

Efecto de las microinyecciones de penicilina repetidas en el núcleo dorsal del rafe, sobre la organización del sueño del gato durante los registros de 23 horas

Adrián Martínez-Cervantes*
Rodrigo Fernández-Mas*
Augusto Fernández-Guardiola**

Summary

The effect of repeated "G" sodic penicillin (Pn) microinjections (50-IU/1µl) in the *nucleus raphe dorsalis* (NDR) of free-moving cats was investigated. The following variables were measured: a) progressive behavioral changes evolution recorded and analyzed in videotape, and b) analysis of sleep organization and architecture, measured by 23 hours recordings. The results shows that Pn microinjection in the NDR fail to induce interictal spikes, paroxysms and generalized convulsive seizures. The Pn repeated microinjection does not produce important changes in the layout and organization of sleep. Nevertheless the increment of rapid eye movement sleep percentage and total time was significant. Another significant finding was the appearance of compulsive grooming. The chemical stimulation of the NDR induce similar behavioral changes as the electrical stimulation of the same nucleus.

Key words: Penicillin, MOR sleep rafe dorsal nucleus behaviour, cat.

Resumen

Se investigó el efecto de la microinyección repetida de penicilina G sódica (Pn) en el núcleo dorsal del rafe (NDR) del gato integro, libre de movimientos. Se midieron las siguientes variables: a) cambios conductuales progresivos analizados por video y b) cambios en la organización del sueño, medidos en registros de 23 horas.

La microinyección de Pn en el NDR no produjo espigas interictales ni cambios importantes en la organización del sueño, a excepción de un aumento del porcentaje y de tiempo total de sueño de movimientos oculares rápidos, que resultaron significativos. Otro hallazgo fue la aparición de un acalamiento compulsivo. Al igual que la estimulación eléctrica (8) la química del NDR mostró la ausencia de signos de epileptización semejantes a los descritos en otras estructu-

ras como la amígdala del lóbulo temporal, el hipocampo y la corteza motora.

Palabras clave: Penicilina, sueño MOR, núcleo dorsal del rafe, conducta, gato.

Introducción

Se ha sugerido que el sistema del rafe participa en una gran variedad de funciones tales como el sueño, la actividad locomotora, la agresión, la sexualidad, la reactividad emocional, la termorregulación, la nocicepción y la memoria (30, 32). Uno de los primeros resultados en la manipulación química del núcleo dorsal del rafe (NDR) muestra que la serotonina contenida en este núcleo tiene un papel importante en la regulación del sueño, ya que las inyecciones de reserpina y paraclofenilalanina (PCPA) inducen insomnio. La administración de reserpina (0.5-1mg/kg) disminuye los niveles cerebrales de monoaminas (20), y provoca un estado de insomnio prolongado con abolición del sueño de movimientos oculares rápidos (MOR) durante veinticuatro horas. Por otra parte, se ha encontrado que la inhibición de la triptofano hidroxilasa (enzima que interviene en el metabolismo de la serotonina) mediante la administración de la PCPA provoca un estado de insomnio (7).

Las lesiones del rafe parecen sensibilizar a las ratas al efecto del *kindling amigdalino* (11), y también bajan el umbral de la postdescarga (PD), y la duración y el número de PDs obtenidas por convulsiones motoras (23). La estimulación del NDR a baja frecuencia, tiene un efecto protector contra las crisis generalizadas, producidas por estimulación eléctrica del núcleo central de la amígdala (25). La estimulación eléctrica breve y repetida de baja intensidad (tipo *kindling*) del NDR, mostró la ausencia de signos de epileptización semejantes a los descritos en otras estructuras como la amígdala del lóbulo temporal (AM), el hipocampo y la corteza motora. La estimulación diaria del NDR sólo provocó la inducción del sueño y un acortamiento sig-

* División de Investigaciones en Neurociencias. Instituto Mexicano de Psiquiatría. Calz. México-Xochimilco 101, San Lorenzo Huipulco, 14370, México, D.F.

** Facultad de Psicología, UNAM.

Para toda correspondencia: Dr. Augusto Fernández-Guardiola. IMP. e-mail: aferran@servidor.unam.mx

nificativo de la latencia del primer sueño (MOR), sin modificar el tiempo total de MOR en las veinticuatro horas de registro. En estos experimentos fue evidente la disminución de las puntas ponto-geniculo-occipitales (PGO) en las primeras seis horas (8).

Hemos reportado el efecto epileptogénico por la aplicación tópica de penicilina G sódica (Pn) subcortical en las preparaciones de gatos crónicos, específicamente cuando el sitio de inyección es la AM (9). En este trabajo se decidió provocar espigas interictales en el NDR mediante la aplicación tópica de Pn, cuya acción es más prolongada que la breve estimulación del *kindling* eléctrico y observar su efecto en veintitrés horas de registro continuo

Método

Se utilizaron cinco gatos machos de entre 3.0 y 4.5 kg. Se hizo la cirugía bajo condiciones asépticas, y la anestesia utilizada fue pentobarbital sódico (33 mg/kg IV). Para el registro de sueño se utilizó un polígrafo Grass 78E. Se implantaron electrodos epidurales de acero inoxidable en forma de clavo, dirigidos hacia la corteza cerebral (pre-frontal y visual) de ambos hemisferios, un electrodo de acero inoxidable paralelo con tres puntas para el registro de las ondas PGO en cada cuerpo geniculado lateral, un electrodo de acero inoxidable bipolar paralelo dirigido hacia la AM izquierda y una cánula-electrodo dirigida en ángulo hacia el

