

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**ESCUELA DE POSTGRADO**



**CICLO SUEÑO-VIGILIA DE UNA CEPA DE *RATÓN KNOCK-OUT*  
PARA EL RECEPTOR COLINÉRGICO NICOTÍNICO ALPHA9**

**NATALIA GABRIELA MADRID LÓPEZ**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN NEUROCIENCIAS**

Director de Tesis: Prof. Dr. Adrián Ocampo

Co – Director de Tesis: Prof. Dr. Paul Delano

2017

## DEDICATORIA

A Nicolás, por las eternas conversaciones.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mis profesores tutores por su compromiso y constante apoyo y por la confianza que depositaron en mi para desarrollar este trabajo de tesis.

A todo el equipo del Laboratorio de Neurobiología de Audición por su infinita ayuda y el montón de café.

A todos en el Laboratorio de Cronobiología y Sueño por enseñarme todo lo que necesité aprender.

Al Laboratorio del profesor Jose Luis Valdés, por permitirme utilizar el material necesario para llevar acabo los experimentos.

A mis hijas por acompañarme tantas veces al laboratorio.

A toda mi familia por toda la ayuda.

## ÍNDICE

	Página
1. Resumen	5
2. Abstract	6
3. Introducción	7
3.1. Ciclo Sueño Vigilia	
3.1.1. Cronobiología del Ciclo Sueño Vigilia	
3.1.1.1. Ritmos Circadianos	
3.1.1.2. Homeostasis del Sueño	
3.1.1.3. Enmascaramiento	
3.1.2. Sueño en Ratones	
3.2. Sistema Auditivo en el sueño	
3.2.1. Sistema Eferente Auditivo	
3.3. Ratón KO $\alpha 9$	
3.3.1. Descripción del modelo Ratón KO $\alpha 9$	
3.3.2. Líneas de Investigación	
4. Hipótesis y Objetivos	17
5. Materiales y Métodos	19
6. Resultados	27
7. Discusión	42
8. Conclusión	45
9. Bibliografía	46

## 1. RESUMEN

Los estados de sueño y vigilia son configuraciones estables del Sistema Nervioso que pueden ser influenciados por modificaciones de los sistemas sensoriales.

El estudio del ciclo de sueño-vigilia de un ratón genéticamente modificado que carece de un receptor en la cóclea dio resultados que muestran diferencias en la organización de los estados de vigilia y sueño, a demás de distinta duración de los episodios de sueño y enmascaramiento fótico que afecta de manera distinta a los ratones control y genéticamente modificados.

## 2. ABSTRACT

The states of sleep and wakefulness are stable configurations of the nervous system that can be influenced by modifications of the sensory systems.

The study of the sleep-wakefulness cycle of a genetically modified mouse that lacks a receptor in the cochlea gave results that show differences in the organization of the sleep and wakefulness states, in addition to different duration of the sleep episodes and the photic masking that affect control mice and genetically modified mice differently.



### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1. Ciclo Sueño Vigilia

El ciclo sueño vigilia es un proceso fisiológico y conductual que refleja uno de los ritmos biológicos diarios más conspicuos. En todos los mamíferos podemos distinguir tres configuraciones o estados conductuales de características electrofisiológicas (EEG) compartidas: la vigilia, el sueño de movimiento oculares rápidos (MOR) y el sueño quieto o NoMOR.

La vigilia se caracteriza por una conducta activa, atenta y coherente con estímulos somatosensoriales, actividad motora voluntaria, tono muscular conservado, EEG desincronizado de alta frecuencia (ondas beta y gamma) y baja amplitud, reflejo de una intensa integración sensoriomotora. El sueño es la interrupción transitoria y fisiológicamente reversible de la vigilia. La transición al sueño se acompaña conductualmente de quietud, ojos cerrados y una elevación de los umbrales perceptuales de los sistemas somatosensoriales. La transición de vigilia a sueño MOR no existe, de tal forma que la entrada al dormir se realiza siempre a través del sueño NoMOR. El sueño NoMOR, también llamado sueño sincronizado o quieto, se caracteriza por ausencia de movimientos voluntarios, EEG sincronizado, ondas delta (1 – 4 Hz) y husos del sueño (ondas sinusoidales de 10-15 Hz). El sueño MOR, o sueño paradójico, se caracteriza por atonía muscular, eventos de ráfagas de movimientos oculares rápidos y EEG desincronizado de baja amplitud y una prominente actividad de ondas theta de origen hipocampal.

##### 3.1.1. Cronobiología del Ciclo Sueño Vigilia

En los mamíferos podemos encontrar distintos patrones, o cronotipos, del ciclo de sueño y vigilia; algunos tienen preferencia por dormir en el día y tener su periodo de actividad en la noche, como el ratón (*Mus musculus*), en cambio el linaje primate prefiere la noche para dormir y hay otros que tienen su periodo de actividad durante el atardecer y amanecer, como el degú. Los distintos cronotipos están en relación a la especialización temporal de cada



especie que permite que la vigilia activa ocurra en los momentos del día de mejor rendimiento sensorio-motor.

Se cree que la organización temporal del ciclo sueño-vigilia es producto de la articulación de mecanismos circadianos y homeostáticos del sueño, a demás de enmascaramiento por luz.

#### 3.1.1.1. Ritmos Circadianos

Los ritmos circadianos se refieren a procesos fisiológicos que manifiestan una oscilación estacionaria con período cercano a 24 horas.

Los procesos rítmicos generados por el sistema circadiano modulan la relación de fase entre el ciclo de luz-oscuridad y la ocurrencia de los estados de ciclo sueño-vigilia de los mamíferos. El proceso circadiano es controlado por un marcapasos endógeno, el cual se encuentra en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo que se encuentra conectado directamente a la retina, lo que le permite ajustar el tiempo biológico de manera cotidiana al amanecer y atardecer (Golombek DA, Rosenstein RE, 2010). Se cree que el rol de este marcapasos es proveer un marco circadiano a la regulación homeostática del sueño (Yasenkov y Deboer, 2012). El núcleo supraquiasmático del hipotálamo modifica de manera predecible y sistemática la probabilidad de residir en alguno de los tres estados, vigilia, sueño NoMOR o sueño MOR, en el curso de las 24 horas del día (Dijk y Czeisler, 1995). Los principales blancos de modulación circadiana son el sueño MOR y la vigilia, mientras que el sueño NoMOR está, principalmente, bajo regulación homeostática (Dijk y Edgar, 1999).

#### 3.1.1.2. Homeostasis del Sueño

El término homeostasis del sueño (Borbély, 1980) se refiere a que ciertas aspectos del dormir, como la duración y/o intensidad de los estados de sueño, se comportan como variables controladas, con un rango estrecho de variabilidad intraindividual, y es mediante ajustes de estas variables de los episodios de sueño que se producen respuestas compensatorias frente a

pérdidas o excesos relativos, de tal forma que se tiende a mantener constante la cantidad y calidad del dormir en 24 horas.

El modelo de los dos procesos (Borbély y cols., 1982) postula que la interacción de un proceso homeostático, dependiente de sueño y vigilia, con un proceso controlado por el marcapasos circadiano determina los aspectos principales de la regulación del sueño. El proceso homeostático representa la deuda del sueño, la cual aumenta durante la vigilia y disminuye durante el sueño, dentro de un rango de valores que oscila en un rango dado por el marcapasos circadiano (Borbély y cols, 2016).

### Regulación Homeostática de Sueño NoMOR

Las ondas delta de EEG en el sueño NoMOR de mamíferos reflejan patrones de hiperpolarización sincronizada de neuronas talamocorticales (Steriade, 1993), y la actividad de éstas puede ser cuantificada a través de un análisis espectral de EEG. La actividad de ondas delta está en estrecha relación con la cantidad de sueño y vigilia anterior. La falta de sueño evoca un aumento en la actividad de ondas delta en el subsiguiente sueño NoMOR de manera proporcional a la falta de sueño anterior (Tobler y Boberly, 1986; Dijk, 1987), y el exceso de sueño resulta en una disminución de la actividad de ondas delta (Werth, 1987), a demás, la actividad de ondas delta disminuye a lo largo de un episodio de sueño NoMOR, independiente de la fase circadiana en que haya comenzado el episodio de sueño (Dijk y Czeisler, 1995). Estas y otras observaciones han sido interpretadas como evidencia de que la actividad de ondas delta refleja la necesidad de sueño NoMOR (Franken, 2001) y por lo tanto, se considera el correlato fisiológico de la intensidad del sueño NoMOR (De Boer 2008, Borbély 2009).

### Regulación Homeostática de Sueño MOR

La privación total y selectiva de sueño MOR desencadena una respuesta de compensación en la cantidad de sueño MOR en humanos (Endo y cols. 1998) y en la rata (Endo y cols 1997; Ocampo-Garcés y cols 2000), que es proporcional al tiempo de privación de sueño MOR (Franken 2002; Cerri y cols. 2005). La modulación homeostática del MOR

también ocurre en ausencia de modulación circadiana por lesión del núcleo supraquiasmático (Wurts y Edgar 2000). Existe una interacción entre la homeostasis del sueño MOR y los mecanismos circadianos (Wurts y Edgar 2000; Hernández 2005; Vivaldi y cols. 2005).

La teoría de homeostasis del sueño parece ajustarse igual de bien al sueño polifásico de roedores como al sueño monofásico de humanos. Sin embargo, debido a la naturaleza polifásica de su sueño, los roedores parecen ser más flexibles en su respuesta a las influencias ambientales sobre el sueño (Yasenkov y Deboer, 2012), esto, acompañado de la corta duración de los episodios MOR en ratón, hace que sea experimentalmente difícil el estudio de la regulación homeostática del sueño MOR en estos últimos.

#### 3.1.1.3. Enmascaramiento

El enmascaramiento es un mecanismo por el cual las claves fóticas del ambiente influyen de manera directa sobre la conducta animal, aumentando o disminuyendo la actividad de éste (Shuboni y cols 2015). El término enmascaramiento se refiere a que la luz puede oscurecer las señales provenientes del reloj circadiano endógeno del animal, por ejemplo, en un animal nocturno la ocurrencia de luz en la noche puede inhibir o “enmascarar” el estado de actividad que el reloj endógeno esté promoviendo a esa hora (Mrosovsky et al, 2008). La dirección de la respuesta al enmascaramiento depende del nicho temporal que ocupe el individuo, o sea, si el animal es diurno, nocturno o crepuscular. En animales nocturnos generalmente ocurre una disminución de la actividad (enmascaramiento negativo) cuando es expuesto a la luz, mientras que en animales diurnos se observa un aumento de actividad (enmascaramiento positivo) (Shuboni y cols 2015).

En circunstancias normales, el encarrilamiento, mecanismo de sincronización del reloj endógeno por claves fóticas al ritmo diario de 24 horas (Chang y Reppert, 2001) , y enmascaramiento por luz actúan de manera complementaria, por lo que es necesario utilizar distintas metodologías experimentales para separar ambos efectos de la luz sobre los ritmos biológicos del animal.

La condición de oscuridad constante permite separar el efecto homeostático del circadiano, y garantiza que cualquier cambio fisiológico en el rango circadiano observado durante el procedimiento experimental se debe a propiedades intrínsecas del reloj circadiano endógeno y no a cambios en el régimen de luz (Yasenkov y DeBoer, 2012). Sin embargo esta condición genera la pérdida del encarrilamiento del reloj endógeno, apareciendo, en el caso del ratón, ciclos sueño-vigilia de mayor duración, lo que dificulta comparaciones con la condición de iluminación 12 horas luz : 12 horas oscuridad.

Una alternativa para separar el efecto de enmascaramiento por luz sin perder la sincronía del reloj endógeno es el protocolo de iluminación donde se mantiene oscuridad constante salvo dos pulsos de luz de 15 minutos; al inicio y al término de lo que corresponde a la fase de luz, llamado fotoperiodo esqueleto (Moore-Ede et al., 1982).

### 3.1.2. Sueño en Ratones

Al igual que en otros mamíferos, en los ratones podemos reconocer tres configuraciones conductuales, vigilia, sueño MOR y NoMOR, de características electroencefalográficas claras y grafoelementos distinguibles.

