



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS SOCIALES
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGÍA

Alteraciones en el ciclo sueño-vigilia en un modelo animal de Epilepsia de Lóbulo Temporal

Memoria para optar al título de Psicólogo

Formato Artículo

JUAN IGNACIO AMARO FUENZALIDA

PROFESOR PATROCINANTE:

ADRIÁN OCAMPO GARCÉS

PROFESOR GUÍA:

MARGARITA BÓRQUEZ QUINTAS

SANTIAGO DE CHILE

2017

Tabla de Contenidos

Índice de ilustraciones y cuadros	pág.3
Resumen	pág.4
Introducción	pág.5
Materiales y Métodos	pág.9
Animales	pág.9
Diseño y Procedimiento	pág.9
Inducción a la Epilepsia	pág.9
Cirugía de Implante de electrodos	pág.10
Registro Polisomnográfico	pág.10
Identificación de estados del ciclo sueño-vigilia y crisis epilépticas	pág.11
Análisis de EEG y análisis estadístico	pág.12
Resultados	pág.14
Ocurrencia de crisis epilépticas	pág.14
Caracterización de estados del ciclo sueño-vigilia	pág.14
Organización temporal del ciclo sueño-vigilia	pág.15
Morfología de la señal y Coeficiente de Variación de la envolvente	pág.16
Actividad sinusoidal en banda delta	pág.18
Discusión	pág.19
Referencias	pág.26
Figuras	pág.35
Anexos	pág.41

Índice de ilustraciones y cuadros

Figura 1	pág.35
Figura 2	pág.36
Figura 3	pág.37
Figura 4	pág.38
Figura 5	pág.39
Figura 6	pág.40

Resumen

La epilepsia y el sueño están estrechamente relacionados. Las crisis epilépticas tienden a ocurrir especialmente durante ciertas fases del ciclo sueño-vigilia, tales como el sueño non-REM, mientras que el ciclo sueño-vigilia puede verse modificado por la actividad epiléptica. **Objetivo:** Esta investigación pretende estudiar la distribución temporal de las crisis tónico-clónicas y el efecto de la epilepsia sobre la duración de las fases del ciclo sueño-vigilia, mediante el Modelo de Pilocarpina de la Epilepsia, un modelo animal de Epilepsia de lóbulo temporal. Adicionalmente, se propone el Coeficiente de Variación de la Envolvente (CVE), como un nuevo método para analizar y detectar anomalías morfológicas y espectrales en los estados del ciclo sueño vigilia a nivel electroencefalográfico. **Método:** Se indujo epilepsia en 29 ratas, mediante la administración de una única dosis de pilocarpina, mientras que otras 13 ratas fueron utilizadas como grupo control. **Resultados:** Existe mayor ocurrencia de crisis tónico-clónica durante la fase de luz. Las ratas epilépticas muestran más tiempo en sueño non-REM que los sujetos sanos durante la fase de luz, pero invierten menos tiempo en Vigilia y sueño REM. Mediante el CVE, se observa una diferencia global entre sujetos epilépticos y sanos en cuanto a la morfología de los estados del ciclo sueño-vigilia. Se identifica un nuevo patrón de actividad de baja frecuencia y bajo CVE, el cual no es contingente a la ocurrencia de crisis epilépticas. **Relevancia:** Reconocer nuevos patrones de actividad permite caracterizar y, potencialmente, identificar la epilepsia, así como predecir eventos epilépticos que la caracterizan.

Palabras Clave: Epilepsia, Ciclo Sueño-Vigilia, Pilocarpina, Electroencefalograma.

Introducción

La epilepsia es una enfermedad caracterizada por la aparición recurrente e impredecible de crisis epilépticas (Fischer et al., 2015), las cuales se registran por medio del electroencefalograma (EEG), técnica que permite identificar la severidad y área comprometida (García, Zelaya, Pastor, Sola y Ortega, 2017). Así, mediante la evaluación de la actividad eléctrica del cerebro, se ha podido categorizar la epilepsia en diferentes tipos, entre ellas la epilepsia de lóbulo temporal (ELT), llamada así debido a que la actividad tiene como origen esta región del cerebro (Crespel, Coubes y Baldy-Moulinier, 2000; Matos, Andersen, do Valle y Tufik, 2010). La ELT es la más común de las epilepsias de tipo focal, las cuales representan el 60% de los casos adultos, siendo llamada también 'epilepsia del sueño' debido a que la ocurrencia de crisis generalizadas se da especialmente durante el sueño non-REM del ciclo-sueño vigilia (Wiebe, 2000; Tellez-Zenteno y Hernández-Ronquillo, 2012).

Por su parte, el ciclo sueño-vigilia (CSV) corresponde al ciclo que integra la conducta que los organismos realizan cuando se encuentran despiertos (vigilia) y los periodos de reposo y baja respuesta ante estímulo (sueño). El CSV ocurre en torno a un periodo de aproximadamente 24 horas (Yasnikov y Deboer, 2012; Deboer, 2013) y al igual que la epilepsia, puede ser registrado utilizando EEG, permitiendo identificar los estados que lo componen. De este modo se reconoce la vigilia -que se caracteriza por actividad de alta frecuencia y baja amplitud (con alta actividad motora)-, el sueño non-REM -caracterizado por la aparición de actividad de baja frecuencia y gran amplitud-, y el sueño REM -el cual presenta una

actividad similar a la vigilia, acompañado en roedores, por la aparición del ritmo theta (Siegel, 2010; Tejeda et al., 2010; Deboer, 2013)-.

Existe una relación compleja entre el CSV y la epilepsia (Malow, 2004; Matos, Andersen, do Valle y Tufik, 2010). Los estados del CSV afectan la manifestación de las crisis epilépticas (Crespel, Baldy-Moulinier y Coubes, 1998; Shouse, Farber y Staba, 2000; Herman, Walczak y Bazil, 2001; Kumar y Raju, 2001; Badawy, Curatolo, Newton y Macdonell, 2006) y las crisis epilépticas pueden desorganizar la estructura de CSV (Bazil, 2000; Hosfra et al., 2011; Yi, Chen, Lin y Chang, 2012). Esto se aprecia en cambios en la duración de los estados del CSV (Kumar y Raju, 2001; Matos, Tsai, Baldo, de Castro, Sameshima y Valle, 2010) y también cambios de fase sobre los periodos de actividad (vigilia) y reposo (sueño) (Quigg, Straume, Smith, Menaker y Bertram, 2001).

En la ELT humana se observa que las crisis tónico-clónicas ocurren principalmente durante el sueño non-REM mientras que en el sueño REM no se presentan crisis, indicando que existen fases del CSV que facilitan la ocurrencia de éstas (Crespel et al., 1998; Herman et al., 2001; Bazil, 2007). Realizar una evaluación exhaustiva de las alteraciones en el CSV en humanos con epilepsia se dificulta, por una parte, por la obtención de registros electrográficos sin interrupciones que permitan caracterizar globalmente la actividad cerebral de los sujetos, y por otra, por la capacidad de acceder a pacientes sin tratamiento farmacológico, cuyo CSV no esté modificado debido al efecto activo de la terapia (Bazil, 2007).

En este contexto, entre los modelos más ampliamente utilizados está el modelo de pilocarpina de la epilepsia (MPE), que recrea en ratas las principales características observadas en ELT humana, incluyendo las crisis tónico-clónicas (crisis con convulsiones) (Cavalheiro, 1995). En el MPE se ha descrito una mayor probabilidad de crisis durante la fase de luz (Arida, Scorza, de Araujo Peres y Cavalheiro, 1999; Matos, Tsai, Baldo, de Castro, Sameshima y Valle, 2010), coincidente con el 'peak' de sueño non-REM (Acherman y Borbély, 2010), sugiriendo un efecto del CSV sobre las manifestaciones epilépticas. En contraposición con lo anterior, existe evidencia que indica que no existe tal preferencia de fase para la ocurrencia de crisis (Bajorat, Wilde, Sellmann, Kirschstein y Köhling, 2011).

Por otro lado, pocas investigaciones han estudiado cómo la epilepsia inducida por pilocarpina modifica el CSV. Se ha observado que ratas epilépticas invierten más tiempo en sueño de ondas lentas (sueño non-REM) en la primera mitad de la fase de luz y durante la fase oscura; esto se ve acompañado por un acortamiento de la vigilia durante la noche. Respecto al sueño REM, este aparece disminuido durante la fase de luz (Matos, Tsai, Baldo, de Castro, Sameshima y Valle, 2010). No se han realizado estudios que evalúen la distribución circadiana (en torno al día) de los estados del CSV en el MPE.

Adicionalmente, los estudios de EEG en el MPE se han centrado en caracterizar espectralmente las crisis (Bortel, Lévesque, Biagini, Gotman y Avoli, 2010), mientras que solo describen cualitativamente las alteraciones electroencefalográficas observadas por medio de la exploración visual (Matos,

Tsai, Baldo, de Castro, Sameshima y Valle, 2010). Así, se han identificado modificaciones patológicas en las características del EEG de los estados del CSV. Estos estudios se han centrado en evaluar la duración de eventos discretos con forma de espiga durante los periodos libres de crisis (Bortel et al., 2010). Sin embargo, no se han realizado análisis de las propiedades espectrales y morfológicas de las alteraciones en el ciclo sueño-vigilia del MPE utilizando un enfoque cuantitativo.