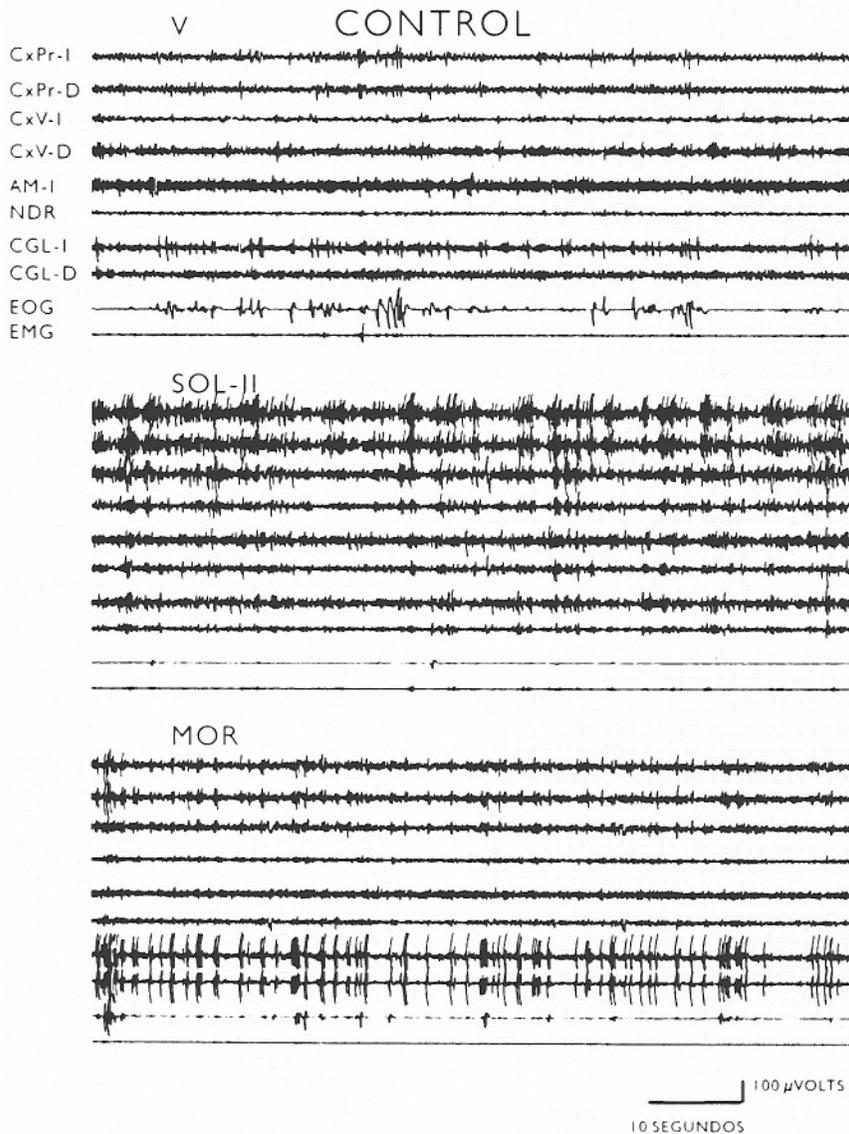


Figura 1. Registro poligráfico en diferentes fases del sueño del gato en situación control, vigilia (V), sueño de ondas lentas (SOL-II) y sueño de movimientos oculares rápidos (MOR). Corteza prefrontal izquierda (CxPr-I), corteza prefrontal derecha (CxPr-D), corteza visual izquierda (CxV-I), corteza visual derecha (CxV-D), corteza de la amígdala del lóbulo temporal izquierda (AM-I), núcleo dorsal del rafe (NDR), cuerpo geniculado lateral izquierdo (CGL-I), cuerpo geniculado lateral derecho (CGL-D), electrooculograma (EOG) y electromiograma (EMG).

NDR (P 0.2, L 0.0, H-1.0 + [10]) siguiendo las coordenadas estereotáxicas (26). además, dos electrodos en forma de clavo incrustados en la órbita del hueso ocular para el registro de los movimientos oculares. El tono muscular se registró en los músculos laterales dorsales de la nuca por medio de dos alambres de acero inoxidable; todos los electrodos se fijaron al cráneo con acrílico dental. Los animales tuvieron un periodo de recuperación de dos semanas, que sirvió como habituación, en cajas sonoamortiguadas usadas para registro. La situación control se registró en cada gato antes de inyectar la Pn.

La Pn se aplicó en el NDR dos veces por semana, con una microjeringa Hamilton, a las 8:30 horas (50 UI/1µl), iniciándose los registros de veintitrés horas. El sueño se calificó manualmente (28) analizando las fases del sueño con un programa (*winsleep*) especialmente diseñado en nuestro laboratorio, en una computadora PC 486/MC25 NCR. La conducta de los animales se analizó utilizando una cámara de video. Al final del experimento se llevó a cabo la verificación histológica de la posición de los electrodos siguiendo la técnica del procedimiento rápido (12).