El ciclo sueño vigilia de los ratones tiene fuerte modulación circadiana (Franken 1998). Bajo ciclo luz – oscuridad 12:12, la vigilia se concentra en la fase activa , cuando las luces están apagadas, mientras que tanto el sueño MOR y NoMOR se concentran en la fase de reposo, cuando las luces están encendidas.

A pesar de estas generalidades se sabe que existen grandes diferencias entre ratones de distintas cepas. Se ha visto que existe una gran variación en los elementos del registro EEG, evidencia de aquello es que las cepas AKR/J, C57BL/6J, C57BR/6J y 129/Ola muestran un ritmo teta muy regular, mientras que en las cepas DBA/2J y C es más irregular y entremezclado con algunos componentes más lentos y otros más rápidos. Por otro lado, se sabe que hay gran variabilidad en la duración de episodios y cantidad de tiempo total que pasa cada cepa en vigilia, sueño MOR o sueño NoMOR (Huber et al, 2000), como por ejemplo, los

ratones de cepa DBA/2J pasan el 62% del tiempo en vigilia, mientras que los ratones de cepa AKR/J dedican solo el 52% del tiempo a este estado. También se ha visto que existen diferencias en los perfiles espectrales de cada estado entre las distintas cepas, en este aspecto se ha descrito, por ejemplo, que en el sueño NoMOR la contribución relativa del poder de las bandas delta y sigma se describen como función del genotipo, mientras que la banda theta parece no tener variación entre las distintas cepas estudiadas (Franken, 1998). Existe diferencia también en la manera en que responden distintas cepas a manipulaciones experimentales, como se muestra en el trabajo de Franken et al (2013), donde se reporta expresión significativamente mayor de *Homer1a* en el cerebro anterior de ratones de cepa AKR/J luego de una privación total de sueño de 6 horas.

### 3.2. Sistema Auditivo en el Sueño

La entrada al sueño se acompaña de una disminución del procesamiento sensorial, que varía según la etapa del sueño en que se esté. La variación del procesamiento sensorial está condicionado por las vías eferentes presentes en los sistemas sensoriales, las que permiten al Sistema Nervioso Central ejercer influencia en los receptores periféricos y en las vías aferentes ascendentes de cada modalidad sensorial.

Los potenciales registrados en la cóclea (Microfónica coclear y Potencial de Acción compuesto del Nervio Auditivo) se ven influidos por los cambios que ocurren en el Sistema Nervioso Central al pasar de la vigilia al sueño. Ambos potenciales aumentan de amplitud de forma paralela durante el sueño NoMOR y ambos disminuyen en el sueño REM a niveles similares a los observados en vigilia (Velluti y cols., 1989). El Sistema Eferente Auditivo parece ser el único sistema posible responsable de producir los cambios observados a nivel del receptor auditivo (Velluti, 2005).

#### 3.2.1. Sistema Eferente Auditivo

El sistema eferente auditivo conecta centros nerviosos superiores con los receptores periféricos en la cóclea, células ciliadas, y con el nervio auditivo.

### Anatomía del Sistema Eferente Auditivo

En mamíferos sistema eferente auditivo se origina en la corteza auditiva y llega hasta la cóclea a través de las fibras olivococleares (Robles y Délano, 2008). Las fibras olivococleares se clasifican en dos grupos, el haz olivococlear lateral y el haz olivococlear medial (Warr y Guinan, 1979). Las fibras de haz olivococlear lateral inervan a las fibras aferentes del nervio auditivo y liberan diversos neurotransmisores como acetilcolina, dopamina y opioides. Las fibras del haz olivococlear medial inervan a las células ciliadas externas y su principal neurotransmisor es acetilcolina (Guinan 2006) .

La acetilcolina liberada desde los terminales presinápticos de las fibras Olivococlear medial actúan sobre receptores nicotínicos alfa9/alfa10 presentes en las células ciliadas externas, la activación de este receptor permite el ingreso de  $Ca^{+2}$  a las células ciliadas externas promoviendo la subsecuente activación de canales de potasio SK2 que lleva a la posterior hiperpolarización de las células ciliadas externas (Elgoyhen y Katz, 2012).

### Fisiología del Sistema Eferente Auditivo

Es sabido que las neuronas olivococleares responden al sonido a tasas de disparo regulares y que su activación produce un efecto inhibitorio en la respuesta coclear (Robles y Délano, 2008).

La estimulación eléctrica de las fibras Olivococlear medial produce una reducción de la amplitud de potencial de acción compuesto del nervio auditivo (Galambos, 1956), potencial que refleja la actividad evocada sincrónica de las fibras del nervio auditivo, y aumenta la amplitud del potencial Microfónico Coclear (Fex, 1959), potencial extracelular generado principalmente por las células ciliadas externas de la cóclea. Esta reducción de potencial de acción compuesto y potencial Microfónico coclear desaparece tras una inyección sistémica de estricnina, bloqueador de la función eferente (Desmedt y Monaco, 1961). Esto muestra que el sistema eferente, a través de la actividad de las células ciliadas externas, puede regular la

sintonización y sensibilidad de la mecánica coclear y respuesta de las células ciliadas internas (Dallos, 1992; Robles y Ruggero, 2001).

El rol que cumple el sistema eferente auditivo en la fisiología y conducta animal es aun materia de estudio, sin embargo se han propuesto distintas funciones basadas en evidencia experimental: i) Antimascaramiento de estímulos auditivos en ambientes con ruido de fondo (Kawase y Liberman, 1993); ii) Prevención de la pérdida auditiva por exposición a sonidos de alta intensidad (Maison y Liberman, 2000); iii) Modular la sensibilidad coclear para filtrar tonos desatendidos en tareas auditivas o en tareas que requieren la atención selectiva a los estímulos de otras modalidades sensoriales (Oatman, 1971; Délano y cols., 2007); iv) Posible acción en el balance de sensibilidad interaural (Darrow y cols., 2006); v) Modulación de las respuestas auditivas aferentes durante los estados de sueño y vigilia (Velluti y cols., 1989).

### 3.3. Ratón KO $\alpha 9$

Con el propósito de proporcionar una herramienta para profundizar el estudio del rol del sistema eferente auditivo en la fisiología y conducta animal, en 1999 Douglas Vetter y colegas elaboran un modelo animal murino, un ratón, el que se ha manipulado genéticamente de manera tal que el gen que codifica la subunidad  $\alpha 9$  del receptor nicotínico presente en la sinapsis haz olivococlear medial – células ciliadas externas está incompleto, eliminándose funcionalmente este receptor.

#### 3.3.1. Descripción del modelo Ratón KO $\alpha 9$

Las subunidades  $\alpha 9$  del receptor nicotínico se ensamblan con subunidades  $\alpha 10$  para formar el receptor que media la transmisión sináptica entre las fibras olivo coclear medial y las células ciliadas externas (Elgoyhen 2001, Vetter 2007). Además la subunidad  $\alpha 9$  está presente en células ciliadas vestibulares de tipo II de ratas (Kong et al., 2006) Otros sitios de expresión incluyen piel, epitelio nasal, pars tuberalis de la glándula pituitaria, corazón y ganglios de la raíz dorsal en rata, urotelio y placenta en rata y humano (Terreros y cols., 2016), y una variedad de células inmunes (véase McIntosh y cols., 2009). Sin embargo, según lo informado

por Elgoyhen y cols. (1994) y confirmado por la búsqueda de Allen Brain Atlas (2012),  $\alpha 9$  no se expresa en el cerebro (Terreros y cols., 2016).

Los ratones KO  $\alpha 9$  no muestran un fenotipo distinto a los controles en la observación externa, además no tienen dificultades evidentes con el equilibrio o el movimiento. Al examinar secciones de cóclea de los ratones KO  $\alpha 9$ , no se observan anomalías estructurales en el ducto coclear, incluyendo las células ciliadas, células de soporte y el ganglio espiral. La neuroanatomía de los ratones KO  $\alpha 9$  es igual a la de los ratones control con la excepción de las terminaciones eferentes en las células ciliadas externas, en los ratones KO  $\alpha 9$  hay menor número de terminaciones y de mayor tamaño.

Las respuesta cocleares (emisiones otoacústicas y potencial de acción compuesto) en ausencia de estimulación de las fibras cruzadas OC en ratones KO  $\alpha 9$  son normales en comparación a los controles. Sin embargo, al estimular eléctricamente las fibras cruzadas olivococleares en el piso del IV ventrículo, los ratones KO  $\alpha 9$  aparentemente no presentaron el efecto olivococlear observado en los ratones control, esto es, disminución de la amplitud de emisiones otoacústicas por producto de distorsión y Potencial de acción compuesto (Vetter y cols., 1999).

Se han realizado varios intentos para identificar déficits funcionales en el knockout de  $\alpha 9$ , lo que podría proporcionar pistas sobre las funciones del sistema eferente. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los ratones knockout  $\alpha 9$  y control en los umbrales de comportamiento para la detección de tono puro y la discriminación de intensidad bajo condiciones de silencio y en presencia de ruido (Prosen, CA y cols., 2000, May, BJ y cols., 2002).

### 3.3.2. Líneas de Investigación que utilizan el modelo KO $\alpha 9$

Como se comentó más arriba, el modelo KO  $\alpha 9$  se generó para el estudio del Sistema Eferente Auditivo, tanto su fisiología (Aedo y cols., 2016) como los fenómenos conductuales (Terreros y cols., 2016) asociados a este, sin embargo actualmente se utiliza en estudios tanto del Sistema Vestibular (Eron y cols., 2015; Kong y cols., 2006; Tu y cols., 2017), desarrollo



de Sistema Auditivo Aferente (Clause y cols., 2014) y Dolor (Mohammadi y cols., 2014; Mohammadi y cols., 2017).

Dados los antecedentes arrojados por la literatura más reciente del modelo  $\alpha$ 9KO, cabe preguntarse por el sueño de este animal, si es que tendrá el mismo ciclo de sueño – vigilia que su contraparte silvestre, si la distribución de los episodios de vigilia, sueño NoMOR y sueño MOR durante el día y la noche será igual en ambos genotipos y si la homeostasis del sueño se ajustará de igual manera en ambos casos. Todo esto porque el ratón  $\alpha$ 9KO es un modelo utilizado en estudios conductuales donde el aprendizaje de tareas, y su consolidación durante el sueño, es un factor a tener en cuenta, a demás de ser un excelente modelo para estudiar cómo variaciones en las distintas modalidades sensoriales pueden generar cambios en la estructura del sueño, como un fenómeno integrativo, y en particular poder profundizar el estudio del rol del Sistema Eferente Auditivo en el umbral auditivo de despertar.

Este trabajo busca aportar en la caracterización de este modelo animal, específicamente describir los aspectos generales del Ciclo Sueño-Vigilia de este modelo, la modulación circadiana de la vigilia, sueño NoMOR y sueño MOR, cómo se comporta en presencia o ausencia de claves fóticas y cómo se regula homeostáticamente bajo distintas condiciones de iluminación. A demás, un aspecto metodológico abarcado por este trabajo es el uso de herramientas computacionales para el diagnóstico de estados de sueño al registro polisomnográfico.

## 4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 4.1. HIPÓTESIS

El ratón KO para el receptor nicotínico alfa9 y el ratón control, ambos de cepa CBA/Sv129, tienen diferencias en la organización del ciclo sueño-vigilia.

### 4.2. OBJETIVOS

#### Objetivo General

Estudiar la organización temporal de los estados de sueño de los ratones KO alfa9 y control. Con esto se busca aportar conocimiento en el entendimiento de cómo modificaciones en el Sistema Auditivo puede generar alteraciones en la estructura del sueño.

#### Objetivos Específicos

##### Objetivos Metodológicos

Validar diagnóstico automático de estados de sueño del ratón. La validación del diagnóstico automático desarrollado en el Laboratorio va a permitir disminuir las horas de trabajo destinadas a la etapificación (designar la etapa del ciclo sueño-vigilia correspondiente a cada ventana de tiempo del registro polisomnográfico).

##### Objetivos Experimentales

Caracterizar la organización temporal de los estados de sueño de los ratones KO alfa9 y control bajo ciclo de luz oscuridad 12:12.