En este sentido, el coeficiente de variación de la envolvente (CVE), es una técnica que permite evidenciar, tanto espectral como morfológicamente, las características del EEG. El CVE provee un patrón de actividad característico de los estados del CSV en ratas sanas según el grado de orden y amplitud descrito electroencefalográficamente por cada estado (Diaz, Bassi, Coolen, Vivaldi y Letelier, 2017). Así, el CVE podría identificar alteraciones en los estados del CSV, operando como un indicador del proceso epiléptico global.

En función de lo anterior esta investigación tiene como objetivo identificar la preferencia de fase de las crisis epilépticas en sujetos epilépticos y evaluar los efectos que tiene la epilepsia, tanto en las propiedades espectrales y morfológicas de los estados del ciclo sueño-vigilia, como en el curso temporal de los mismos.

Materiales y Métodos

Animales

Se utilizaron 42 ratas macho (Sprague Dawley) de 250-300grs., provenientes del bioterio de la Universidad Católica. Las ratas fueron mantenidas en jaulas individuales bajo un ciclo de 12-h luz/12-h oscuridad con encendido de la luz a las 07:00 a.m. bajo una temperatura ambiente de 21-24 °C. Todos los sujetos se encontraban en condiciones *ad libitum* durante todo el experimento. Todos los procedimientos se realizaron bajo protocolos aprobados por Comité de Ética de la Universidad de Chile (CBA 0797 FMUCH).

Diseño y procedimiento

Se indujo epilepsia a 29 ratas mediante la administración de pilocarpina, a las que se les evaluó la ocurrencia de crisis epilépticas por medio de exploración polisomnográfica, es decir, mediante electroencefalograma (EEG) y electromiograma (EMG). Se seleccionaron 13 sujetos epilépticos (grupo PILO) para identificar polisomnográficamente el curso temporal de los estados del CSV y realizar una caracterización espectral y morfológica de la señal EEG. Otras 13 ratas no epilépticas fueron asignadas al grupo control (grupo CONTROL), para ser comparadas con el grupo PILO. Con el fin de realizar el registro EEG/EMG, todos los sujetos fueron sometidos a una cirugía de implante de electrodos.

Inducción a la Epilepsia

Se indujo *Status Epilepticus* (SE) a 29 ratas mediante la administración de una dosis de pilocarpina (350 mg/kg), 30 minutos luego de una inyección de

methyl-escopolamina (1 mg/kg). 45 minutos después del inicio de SE, la actividad convulsiva fue interrumpida con una inyección de diazepam (20 mg/kg) (dosis adaptadas de Cavalheiro (1995)).

Cirugía de implante de electrodos

Siete días después de inducir SE, todos los sujetos fueron sometidos a una cirugía de implante de electrodos (para más detalle ver anexo 1). Se anestesió a los sujetos por medio de ketamina (50 mg/kg) y xilacina (10 mg/kg) y se implantaron 4 electrodos intracraneales para el registro de la actividad EEG. Dos electrodos EEG fueron ubicados bilateralmente en corteza temporal (AP: -5.6 mm respecto a bregma, ML: \pm 4.5 mm). Los dos restantes fueron ubicados en torno a línea media (AP: -2 mm respecto a Lambda, ML: +1.5mm y ML: -0.5, respectivamente). Adicionalmente, se implantaron 2 electrodos en los músculos de la nuca para el registro EMG. Luego de la cirugía, los sujetos fueron tratados con dosis de antibióticos y analgésicos (ver anexo 1 y 2).

Registro Polisomnográfico

Luego de una semana de realizada la cirugía, cada animal fue instalado en una cámara de Faraday (Castro-Faúndez, Díaz, Ocampo-Garcés, 2016) donde se les conectó durante 72 horas para el registro polisomnográfico mediante un cable flexible (40 cm) unido a un conmutador sostenido mediante un sistema de contrabalanceo para facilitar el movimiento libre del animal (PlasticsOne ®. Medical Design and Manufacture).

Se generaron dos canales para los electrodos EEG con una derivación bipolar y un solo canal para EMG. Todos los canales fueron filtrados analógicamente con un filtro *bandpass* (EEG: 0.3–30 Hz, EMG: 30–100 Hz) y amplificados por una ganancia de 2000 a 10000, aplicándose un filtro *notch* a todos los canales. La señal fue capturada por un amplificador (Grass Modelo 15KS, Astro-Med, Inc., West Warwick, RI) con una tasa de muestreo de 250 Hz.

Identificación de estados del ciclo sueño-vigilia y crisis epilépticas

Luego del registro polisomnográfico se utilizó una interfaz desarrollada en IgorPro V6.1 (www.wavemetrics.com) para la exploración visual del registro. Se generaron épocas de 15 segundos para ser clasificadas como Vigilia, sueño non-REM o sueño REM, en tanto el estado ocupara al menos 50% de la época.

La vigilia fue identificada por la presencia de un EEG de baja amplitud y con actividad EMG. Mientras que el sueño non-REM fue reconocido mediante una señal EEG de baja frecuencia y de alta amplitud (1 – 4 Hz), acompañado de husos de sueño de 10 a 15 Hz; sueño non-REM se caracterizó además por una disminución del tono muscular. El sueño REM se identificó por la presencia de actividad theta (6 – 9 Hz) coincidente con atonía muscular (Castro-Faúndez et al., 2016). Las épocas imposibles de clasificar fueron descartadas.

Mediante el mismo método se identificaron las crisis de todos los sujetos epilépticos (n = 29), de acuerdo con lo descrito en Bortel et al. (2010). Se identificó el horario de ocurrencia de las crisis respecto al encendido de la luz. Esto se contrastó con grabaciones del registro mediante una cámara web simple o con

modalidad infrarrojo (HD-CMOS-Kamera MIC Saugen), dependiendo de las condiciones lumínicas.

Análisis de EEG y análisis estadístico

El análisis del EEG se implementó por medio de R (www.r-project.org), utilizando los paquetes 'signal' y 'multitaper'. Se trabajó con el canal EEG que presentó mejor calidad de registro.

Para la caracterización espectral de los estados del CSV, se aplicó la Transformada Rápida de Fourier (FFT) sobre el canal EEG, generando un espectrograma multitaper con épocas de 15 segundos. Se utilizaron 30 tapers para una estimación espectral más precisa (Prerau, Brown, Bianchi, Ellenbogen y Purdon, 2017). El espectrograma fue estandarizado (ver anexo 3) y luego se segmentó en función de los estados del CSV para obtener el espectro promedio del grupo PILO y CONTROL.

Para evaluar las particularidades morfológicas de la actividad en sujetos epilépticos (grupo PILO), se utilizó el Coeficiente de Variación de la Envolvente (CVE) (Díaz, Arancibia, Bassi y Vivaldi, 2014; Díaz et al., 2017) y Medias Cuadráticas (RMS) (Rangayyan, 2015). El EEG fue filtrado digitalmente (*butterworth*) en las bandas delta (0.5–4 Hz), theta (4– 10 Hz) y sigma (10–15 Hz) y se le calculó el RMS y CVE para obtener un valor por cada época de 15 segundos. Se utilizó el valor CVE de 0.523 (± 1.96 desviaciones estándar) como criterio estandarizado para caracterizar la morfología de la señal filtrada, sea sinusoidal (CVE bajo), gaussiana (CVE medio) o pulsátil (CVE alto) (Díaz, Razeto-

Barry, Letelier, Caprio y Bacigalupo, 2007; Diaz et al., 2017). La amplitud de la señal para cada época fue estimada mediante RMS.

Para los análisis estadísticos se utilizó ANOVA factorial de medidas repetidas (ANOVA mixto) y prueba t para muestras relacionadas (pareada) e independientes (no-pareada), según sea el caso. Se calculó la *d* de Cohen para identificar el tamaño del efecto de las diferencias significativas.

Resultados

Ocurrencia de crisis epilépticas

En la Figura 1A se observa una crisis epiléptica representativa. Los sujetos epilépticos ($n=29$) presentan en promedio 1.3 ($DE=2.4$) crisis durante la fase de luz, y 0.5 ($DE=0.9$) durante la fase de oscuridad (Figura 1B). Se observan diferencias significativas en el número de crisis durante ambas fases (prueba t pareada: $t=2.47$; $p=0.01$; $d=0.46$). Para conocer la distribución a lo largo de día se calculó un valor único por cada hora para ambos días de registro (Figura 1C).

Caracterización de estados del ciclo sueño-vigilia

A un nivel descriptivo, el grupo CONTROL presenta patrones de actividad EEG/EMG consistentes con la literatura (Ocampo-Garcés y Vivaldi, 2002; Siegel, 2010), permitiendo identificar cada estado del CSV (Figura 2A).

