar rats (275-330 g) were used in this study. The animals were obtained from and determined to be in good health by the Institutional Animal Care Facility. The experimental procedures were conducted in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (8th edition, National Academy Press, Washington, DC, 2010) and approved by the Institutional Animal Care Commission (protocol No. 070153-000332-16, Facultad de Medicina, Universidad de la República). Adequate measures were taken to minimize pain, discomfort or stress of the animals, and efforts were made to use the smallest number of animals necessary to obtain reliable data.

### Surgical procedures

The animals were chronically implanted with electrodes to monitor the states of sleep and W. We employed surgical procedures like those used in our previous studies (e.g., 10). Anesthesia was induced with a mixture of ketamine-xylazine (90 mg/kg; 5 mg/kg i.p., respectively). The rat was positioned in a stereotaxic frame, and the skull was exposed. To record the EEG, stainless steel screw electrodes (1 mm diameter) were screwed on craniotomies to have their tips touching the brain's surface (above the dura mater) in different cortices. The arrangement of electrodes is depicted in Figure 1. Six electrodes were located bilaterally in the primary motor cortex (M1: L  $\pm$  2.5 mm, AP +2.5 mm), the primary somatosensory cortex (S1: L  $\pm$  2.5 mm, AP -2.5 mm) and secondary visual cortex (V2: L  $\pm$  2.5 mm, AP -7.5 mm). The reference electrode was placed in the cerebellum (Figure 1 A). Bipolar electrodes were inserted into the neck muscles in order to record the electromyogram (EMG). The electrodes were connected to a plug that was bonded to the skull with acrylic cement. At the end of the surgical procedures, an analgesic (Ketoprofen, 1 mg/kg, subcutaneously) was administered. Incision margins were kept clean and a topical antibiotic was applied daily. After the animals recovered from the preceding surgical procedures, they were adapted to the recording chamber for one week.