Caracterizar la organización temporal de los estados de sueño de los ratones KO alfa9 y control bajo protocolo de iluminación fotoperiodo esqueleto. El estudio del

Ciclo sueño-vigilia en estas condiciones de iluminación permite estudiar la organización de los estados de sueño sin la influencia directa de la luz pero sin perder el ritmo circadiano de 24 horas.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1. Sujetos

Se utilizaron 16 ratones (20-35 g) control y 16 ratones knock out para el receptor de acetilcolina  $\alpha$ -9 nicotínico (cepa híbrida CBA/Sv129, obtenida a través de proyecto colaborativo con Dra. Ana Belén Elgoyhen, Universidad de Buenos Aires, Argentina) de entre 2 a 6 meses de edad, todos machos.

### 5.2. Polisomnografía

#### 5.2.1. Etapa quirúrgica

Bajo anestesia profunda ( 50mg/kg de peso corporal de ketamina y 10mg/kg de peso corporal de xilacina), se realizó una incisión superficial de piel, en la línea media y dirección rostro-caudal, desde la región mastoidea hasta 1 cm posterior al hueso cefálico (longitud aproximada de 0,5 a 1,0 cm). Luego se realizó una segunda incisión en la línea media y en dirección fronto-occipital, en los planos aponeuróticos y musculares de la cabeza, para permitir acceso directo a la calota del animal e identificar las fontanelas Lambda y Bregma. El periostio de las regiones ósea expuesto se removió mediante la aplicación de agua oxigenada 18%, cuidando no dañar la musculatura circundante.

La calota se perforó hasta visualizar la duramadre, mediante una broca estereotáxica seguido de la inserción de dos tornillos utilizados como electrodos de registro electroencefalográfico, el electrodo frontal se insertó 1,7 mm lateral de la línea media y 1,5mm anterior a Bregma, el electrodo parietal se insertó 1,7 mm lateral a la línea media y 1,0mm anterior a Lambda. Posteriormente, mediante una aguja fina, se insertaron cuatro electrodos en los músculos de la nuca para registro electromiográfico.

### 5.2.2. Etapa post-quirúrgica

Se dieron siete días de recuperación post-quirúrgica, acompañada de terapia antibiótica y antiinflamatoria de acuerdo al protocolo correspondiente. Durante este periodo, cada animal fue mantenido en una jaula individual (30 x 30 x 25 cm), en una habitación aislada de sonidos externos, bajo condiciones estables de temperatura ( $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), ciclo luz-oscuridad 12:12 y con acceso a comida y agua *ad libitum*.

### 5.2.3. Registro y adquisición de datos

Para el registro polisomnográfico cada animal, en su respectiva jaula, fue instalado en una cámara de aislamiento lumínico y sonoro de 65 x 60 x 70 cm a temperatura constante de  $25^{\circ}\text{C}$  con comida y agua *ad-libitum*. Luego se conectaron para el registro polisomnográfico mediante un cable flexible de 50 cm aproximadamente, que colgaba de un conmutador, sostenido mediante un sistema de contrabalanceo para facilitar el movimiento libre del animal.

Las señales fueron adquiridas mediante un programa que consta de 4 canales, muestreadas a 250 Hz y filtradas on-line con los siguientes pasabandas: EEG (0,3-30Hz) y EMG (30-100 Hz). Este software cuantificó los elementos detectados en épocas sucesivas de 5 segundos, permitiendo visualizarlos para diagnóstico de estados de sueño en forma manual (off-line). Luego de dos o tres días para la ambientación del animal a estas condiciones, comenzaban los días experimentales.

En la Figura 1 se presenta un diagrama del protocolo experimental utilizado.

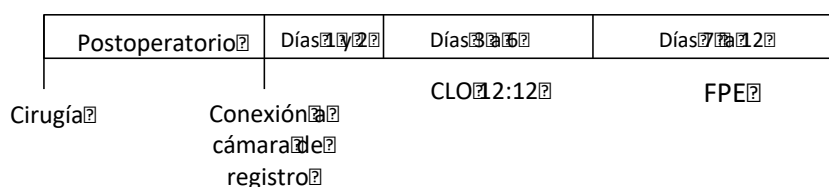


Figura 1. Protocolo Experimental. Se da inicio a la etapa experimental con la cirugía de implante de los electrodos. Luego de una semana de cuidados postoperatorios del animal, este se conecta a la cámara de registro donde permanece por dos días para acostumbrarse, luego

siguen los días de registro bajo protocolo de iluminación CLO 12:12 y finalmente pasa registro bajo condiciones de Fotoperiodo Esqueleto (FPE).

### 5.3. Protocolo de Iluminación

La organización temporal de los estados de sueño y vigilia se estudiaron bajo dos condiciones de luz, ciclo de luz:oscuridad de 12 horas en cada fase (CLO12:12) y fotoperiodo esqueleto (FPE).

Para fines metodológicos, se define la Hora Zeitgeber como la hora desde el encendido de luces, en nuestro caso, la hora Zeitgeber 0 (0 ZT) corresponde a las 8.00 de la mañana, del mismo modo la hora Zeitgeber 12 (12 ZT) corresponde a las 8.00 de la tarde.

Durante los primeros 4 días experimentales los animales estuvieron bajo protocolo CLO 12:12, donde el encendido de luz era desde las 8.00 de la mañana (ZT 0) hasta las 19.59 de la tarde, ventana de tiempo a la que nos referiremos como “Fase de Luz” y las luces se mantenían apagadas desde las 20.00 (12 ZT) hasta las 7.59 de la mañana siguiente, ventana de tiempo a la que nos referiremos como “Fase de Oscuridad”. Luego de cuatro días en estas condiciones, se daba inicio al protocolo de iluminación de Fotoperiodo Esqueleto. En esta condición los animales estaban bajo oscuridad todo el día con excepción de dos pulsos de luz de 15 minutos, a las 8.00, o sea cuando anteriormente comenzaban las horas de luz, y a las 19.45, o sea cuando estaban por finalizar las horas de luz.

La condición de iluminación CLO 12:12 permite estudiar la distribución de estados de sueño en condiciones similares a las naturales, mientras que el estudio en la condición de fotoperiodo esqueleto permite estudiar la distribución de los estados de sueño y vigilia en ausencia de la modulación de estos por claves fóticas, sin perder el ritmo circadiano.

En la Figura 2 se muestra un esquema de los protocolos de iluminación utilizados durante los días experimentales.

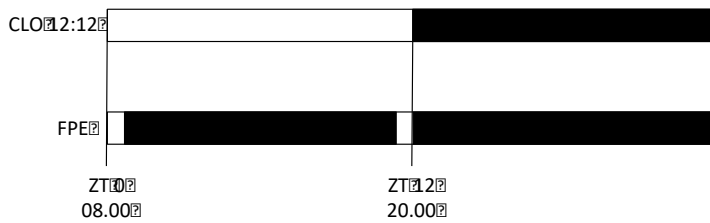


Figura 2. Protocolos de iluminación.

#### 5.4. Diagnóstico Polisomnográfico

Una vez finalizados los experimentos, se procede a realizar el diagnóstico de estados de sueño – vigilia de cada día experimental válido, esto es, días cuyo registro esté completo sin anomalías como cortes de luz o inconvenientes con el implante. Esto se realiza en dos etapas, primero se realiza el Diagnóstico automático descrito más abajo, y si el resultado de esto es satisfactorio se procede a realizar el Diagnóstico Visual de ese día para luego finalizar con la validación del Diagnóstico Automático a través del Coeficiente Kappa de Cohen.

##### 5.4.1. Diagnóstico Automático

El diagnóstico de estados de sueño vigilia computarizado se obtiene a través de una reducción dimensional del poder espectral de EEG y EMG. Para esto, se aplica una transformada de Fourier de corto tiempo, en ventanas de 2 segundos superpuestas en 75%, a los cuatro canales de registro, 3 de EEG y uno de EMG. Se obtienen tres variables para cada ventana de tiempo analizada; actividad del músculo, promedio de la actividad de las bandas delta y sigma y actividad de la banda theta. La actividad se calcula como el promedio del logaritmo del poder espectral de cada banda.

Las variables obtenidas se proyectan en un plano considerando tres direcciones de desplazamiento, donde se pueden observar agrupaciones de las variables ( o *clusters*) en torno a tres centroides. Los centroides se pueden concebir como el arquetipo de cada estado del ciclo sueño – vigilia. En la Figura 3 se muestra un ejemplo de lo antes mencionado.

Se define un perímetro alrededor de cada centroide que permite detectar la transición a cada estado.

En resumen, cada ventana de tiempo analizada se transforma en un punto del plano proyectado, donde la proximidad a alguno de los centroides determina el estado del ciclo sueño – vigilia que predomina en dicha ventana de tiempo de 5 segundos cada una.

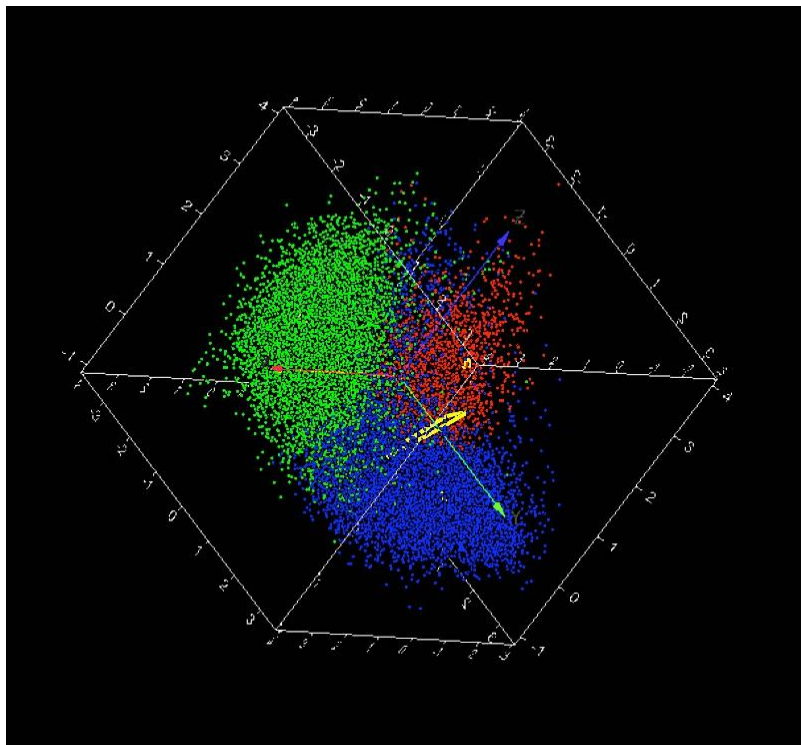


Figura 3. Gráfico de dispersión donde se proyectan todas las épocas de un día experimental. Las agrupaciones de puntos representan los estados de sueño vigilia. En colores verde, rojo y azul se representan las épocas asignadas a vigilia, sueño MOR y NoMOR, respectivamente. Las flechas representan los ejes de las variables proyectadas.



#### 5.4.2. Diagnóstico Visual

El diagnóstico de estados de sueño se realizó en épocas de 5 segundos según el predominio sostenido(>2,5 segundos) de las siguientes características polisomnográficas: vigilia, desincronización del EEG y actividad fásica EMG; sueño No MOR, actividad delta de alta amplitud (0,3-4Hz), presencia de husos de sueño (actividad sigma 11-16 Hz) y disminución del tono muscular en EMG; sueño MOR, actividad theta (5-10 Hz) regular y sostenida junto con una mayor disminución del tono muscular en comparación al sueño NoMOR.

#### 5.5. Validación Diagnóstico Automático de estados de sueño-vigilia

Una vez obtenidos los diagnósticos automático de cada día experimental, se procedió a realizar diagnóstico visual de dos intervalos de tres horas cada uno, uno durante la fase de luz y el otro durante la fase de oscuridad, por cada día experimental.

Luego se calculó el Coeficiente Kappa de Cohen entre el diagnóstico visual y el diagnóstico automático obtenido. El Coeficiente Kappa de Cohen es una medida estadística que da cuenta de la concordancia entre dos evaluadores, cuyo valor va entre 0 y 1, considerándose “bueno” cuando es mayor a 0,6.

Para realizar los análisis posteriores se utilizó el diagnóstico automático de sueño previamente validado.