Respecto al grupo PILO, lo más llamativo es el cambio en la calidad del registro EEG, destacando el cambio en la morfología de las ondas y la frecuente ocurrencia de episodios epilépticos precedidos y seguidos por intervalos en los que no se puede identificar estados de CSV.

Específicamente, el grupo PILO muestra un sueño non-REM caracterizado por una actividad de gran amplitud EEG de tipo regular superpuesta con espigas (Figura 2A). Por su parte el sueño REM se caracteriza tanto por una menor amplitud EEG como por un componente espectral menos sinusoidal al grupo CONTROL. La vigilia del grupo PILO es similar a la del grupo CONTROL, pero con actividad tipo 'espiga' (Figura 2B). Al realizar una caracterización espectral de los

estados (Figura 2C), se observa que el grupo CONTROL describe un 'peak' entre los 4–10 Hz (banda theta) durante Vigilia y sueño REM, superando la amplitud presentada en sueño non-REM, mientras que en el grupo PILO se observa una atenuación de esta banda. Así, la banda theta presenta significativamente más actividad en grupo CONTROL durante el sueño REM (prueba t no pareada: $t=5.84$; $p=0.01$; $d=1.7$) pero no en Vigilia (prueba t no pareada: $t=0.19$; $p=0.421$), mientras que la amplitud en theta es mayor durante sueño REM respecto a Vigilia, en grupo CONTROL (prueba t pareada: $t=4.65$; $p<0.001$; $d=0.9$), pero no en el grupo PILO (prueba t pareada: $t=-1.51$; $p=0.92$).

Organización temporal del ciclo sueño-vigilia

Al disponer la distribución temporal de los estados del CSV sobre 24 horas (promedio de ambos días). Ambos grupos describen más tiempo en vigilia durante la fase de oscuridad, y mayor tiempo en sueño (tanto sueño non-REM como REM) en la fase de luz. Adicionalmente se observa mayor tiempo en sueño REM durante la segunda mitad de la fase de luz en todos los sujetos (Figura 3).

Se cuantificó el tiempo (en minutos) invertido en cada estado del CSV durante el día, dividiéndolo en 8 bloques (octantes). Se observan diferencias significativas en cuanto al tiempo en vigilia ($F_{(4.4,107.2)}=50.10$; $p<0.001$) e interacción entre los grupos y octantes ($F_{(4.4;107,2)}=2.78$; $p=0.025$). El grupo CONTROL presenta significativamente más tiempo en vigilia en el tercer ($t=2.25$; $p=0.034$; $d=0,88$), cuarto ($t=4.47$; $p=0.01$; $d = 1.75$) y quinto ($t=2.31$; $p=0.03$; $d = 0.9$) octante respecto a PILO. En cuanto al sueño non-REM, se identifican igualmente diferencias entre octantes ($F_{(4,103)}=67.95$; $p<0.001$), existiendo

interacción con el factor grupos ($F_{(4;103)}=3.83$; $p=0.005$). Sujetos PILO describen significativamente más sueño non-REM en el tercer ($t=-2.43$; $p=0.02$; $d=0.95$) y cuarto ($t=-3.97$; $p=0.01$; $d=1.56$) octante, en comparación al grupo CONTROL. Se observan resultados similares en sueño REM, ambos grupos describen diferencias en cuanto al tiempo entre los octantes ($F_{(5;117)}=17.78$; $p<0.001$), existiendo interacción con el factor grupo ($F_{(5;117)}=3.89$; $p=0.005$). Grupo CONTROL describe significativamente más tiempo invertido en sueño REM en el primer ($t=3.39$; $p=0.002$; $d=1.33$), segundo ($t=2.59$; $p=0.016$; $d=1.01$), séptimo ($t=2.31$; $p=0.03$; $d=0.9$) y octavo octante ($t=4.42$; $p=0.01$; $d=1.73$). Para evaluar cada hipótesis se utilizó un contraste ANOVA factorial de medidas repetidas (mixto), implementando la corrección de Greenhouse–Geisser. Mientras que se realizaron pruebas t no pareadas para comparar los grupos en diferentes octantes.

Morfología de la señal y Coeficiente de Variación de la envolvente

Por medio del CVE y RMS de la señal filtrada en delta, theta y sigma se evaluó la morfología de la señal del grupo PILO y CONTROL.

El grupo CONTROL describe que, para cualquier banda, la baja amplitud (RMS) de la señal coincide con CVE de tipo gaussiano, coincidiendo con épocas clasificadas como vigilia. En la banda delta, al incremento en RMS está acompañado por un aumento progresivo del CVE. Al alcanzar valores máximos, CVE oscila entre valores altos y medios, coincidiendo con épocas de sueño non-REM. De manera similar a la vigilia, épocas identificadas como sueño REM, se encuentran centradas en 0.523 (Figura 4A). La banda theta se caracteriza por un patrón diferencial en función de los estados del CSV. Las épocas non-REM

concuerdan con un aumento en RMS simultaneo al CVE. Las épocas de Vigilia y sueño REM coinciden con una disminución del CVE, alcanzando valores tipo sinusoidales en sueño REM (Figura 4B). Finalmente, sigma describe un patrón similar al observado en delta (Figura 4C). El comportamiento de las tres bandas y la topografía de los estados del ciclo-sueño vigilia coinciden con la literatura (Díaz et al., 2017).

Respecto al grupo PILO, en cada banda los valores RMS más bajos coinciden con un CVE gaussiano. En delta, los valores RMS medios son coincidentes con un aumento en CVE hasta sus valores máximos, pero en la medida que RMS continúa aumentando, CVE tiende hacia valores sinusoidales. Las épocas con mayor amplitud coinciden con las identificadas como sueño non-REM (Figura 4D). En theta, cuando la amplitud de la señal tiende a aumentar, existe únicamente un aumento del CVE coincidente con las épocas de sueño non-REM. No se observan épocas con CVE bajo como ocurre en grupo CONTROL con las épocas asociadas a sueño REM (Figura 4E). Finalmente, en sigma, se observa un patrón similar delta y sigma en grupo CONTROL (Figura 4F).

Al comparar el patrón de actividad entre el grupo PILO y CONTROL, se identificó que, en delta y theta, el cuadrante superior izquierdo ($RMS > \text{Mediana}$; $CVE < 0.523$), presenta diferencias significativas en el número de épocas con este patrón de actividad (pruebas t no pareadas: delta: $t=-5.81$; $p<0.001$; $d=2.28$; theta: $t=2.26$; $p=0.04$; $d=0.89$).

Actividad sinusoidal en banda delta

La actividad tipo sinusoidal de alta amplitud en el cuadrante superior en delta (DELTA-S) en el grupo PILO, sugiere una alteración en el sueño non-REM (Figura 5).

Para evaluar la consistencia con la identificación de estados del CSV, se identificaron las épocas con actividad muscular más baja (EMG = RMS de 70-90 Hz; $EMG < \text{mediana EMG}$). Existe una coincidencia entre las épocas DELTA-S y baja actividad EMG (Figura 6A); se observa significativamente más tiempo invertido en DELTA-S en las épocas con actividad EMG más baja ($EMG < \text{mediana EMG}$) cuando se comparan con actividad EMG alta ($EMG > \text{mediana EMG}$) (prueba t pareada: $t=5.97$; $p<0.001$; $d=1.65$) (Figura 6B).

Finalmente, se calculó la probabilidad de ocurrencia de eventos DELTA-S tres horas previas a crisis epilépticas del grupo PILO. Se utilizó como referencia la primera crisis del día. Se encontró que durante la primera hora se observa una alta probabilidad de ocurrencia de DELTA-S seguido por una disminución progresiva de la misma (Figura 6C). Se observan diferencias significativas en el tiempo promedio invertido en DELTA-S entre la primera y segunda mitad de las 3 horas pre-crisis (prueba t pareada: $t=2.5$; $p=0.04$; $d=0.88$).

Discusión

Los presentes resultados, indican que, tal como se reporta en la literatura (Matos, Tsai, Baldo, de Castro, Sameshima y Valle, 2010), existe una relación entre la fase de luz de los sujetos epilépticos y la ocurrencia de crisis. Las crisis ocurren especialmente durante la fase de reposo, fase en la que predomina el sueño non-REM. Este resultado es concordante con lo que se observa en humanos con ELT (Crespel et al., 1998; Herman et al., 2001; Bazil, 2007). Sin embargo, en Bajorat et al. (2011) se ha indicado que no existe preferencia circadiana por las crisis. Esta diferencia en los resultados podría deberse a que las crisis en Bajorat et al. (2011), son evaluadas y clasificadas con base en un criterio conductual (escala de Racine), donde las crisis son rotuladas como generalizadas o no generalizadas en función de la presencia de convulsiones. Este criterio no se utilizó en el presente estudio, tomando en consideración únicamente las crisis generalizadas.