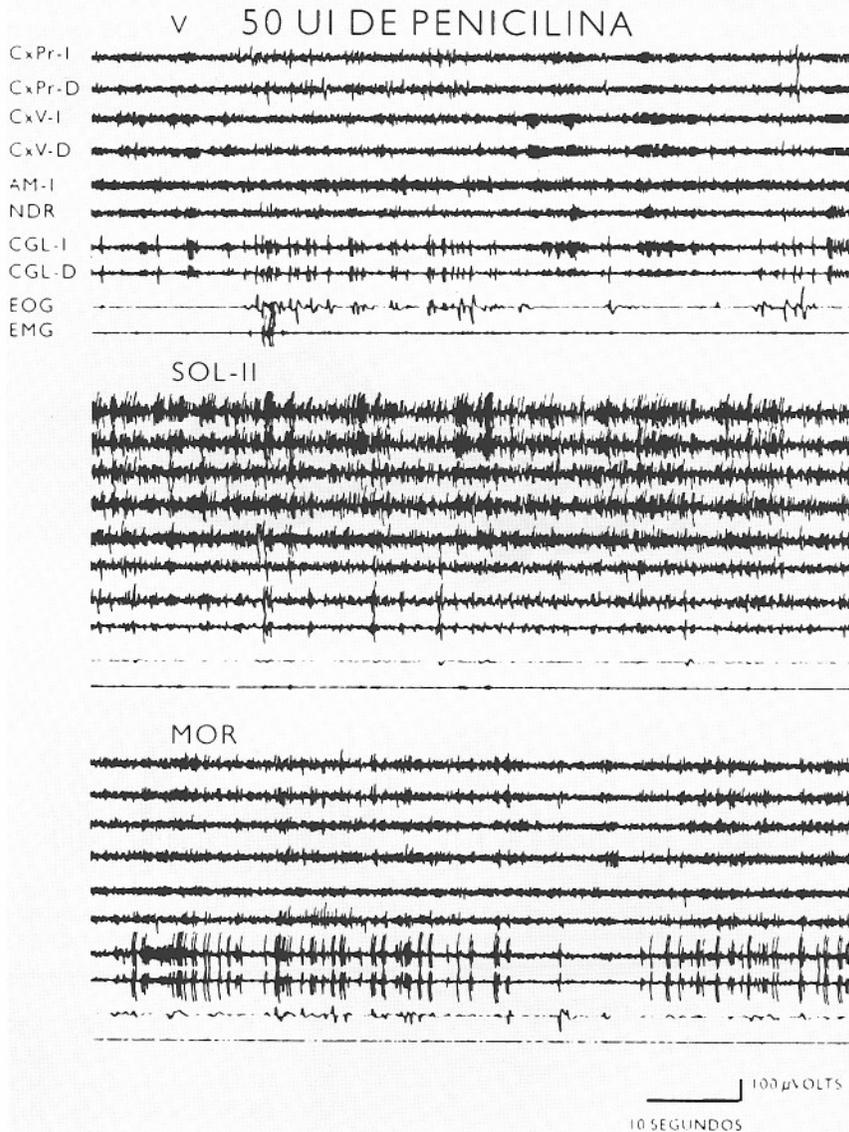


Figura 2. Registro poligráfico de diferentes fases de sueño del gato # 4, en situación experimental después de la cuarta microinyección de 50 Unidades Internacionales UI de penicilina g sódica en un µl de solución salina. La vigilia (V), el sueño de ondas lentas (SOL-II) y el sueño de movimientos oculares rápidos (MOR) son las primeras fases después de la microinyección. Las abreviaturas de las estructuras son como en la figura 1. Nótese que la aplicación de la penicilina en el núcleo dorsal del rafe (N-DR) no produce actividad paroxística.

Resultados

La microinyección de Pn en el NDR no produjo espigas en ningún caso (fig. 1-2). Al mismo tiempo, los animales presentaron acicalamiento compulsivo.

En los registros de veintitrés horas se efectuaron siete controles y veintiocho experimentales; de cada registro se elaboró un hipnograma (fig. 3 y 4). Los veintiocho registros polisomnográficos bajo dosis repetidas de Pn revelaron una disminución no significativa del tiempo total (TT) y del porcentaje de V. El TT y el porcentaje de SOL II aumentó ligeramente. El TT y el porcentaje de MOR mostró un aumento significativo (fig. 6 y 7). Las latencias fueron similares en los registros controles y experimentales. El efecto de la Pn sobre la organización del sueño se describe en el cuadro 1. En la fig. 5 se ilustran los 35 registros en V y el sueño MOR por medio de una gráfica de barras; cada línea corresponde a un registro de 23 horas.

Los resultados histológicos de la colocación de la cánula en el NDR se muestran en el cuadro 2. Este cuadro contiene el nombre del animal, los planos

anteroposteriores (AP), el área estimulada y el número de dosis aplicadas a cada animal.

Discusión

El efecto de la Pn tópica sobre los circuitos neuronales se debe al bloqueo parcial de la inhibición mediada por GABA (19). Los potenciales sinápticos dependientes de GABA_A y GABA_B, y los potenciales intrínsecos Ca²⁺ activados por K⁺, participan en la hiperpolarización tardía de la desviación despolarizante paroxística, generada por la aplicación tópica de Pn (6).

La microinyección de Pn en el NDR no produce espigas interictales ni crisis, y no se inducen signos semejantes a la epileptización, tal como es el caso de la AM, el hipocampo y la corteza motora. Se obtuvieron resultados similares por la estimulación eléctrica de este núcleo (8). En el NDR se ha descrito la distribución de pequeñas interneuronas gabaérgicas que participarían en el control de la actividad funcional del rafe (2,10,15,31). La ausencia de fenómenos paroxísticos

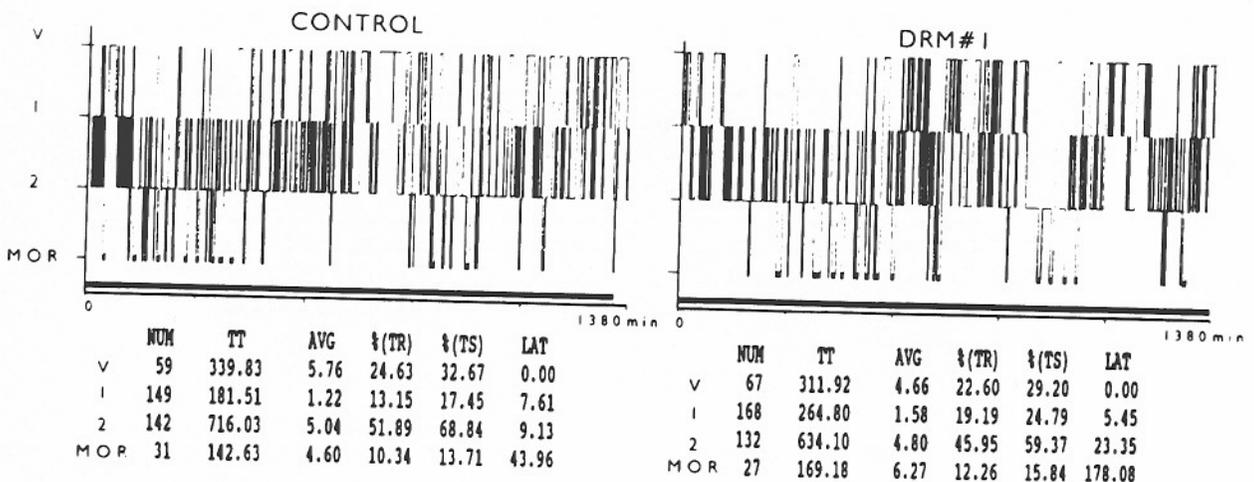
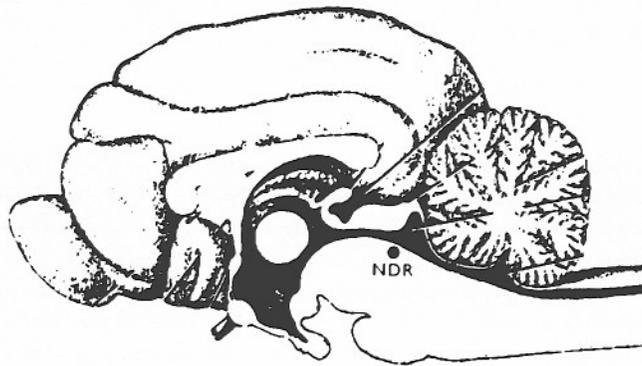