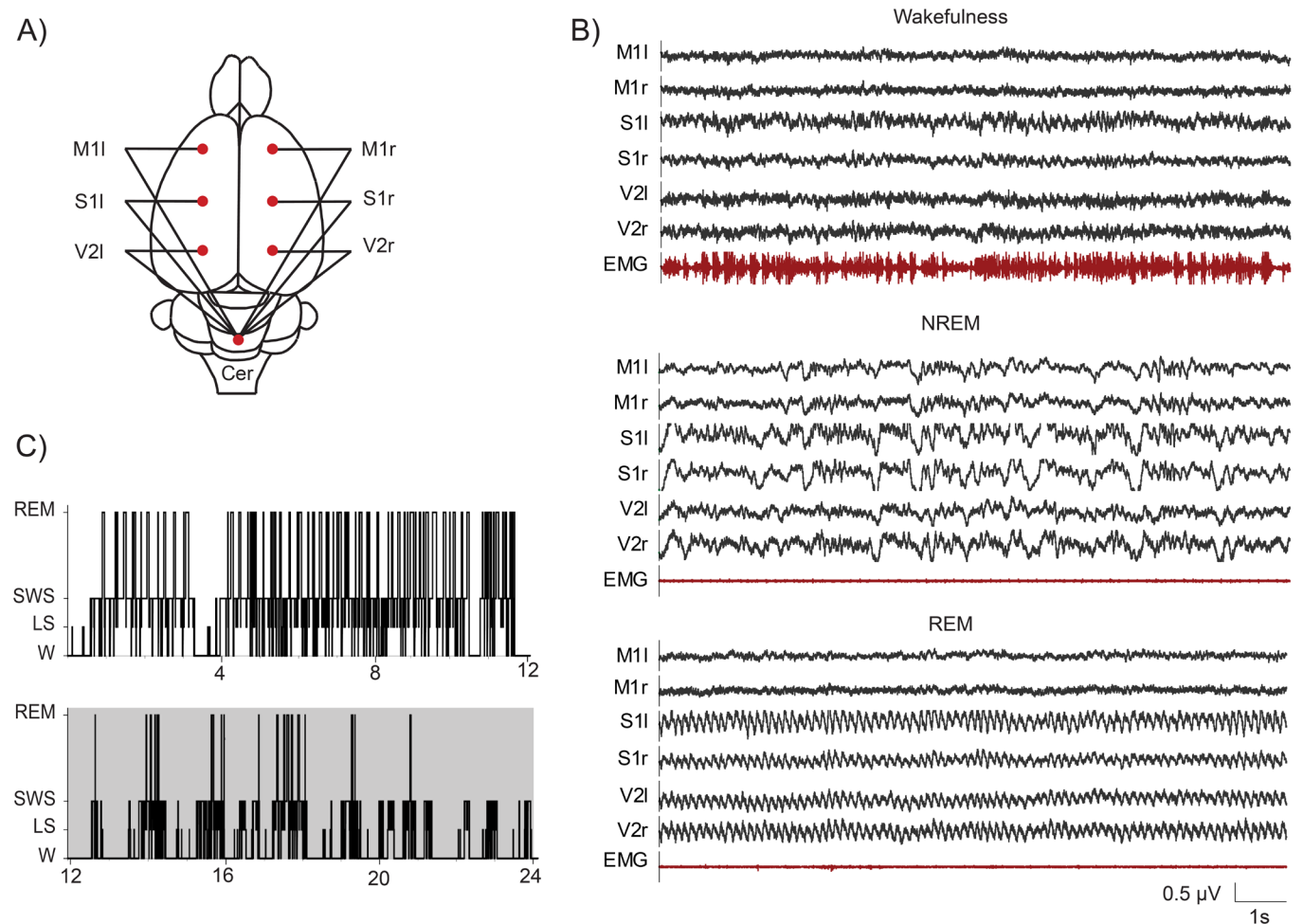
### Experimental sessions

All animals were housed individually in transparent cages (40 x 30 x 20 cm) containing wood shavings in a temperature-controlled room (21- 24 °C) with 12:12h light-dark cycle, light (50 lux) beginning at 08:00h (ZT0), with water and food *ad libitum*. The recordings were performed through a rotating connector, to allow the rats to move freely within the recording box.

All the data was collected continuously over a 24h period recordings starting at ZT0. Bioelectric signals were amplified ( $\times$ 1000), the filters were set at 0.1 Hz and 200 Hz. EEG and EMG activity were captured and stored directly on a PC computer through a National Instruments data acquisition card of 16 bits with a sampling rate of 1024 Hz by means of DASyLab software (Measurement Computing). The animals were left undisturbed during all the recordings.

### Data analysis

Behavioral states were determined in 10 s epochs. W was defined as low voltage fast waves in the frontal cortex, sometimes with theta rhythm in occipital cortex and relatively high EMG activity. Light sleep (LS) was defined as high voltage slow cortical waves interrupted by low voltage fast electroencephalographic activity, while slow-wave sleep (SWS) was identified by continuous high amplitude slow (1-4 Hz) frontal, parietal and occipital waves and sleep spindles combined with a reduced EMG activity. For the daily power spectrum analysis, LS and SWS were pooled together and classified as NREM sleep. REM sleep was defined as low voltage fast frontal waves, a regular theta rhythm in the parietal and occipital cortices, and a silent EMG except for occasional myoclonic twitching.



**Figure 1.** A) Representative scheme showing the position of the recording electrodes. The electrodes were referred to a common electrode that was located over the cerebellum (Cer). M1, primary motor cortex; S1, primary somatosensory cortex; V2, secondary visual cortex; r, right; l, left. B) Polysomnographic recordings of a representative animal in wakefulness, NREM sleep, and REM sleep. EMG: electromyogram. C) Representative hypnogram of the 24h period (0 is 8:00 AM: ZT0). The shaded area indicates the lights-off period.

In order to analyze the power spectrum in each EEG channel, we used procedures like those applied in our previous studies (e.g., 10). The power spectrum was estimated on Matlab using the Welch function (Hamming window, window size 10 s, with an overlap of 2.5 s, a frequency sample of 1024 Hz and a resolution of 0.5 Hz). The mean power of all 6 electrodes and 7 rats, was used to calculate the relative power. This was determined by dividing the power value for each frequency band in each time point, by the sum of the total power for that frequency in the 24 hs. Z transformations were made in order to express the values as deviations from the mean. It is important to note that in the REM sleep analysis the last hour was not computed due to a coincidental lack of this behavioral state in all animals during that period.

## RESULTS

### Polysomnographic recordings

The simultaneous electrocortical activity of different brain areas was recorded continuously over a 24h period.