En cada ratón se utilizó el promedio de dos días representativos para cada condición experimental, protocolo de iluminación 12:12 y fotoperiodo esqueleto.

#### 5.6. Análisis de Frecuencia

Se aplica a la señal EEG un filtro digital Butterworth de orden 4 de banda pasante 0.5-4 Hz (banda delta).

La señal filtrada se segmenta en épocas de 5 segundos sin traslape y se calcula la media cuadrática (RMS) de cada época. El resultado del proceso es una estimación de la amplitud promedio de delta en épocas de 5 segundos.

El análisis del poder de ondas lentas se realizó sólo para el sueño NoMOR, como indicador de la homeostasis del sueño (DeBoer, 2008). Para el análisis del poder de ondas delta se consideraron sólo los episodios de sueño NoMOR de duración igual o mayor a 24 épocas consecutivas, equivalente a 2 minutos, dado que los episodios de menor duración tienen mucha interrupción generando artefactos en el análisis espectral.

La actividad de ondas delta se expresa como z-score, valor que representa la actividad de ondas delta normalizado por el valor promedio de este de cada día experimental.

## 5.7. Análisis de Resultados

Una vez finalizado el diagnóstico de estados de sueño – vigilia, se procede a analizar las variables circadianas y homeostáticas del sueño como se describe a continuación.

### 5.7.1. Variables

Por cada día experimental de cada ratón se analizaron las siguientes variables:

- Cantidad de vigilia, de sueño NoMOR y de sueño MOR. Entendido como el número de épocas (de 5 segundos) en que pasa un ratón en cada uno de los estados cada día expresado en minutos. Estas variables se analizaron colapsando los datos en bloques de 1 hora (24 horas del día), en bloques de 12 horas (dos fases por día) y la cantidad total de cada estado por día. Los bloques de 12 horas corresponden a las fases de luz y oscuridad del día, en el caso de los días con CLO 12:12, y para los días con fotoperiodo esqueleto corresponden a los mismos bloques horarios que en los días con CLO 12:12, o sea, a las ventanas de tiempo entre las horas 0 -11 ZT y 12-23 ZT.

- Duración de episodios de vigilia, sueño NoMOR y sueño MOR. Un episodio se entiende como la ventana de tiempo ininterrumpido en que el ratón está en alguno de los estados de sueño – vigilia.
- Actividad de Ondas Delta durante el sueño NoMOR, calculado como se detalla más arriba.

### 5.7.2. Estadística

El análisis estadístico de los resultados se realizó utilizando Intercooled Stata 9.2 para Windows (StataCorp, College Station, TX).

Se realizó ANOVA mixto para cada variable y luego test-t para determinar diferencias significativas entre los grupos. El detalle de cada análisis estadístico se adjunta en las figuras de la sección Resultados.

Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina, Protocolo CBA 0684 FMUCH.

## 6. RESULTADOS

A continuación se describen los resultados obtenidos de un total de 6 ratones silvestres y 10 ratones  $\alpha 9$ KO.

### 6.1. Características del Registro Polisomnográfico

El estudio visual del registro polisomnográfico de ratones silvestres y  $\alpha 9$ KO permite notar que existen claros elementos representativos de cada estado de sueño – vigilia, como husos de sueño en la banda sigma, aumento y disminución de actividad de ondas delta en las transiciones de vigilia a sueño NoMOR y viceversa, aumento y mantención de actividad en la banda theta en el sueño MOR y actividad intensa en el registro EMG acompañado de sincronía en las bandas deltas durante la vigilia. Por otro lado no se observaron diferencias en los grafoelementos entre los ratones silvestres y  $\alpha 9$ KO.

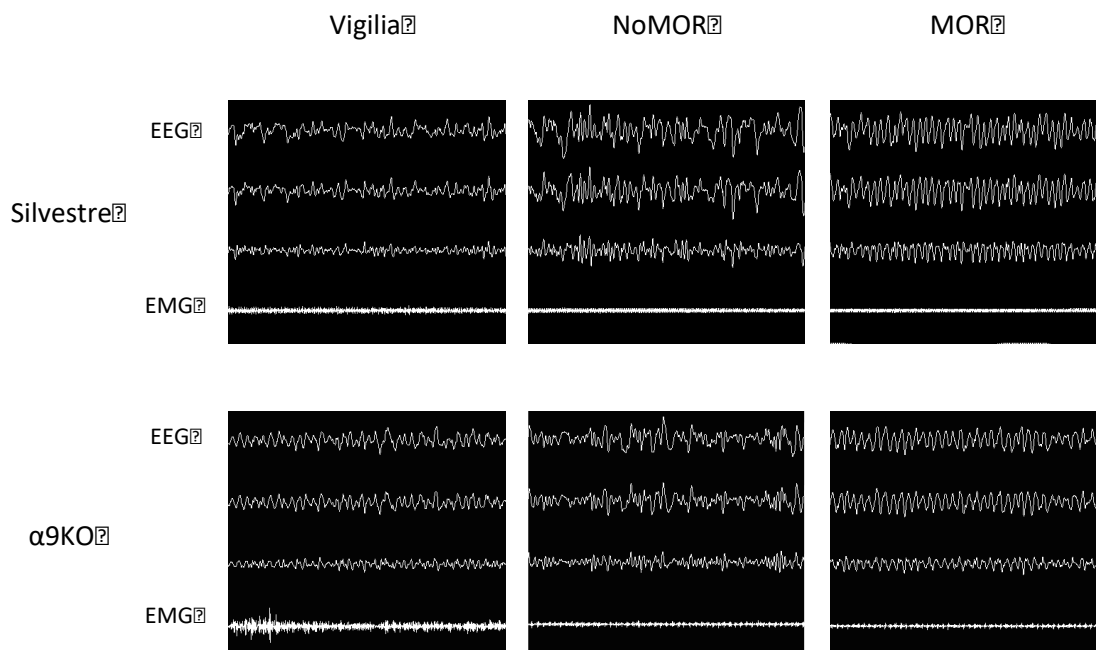


Figura 4. Registro polisomnográfico del ratón silvestre y  $\alpha 9$ KO de cepa CBA/Sv129 bajo CLO 12:12. Muestra representativa de 5 segundos de registro EEG y EMG de vigilia, sueño NoMOR y sueño MOR de un ratón silvestre y un ratón  $\alpha 9$ KO .

En la figura 4 se muestran extractos representativos del registro polisomnográfico de un ratón silvestre y un ratón  $\alpha 9$ KO, todos los registros observados fueron obtenidos durante la hora 4 ZT bajo protocolo de iluminación CLO 12:12. En esta figura se observan las características de los estados de sueño – vigilia que permiten su identificación visual en el registro. En la vigilia se observa actividad EEG sincrónica de baja amplitud acompañada de actividad en el músculo. En el sueño NoMOR se observa actividad EEG de gran amplitud, gran actividad en la banda delta, husos de sueño en la banda sigma y menor actividad en el músculo. En el sueño MOR se observa gran actividad de ondas theta y atonía muscular. Durante los días experimentales con protocolo de iluminación de Fotoperiodo Esqueleto se observaron las mismas características antes descritas, sin apreciarse diferencias en el registro con respecto a los días bajo CLO 12:12.

Observando el registro a mayor escala temporal, podemos notar que hay gran cantidad de transiciones del sueño a la vigilia y viceversa. Esto es característico del cronotipo de roedores y se puede observar en la figura 5, donde además observamos una ilustrativa correlación entre el hipnograma, el registro polisomnográfico y la actividad de ondas delta. Notar en la figura 5 que cuando el registro está en vigilia en el hipnograma, el registro polisomnográfico presenta baja amplitud de EEG e intensa actividad EMG, acompañado de una disminución en la actividad de ondas delta. Por otro lado, vemos que cuando el hipnograma indica sueño NoMOR, en el registro polisomnográfico vemos mayor amplitud en el registro EEG y muy pobre actividad EMG, destacar que la presencia de husos del sueño en la banda theta se hace imposible de ver con la escala temporal en la que está la figura, además podemos ver el claro aumento y subsecuente mantención de la actividad de ondas delta en la parte C de la figura durante el sueño NoMOR y la disminución abrupta de esta cada vez que el episodio es interrumpido por episodios de vigilia o sueño MOR. A esta escala temporal es difícil observar las características de sueño MOR dado la corta duración de sus episodios, sin embargo, podemos notar que cuando el hipnograma indica sueño MOR observamos atonía muscular en el registro EMG y una clara disminución en la actividad de ondas delta.

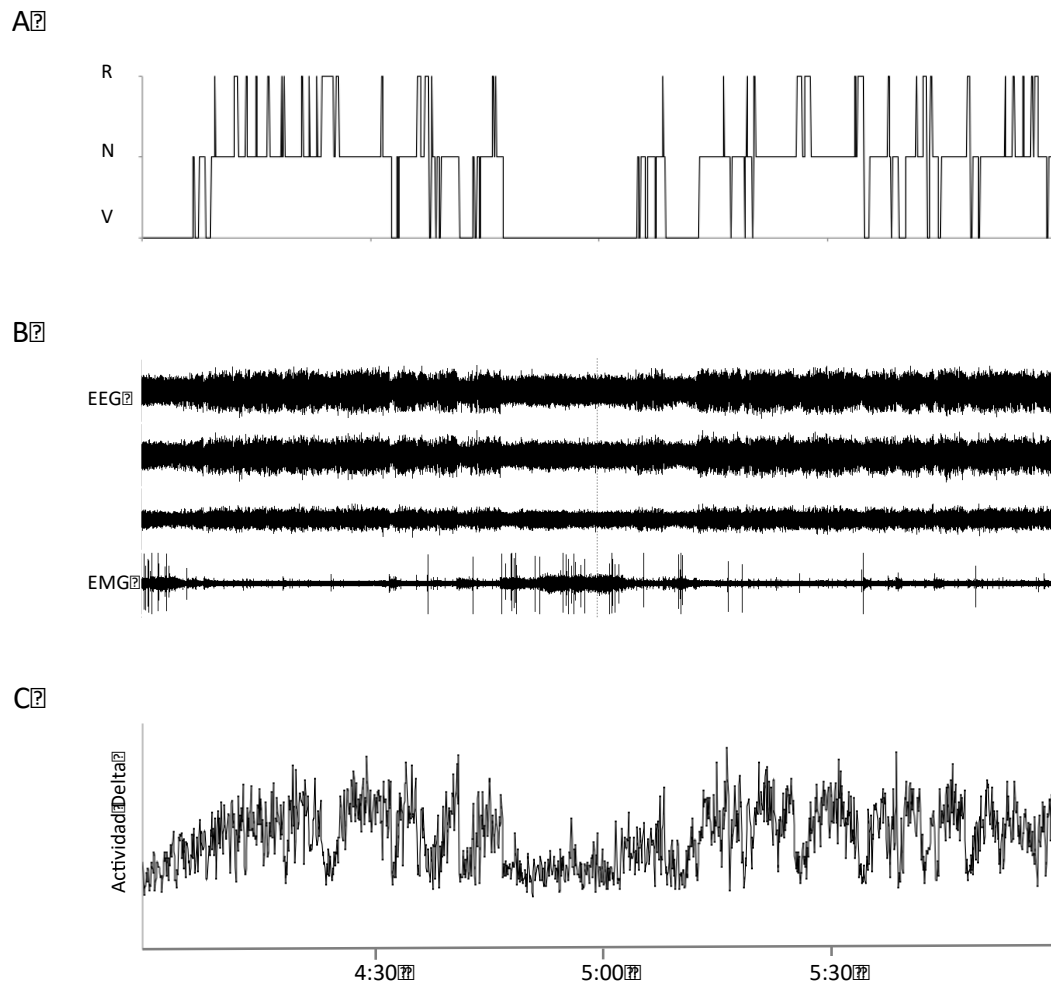


Figura 5. Muestra representativa de dos horas del ciclo sueño-vigilia de un ratón silvestre. A) Hipnograma. V: vigilia, N : Sueño NoMOR, R: Sueño MOR. B) Registro polisomnográfico. Se muestra registro EEG y EMG. C) Actividad de ondas Delta correspondiente al registro observado en B y hipnograma observado en A. La muestra observada corresponde al registro de las horas 4 y 5ZT, fase de luz.