Por su parte, se ha observado que la distribución temporal de las crisis describe un periodo más largo que el CSV, donde el número máximo y mínimo de crisis describe un periodo entre 3 a 5 días en fases tempranas de la inducción a la epilepsia. Por esta razón, existirían periodos libres de crisis desde la inducción a la epilepsia y otros periodos donde las crisis tenderían a aumentar (Goffin, Nissinen, Van Laere y Pitkänen, 2007). Esto último podría explicar la distribución observada en Bajorat et al. (2011) y las diferencias con los resultados del presente estudio.

Adicionalmente, tal como señala Curia, Longo, Biagini, Jones y Avoli (2008), el comportamiento de las crisis puede variar tanto por la cepa como por la dosis

utilizada en el experimento. Bajorat et al. (2011) trabajó con ratas Wistar y con una dosis de 340mg/kg, mientras que en esta investigación se utilizaron Sprague Dawley y una dosis 10mg/kg más de pilocarpina para la inducción de la epilepsia. Por último, el tamaño muestral utilizado en esta investigación ($n = 29$) podría explicar las diferencias identificadas con Bajorat et al. (2011), quienes usaron 13. Es sabido que la probabilidad de encontrar diferencias estadísticamente significativas varía en función del tamaño muestral, y en este sentido también podría entenderse por qué en investigaciones anteriores, tales como Arida et al. (1999) se encontrara que las crisis ocurren especialmente durante la fase de luz, investigación en la que se identificaron crisis en 21 sujetos durante 135 días.

Por su parte, se identificó que los sujetos epilépticos reportan significativamente menos tiempo en vigilia y sueño REM. Interesantemente, el grupo PILO describe significativamente menor tiempo invertido en vigilia, durante la segunda mitad de la fase de luz y la primera de la fase de oscuridad. Esto último se contradice con otras investigaciones, donde se habla de un aumento de la vigilia durante la fase de luz y una disminución durante la fase de oscuridad (Matos, Tsai, Baldo, de Castro, Sameshima y Valle, 2010).

En cuanto a la disminución del tiempo en sueño REM de las ratas del grupo PILO, la evidencia sugiere que, sobre todo el sueño REM, está asociado a la inhibición de episodios epilépticos y simultáneamente existirá una disminución de este estado en el CSV en la medida que las crisis aumentan (Kumar, 2001). La disminución del sueño REM se observa tanto al inicio como la mitad del día, sin embargo, no se observan diferencias en torno a la segunda mitad de la fase de

luz. Es decir, si bien existe un menor tiempo en sueño REM durante la fase de luz, no se observa que esta alteración coincida con el 'peak' de crisis epilépticas durante el día.

Finalmente, las ratas con epilepsia describen un aumento en la duración del sueño non-REM durante la segunda mitad de la fase de luz, consistente con la disminución de los episodios de vigilia, es decir que, se observaría un intercambio entre el tiempo invertido en cada estado, donde más sueño non-REM significa menos vigilia. La literatura sugiere un aumento la duración del sueño non-REM, pero contradictoriamente, este aumento se aprecia durante la fase oscura y la primera mitad de la fase de luz (Matos, Tsai, Baldo, de Castro, Sameshima y Valle, 2010). Tomando en cuenta que las crisis pueden modificar CSV, las diferencias observadas podrían explicarse por el número de crisis presentadas por los sujetos durante el registro, tal como señala Goffin et al. (2007), la distribución temporal de las crisis puede variar a lo largo de semanas, dando relevancia al tiempo transcurrido entre la inducción a la epilepsia y el día de registro. Esto podría explicar las diferencias observadas con Matos, Tsai, Baldo, de Castro, Sameshima y Valle (2010).

Adicionalmente, en Curia et al. (2008), se reconoce que el MPE es un modelo que presenta una gran variabilidad tanto en el número de crisis como en la modificación de circuitos neuronales. Tales alteraciones son de origen multifactorial, incluyendo, peso, género, cepa, edad y dosis. Así, de acuerdo con lo que plantea Curia et al. (2008) la diferencia en los resultados aquí obtenidos en comparación a Matos, Tsai, Baldo, de Castro, Sameshima y Valle (2010) podría

deberse a que no se replicaron las condiciones experimentales realizadas en su experimento.

Aun así, se ha podido observar cambios en la duración de los estados del CSV, esto sugiere que la epilepsia por pilocarpina podría estar afectando el proceso homeostático que regula el sueño. De acuerdo con este modelo teórico, el CSV está regulado por un proceso que dicta cuánto duermen los organismos (procesos homeostático o S) y por uno que indica cuándo los organismos duermen (proceso circadiano o C) (Acherman y Borbély, 2010). En otros modelos animales se ha planteado que las crisis pueden desplazar la fase circadiana en ausencia de un zeitgeber fótico (en ausencia de ciclo luz-oscuridad) (Quigg et al., 2001). En este sentido, aún es necesario investigar si existen modificaciones en la fase circadiana en el MPE, y si ésta puede verse afectada por las crisis.

Respecto a las alteraciones morfológicas encontradas usando el CVE, cabe preguntarse si todas las épocas identificadas como sueño non-REM, corresponden efectivamente a dicho estado. Una primera posibilidad es que DELTA-S (Figura 5), sea únicamente una alteración de la morfología del sueño non-REM, donde las anomalías histológicas generadas por el MPE (Curia et al., 2008; Hester y Danzer, 2013; Polli et al., 2014), altere las estructuras que permitan generar la onda lenta que lo caracteriza, generando periodos de orden pulsátil o periodos de orden sinusoidal. Para poder evaluar esta hipótesis, es necesario explorar la distribución temporal de DELTA-S, y su ocurrencia durante periodos de poca presión como alta presión de sueño. Si esta actividad es una modificación del sueño non-REM se esperaría una mayor tasa de ocurrencia en periodos con

alta presión de sueño, estando regulado por el proceso S del sueño (Acherman y Borbély, 2010).

En segundo lugar, es posible que DELTA-S, sea una ralentización del ritmo theta del sueño REM. Los resultados indican que en la medida que las crisis epilépticas se aproximan, la probabilidad de ocurrencia de los eventos DELTA-S disminuye. Por su parte, en Shouse, Farber y Staba (2000) y Kumar (2001) se indica que el sueño REM puede suprimir la ocurrencia de crisis epilépticas y estas, a su vez, pueden disminuir la duración del sueño REM. De esta manera tanto el sueño REM como DELTA-S describen una relación similar con las crisis. Adicionalmente, el sueño REM en roedores se caracteriza por la presencia de ritmo theta hipocampal (Siegel, 2010), que al igual que DELTA-S describe un patrón de orden sinusoidal. El daño en hipocampo debido al efecto de la pilocarpina (Curia et al., 2008; Hester y Danzer, 2013; Polli et al., 2014) podría estar reduciendo la velocidad del ritmo theta.

En la misma línea, se ha observado en ratas que dosis no patológicas de pilocarpina pueden fortalecer la conectividad funcional entre corteza e hipocampo durante el ritmo theta en sueño REM (Tejeda et al., 2010). Así, si bien no se reconoce el mecanismo por el cual actúa este fármaco, la evidencia sugiere que el ritmo theta puede verse modificado por la pilocarpina. En este sentido, es posible que DELTA-S, no sea una modificación del sueño non-REM, sino un enlentecimiento del oscilador que genera el ritmo theta durante el sueño REM.

En tercer lugar, tomando en cuenta que EMG presenta baja amplitud durante la presencia de este estado y que describe sus propias características

electroencefalográficas, cabe la posibilidad de que DELTA-S sea un estado de reposo en sí mismo. Si bien comparte características tanto con el sueño non-REM como con el sueño REM, es necesario evaluar si es o no un estado independiente de estos.

Para contrastar estas hipótesis aún hace falta investigación. Resulta crucial identificar la distribución temporal de DELTA-S, así como la longitud de los episodios y el comportamiento de las transiciones, con el objetivo de determinar la relevancia biológica del fenómeno.

Cualquiera sea la explicación, el CVE permite describir un patrón característico de actividad para las ratas del MPE que no está presente en sujetos sanos, permitiendo diferenciarlos claramente. El CVE, a diferencia de otras técnicas, permite distinguir entre pulsos, sinusoides y actividad gaussiana de manera independiente a la amplitud de la señal, pudiendo diferenciar una gran gama de patrones de actividad. En esta lógica, aún queda por explorar como el CVE podría ser utilizado para la identificación de otras alteraciones propias de la epilepsia, como lo son las descargas interictales con forma de espiga, que por el momento han sido identificadas y analizadas de manera cualitativa (Bortel et al., 2010).

A modo de conclusión, mediante esta investigación se ha podido identificar la preferencia de fase de las crisis epilépticas durante la fase de reposo, así como la modificación en de la duración de estados específicos del ciclo sueño vigilia en sujetos epilépticos respecto de organismos sanos. Adicionalmente se han identificado alteraciones electroencefalográficas, tales como la disminución del

ritmo theta durante el sueño REM y la aparición de DELTA-S. Respecto a este último se puede observar que, dada su relación temporal con las crisis epilépticas, potencialmente podría funcionar como indicador o predictor de las mismas. A su vez, la identificación de un patrón característico en sujetos epilépticos y la clara distinción con sujetos sanos, abre la posibilidad de utilizar CVE para evaluar dichos cambios en seres humanos, con el potencial de determinar anomalías específicas en el electroencefalograma o la posible huella que definiría la epilepsia como proceso global.