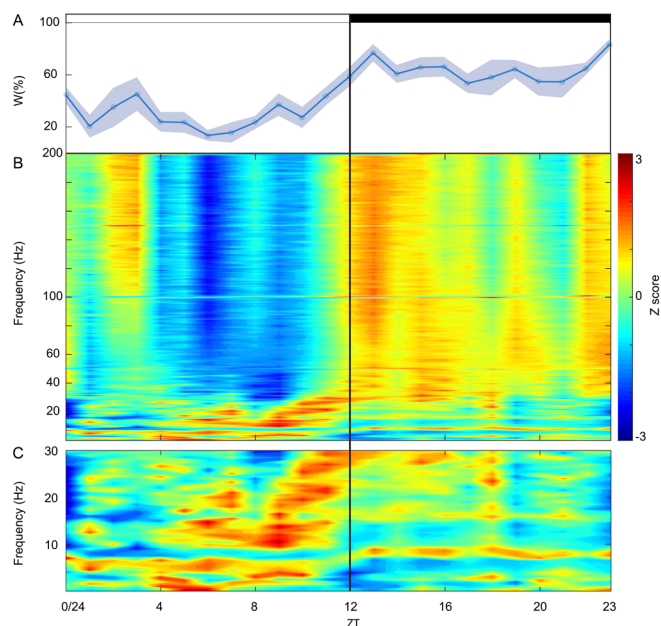
Representative recordings of these areas during W, NREM, and REM sleep are shown (Figure 1B). The polycyclic nature of the sleep-wake cycle of the rat can be observed in a representative hypnogram (Figure 1C). The animals showed a clear preference for sleep during the light period (72% of total sleep time; 59% in NREM and 13% in REM sleep) and to be awake at night (61% in W; 32% in NREM and 4% in REM sleep).

### Daily power spectrum during wakefulness

Figure 2A shows the hour-to-hour analysis of the percentage of W; the daily variation in the percentage of W is readily observed.

The EEG power spectrum during W has robust daily variations, as shown in the spectrograms (grand average of animals and channels) (Figure 2B and C). The main observation was that diurnal and nocturnal W differ in their electrocortical activity profiles. The relative power of the high-frequency rhythms (30 - 200 Hz) was higher both at the beginning (between ZT12 and ZT16) and at the end of the dark phase, reaching values that were 2 to 3 standard deviations (SD or Z-units) over the mean (Figure 2B).





**Figure 2. EEG relative power spectra during wakefulness.** A) Percentage of time spent in W throughout the 24h period. The shaded outline indicates 1 SD. The top bar indicates light and dark periods. B) Z-score of the relative power spectrogram of W during the 24h period. The black vertical line indicates lights-off onset. C) Zoomed inset showing the Z-score of the relative power spectrogram for the 0-30Hz band. ZT0 = 8AM. Panels B and C share the same z-score color scale. All Y-axis starting at 0.

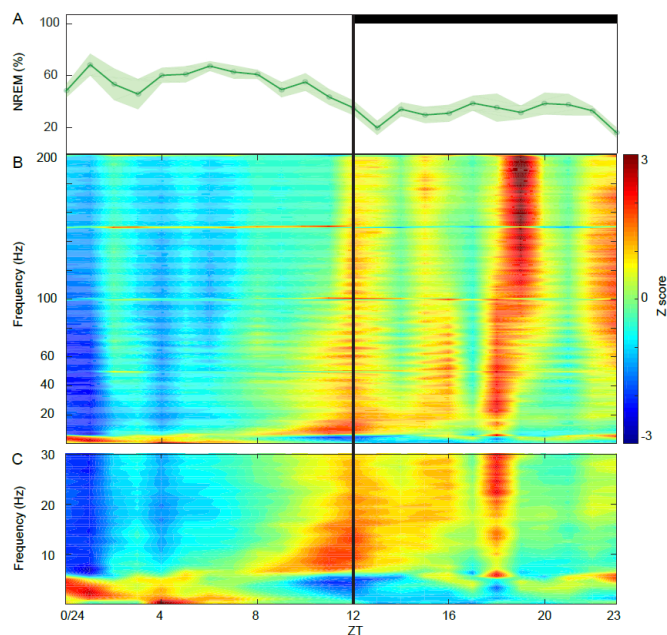
In addition, their lower values were observed in the ZT4-ZT10 window (light phase). Inspecting the frequencies up to 30Hz we observed higher relative power values (2 to 3 SD over the mean) mainly from Z4 up to Z12 (Figure 2C). Note that from ZT8 to ZT12 there is a progressive increase in the relative power of frequencies in the 12-30 Hz range. Another interesting observation is that theta-band activity (5 to 9 Hz) seemed to be faster during the nighttime.