## 6.2. Diagnóstico Automático

El análisis de señales polisomnográficas para la obtención de un diagnóstico automático de estados de sueño-vigilia se aplicó a 190 días de registro. De estos, 179 días contaban con las características de registro necesarias para dicho análisis.

En la figura 6 se muestran ejemplos de días de registro, en A se observan gráficos correspondientes a días experimentales que si obtuvieron diagnóstico automático. En B se observan dos casos distintos; a la izquierda se observa que todas las épocas fueron asignadas a sueño MOR, probablemente debido a problemas con el registro EMG, a la derecha se observa que hay un gran número de épocas asignadas a sueño NoMOR en desmedro, principalmente, de la vigilia, lo que arroja un diagnóstico errado en ambos casos.

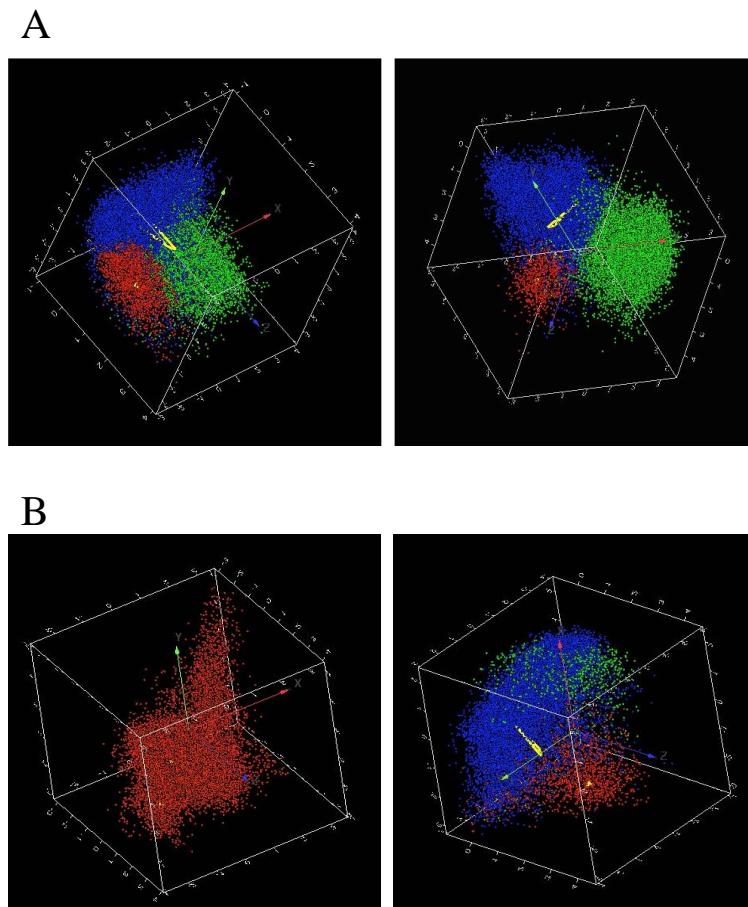


Figura 6. Gráficos de dispersión donde cada punto representa una época de 5 segundos de un día experimental completo. A, dos ejemplos de días experimentales donde ocurre agrupación de puntos o *clusters* de manera correcta, permitiendo la generación de diagnóstico automático para un subsiguiente análisis. B, dos ejemplos de días experimentales donde no ocurre una correcta agrupación de puntos como los observados en A. Los colores verde, rojo y azul representan las épocas asignadas a vigilia, sueño MOR y NoMOR, respectivamente.

### 6.3. Validación del Diagnóstico Automático de Sueño

Luego de finalizar el registro de los días experimentales, se procedió a examinarlos visualmente para ver si las condiciones de registro eran adecuadas para su posterior análisis.

Un total de 175 días experimentales fueron analizados para realizar la validación del diagnóstico automático, de los cuales un 79% arrojó valores del Coeficiente Kappa Cohen superiores a 0,6, considerados como valores “buenos” o “muy bueno”.

De 19 ratones utilizados en la etapa experimental, sólo 1 obtuvo valores de Coeficiente Kappa Cohen bajo 0,6 en todos los días de registro.

Se observó que una de las fuentes de discrepancia recurrentes entre el diagnóstico automatizado y realizado visualmente era la clasificación errónea de vigilia en vez de sueño MOR en el diagnóstico automático.

### 6.4. Organización Temporal de Estados de Sueño y Vigilia

Luego de obtener el diagnóstico de todos los días experimentales a utilizar, se procedió a analizar la distribución temporal de los estados de sueño – vigilia, agrupando los datos en bloques de 1 hora ( figuras 7 y 8) y en totales diarios y valores por fase (Tabla 1).

En la Tabla 1 se resumen los valores totales promedio de vigilia, sueño NoMOR y sueño MOR de ratones silvestres y  $\alpha$ 9KO para los días experimentales con protocolo de iluminación CLO 12:12 y fotoperiodo esqueleto, así como también el valor promedio de cada estado para la fase de luz y oscuridad. No hay diferencias significativas en las cantidades de vigilia, sueño NoMOR y sueño MOR entre ratones silvestres y  $\alpha$ 9KO, así como tampoco existen diferencias al comparar días experimentales con distinto protocolo de iluminación de un mismo grupo de ratones, silvestres o  $\alpha$ 9KO. Las diferencias significativas las observamos al comparar entre la fase de luz y fase de oscuridad, para ambos genotipos, donde es mayor la cantidad de tiempo destinada a sueño NoMOR y sueño MOR durante la fase de luz y mayor la cantidad de tiempo destinada a la vigilia en la fase de oscuridad. Estas diferencias presentes en



los registro bajo CLO 12:12 se mantienen cuando se pasa a protocolo de iluminación Fotoperiodo Esqueleto.

Silvestre														
	CLO 12:12					FPE								
	Total	Fase Luz		Fase Oscuridad		Total	Fase Luz		Fase Oscuridad					
	Prom	ESM	Prom	ESM	Prom	ESM	Prom	ESM	Prom	ESM				
Vigilia	45,7	1,8	39,9	2,3	51,5	2,5	*	48,3	1,4	43,2	1,6	53,3	2,2	*
Sueño NoMOR	46,3	2,1	50,8	2,9	41,8	2,4	*	44,6	1,7	48,2	1,7	40,9	2,2	*
Sueño MOR	8,0	0,7	9,3	0,8	6,7	0,7	*	7,1	0,5	8,5	0,6	5,7	0,7	*

$\alpha$ 9KO														
	CLO 12:12					FPE								
	Total	Fase Luz		Fase Oscuridad		Total	Fase Luz		Fase Oscuridad					
	Prom	ESM	Prom	ESM	Prom	ESM	Prom	ESM	Prom	ESM				
Vigilia	45,0	1,5	37,3	1,5	52,7	2,8	*	43,1	1,5	37,8	1,2	48,3	2,2	*
Sueño NoMOR	48,2	1,4	54,7	1,2	41,8	2,6	*	49,8	1,7	53,6	1,4	46,1	2,2	*
Sueño MOR	6,8	0,7	8,0	0,5	5,5	1,0	*	7,1	0,7	8,6	0,9	5,6	0,7	*

Tabla 1. Tiempo transcurrido en cada uno de los estados de sueño vigilia durante el día, la fase de luz y fase de oscuridad. Los valores corresponden al porcentaje del total de tiempo registrado bajo Ciclo de Luz-Oscuridad 12:12 y bajo Fotoperiodo Esqueleto en ambos genotipos, expresado como promedio y error estándar de la media asociado. Valores obtenidos de 6 ratones silvestres y 10 ratones  $\alpha$ 9KO. \*Fase de luz distinta a Fase de Oscuridad,  $p < 0,05$  (test-t pareado).

Luego de analizar la distribución de los estados del ciclo sueño-vigilia según fases y valores totales diarios, se procede a analizar la modulación diaria de estos, agrupando los datos en bloques de una hora para observar la variación que presentan a lo largo del día.

En las figuras 7 y 8 se observa la modulación diaria de la vigilia, el sueño NoMOR y sueño MOR de ratones silvestres (círculos cian) y  $\alpha$ 9KO (círculos rojos) bajo CLO 12:12 y fotoperiodo esqueleto, respectivamente.

En ambas figuras podemos ver que hay una clara modulación diaria, con preferencia al dormir durante la fase de luz y mayor actividad en la fase de luz, notar que esta modulación no se pierde al pasar a protocolo FPE.

Bajo CLO 12:12 se observan diferencias significativas entre ratones silvestre y  $\alpha$ 9KO en los tres estados de sueño-vigilia. En la vigilia hay diferencias significativas en la hora 10 ZT, en el sueño NoMOR se observan diferencias significativas en las horas 10 y 11 ZT, en el sueño MOR se observan diferencias significativas en la hora 2 ZT. Notar que todas las diferencias se encuentran en horas correspondientes a la fase de luz.

Bajo FPE se observan diferencias significativas entre ratones silvestre y  $\alpha$ 9KO en los tres estados de sueño-vigilia. En la vigilia hay diferencias significativas en las horas 9, 10, 11, 12 y 14 ZT, en el sueño NoMOR se observan diferencias significativas en las horas 9, 11, 12, 14 y 23 ZT, en el sueño MOR se observan diferencias significativas en la hora 10 ZT. Bajo este protocolo, las diferencias encontradas entre ambos grupos de ratones no se encuentran todas en horas correspondientes a fase de luz u oscuridad, pero si se puede observar una tendencia a que las diferencias se centran a la hora 12 ZT, que corresponde al cambio de fase de luz – fase de oscuridad.

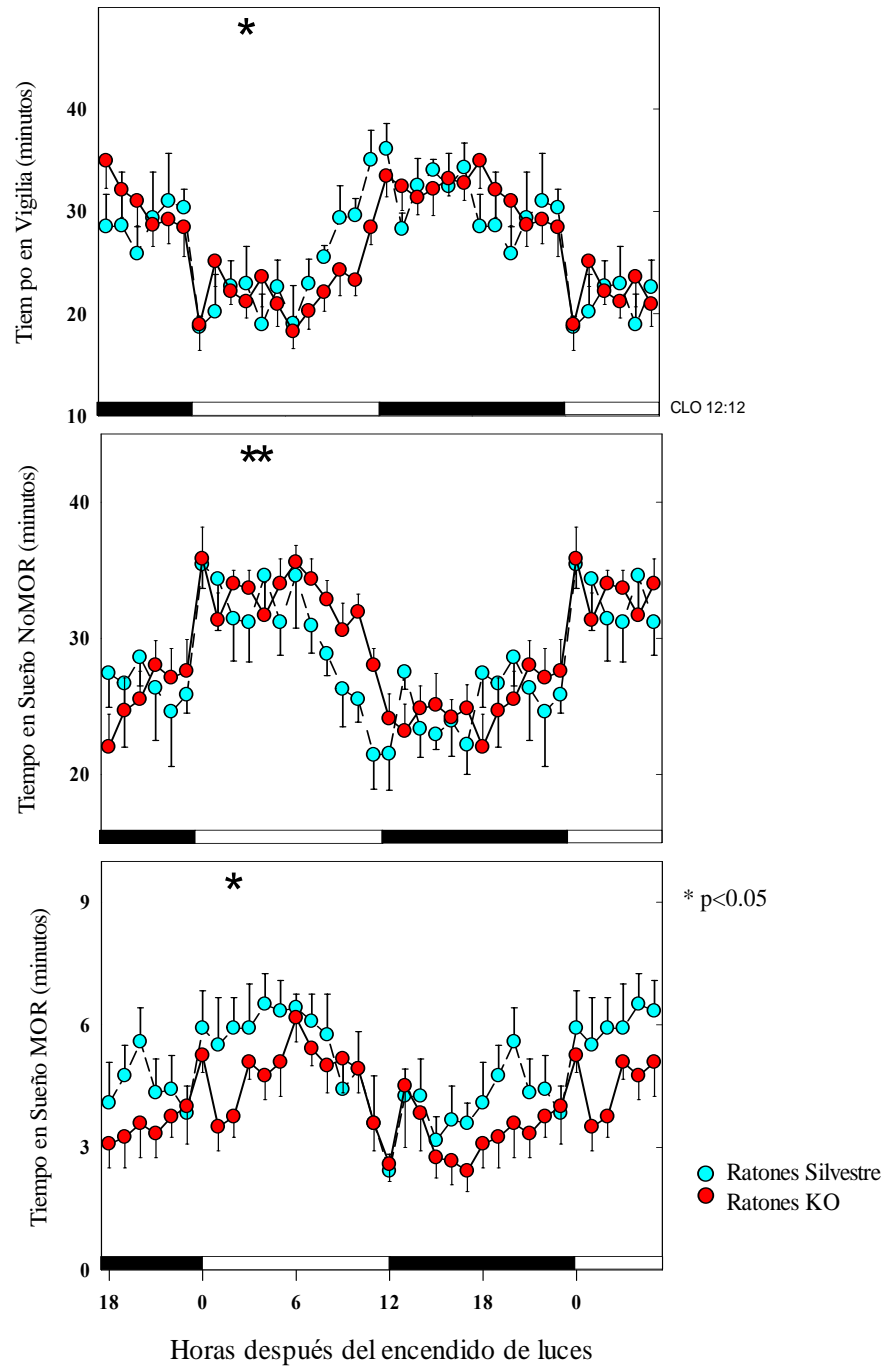


Figura 7. Perfil diario de los estados de sueño y vigilia en ratones silvestres y  $\alpha 9$ KO bajo Ciclo de Luz-Oscuridad 12:12. El eje de las ordenadas corresponde al tiempo que transcurre en vigilia, sueño NoMOR o sueño MOR, expresado en minutos. El eje de las abscisas corresponde a las horas desde el encendido de luces, donde la hora 0 corresponde a la hora 0