Referencias

- Achermann, P. y Borbély, A. (2010). Sleep Homeostasis and Models of Sleep Regulation. En M. Kryger, T. Roth y W. Dement (Eds.), *Principles and Practice of Sleep Medicine.*, 5th ed (pp. 431-444). Philadelphia: Saunders.<https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-6645-3.00037-2>
- Arida, R., Scorza, F., de Araujo Peres, C., y Cavalheiro, E. (1999). The course of untreated seizures in the pilocarpine model of epilepsy. *Epilepsy research*, 34(2), 99-107.[https://doi.org/10.1016/S0920-1211\(98\)00092-8](https://doi.org/10.1016/S0920-1211(98)00092-8)
- Badawy, R., Curatolo, J., Newton, M., Berkovic, S. y Macdonell, R. (2006). Sleep deprivation increases cortical excitability in epilepsy syndrome-specific effects. *Neurology*, 67(6), 1018-1022.
<https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000237392.64230.f7>
- Bajorat, R., Wilde, M., Sellmann, T., Kirschstein, T., y Köhling, R. (2011). Seizure frequency in pilocarpine-treated rats is independent of circadian rhythm. *Epilepsia*, 52(9). doi: 10.1111/j.1528-1167.2011.03200.x
- Bazil, C., Castro, L., y Walczak, T. (2000). Reduction of rapid eye movement sleep by diurnal and nocturnal seizures in temporal lobe epilepsy. *Archives of neurology*, 57(3), 363-368. doi: 10.1001/archneur.57.3.363

Bazil, C. (2007). Sleep. En S. Schochter, G. Holmes y D. Kasteleijn-Nolst (Eds.), *Behavioral aspects of epilepsy: principles and practice.*, 1th ed (pp. 489-495). Nueva York: Demos Medical Publishing. Recuperado de: <https://www.dropbox.com/s/2bca4jn6wknxyth>

Bortel, A., Lévesque, M., Biagini, G., Gotman, J., y Avoli, M. (2010). Convulsive status epilepticus duration as determinant for epileptogenesis and interictal discharge generation in the rat limbic system. *Neurobiology of disease*, 40(2), 478-489. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2010.07.015>

Castro-Faúndez, J., Díaz, J., y Ocampo-Garcés, A. (2016). Temporal organization of the sleep-wake cycle under food entrainment in the rat. *Sleep*, 39(7), 1451-1465. <https://doi.org/10.5665/sleep.5982>

Cavalheiro, E. (1995). The pilocarpine model of epilepsy. *The Italian Journal of Neurological Sciences*, 16(1-2), 33-37. <https://doi.org/10.1007/BF02229072>

Crespel, A., Baldy-Moulinier, M. y Coubes, P. (1998). The relationship between sleep and epilepsy in frontal and temporal lobe epilepsies: practical and

physiopathologic considerations. *Epilepsia*, 39(2), 150-157. doi:
10.1111/j.1528-1157.1998.tb01352.x

Crespel, A., Coubes, P. y Baldy-Moulinier, M. (2000). Sleep influence on seizures and epilepsy effects on sleep in partial frontal and temporal lobe epilepsies. *Clinical Neurophysiology*, 111, S54-S59.[https://doi.org/10.1016/S1388-2457\(00\)00402-8](https://doi.org/10.1016/S1388-2457(00)00402-8)

Curia, G., Longo, D., Biagini, G., Jones, R., y Avoli, M. (2008). The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Journal of neuroscience methods*, 172(2), 143-157.<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2008.04.019>

Díaz, J., Arancibia, J., Bassi, A., y Vivaldi, E. (2014). Envelope analysis of the airflow signal to improve polysomnographic assessment of sleep disordered breathing. *Sleep*, 37(1), 199-208.<https://doi.org/10.5665/sleep.3338>

Diaz, J., Bassi, A., Coolen, A., Vivadi, E.A. y Letelier, J. (2017). Envelope analysis links oscillatory and arrhythmic EEG activities to two types of neuronal synchronization. *NeuroImage*. Under Review.

Díaz, J., Razeto-Barry, P., Letelier, J., Caprio, J., y Bacigalupo, J. (2007). Amplitude modulation patterns of local field potentials reveal asynchronous neuronal populations. *Journal of Neuroscience*, 27(34), 9238-9245. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4512-06.2007>

Deboer, T. (2013). Behavioral and electrophysiological correlates of sleep and sleep homeostasis. In *Sleep, Neuronal Plasticity and Brain Function* (pp. 1-24). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/7854_2013_248

Fisher, R., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J., Elger, C., ... y Hesdorffer, D. (2014). A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, 55(4), 475-482. doi: 10.1111/epi.12550

García, A., Zelaya, L., Pastor, J., Sola, R., y Ortega, G. (2017). ¿Dónde comienza el período postictal en la epilepsia del lóbulo temporal? Hacia una definición cuantitativa. *Revista de neurología*, 64(8), 337-346. Recuperado de: <https://www.neurologia.com/articulo/2016269>

Goffin, K., Nissinen, J., Van Laere, K., y Pitkänen, A. (2007). Cyclicity of spontaneous recurrent seizures in pilocarpine model of temporal lobe

epilepsy in rat. *Experimental neurology*, 205(2), 501-505.<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.03.008>

Herman, S., Walczak, T. y Bazil, C. (2001). Distribution of partial seizures during the sleep–wake cycle Differences by seizure onset site. *Neurology*, 56(11), 1453-1459.<https://doi.org/10.1212/WNL.56.11.1453>

Hester, M., y Danzer, S. (2013). Accumulation of abnormal adult-generated hippocampal granule cells predicts seizure frequency and severity. *Journal of Neuroscience*, 33(21), 8926-8936.<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5161-12.2013>

Hofstra, W., Gordijn, M., van der Palen, J., van Regteren, R., Grootemarsink, B., y de Weerd, A. (2011). Timing of temporal and frontal seizures in relation to the circadian phase: a prospective pilot study. *Epilepsy research*, 94(3), 158-162.<https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2011.01.015>

Kumar, P., y Raju, T. (2001). Seizure susceptibility decreases with enhancement of rapid eye movement sleep. *Brain research*, 922(2), 299-304.[https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)03174-2](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)03174-2)

Malow, B. (2004). Sleep deprivation and epilepsy. *Epilepsy currents*, 4(5), 193-195.
doi: 10.1111/j.1535-7597.2004.04509.x

Matos, G., Andersen, M., do Valle, A. y Tufik, S. (2010). The relationship between sleep and epilepsy: evidence from clinical trials and animal models. *Journal of the neurological sciences*, 295(1), 1-7.
<https://doi.org/10.1016/j.jns.2010.05.003>

Matos, G., Tsai, R., Baldo, M., de Castro, I., Sameshima, K. y Valle, A. (2010). The sleep–wake cycle in adult rats following pilocarpine-induced temporal lobe epilepsy. *Epilepsy y Behavior*, 17(3), 324-331.
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2009.11.015>

Ocampo-Garcés, A., & Vivaldi, E. (2002). Short-term homeostasis of REM sleep assessed in an intermittent REM sleep deprivation protocol in the rat. *Journal of sleep research*, 11(1), 81-89. doi: 10.1046/j.1365-2869.2002.00281.x

Polli, R., Malheiros, J., dos Santos, R., Hamani, C., Longo, B., Tannús, A., ... y Covolan, L. (2014). Changes in hippocampal volume are correlated with cell loss but not with seizure frequency in two chronic models of temporal lobe epilepsy. *Frontiers in neurology*, 5. doi: 10.3389/fneur.2014.00111

Prerau, M., Brown, R., Bianchi, M., Ellenbogen, J., y Purdon, P. (2017). Sleep neurophysiological dynamics through the lens of multitaper spectral analysis. *Physiology*, 32(1), 60-92. doi: 10.1152/physiol.00062.2015

Quigg, M., Straume, M., Smith, T., Menaker, M., y Bertram, E. (2001). Seizures induce phase shifts of rat circadian rhythms. *Brain research*, 913(2), 165-169.[https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)02780-9](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02780-9)

Rangayyan, R. M. (2015). *Biomedical signal analysis* (Vol. 33). John Wiley y Sons.
Recuperado de: <https://www.dropbox.com/s/q983p6at02ezqsj>

Tejada, S., Gonzalez, J., Rial, R., Coenen, A., Gamundi, A., y Esteban, S. (2010). Electroencephalogram functional connectivity between rat hippocampus and cortex after pilocarpine treatment. *Neuroscience*, 165(2), 621-631.<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.10.031>

Téllez-Zenteno, J., y Hernández-Ronquillo, L. (2012). A review of the epidemiology of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy research and treatment*, 2012.<http://dx.doi.org/10.1155/2012/630853>

Shouse, M., Farber, P., y Staba, R. (2000). Physiological basis: how NREM sleep components can promote and REM sleep components can suppress seizure discharge propagation. *Clinical Neurophysiology*, 111, S9-S18. [https://doi.org/10.1016/S1388-2457\(00\)00397-7](https://doi.org/10.1016/S1388-2457(00)00397-7)

Siegel, J. (2010). REM Sleep. En M. Kryger, T. Roth y W. Dement (Eds.), *Principles and Practice of Sleep Medicine.*, 5th ed (pp. 92-111). Philadelphia: Saunders. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-6645-3.00008-6>

Wiebe, S. (2000). Epidemiology of temporal lobe epilepsy. *Canadian Journal of Neurological Sciences*, 27(S1), S6-S10. <https://doi.org/10.1017/S0317167100000561>

Yasenkov, R. y Deboer, T. (2012). Chapter 12 - Circadian modulation of sleep in rodents. En A. Kalsbeek, M. Merrow, T. Roennenberg y R. Foster. (Eds.), *The Neurobiology of Circadian Timing* (pp. 203-2018). Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-444-59427-3.00012-5.