### Daily power spectrum during NREM sleep

As it is shown in Figure 3A NREM sleep predominates during the light phase. During the light phase, from ZT0 to ZT6, NREM was characterized by an increase in the relative power of the activity up to 5Hz (mainly slow-wave activity, SWA), and a decrease in the higher frequencies (Figure 3B and C). From ZT8 a progressive increase in power in 9-15 Hz oscillations (sleep spindles) was observed. The SWA relative power reached a minimum value two hours before lights-off. During the dark period, NREM was characterized by an increase in the relative power of frequencies higher than 6 Hz and up to 200Hz (Figure 3B and C); however, these changes were not homogenous throughout the night.

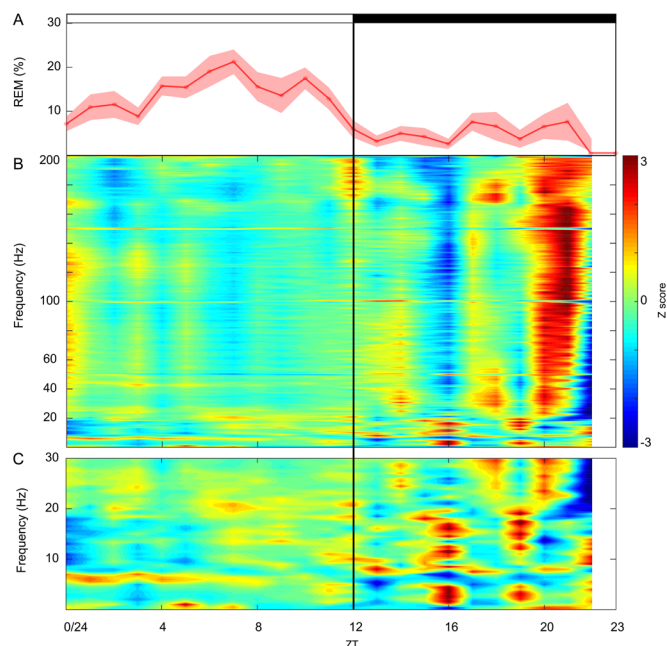
### Daily power spectrum during REM sleep

Figure 4A shows the hour-to-hour analysis of the percentage of REM sleep. This behavioral state was more prominent during the light phase, no presence of REM sleep was detected in the last hour of the recordings.



**Figure 3. EEG relative power spectra during NREM sleep.** A) Top panel: Percentage of time spent in NREM throughout the 24h period. The shaded outline indicates 1 SD. The top bar indicates light and dark phases. B) Z-score for the relative power spectrogram of NREM during the 24h period. The black vertical line indicates lights-off onset. C) Zoomed inset showing the Z-score of the relative power spectrogram for the 0-30Hz band. ZT0=8AM. Panels B and C share the same z-score color scale. All Y-axis starting at 0.

The relative power spectrogram during the lights-on period showed no marked changes in relation to the mean (Figure 4B); however, it was highly variable during the dark phase.



**Figure 4. EEG relative power spectra during REM sleep.** A) Percentage of time spent in REM throughout the 24h period. The shaded outline indicates 1 SD. The top bar indicates light and dark phases. B) Z-score for the relative power spectrogram during the 24h period. The black vertical line indicates lights-off onset. C) Zoomed inset showing the Z-score of the relative power spectrogram for the 0-30Hz band. ZT0=8AM. Panels B and C share the same z-score color scale. All Y-axis starting at 0.

In fact, the relative power of frequencies up to 30Hz changed with short time increases and decreases over the mean. Also, the most remarkable fact was the increase in the relative power of frequencies in the 20-200 Hz range, at the end of the nighttime (Figure 4B). During the day, theta frequency appears to be slower than during the dark-phase. (Figure 4C). Note that the last hour in the spectrogram is blank due to the lack of REM sleep during this period.