ZT, o sea, las 8.00 de la mañana. Los valores se expresan como promedio por cada hora ( $\pm$  ESM). Los círculos cian representan a ratones silvestres (n=6) , los círculos rojos representan a  $\alpha$ 9KO (n=10). Los asteriscos en la parte superior de cada recuadro indican diferencias significativas entre ratón silvestre y  $\alpha$ 9KO (test de t no pareado de dos colas) después de ANOVA mixto significativo para interacción de factores “Genotipo” y “Hora Zeitgeber”. En la parte inferior de cada recuadro se muestra un esquema del protocolo de iluminación, las barras blancas indican el encendido de luces entre las horas 0 y 11 ZT y las barras negras el apagado de luces entre las horas 12 y 23 ZT.

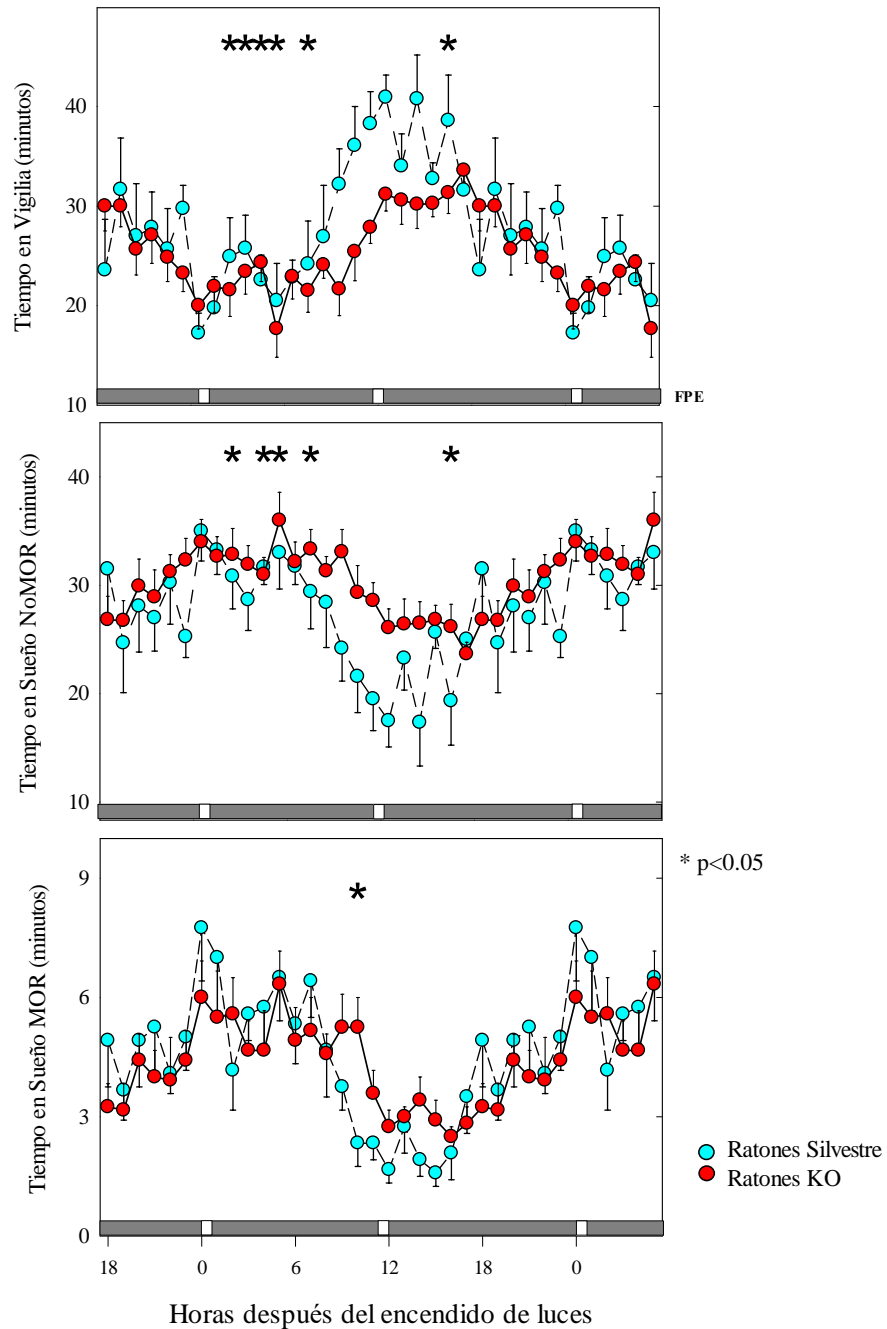


Figura 8. Perfil diario de los estados de sueño y vigilia en ratones silvestres y  $\alpha 9$ KO bajo protocolo de iluminación Fotoperiodo Esqueleto. El eje de las ordenadas corresponde al tiempo que transcurre en vigilia, sueño NoMOR o sueño MOR, expresado en minutos. El eje de las abscisas corresponde a las horas desde el encendido de luces, donde la hora 0 corresponde a la hora 0 ZT, o sea, las 8.00 de la mañana. Los valores expresados en minutos

corresponde al promedio por cada hora ( $\pm$  ESM). Los círculos cian representan a ratones silvestres (n=6) , los círculos rojos representan a  $\alpha 9$ KO (n=10). Los asteriscos en la parte superior de cada recuadro indican diferencias significativas entre ratón silvestre y  $\alpha 9$ KO (test de t no pareado de dos colas) después de ANOVA mixto significativo para interacción de factores “Genotipo” y “Hora Zeitgeber”. En la parte inferior de cada recuadro se muestra un esquema del protocolo de iluminación, las barras grises representan la oscuridad constante excepto por dos pulsos de luz de 15 minutos cada uno, representados por los cuadrados blancos.

### 6.5. Arquitectura del sueño

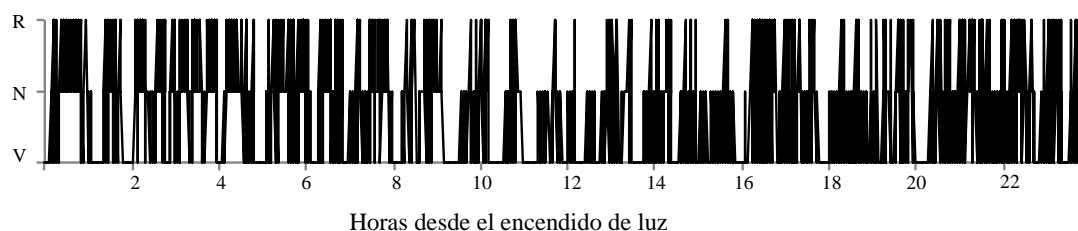
Luego de analizar el perfil diario de los estados de sueño –vigilia bajo los dos protocolos de iluminación en ambos grupos de ratones, se procedió a estudiar la arquitectura del sueño de los ratones silvestres y  $\alpha 9$ KO. El estudio de la arquitectura del sueño nos permite comprender cómo la falta del receptor nicotínico  $\alpha 9$  puede o no influir en la duración de los episodio de los estados de sueño y vigilia, y, por otra parte, cómo la ausencia de claves fóticas, protocolo FPE, puede o no influir en la duración de episodios. Para esto se observó el hipnograma de un día completo de registro y se analizó la duración de los episodios de vigilia, sueño NoMOR y sueño MOR en ambos grupos estudiados bajo los dos protocolos utilizados.

En la figura 9 se muestra, en A, un hipnograma de un día completo de registro de un ratón normal representativo. Se puede apreciar que a pesar de que hay preferencia por la vigilia durante la fase de oscuridad y preferencia por el sueño durante la fase de luz (Tabla 1), en el hipnograma vemos que hay gran alternancia entre vigilia, sueño NoMOR y sueño MOR, haciendo que no se observen largos episodio de sueño o vigilia sin interrupciones, siendo esto característico de los animales con sueño polifásico.

En la parte B de la figura 9 se muestra la comparación de la duración de episodios de vigilia, sueño NoMOR y sueño MOR de ambos grupos de ratones bajo protocolo de iluminación CLO 12:12 y FPE, agrupando los datos en fase de luz y fase de oscuridad. Podemos ver que no se encontraron diferencias significativas en la duración de los episodios

de vigilia, mientras que en sueño NoMOR y sueño MOR si hay diferencias reportadas. La duración de episodios de sueño NoMOR es menor, en ambos grupos, bajo ambos protocolos y tanto en fase de luz como en fase de oscuridad, en animales silvestre que en ratones  $\alpha 9$ KO. En el caso del sueño MOR, se reporta menor duración de los episodios en ratones silvestres bajo protocolo CLO 12:12, en ambas fases, y en fase de luz bajo protocolo FPE, mientras que en fase de oscuridad de este último no se encontraron diferencias significativas.

A



B

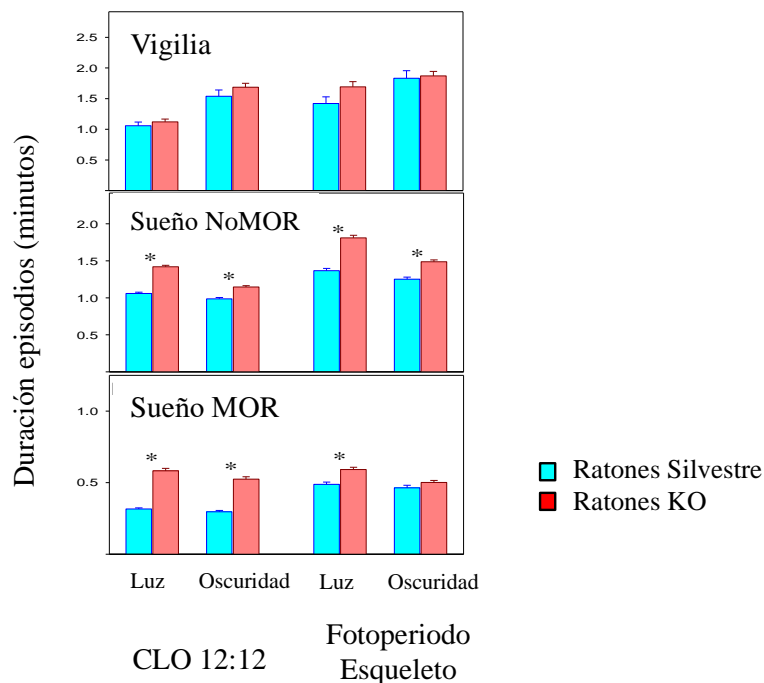


Figura 9. Arquitectura del sueño. A) Hipnograma de un día completo de registro de un ratón representativo, los datos observados corresponden a 17280 épocas de 5 segundos. El eje de las

ordenadas indica el estado del ciclo sueño – vigilia, donde V: vigilia, N : Sueño NoMOR, R: Sueño MOR. B) Comparación de la duración de episodios (promedio  $\pm$  ESM) de vigilia, sueño NoMOR y sueño MOR, de ratones silvestres (cian) y  $\alpha$ 9KO (rojo) bajo ambos protocolos de iluminación. El eje de las ordenadas corresponde a la duración de los episodios de vigilia, sueño NoMOR y sueño MOR, cada recuadro con las escala que más le acomoda dado la duración promedio en cada caso. En el eje de las abscisas se indica la fase del día, fase de luz (“luz”) o fase de oscuridad (“oscuridad”) de cada protocolo en que se está realizando la comparación. Para esta figura se utilizaron los resultados de 6 ratones silvestres y 10 ratones  $\alpha$ 9KO. Los asteriscos indican diferencias significativas entre ratones silvestres y  $\alpha$ 9KO (test-t  $p < 0,05$ ).