Yi, P., Chen, Y., Lin, C. y Chang, F. (2012). Occurrence of epilepsy at different zeitgeber times alters sleep homeostasis differently in rats. *Sleep*, 35(12), 1651-1665.<https://doi.org/10.5665/sleep.2238>

Figuras

Distribución temporal de las crisis epilépticas

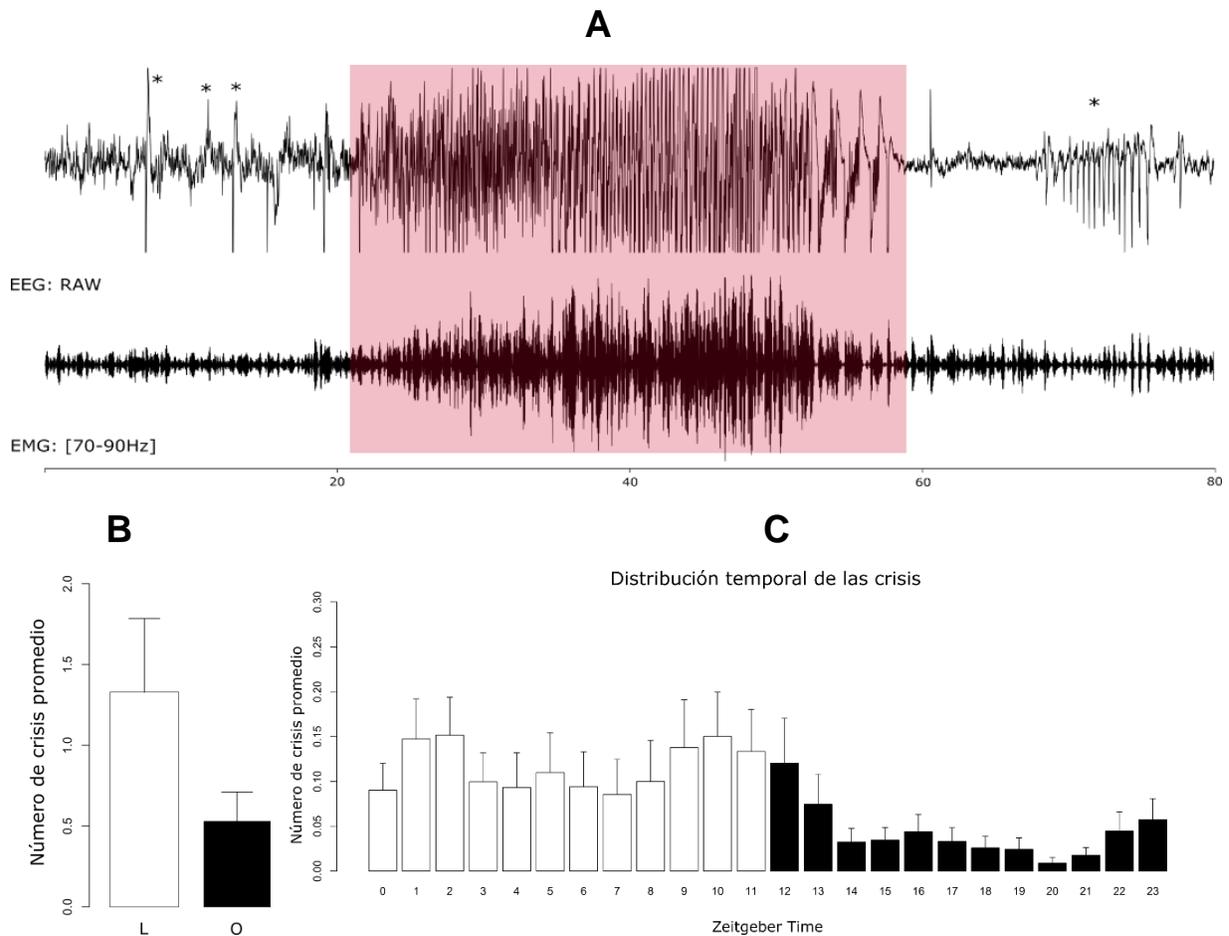


Figura 1.A Ejemplo de crisis epiléptica (rojo). EEG y EMG presentan alta amplitud en ambos canales. En asterisco se indican alteraciones en el EEG anteriores y posteriores a las crisis. **B** Numero de crisis promedio durante fase de luz (blanco) y fase de oscuridad (negro). **C** Distribución de las crisis epilépticas a lo largo de las 24 horas del día con referencia al encendido de la luz (Zeitgeber Time 0). La distribución fue suavizada para expresarlo como fenómeno circular. Las barras de error señalan el error típico.

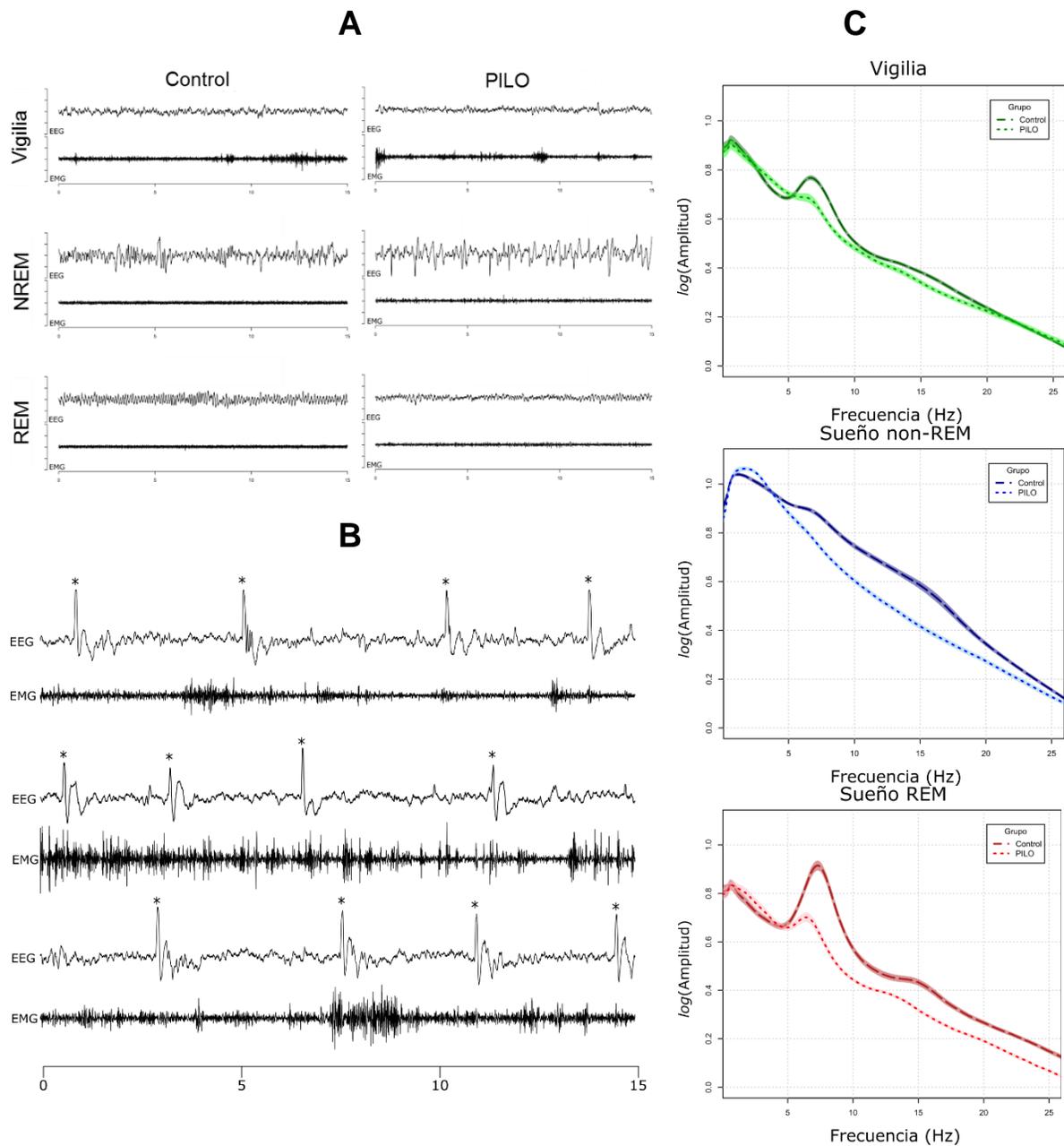


Figura 2. A Épocas representativas de registro EGG/EMG para los estados del CSV en un sujeto de cada grupo. B Espigas durante vigilia en sujetos PILO C Espectro promedio para fases del CSV (verde=vigilia, azul=non-REM y rojo=REM). Para cada estado, la línea gruesa y discontinua representa el grupo CONTROL, y el grupo PILO se ve representado por la línea delgada y punteada. La sombra transparente en torno a cada línea corresponde al error típico.