Figura 3. Esquema del cerebro de un gato vista lateralmente, mostrando el sitio de la inyección. Los polisomnogramas muestran la ocurrencia de las fases de sueño en 23 horas de registro continuo del gato en control y la segunda dosis (50 Unidades Internacionales UI de penicilina g sódica en un μ l de solución salina) aplicada al gato DRM #1. En las ordenadas, las letras de los polisomnogramas nos indican la vigilia (V), el sueño de ondas lentas I (1), el sueño de ondas lentas II (2) y el sueño de movimientos oculares rápidos (MOR). En las abscisas, los números representan las horas del tiempo de registro. La barra negra paralela a las abscisas representa el tiempo de análisis, que corresponde a 1380 min.

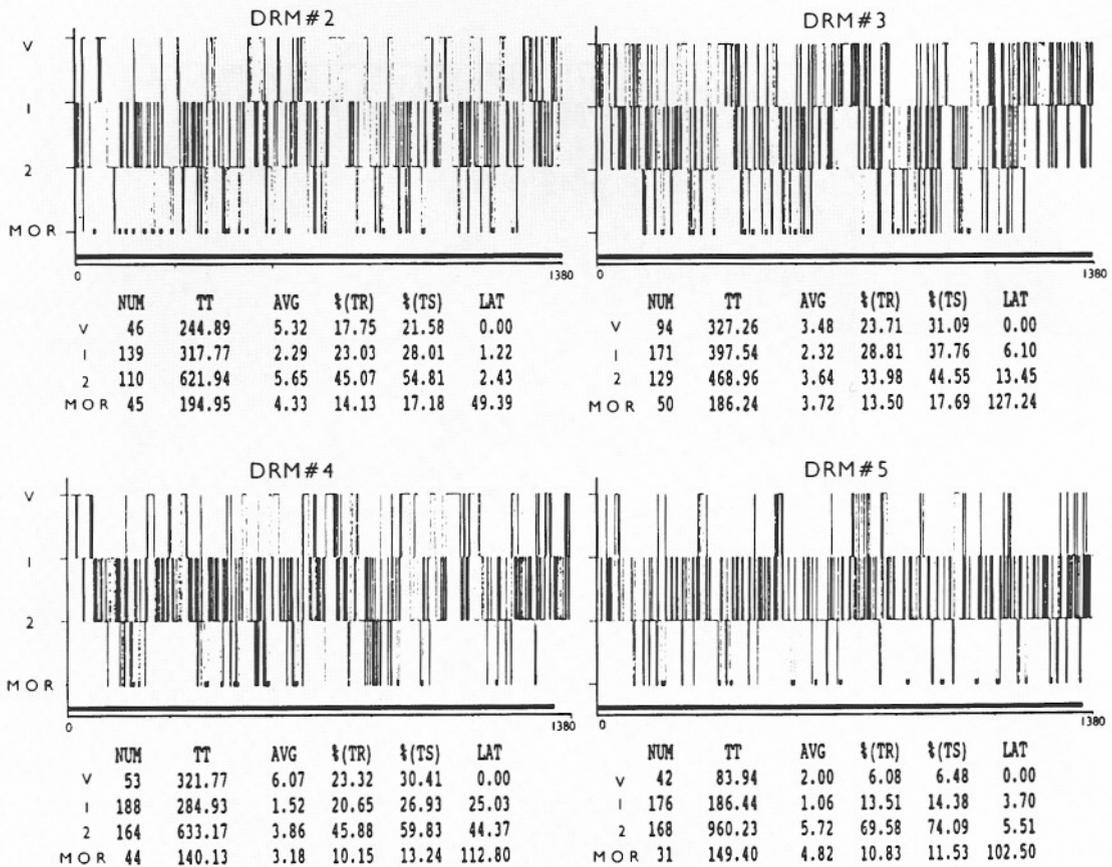


Figura 4. Los polisomnogramas muestran ejemplos de la ocurrencia de las fases de sueño de un registro de 23 horas de los gatos DRM #2, 3, 4, y 5, después de la microinyección de 50 Unidades Internacionales de penicilina g sódica en un μ l de solución salina. En las ordenadas, las letras del polisomnograma nos indican la vigilia (V), el sueño de ondas lentas I (1), el sueño de ondas lentas II (2) y el sueño de movimientos oculares rápidos (MOR). En las abscisas, los números representan las horas del tiempo de registro. La barra negra paralela a las abscisas representa el tiempo de análisis, que corresponde a 1380 min.