#### 6.6. Análisis de Poder Espectral de Ondas Delta

La última etapa del análisis de datos fue calcular la Actividad de ondas Delta en el sueño NoMOR, utilizado como indicador de la regulación homeostática del sueño. Para esto se estimó la actividad de ondas delta como valor normalizado por el promedio diario (z-score), en bloques de dos horas.

En la figura 10 se muestran las curvas diarias de Actividad de Ondas Delta de ratones silvestres y  $\alpha$ 9KO, en los dos protocolos de iluminación utilizados. Para el análisis estadístico se consideraron sólo los episodio de sueño NoMOR consolidados, o sea, aquellos mayores a 2 minutos.

La variación diaria de actividad de ondas delta difiere entre ambos grupos de animales. Bajo el protocolo de CLO 12:12 hay una mayor densidad de ondas delta en ratones  $\alpha$ 9KO en la primera parte de la fase de luz, mientras que esto se revierte en la fase de oscuridad, donde es mayor en el caso de los ratones silvestres. Estas diferencias se mantienen cuando se realiza la comparación bajo FPE.



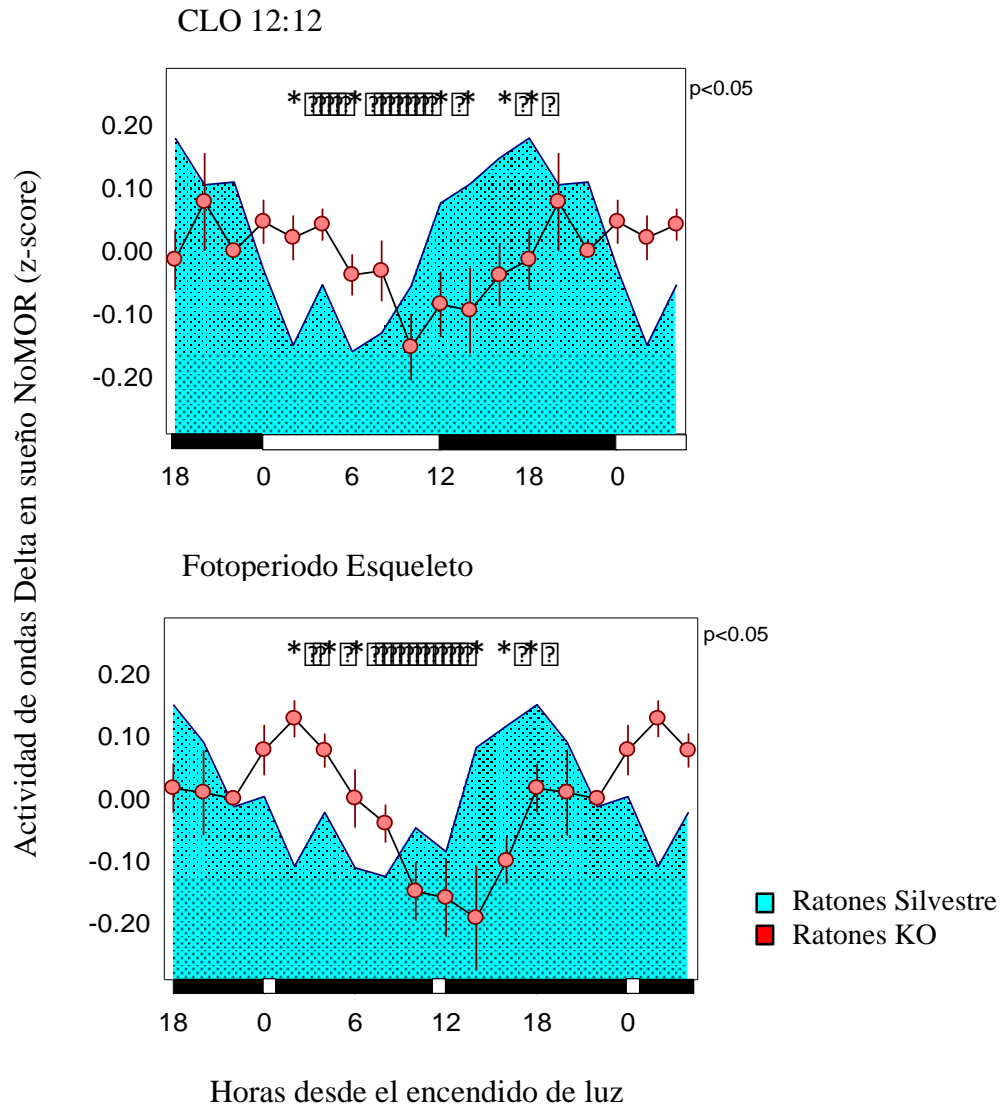


Figura 10. Actividad de ondas Deltas en sueño NoMOR. Se muestra la actividad de Ondas Delta durante el sueño NoMOR, expresado como valores promedio de z-score ( $\pm$  ESM), de ratones silvestres (áreas color cian) y  $\alpha$ 9KO (círculos rojos) bajo protocolo de iluminación CLO 12:12 y fotoperiodo esqueleto agrupados en bloques de dos horas. Estos resultados se obtuvieron del promedio de 6 ratones silvestres y 10 ratones  $\alpha$ 9KO. En el eje de las abscisas se indican las horas transcurridas desde el encendido de la luz. En la parte inferior de cada gráfico se representan los protocolos de iluminación. Los cuadrados en la parte superior de cada gráfico expresa la diferencia significativa entre ratones silvestres y  $\alpha$ 9KO ( $p < 0,05$ , test-t

no pareado de dos colas) después de un ANOVA mixto significativo para la interacción entre los factores “genotipo” y “hora zeitgeber”.

## 7. DISCUSIÓN

Dados los resultados anteriormente expuestos, se aprueba la hipótesis “El ratón KO para el receptor nicotínico alfa9 y el ratón control, ambos de cepa CBA/Sv129, tienen diferencias en la organización del ciclo sueño-vigilia”, pues hemos demostrado que existen diferencias en la modulación circadiana (figuras 7 y 8), en la duración de episodios (figura 9) y en la actividad de ondas delta durante el sueño NoMOR (figura 10).

En el estudio realizado se utilizó registro polisomnográfico utilizando sólo dos componentes, EEG y EMG, dado en parte por el tamaño del animal como por la simplificación de la cirugía en la que son implantados los electrodos. A pesar de esto, el registro es claro en sus grafoelementos, se pueden distinguir las características de los estados de sueño y vigilia como husos del sueño, aumento y disminución de la actividad de ondas delta, aumento y disminución de ondas theta, por lo que la etapificación de estados resulta, en gran parte del registro, inequívoca.

El Diagnóstico Automático es una herramienta que permite disminuir considerablemente las horas de trabajo en la etapificación de estados sueño-vigilia visualmente, sin embargo se debe ser cuidadoso con el uso de esta ya en el registro se pueden generar artefactos que hagan que se el computador asigne estados erróneos, como se muestra en la figura 6. Es por esto que se hace necesario evaluar visualmente cada día de registro, y así asegurar que el registro es consistente, antes de realizar el Diagnóstico Automático, además de realizar la subsecuente validación visual del Diagnóstico Automático a través de herramientas estadísticas como el Coeficiente Kappa de Cohen utilizado en este trabajo.

El tiempo diario destinado a cada estado no difiere entre ambos genotipos, y esto se mantiene al pasar de un protocolo de iluminación al otro, exhibiéndose, en ambos grupos, una clara preferencia por la vigilia durante la fase de oscuridad y por el sueño durante la fase de luz.

La modulación circadiana observada en ambos genotipos es consistente con el cronotipo nocturno típico de los ratones, así como también de característica polifásica y de

episodios muy cortos (Figura 9), sin embargo los ratones  $\alpha 9$ KO exhiben mayor consolidación de los episodios de sueño NoMOR (Figura 9).

Es interesante notar que el perfil temporal de actividad de ondas delta normalizado durante el sueño NoMOR es diferente para ratones silvestres y  $\alpha 9$ KO, en ambos protocolos de iluminación utilizados (Figura 10). La actividad de ondas delta durante el sueño NoMOR de los ratones  $\alpha 9$ KO tiene valores mayores durante la fase de luz, esto en ambos protocolos, mientras que los ratones silvestres muestran valores superiores durante la fase de oscuridad. Dado que el perfil temporal observado bajo ambos protocolos de iluminación es similar, no es posible concluir si es que el cambio de iluminación afecta la homeostasis del sueño del ratón. Para poder responder esta interrogante podrían realizarse experimentos de privación de sueño total y privación selectiva de sueño NoMOR.

La comparación de ambos grupos bajo CLO 12:12 nos permite reflexionar sobre el efecto de la falta de la subunidad nicotínica  $\alpha 9/\alpha 10$  en la cóclea sobre el sueño en condiciones ambientales neutras. Como se comenta en la sección introductoria, los sistemas sensoriales son capaces de modificar la configuración del Sistema Nervioso Central, de forma tal que la carencia de un receptor periférico es capaz de alterar la distribución de los estados de sueño. En la Figura 7 se observan diferencias entre los ratones control y los modificados genéticamente, a pesar de que el registro se realiza bajo condiciones iguales de aislación acústica, iluminación constante durante las horas de luz, temperatura constante y agua y comida a libre demanda, en ambos grupos. A pesar de no haber factores externos que interrumpen el sueño de los ratones en registro, la falta de este receptor genera diferencias en el sueño. Esto último se puede explicar dado que se cree que es el Sistema Eferente Auditivo el responsable de modificar la actividad del Sistema Aferente Auditivo durante el sueño. Al estar ausente la subunidad  $\alpha 9$  en la sinápsis Olivococlear-medial, los ratones  $\alpha 9$ KO serían carentes de las variaciones de potenciales cocleares descritas por Velluti y cols.,(1989), lo que podría estar ocasionando las diferencias en la distribución de vigilia, sueño NoMOR y sueño MOR durante las horas de luz (Figura 7) y las diferencias en la duración de episodios de sueño NoMOR y sueño MOR (Figura 9).

El uso de dos protocolos de iluminación, CLO 12:12 y FPE, permitió estudiar el efecto de la luz sobre las variables analizadas, y analizar de esta forma, el efecto del enmascaramiento por luz sobre el ratón  $\alpha 9$ KO. En las figuras 7 y 8 podemos ver que hay mayor cantidad de vigilia y menor de sueño NoMOR en el ratón  $\alpha 9$ KO en las horas cercanas al cambio de fase de luz a fase de oscuridad, y que esta diferencia se hace mayor bajo FPE. Smith et al. (2014) reportaron, por primera vez, la presencia del receptor  $\alpha 9$  en retina de ratones, lo que permitiría explicar porqué bajo distintos protocolos de iluminación el ratón  $\alpha 9$ KO exhibe las diferencias anteriormente descritas.