## DISCUSSION

In this preliminary study, we performed a descriptive analysis of the daily variations in the EEG power spectrum (0.1 – 200 Hz) of W, NREM and REM sleep of the rat. We demonstrated the presence of an important daily variation in the spectrographic profile of both W and sleep. This variation was evident both within and between the light and dark phases.

Previous studies showed diurnal variations in the EEG of the rat on frequencies up to 30 Hz<sup>7,4,11</sup>. In fact, our results support the pioneer studies of Rosenberg et al.,<sup>12</sup> and Steinfelds et al.<sup>7</sup>, that showed that the highest spectral values can be found during the day in the delta band for NREM sleep and in the theta band for REM sleep. However, we chose to use relative power in order to analyze differences within each frequency band throughout the 24hs for each behavioral state. These previous studies were limited to study frequencies lower than 30Hz, while in this report we also analyze the higher frequencies (up to 200Hz).

Our results showed that diurnal W was heterogeneous with the main changes being a decrease in the relative power of high frequency oscillations (> 30 Hz), and bouts of increase in the relative power of slower rhythms. Nocturnal W was characterized by a larger relative power in the high-frequency rhythms (> 30 Hz) while slower oscillations, apart from the theta band, showed not main changes. This result suggests that nocturnal W presents greater cortical arousal than diurnal W.

Human electrocortical activity has been shown to exhibit important diurnal and circadian variations. Cacot et al.<sup>13</sup> found a clear diurnal variation in the power of EEG rhythms up to 30 Hz during W, with maximum achieved at noon or in the afternoon. In addition, classic studies by Kleitman have shown ultradian differences in behavior during W, what was called basic rest-activity cycle<sup>14</sup>; however, the electrophysiological counterpart of this ultradian cycle has not been studied in detail.

Regarding NREM sleep, in comparison to nighttime, diurnal activity presented a higher power in lower frequencies (mainly below 5 Hz), while the power of the high frequencies (> 30 Hz) was lower. Hence, suggesting that NREM sleep during the day is deeper than during the night. In accordance with Bergmann et al.<sup>2</sup>, our data showed that as NREM sleep time increases, slow-wave incidence and amplitude increase. Fluctuations in the electrocortical activity, probably reflecting the level of arousal, also occur during night NREM sleep. In humans, a cyclic alternating pattern (CAP), characterized by the regular alternation of EEG patterns that represents a complex form of periodic activity, was described during NREM sleep see <sup>15,16</sup>. In fact, Terezano et al.<sup>17</sup>, showed the existence of a CAP in NREM sleep characterized by changes at the level of arousal to sensory stimuli.

An important fact, is that during W and NREM, an opposite correlation between high frequency (> 30 Hz) and low-frequency oscillations (mainly in the delta, 0.5-4 Hz band) was evident. This result agrees with Maloney et al.<sup>18</sup> who showed that gamma activity was negatively correlated with delta across all behavioral states.

Regarding REM sleep, our results showed a mostly homogeneous profile during the light-phase. This is in accordance with previous results by Borbély et al.<sup>4</sup>, who showed no clear variations in the relative EEG power density of REM during the day. Hence, REM sleep is a highly stable behavioral state during the light phase. During the night REM sleep the spectrogram has a changing profile with alternations between bouts of slow (< 20Hz) and high (30 - 200 Hz) electrocortical activity. Our results agree with those of Steinfelds et al.<sup>7</sup> where a clear increase in the EEG spectral power was observed at the end of the dark period. Finally, it was readily observed that during the first half of the light period, the frequency of the peak of the theta band during REM sleep was lower than in the dark period; probably this fact could be related with a more active REM sleep during the night<sup>19</sup>.

## CONCLUSIONS AND FUTURE DIRECTIONS

In the present report, we demonstrated a clear difference in the power spectrum profile both in W and sleep during the light and dark phases among a wide range of electrocortical oscillations (0.1-200 Hz). However, further analysis needs to be done in order to better understand if the observed variations depend on external cues, circadian and/or homeostatic process (processes C and S, respectively; see Borbély et al., 20). Sleep deprivation, as well as recording in free-running conditions, will be optimal to answer these interrogations.