Cuadro 1

Efecto de la penicilina aplicada en el NDR sobre la vigilia (V), la fase I del sueño de ondas lentas (SOL-I), la fase II del sueño de ondas lentas (SO [50 Unidades Internacionales UI de penicilina g sódica en un μ l de solución salina] L-II), y en el sueño de movimientos oculares rápidos (MOR)

Fases de sueño		Número de fases	Tiempo total (min)	Duración promedio (min)	Porcentaje	Latencia (min)
V	C	67.5 \pm 32.7	309.3 \pm 136.7	4.7 \pm 1.3	22.4 \pm 9.9	
	P	71.6 \pm 22.0	265.0 \pm 86.6	3.8 \pm 1.2	19.2 \pm 6.3	
SOL-I	C	178.9 \pm 30.0	282.0 \pm 68.9	1.6 \pm 0.3	20.4 \pm 5.0	5.2 \pm 3.0
	P	179.4 \pm 25.5	269.6 \pm 60.5	1.5 \pm 0.4	19.6 \pm 4.4	6.5 \pm 6.0
SOL-II	C	152.6 \pm 15.9	669.1 \pm 143.7	4.5 \pm 1.0	48.5 \pm 10.4	13.5 \pm 9.1
	P	149.0 \pm 21.0	703.0 \pm 129.5	4.7 \pm 0.9	50.8 \pm 9.6	14.8 \pm 13.7
MOR	C	33.1 \pm 4.5	119.5 \pm 34.9	3.6 \pm 1.0	8.7 \pm 2.5	122.1 \pm 86.4
	P	36.3 \pm 7.4	*144.5 \pm 25.1	4.0 \pm 0.9	*10.6 \pm 1.9	80.6 \pm 43.3

Los datos están expresados por la media \pm SD. C Control n = 7; P grupo experimental 50 UI n = 28.

*P < 0.05; (la prueba t-Student de dos colas, c vs p).

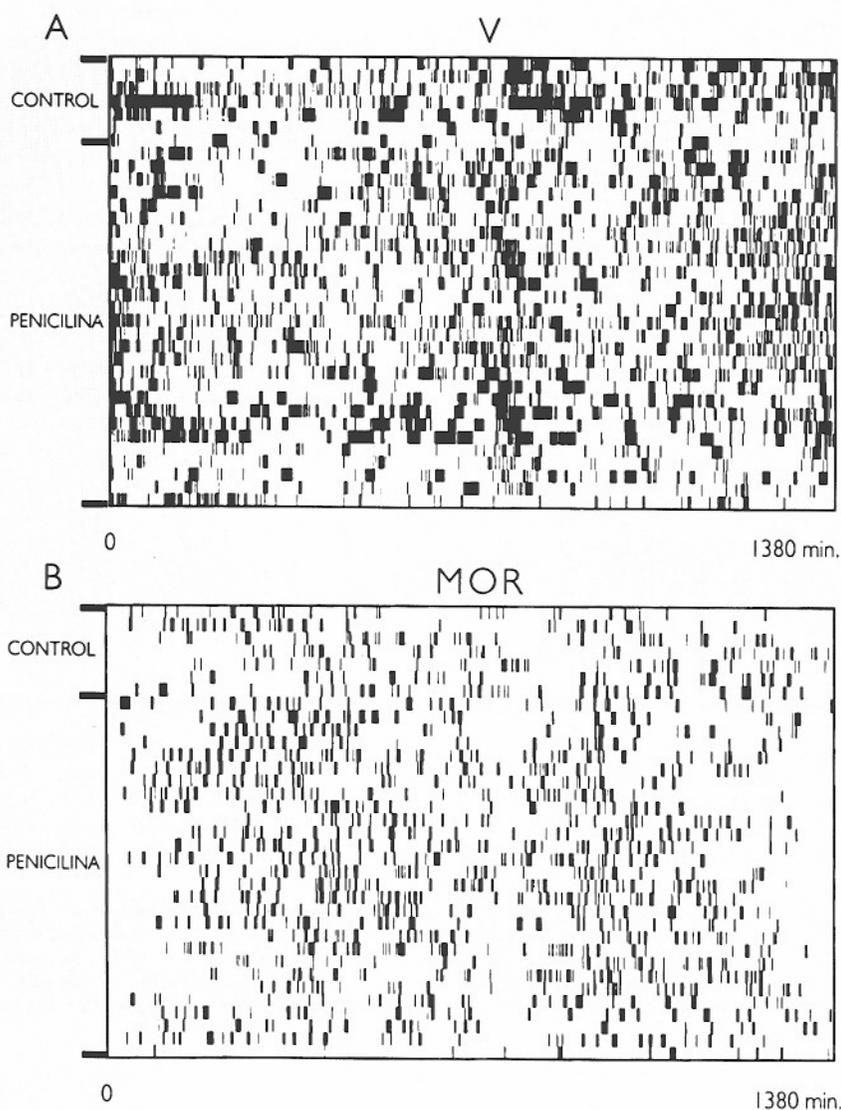


Figura 5. Esta gráfica de barras nos muestra, a manera de resumen, los 35 registros de 23 horas (1380 minutos). Las primeras siete barras corresponden a los controles y las siguientes 28 barras corresponden a los registros experimentales. La figura 5A representa la vigilia (V) y la figura 5B representa el sueño de movimientos oculares rápidos (MOR). El análisis estadístico mostró una diferencia significativa solamente en el MOR.

en el NDR se explica por la carencia de células gabaérgicas grandes locales, proviniendo el *in put* inhibitorio de la habénula lateral y de la formación reticular pontina. Otra explicación de la ausencia de epilepto-

génesis inducida por Pn, sería la ausencia de amino ácidos excitatorios en el NDR. Los receptores del NMDA desempeñan un papel importante en la epileptogénesis por Pn, ya que los antagonistas del NMDA atenúan,

Cuadro 2
La cantidad de penicilina inyectada fue de 50 UI en 1 μ l.