## 8. CONCLUSIÓN

- El Diagnóstico Automático de estados de sueño y vigilia desarrollado en el Laboratorio de Cronobiología y Sueño se puede utilizar para la etapificación en ratones de cepa CBA/Sv129.
- A pesar de que la cantidad total diaria de vigilia, sueño NoMOR y sueño MOR es la misma en ratones control y  $\alpha 9$ KO, la distribución durante el día y la duración de los episodios es distinta.
- Las variaciones en la organización de los estados de sueño y vigilia y duración de episodios bajo ambos protocolos de iluminación se pueden explicar por efectos del Sistema Eferente Auditivo sobre las configuraciones del sueño y por la presencia de la subunidad  $\alpha 9$  en retina.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

Aedo, C., Terreros, G., León, A., & Delano, P. H. (2016). The Corticofugal Effects of Auditory Cortex Microstimulation on Auditory Nerve and Superior Olivary Complex Responses Are Mediated via Alpha-9 Nicotinic Receptor Subunit, 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155991>

Borbély, A. A. (1980). Sleep: circadian rhythm versus recovery process. Functional states of the brain: their determinants. Elsevier, Amsterdam, 151-161.

Borbély, A. A. (1982). Sleep regulation: circadian rhythm and homeostasis. Sleep. Clinical and experimental aspects, 83-104.

Borbély, A. A., Daan, S., Wirz - Justice, A., & Deboer, T. (2016). The two - process model of sleep regulation: a reappraisal. Journal of sleep research, 25(2), 131-143.

Cerri M., Ocampo-Garcés A., Amici R., Baracchi F., Capitani P., Jones C.A., Luppi M., Perez E., Parmeggiani P.L., Zamboni G. (2005) Cold exposure and sleep in the rat: effects on sleep architecture and EEG. Sleep, 28:694-705.

Chang, D. C., & Reppert, S. M. (2001). The Circadian Clocks of Mice and Men Minireview, 29, 555–558.

Clause, A., Kim, G., Sonntag, M., Weisz, C. J. C., Vetter, D. E., Rübsamen, R., & Kandler, K. (2014). The precise temporal pattern of prehearing spontaneous activity is necessary for tonotopic map refinement. Neuron, 82(4), 822–35. doi:10.1016/j.neuron.2014.04.001.

Dallos, P. (1992). The Active Cochlea. The Journal of Neuroscience, 12(12), 4575–4585

Darrow, K. N., Maison, S. F., & Liberman, M. C. (2006). Cochlear efferent feedback balances interaural sensitivity. Nature neuroscience, 9(12), 1474–6. doi:10.1038/nn1807

Delano, P. H., Elgueda, D., Hamame, C. M., & Robles, L. (2007). Selective Attention to Visual Stimuli Reduces Cochlear Sensitivity in Chinchillas, 27(15), 4146–4153. doi:10.1523/JNEUROSCI.3702-06.2007

Desmedt, J. E., & Monaco, P. (1961). Mode of action of the efferent olivo-cochlear bundle on the inner ear. *Nature*, 192, 1263–1265

Dijk D., Edgar D. (1999) Circadian and homeostatic control of wakefulness and sleep. En: Regulation of sleep and circadian rhythms. Turek F., Zee P. Eds. Marcel Dekker, Inc. New York, Basel. pp: 111-147.

Dijk, D. J., & Czeisler, C. a. (1995). Contribution of the circadian pacemaker and the sleep homeostat to sleep propensity, sleep structure, electroencephalographic slow waves, and sleep spindle activity in humans. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 15(5 Pt 1), 3526–3538.

Elgoyhen, a B., Vetter, D. E., Katz, E., Rothlin, C. V, Heinemann, S. F., & Boulter, J. (2001). Alpha10: a Determinant of Nicotinic Cholinergic Receptor Function in Mammalian Vestibular and Cochlear Mechanosensory Hair Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(6), 3501–6.

Elgoyhen, A. B., Johnson, D. S., Boulter, J., Vetter, D. E., & Heinemann, S. (1994).  $\alpha 9$ : an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Cell*, 79(4), 705-715

Elgoyhen, A., & Katz, E. (2012). The efferent medial olivocochlear-hair cell synapse. *J Physiol Paris*, 106, 47–56.

Endo, T., Schwierin, B., Borbély, A. A., and Tobler, I. (1997) Selective and total sleep deprivation: effect on the sleep EEG in the rat. *Psych. Res.* 66: 97-110.



Endo, T.; Roth, C.; Landolt, H.P.; Werth, E.; Aeschbach, D.; Achermann, P. and Borbély, A. A. "Selective REM sleep deprivation in humans: effects on sleep and sleep EEG". *American Journal Physiology*. 274(4 Pt 2):R1186-94, 1998.

Eron, J. N., Davidovics, N., & Della Santina, C. C. (2015). Contribution of vestibular efferent system alpha-9 nicotinic receptors to vestibulo-oculomotor interaction and short-term vestibular compensation after unilateral labyrinthectomy in mice. *Neuroscience letters*, 602, 156–61. doi:10.1016/j.neulet.2015.06.060.

Fex, J. (1959). Augmentation of cochlear microphonic activity by stimulation of efferent fibers to the cochlea; preliminary report. *Acta Otolaryngol*, 50, 540 – 541.

Franken, P., Chollet, D., & Tafti, M. (2001). The Homeostatic Regulation of Sleep Need Is under Genetic Control, 21(8), 2610–2621.

Franken, P., Malafosse, a, & Tafti, M. (1998). Genetic variation in EEG activity during sleep in inbred mice. *The American journal of physiology*, 275(4 Pt 2), R1127–37.

Galambos, R. (1956). Suppression of the auditory nerve activity by stimulation of efferent fibers to cochlea. *Journal of neurophysiology*, 19(5), 424–37.

Guinan JJ. JR. Olivocochlear Efferents: Anatomy, Physiology, Function, and the Measurement of Efferent Effects in Humans. *Ear Hear* 2006; 27(6): 589-607.

Hernández F. Cronobiología del Sueño de Movimientos Oculares Rápidos en *Octodon degus*. Tesis para optar al título de Médico-Veterinario (director de tesis: Ocampo-Garcés A), Universidad de Chile, 2005.

Kawase, T., & Liberman, M. C. (1993). Antimasking effects of the olivocochlear reflex. I. Enhancement of compound action potentials to masked tones. *Journal of Neurophysiology*, 70(6), 2519–2532.

Kong, W.-J., Guo, C.-K., Zhang, S., Zhang, X.-W., Wang, Y.-J., & Li, Z.-W. (2006). Fast cholinergic efferent inhibition in guinea pig outer hair cells. *Brain Research*, 1102(1), 103–8. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.04.107>.

Madrid-López, G N., Estrada, J G., Ocampo-Garcés, A P., Delano, P H. (2014). Characterization of the sleep-wake cycle in the hybrid mouse strain CBA/Sv129. Presentación en panel. X Reunión Anual Sociedad Chilena de Neurociencia, Valdivia, Chile.

Maison, S. F., & Liberman, M. C. (2000). Predicting vulnerability to acoustic injury with a noninvasive assay of olivocochlear reflex strength. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(12), 4701–7.

May, B. J., Prosen, C. A., Weiss, D., & Vetter, D. (2002). Behavioral investigation of some possible effects of the central olivocochlear pathways in transgenic mice. *Hearing research*, 171, 142–157.

Mohammadi, S. A., Burton, T. J., & Christie, M. J. (2017).  $\alpha 9$ -nAChR knockout mice exhibit dysregulation of stress responses, affect and reward-related behaviour. *Behavioural Brain Research*, 328(January), 105–114. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.04.005>.

Mrosovsky, N., & Thompson, S. (2008). Negative and positive masking responses to light in retinal degenerate slow ( rds / rds ) mice during aging, 48, 1270–1273. <https://doi.org/10.1016/j.visres.2008.02.016>

Ocampo-Garcés A., Molina E., Rodriguez A., Vivaldi EA. (2000) Homeostasis of REM sleep after total and selective sleep deprivation in the rat. *J. Neurophysiol* 84: 2699-2702.

Prosen, C. a, Bath, K. G., Vetter, D. E., & May, B. J. (2000). Behavioral assessments of auditory sensitivity in transgenic mice. *Journal of neuroscience methods*, 97(1), 59–67

Robles L. and Delano PH. Efferent System, in “The Senses: a Comprehensive Reference”, Chapter 13, Volume: Audition, Editors P. Dallos, and D. Oertel. Elsevier Press, 2008; pages 413-45.

Robles, L., & Ruggero, M. a. (2001). Mechanics of the mammalian cochlea. *Physiological reviews*, 81(3), 1305–52

Ruby, N. F., Brennan, T. J., Xie, X., Cao, V., Franken, P., Heller, H. C., & O'hara, B. F. (2002). Role of melanopsin in circadian responses to light. *Science*, 298(5601), 2211-2213.

Shuboni, D. D., Cramm, S. L., Yan, L., Ramanathan, C., Cavanaugh, B. L., Nunez, A. A., & Smale, L. (2015). Acute effects of light on the brain and behavior of diurnal *Arvicantis niloticus* and nocturnal *Mus musculus*. *Physiology & behavior*, 138, 75-86.

Smith, M. L., Souza, F. G. O., Bruce, K. S., Strang, C. E., & Morley, B. J. (2014). Acetylcholine receptors in the retinas of the  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor knockout mouse, (September), 1328–1356.

Steriade M, McCormick DA, Sejnowski TJ. (1993) Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain. *Science* 262:679-85.

Terreros, X. G., Jorratt, P., Aedo, X. C., Bele, X. A., Delano, X. P. H., Fisiología, P. De, ... Otorrinolaringología, D. De. (2016). Selective Attention to Visual Stimuli Using Auditory Distractors Is Altered in Alpha-9 Nicotinic Receptor Subunit Knock-Out Mice, 36(27), 7198–7209. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4031-15.2016>

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.

Tu, L., Poppi, L., Rudd, J., Cresswell, E. T., Smith, D. W., Brichta, A., & Nalivaiko, E. (2017). *Physiology & Behavior* Alpha-9 nicotinic acetylcholine receptors mediate

hypothermic responses elicited by provocative motion in mice. *Physiology & Behavior*, 174, 114–119. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.012>

Velluti, R. A., & Pedemonte, M. (2005). El sistema auditivo en el ciclo sueño-vigilia, 41(5), 280–286.

Velluti, R. A., & Pedemonte, M. (2005). El sistema auditivo en el ciclo sueño-vigilia. *Rev Neurol*, 41, 280-6.

Vetter, D. E., Katz, E., Maison, S. F., Taranda, J., Turcan, S., Ballesteros, J., ... Boulter, J. (2007). The alpha10 nicotinic acetylcholine receptor subunit is required for normal synaptic function and integrity of the olivocochlear system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(51), 20594–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708545105>

Vivaldi EA, Ocampo-Garcés A, Villegas R. (2005) Short-term homeostasis of REM sleep throughout a 12:12 light-dark schedule in the rat. *Sleep* 28(8):931-43.

Voirin, B., Scriba, M. F., Martinez-Gonzalez, D., Vyssotski, A. L., Wikelski, M., & Rattenborg, N. C. (2014). Ecology and neurophysiology of sleep in two wild sloth species. *Sleep*, 37(4), 753–61. <http://doi.org/10.5665/sleep.3584>

Warr WB, Guinan JJ JR. Efferent innervation of the organ of Corti: Two separate systems. *Brain Res* 1979; 173: 152-5.

Wurts S., Edgar D. Circadian and homeostatic control of rapid eye movement (REM) sleep: promotion of REM tendency by the suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci*, 20:4300-4310, 2000.

Yasnikov, R., & Deboer, T. (2012). Circadian modulation of sleep in rodents. *Progress in brain research* (1st ed., Vol. 199). Elsevier B.V. <http://doi.org/10.1016/B978-0-444-59427-3.00012-5>

## LISTADO DE PUBLICACIONES

Madrid-López, G N., Estrada, J G., Ocampo-Garcés, A P., Delano, P H. (2014). Characterization of the sleep-wake cycle in the hybrid mouse strain CBA/Sv129. Presentación en panel. X Reunión Anual Sociedad Chilena de Neurociencia, Valdivia, Chile.

Madrid-López, N., Estrada, J., Díaz, J., Bassi, A., Délano, P. H., & Ocampo-garcés, A. (2017). The Sleep – Wake Cycle in the Nicotinic Alpha-9 Acetylcholine Receptor Subunit Knock-Out Mice. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00302>. Provisionalmente Aceptado.