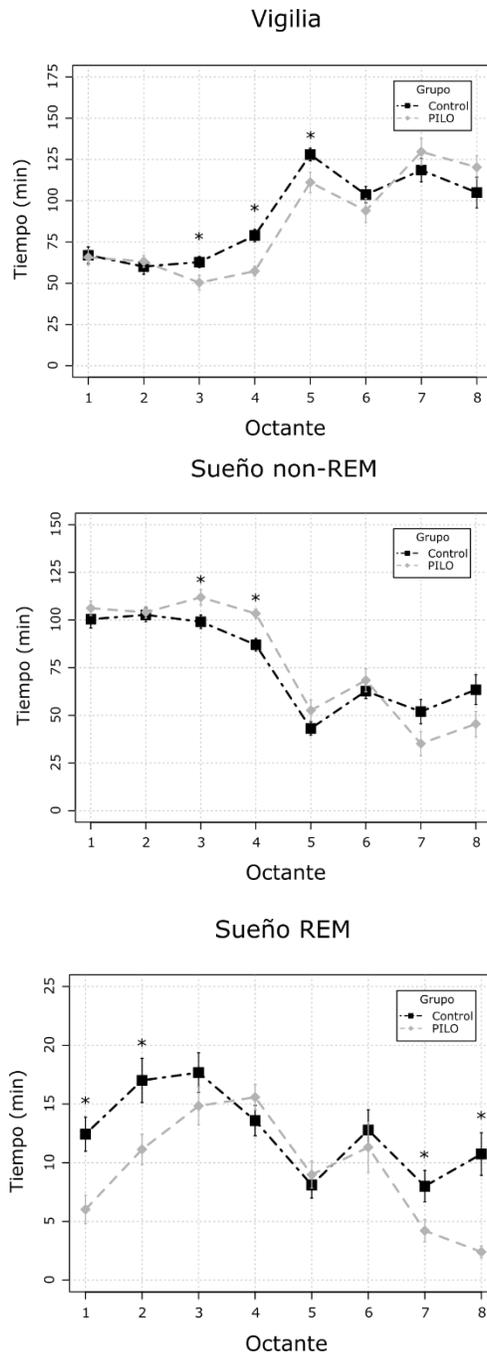


Figura 3. Descripción de la distribución del tiempo promedio (en minutos) de estados del CSV para el grupo CONTROL (negro) y PILO (gris). En asteriscos se indican las diferencias significativas. Las barras de error señalan error típico.

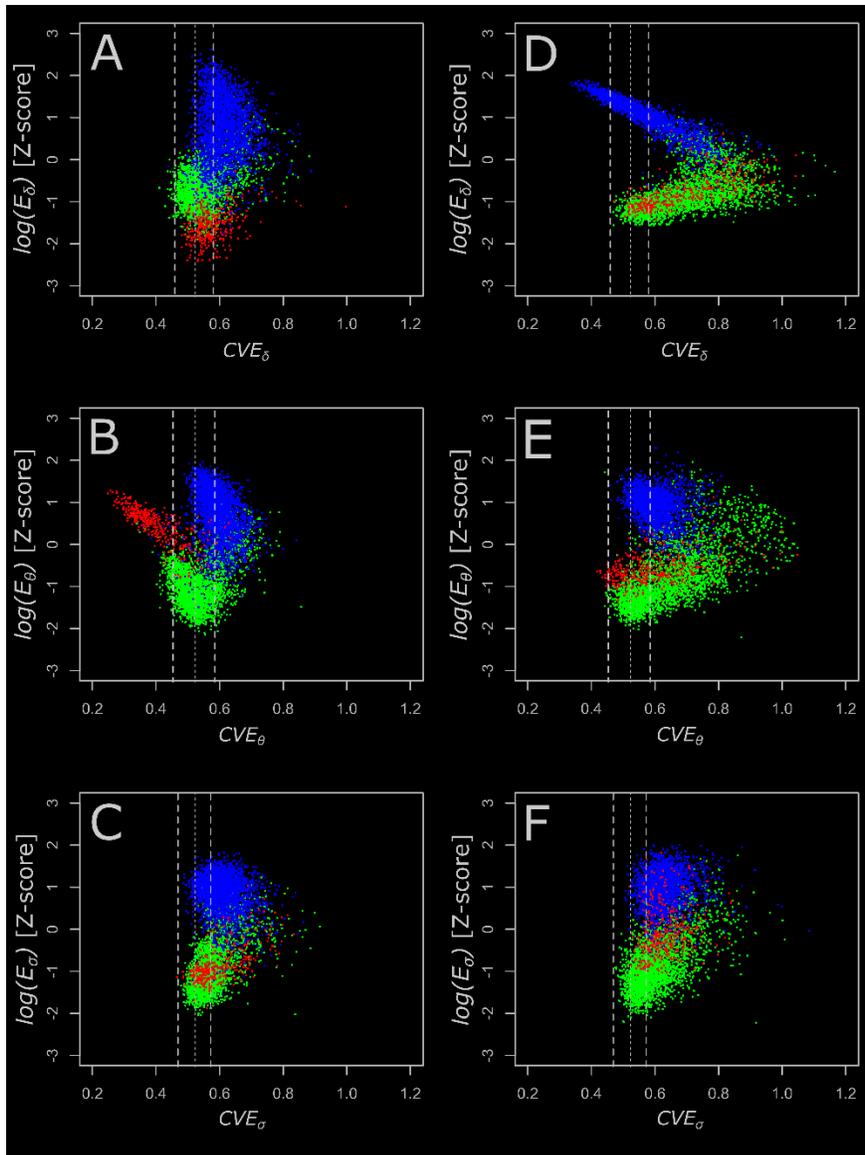


Figura 4. Gráfico de dispersión de RMS vs CVE de las bandas Delta (A D), theta (B E) y sigma (C F) para sujeto del grupo CONTROL (izquierda) y un sujeto del grupo PILO (derecha). Cada punto representa una época de 15 segundos coloreada de acuerdo con un estado del CSV (verde=vigilia; azul=non-REM; rojo=REM). RMS se expresa en escala logarítmica.

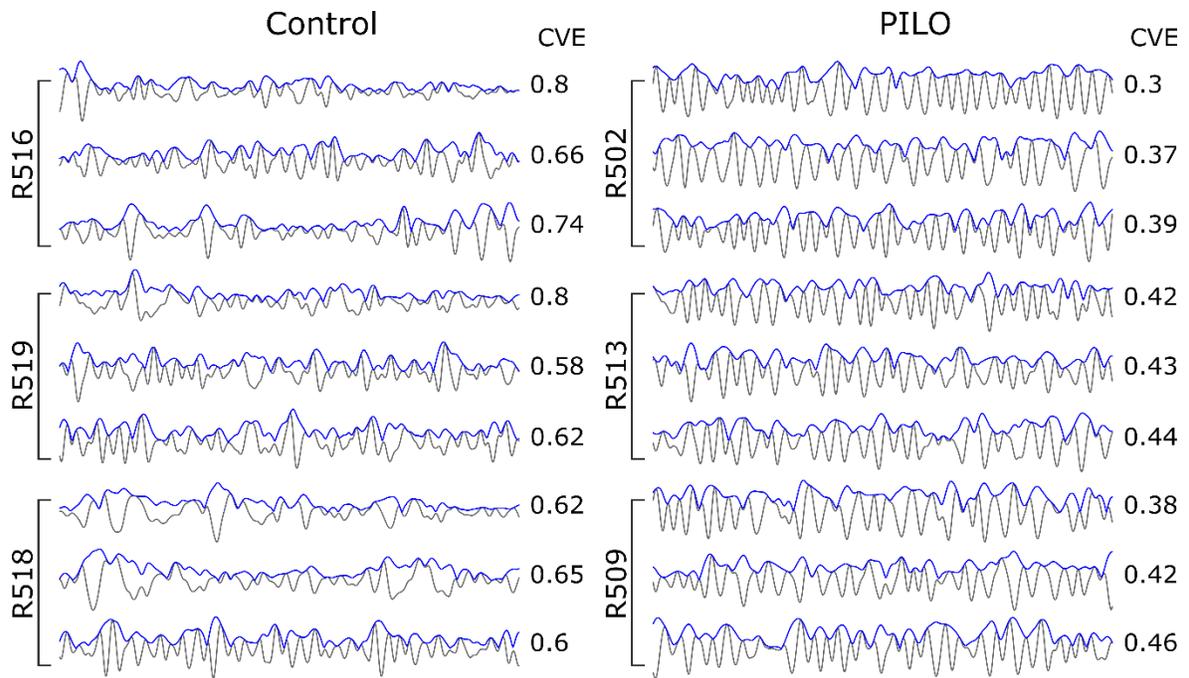


Figura 5. Ejemplos de épocas filtradas en delta de 3 sujetos de cada grupo. El trazo gris corresponde a la señal filtrada y el azul a la envolvente de dicha señal. Se indica el sujeto al que pertenece la muestra, así como el CVE asociado.