Núm. de gato	AP (mm)*	Area estimulada*	Núm de inyecciones
DRM-1	Post 1.5	N Dorsal rafe	4
DRM-2	Post 1.5	N Dorsal rafe	9
DRM-3	Post 0.5	N <i>Angustus</i>	5
DRM-4	Post 1.5	N Dorsal rafe	5
DRM-5	Post 1.5	Substancia gris	5

*(según el atlas de 24).

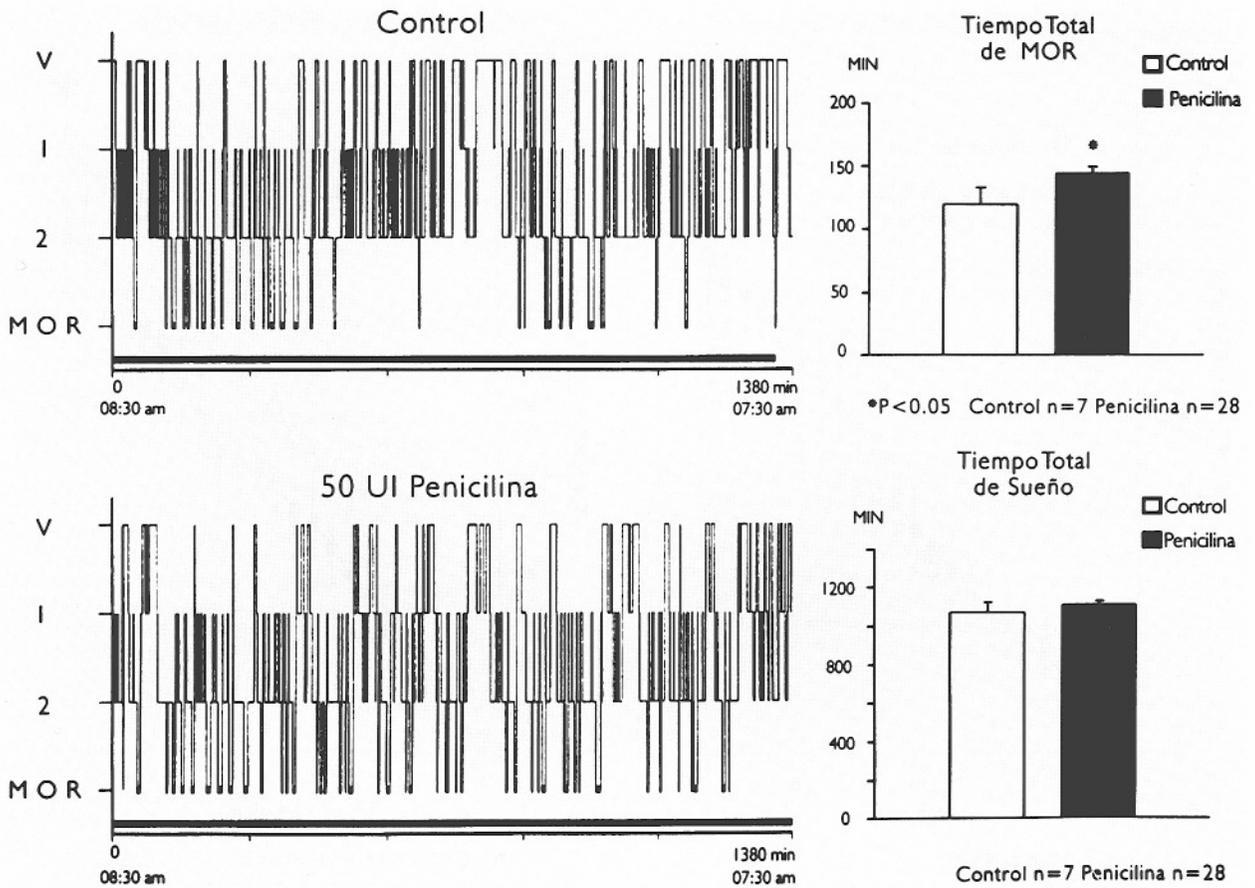


Figura 6. Los polisomnogramas que muestran dos ejemplos de la ocurrencia de las fases de sueño de un registro de 23 horas del gato DRM # 2, en situación control y después de la microinyección de 50 Unidades Internacionales de penicilina g sódica en un ul de solución salina. Las gráficas ilustran el promedio del tiempo total de MOR y de sueño. Nótese la diferencia significativa del MOR en situación experimental. En los polisomnogramas se observa la mayor ocurrencia del MOR y la disminución de la V después de la aplicación de Pn en el NDR. Las abreviaturas son como en la figura 4.

por lo menos, una porción de la descarga paroxística inducida por Pn. Además, la aplicación de un antagonista como el ácido kinurenico reduce la magnitud de la respuesta neuronal evocada por un estímulo fásico auditivo (18).

El acicalamiento compulsivo observado podría ser resultado de la activación de las proyecciones entre el NDR y del núcleo medial del rafe hacia el núcleo *accumbens*, el hipocampo y la AM, lo que incrementaría la actividad motora y activaría al núcleo salival, situado en el campo lateral del *tegmentum* (14, 25, 29). Las inyecciones de agonistas al receptor GABA en el NDR, que muestran un aumento de la actividad motora y del consumo de alimento en ratas, en forma dosis-dependiente (4, 22) sugieren el papel fisiológico del GABA en esta área.

El fenómeno de la inducción del sueño MOR se explicaría por la inhibición, producida por la Pn, sobre las interneuronas gabaérgicas que, a su vez, al liberar a las neuronas serotoninérgicas promoverían la síntesis de los péptidos hipotálamo-hipofisarios CLIP y VIP, cuya administración intraperitoneal, intravenosa o intracerebroventricular induce un aumento del sueño MOR.