In addition, another future direction is to perform a detailed analysis of the daily variation of the activity of different neocortical and archicortical (olfactory bulb) areas as well as of their functional connectivity.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), (Proyecto FCE\_1\_2017\_1\_136550); Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) (Proyecto I+D 2016\_589); and Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas (PEDECIBA)-Uruguay.

## REFERENCES

1. da Silva FL. Neural mechanisms underlying brain waves: from neural membranes to networks. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*. 1991 Aug 1;79(2):81-93.
2. Bergmann BM, Winter JB, Rosenberg RS, Rechtschaffen A. NREM sleep with low-voltage EEG in the rat. *Sleep*. 1987 Jan 1;10(1):1-1.
3. Etevenon P, Giannella F. Waking and sleeping states in the rat from an EEG data analysis point of view. *Waking & Sleeping*. 1980 Jan-Mar;4(1):33-45.
4. Borbély AA, Tobler I, Hanagasioglu M. Effect of sleep deprivation on sleep and EEG power spectra in the rat. *Behavioural brain research*. 1984 Dec 1;14(3):171-82.
5. Young GA, Steinfelds GF, Khazan N, Glaser EM. Cortical EEG power spectra associated with sleep-awake behavior in the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 1978 Jan 1;8(1):89-91.

6. Yassenkov R, Deboer T. Circadian modulation of sleep in rodents. In: *Progress in brain research* 2012 Jan 1 (Vol. 199, pp. 203-218). Elsevier.
7. Steinfels GF, Young GA, Khazan N. Diurnal variations in REM and NREM sleep EEG power spectra in the rat. *Brain research*. 1980 Jan 13;181(2):425-32.
8. Grasing K, Szeto H. Diurnal variation in continuous measures of the rat EEG power spectra. *Physiology & behavior*. 1992 Feb 1;51(2):249-54.
9. Dijk DJ. Circadian variation of EEG power spectra in NREM and REM sleep in humans: dissociation from body temperature. *Journal of sleep research*. 1999 Sep;8(3):189-95.
10. Cavelli M, Castro-Zaballa S, Mondino A, Gonzalez J, Falconi A, Torterolo P. Absence of EEG gamma coherence in a local activated cortical state: a conserved trait of REM sleep. *Translational Brain Rhythmicity*. 2017;21132017.
11. Grasing K, Szeto H. Diurnal variation in continuous measures of the rat EEG power spectra. *Physiology & behavior*. 1992 Feb 1;51(2):249-54.
12. Rosenberg RS, Bergmann BM, Rechtschaffen A. Variations in slow wave activity during sleep in the rat. *Physiology & behavior*. 1976 Dec 1;17(6):931-8.
13. Cacot P, Tesolin B, Sebban C. Diurnal variations of EEG power in healthy adults. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*. 1995 May 1;94(5):305-12.
14. Kleitman N. The basic rest-activity cycle and physiological correlates of dreaming. *Experimental neurology*. 1967 Dec 1;19:2-4.
15. Gaches J. Activités périodiques en EEG. *Revue d'Electroencéphalographie et de Neurophysiologie Clinique*. 1971 Jan 1;1(1):9-33.
16. Terzano MG, Mancina D, Manzoni Gc. Periodic activities in Creutzfeldt-Jakob disease and epilepsy. In: Nisticò G, Di Perri R, Meinardi H, eds. *Epilepsy: an update on research and therapy*. New York: Alan R. Liss, 1983:199-226.
17. Terzano MG, Mancina D, Salati MR, Costani G, Decembrino A, Parrino L. The cyclic alternating pattern as a physiologic component of normal NREM sleep. *Sleep*. 1985 Jun 1;8(2):137-45.
18. Maloney KJ, Cape EG, Gotman J, Jones BE. High-frequency  $\gamma$  electroencephalogram activity in association with sleep-wake states and spontaneous behaviors in the rat. *Neuroscience*. 1997 Jan 1;76(2):541-55.
19. Sei H, Morita Y. Acceleration of EEG theta wave precedes the phasic surge of arterial pressure during REM sleep in the rat. *Neuroreport*. 1996 Nov 25;7(18):3059-62.
20. Borbély AA, Daan S, Wirz-Justice A, Deboer T. The two-process model of sleep regulation: a reappraisal. *Journal of sleep research*. 2016 Apr;25(2):131-43.