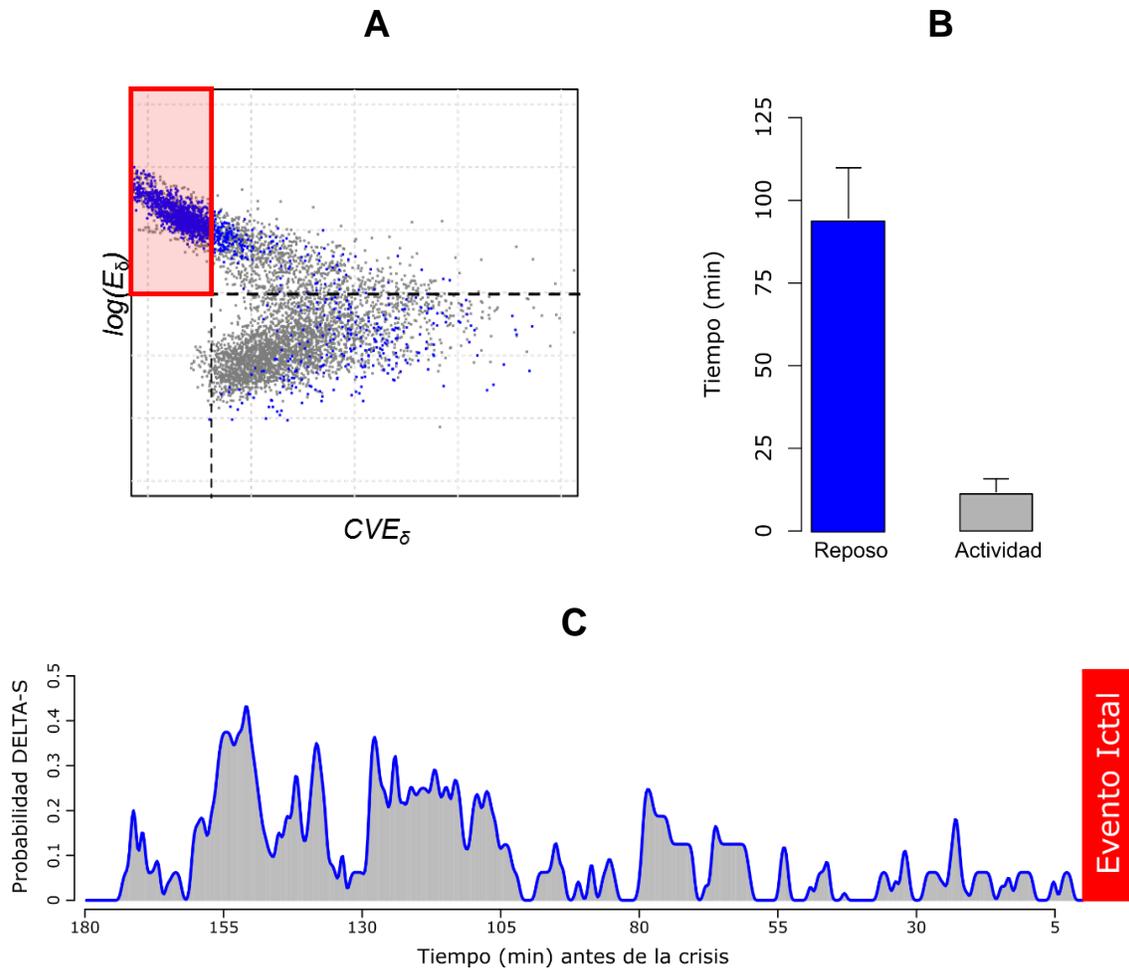


Figura 6. **A** Describe el patrón global de actividad de un sujeto del grupo PILO (Izquierda). El eje horizontal refiere al CVE y el vertical al RMS filtrado en delta. La línea punteada vertical indica el promedio del CVE en un modelo gaussiano filtrado en delta; la horizontal representa la mediana de RMS (en escala logarítmica). En azul se indican épocas con el 25% de actividad muscular más baja. El área en rojo, indica la región donde se identifica la actividad DELTA-S. **B** Tiempo promedio invertido en DELTA-S durante el reposo (azul) y la actividad (gris). **C** Probabilidad de ocurrencia de un evento DELTA-S, en las tres horas previas a un evento ictal (crisis). Se suavizó la distribución para una mejor apreciación.

Anexos

Anexo 1. Protocolos anestésicos, antibióticos, y de manejo inflamatorio.

Protocolo anestésico

Inducción: Xilacina 0.1 mg/Kg.+Ketamina 0.1 mg/Kg.

Dosis: 0,15 ml Xilacina + 0,15 ml Ketamina
disueltos en 0,7 ml de solución fisiológica 0,9%.

Vía de administración: Punción directa intra-peritoneal.

Intervalo administración: Al inicio de etapa quirúrgica, una vez.

Conducción anestésica: Ketamina 0.1 mg/Kg.

Dosis: 0,20 ml Ketamina
disueltos en 0,8 ml de solución fisiológica 0,9%.

Vía de administración: Punción directa intra-peritoneal.

Intervalo administración: Durante procedimiento quirúrgico si el animal demuestra signos de dolor, con un máximo de 3 veces.

Protocolo antibiótico y manejo del proceso inflamatorio

Antibiótico: Enrofloxacino 10%

Vía de administración: Punción directa intra-peritoneal.

Dosis: 0,1 ml disuelto en 0,4 ml de solución fisiológica 0,9%.

Antiinflamatorio: Ketoprofeno 1%

Vía de administración: Punción directa intra-peritoneal

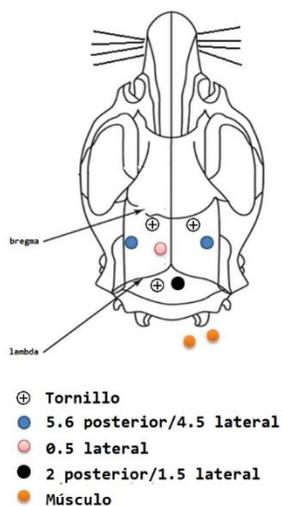
Dosis: 0,1 ml. disuelto en 0,4 ml de solución fisiológica 0,9%.

Las dosis señaladas se colocaron al término del procedimiento quirúrgico. Todos los procedimientos fueron registrados en la ficha quirúrgica.

Anexo 2. Esquema de ubicación de electrodos para registro polisomnográfico

Electrodo EEG	Antero-Posterior	Lateral
1	5.6	-4.5
2	5.6	4.5
3	-	-.5
4	-2	1.5

Coordenadas estereotáxicas para ubicación de electrodos corticales. Para más detalle revisar esquema a continuación.



Esquema de ubicación de electrodos para registro polisomnográfico. Se identifican los electrodos corticales 1, 2 (azul), 3 (rosado) y 4 (negro). Los electrodos para registro de actividad muscular se indican en salmón.

Anexo 3. Estandarización del espectro.

El *espectro promedio* presentado, se obtiene al promediar linealmente los espectros referidos a cada sujeto de estudio (calculado independientemente para cada estado del CSV). A su vez, el espectro de cada sujeto fue calculado mediante el promedio de los espectros de cada época del *espectrograma estandarizado* ($eSPEC$), el cual fue obtenido mediante la Fórmula 1. Donde $eSPEC$ corresponde a una matriz de i filas y j columnas obtenida mediante la división entre la diferencia de cada elemento del espectrograma bruto ($SPEC$) y el percentil 5 de la totalidad del espectrograma ($P5_{SPEC}$) y la diferencia entre el percentil 95 ($P95_{SPEC}$) y 5 ($P5_{SPEC}$) de la totalidad del espectrograma.

Fórmula 1:

$$eSPEC_{ij} = \frac{(SPEC_{ij} - P5_{SPEC})}{(P95_{SPEC} - P5_{SPEC})}$$