La inyección de CLIP en el NDR en las ratas es seguida de un aumento significativo de la cantidad de sueño MOR (5). Los resultados más recientes sugieren que la liberación de serotonina durante la V puede iniciar una cascada de acontecimientos genómicos en algunas neuronas localizadas en el área preóptica. Esta liberación conduce a una regulación homeostática del SOL (17,24) ya que las lesiones disminuyen el nivel de serotonina en el cerebro anterior y disminuyen el sueño de ondas lentas (SOL) relacionado con el nivel bajo de serotonina (16). En las ratas se provoca una vigilia (V) persistente cuando ha sido lesionado el NDR (3). Otros datos apoyan la hipótesis de que el NDR interviene en los mecanismos de la V, más que en la promoción directa del sueño (1,13).

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran el posible papel del *input* gabaérgico sobre los sistemas de neuronas serotoninérgicas del NDR. En conclusión, no se produjeron descargas epileptiformes al microinyectar Pn en el NDR, y los cambios conductuales más notables fueron el acicalamiento compulsivo y la inducción de sueño MOR.

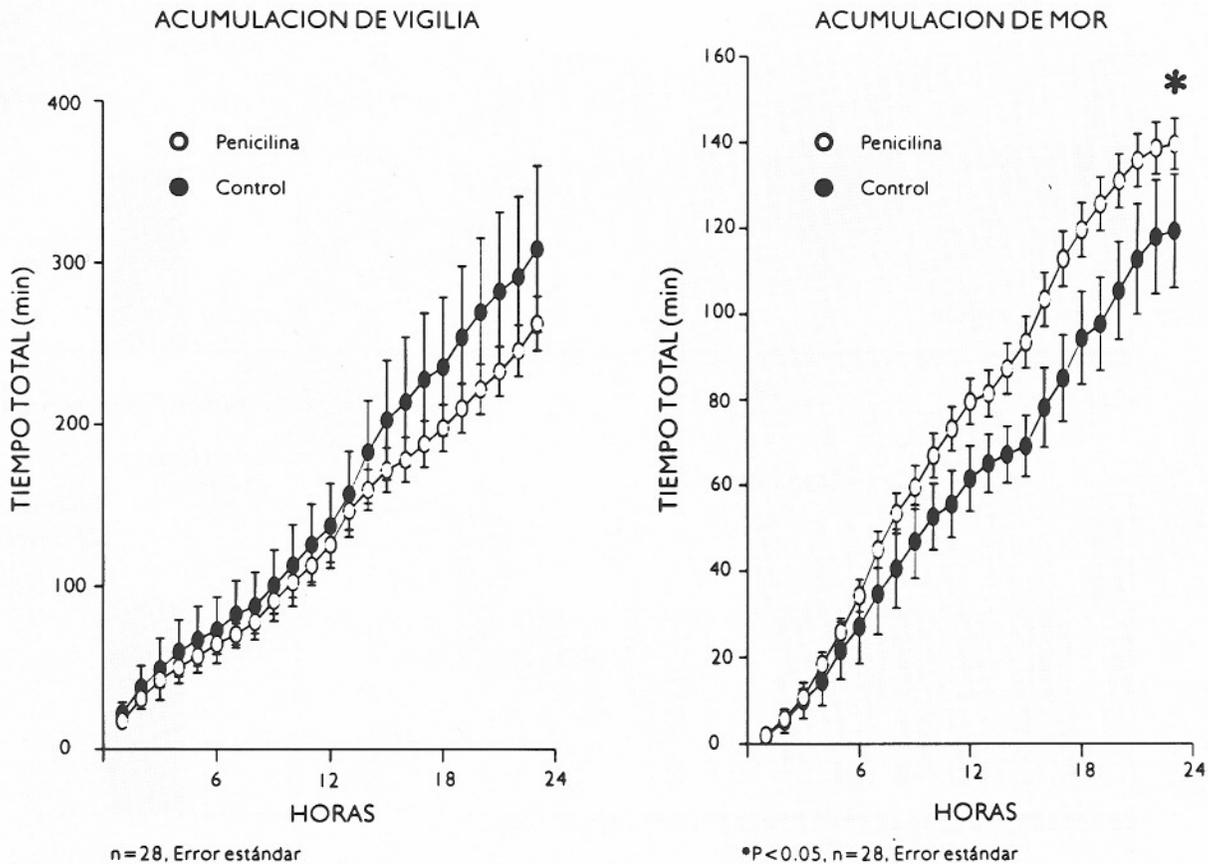


Figura 7. Gráfica de acumulación del tiempo total de sueño de movimientos oculares rápidos (MOR) en situación control y bajo el efecto de la penicilina y sódica. Cada punto representa una hora de registro; y la curva, el tiempo acumulado de la fase. Nótese la diferencia significativa del tiempo total del MOR en situación experimental.

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado parcialmente por CONACyT, Núm. de proyecto D111-903737, y por el Programa Universitario de Investigación en Salud (PUIS)-UNAM. Los autores agradecen la donación de la NCR de México, de una computadora

PC 486/MC25, la cual fue utilizada para los análisis de los experimentos llevados a cabo durante la investigación, así como la asistencia técnica de Armando Solórzano y Alfredo Martínez. Igualmente, agradecemos a Raúl Cardoso por la preparación de las ilustraciones.

REFERENCIAS

1. ARPA-J, DE ANDRES I: Re-examination of the effects of raphe lesions on the sleep/wakefulness cycle states in cats. *J Sleep Res*, 2:96-102, 1993.
2. BELIN MF, AGUERA M, TAPPAZ M, McRAE-DEGUEURCE A, BOBILLIER P, PUJOL JF: Gaba-accumulating neurons in the nucleus raphe dorsalis and periaqueductal gray in the rat: A biochemical and radioautographic study. *Brain Res*, 170:279-297, 1979.
3. BOUHUY S, VAN DEN HOOFDAKKER RH: Effects of midbrain raphe destruction on sleep and locomotor activity in rats. *Physiol Behav*, 19:535-541, 1977.
4. BORSINI F, BENDOTTI C, PRZEWLOCKA B, SAMANIN R: Monoamine involvement in the overeating caused by muscimol injection in the rat nucleus raphe dorsalis and the effects of d-fenfluramine and d-amphetamine. *Eur J Pharmacol*, 94:109-115, 1983.
5. CHASTRETTE N, CESPUGLIO R, JOUVET M: Pro-opiomelano-cortin (POMC)-derived peptides and sleep in the rat. Part 1 -Hypnogenic properties of ACTH derivatives. *Neuropeptides*, 15:61-74, 1990.
6. DICHTER MA, AYALA GF: Cellular mechanisms epilepsy: A status report. *Science*, 237:157-164, 1987.
7. DELORME F, FROMENT JL, JOUVET M: Suppression du sommeil par la pchlorométhamphétamine et p-chlorophénylalanine. *CR Soc Biol (Paris)*, 160:2347-2351, 1966.
8. FERNANDEZ-GUARDIOLA A, JURADO JL, CALVO JM: Repetitive low-intensity electrical stimulation of cat's nonlimbic brain structures: dorsal raphe nucleus kindling. En JA Wada (ed). *Kindling 2*. Raven Press, Nueva York, 123-135, 1981.
9. FERNANDEZ-GUARDIOLA A, MARTINEZ A, FERNANDEZ-MAS R: Repeated penicillin-induced amygdala epileptic focus in freely moving cats. EEG, polysomnographic (23 h recording), and brain mapping study. *Epilepsy Res*, 22:127-136, 1995.
10. GAMRANI H, CALAS A, BELIN MF, AGUERA M, PUJOL JF: High resolution radioautographic identification of [³H]-GABA labeled neurons in the rat nucleus raphe dorsalis. *Neurosci Lett*, 15:43-48, 1979.
11. GODDARD G V, MCINTYRE D C, LEECH CK: A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Exp Neurol*, 25:295-330, 1969.
12. GUZMAN-FLORES C, ALCARAZ M, FERNANDEZ-GUARDIOLA A: Rapid procedure to localize electrodes

- in experimental neurophysiology. *Bol Est Méd Biol (Méx)*, 16:29-31, 1958.
13. HERNANDEZ-PEON R, DRUCKER R, RAMIREZ DEL ANGEL A, CHAVEZ B, SERRANO P: Brain catecholamines and serotonin in rapid sleep deprivation. *Physiol Behav*, 4:659-661, 1969.
 14. HILLEGART V, AHLENIUS S, LARSSON K: Effects of local application of 5-HT into the median and dorsal raphe nuclei on male rat sexual and motor behavior. *Behav Brain-Res*, 33:279-286, 1989.
 15. HOLMES CJ, MAINVILLE LS, JONES BE: Distribution of cholinergic, gabaergic and serotonergic neurons in the medial medullary reticular formation and their projections studied by cytotoxic lesions in the cat. *Neuroscience*, 62:1155-1178, 1994.
 16. JOUVET M: Biogenic amines and sleep states. *Science*, 163:32-41, 1969.
 17. JOUVET M: Serotonin and sleep: An unfinished story. *MED-SCI. Medecine/Sciences*, 11:886-893, 1995.
 18. LEVINE ES, JACOBS BL: Neurochemical afferents controlling the activity of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus: Microiontophoretic studies in the awake cat. *J Neurosci*, 12:4037-4044, 1992.
 19. LOEB C, BO GP, SCOTTO A, BENASSI B, BESIO G, MINARDI P, FAVERIO A: GABA and phospholipids in penicillin-induced seizures. *Exp Neurol*, 90:278-280, 1985.
 20. MATSUMOTO J, JOUVET M: Effects de reserpine, DOPA et 5-HTP sur les 2 états de sommeil. *CR Soc Biol (Paris)*, 158:2137-2140, 1964.
 21. PETROV T, KRUKOFF TL, JHAMANDAS JH: The hypothalamic paraventricular and lateral parabrachial nuclei receive collaterals from raphe nucleus neurons: A combined couple retrograde and immunocytochemical study. *J Comp Neurol*, 318:18-26, 1992.
 22. PRZEWLOCKA B, STALA L, SCHEEL-KRUGER J: Evidence that GABA in the nucleus rapheus dorsalis induces stimulation of locomotor activity and eating behavior. *Life Sci*, 25:937-946, 1979.
 23. RACINE R, COSCINA DV: Effects of midbrain raphe lesions or systemic p-Chlorophenylalanine on the development of kindled seizures in rats. *Brain Res Bull*, 4:1-7, 1979.
 24. SALLANON M, JANIN M, BUDA C, JOUVET M: Serotonergic mechanisms and sleep rebound. *Brain Res*, 268:95-104, 1983.
 25. SIEGEL J, MURPHY GJ: Serotonergic inhibition of amygdala-kindled seizures in cats. *Brain Res*, 174:337-340, 1979.
 26. SNIDER RS, NIEMER WT: *A Stereotaxic Atlas of the Cat Brain*. University of Chicago Press. Chicago, 1961.
 27. TAKEUCHI Y, FUKUI Y, ICHIYAMA M, MIYOSHI S, NISHIMURA Y: Direct amygdaloid projections to the superior salivatory nucleus: A light and electron microscopic study in the cat. *Brain Res Bull*, 27:85-92, 1992.
 28. URSIN R, STERMAN MB: *A Manual for Standardized Scoring of Sleep and Waking States in the Adult Cat*. University of California. Los Angeles, 1981.
 29. VERTES-RP, KOCIS B: Projections of the dorsal raphe nucleus to the brainstem: PHA-L analysis in the rat. *J Comp Neurol*, 340:11-26, 1994.
 30. VOGT M: Some functional aspects of central serotonergic neurons. En: N N Osborne (ed). *Biology of Serotonergic Transmission*. Wiley, Chichester, 299-315, 1982.
 31. WANG R Y, AGHAJANIAN G K: Physiological evidence for habenula as major link between forebrain and midbrain raphe. *Science*, 197:89-91, 1977.
 32. WHITAKER-AZMITIA PM, PEROUTKA SJ: *The Neuro-Pharmacology of Serotonin*. Academy of Science. Nueva York, 1990.