



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“ADMINISTRACIÓN AGUDA DE METILBENCENO Y SU EFECTO
SOBRE LOS PATRONES DEL SUEÑO Y CONTENIDO DE
MONOAMINAS EN CEREBRO DE RATAS WISTAR”

TESIS

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

PRESE NTA

SAMUEL CALDERÓN MARTÍNEZ

Asesores:

DR. PEDRO SÁNCHEZ APARICIO

DR. ALFONSO ALFARO RODRÍGUEZ

DR. SERGIO RECILLAS MORALES



TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO, NOVIEMBRE 2017

TÍTULO

“ADMINISTRACIÓN AGUDA DE METILBENCENO Y SU EFECTO
SOBRE LOS PATRONES DEL SUEÑO Y CONTENIDO DE
MONOAMINAS EN CEREBRO DE RATAS WISTAR”

AGRADECIMIENTOS

A DIOS Y LA VIRGEN

A MIS PADRES Y HERMANOS

A MI FAMILIA

DEDICATORIA

A DIOS Y LA VIRGEN

A MIS PADRES Y HERMANOS

A MI FAMILIA

Índice

ÍNDICE DE CUADROS.....	7
ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
ÍNDICE DE IMAGENES.....	8
RESUMEN.....	9
INTRODUCCIÓN.....	10
REVISIÓN DE LITERATURA.....	11
1.- Problemática de agentes inhalatorios y drogas en jóvenes	11
2.- Tolueno	12
2.1 Caracterización del tolueno	12
2.2 Relación Tolueno-hombre-animal	12
2.3 Efecto del Tolueno en el organismo.....	13
3.- Sueño	14
3.1 Caracterización de los patrones de sueño	14
3.2. Fases de sueño	15
3.2.1. Vigilia.....	16
3.2.2. Sueño NMOR.....	16
3.2.2.1 Fase 1	16
3.2.2.2 Fase 2	17
3.2.2.3 Fase 3	18
3.2.3. Sueño MOR	19
3.3 La importancia del buen dormir	20
4.- Electroencefalograma	21
4.1 Aplicación clínica del EEG	22
5. Uso de la rata como modelo animal de laboratorio	23
JUSTIFICACIÓN.....	24
HIPÓTESIS	25
OBJETIVOS	25
GENERAL.....	25
ESPECÍFICOS	25
MATERIAL.....	26
MÉTODOLÓGIA	27
Número de Animales y Localización.....	27
1.2. Manipulación	28
Diseño experimental.....	28
ANÁLISIS DE DATOS.....	34

ADMINISTRACIÓN AGUDA DE METILBENCENO Y SU EFECTO SOBRE LOS PATRONES DEL SUEÑO Y CONTENIDO DE MONOAMINAS EN CEREBRO DE RATAS WISTAR

LIMITE DE ESPACIO	35
LÍMITE DE TIEMPO.....	36
RESULTADOS	37
DISCUSIÓN.....	43
CONCLUSIÓN.....	46
LITERATURA CITADA	47
GLOSARIO.....	54

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Título del cuadro	Página
Cuadro 1.	Tratamientos, grupo control y grupo experimental.	28
Cuadro 2.	Cronograma de actividades.	36
Cuadro 3.	Parámetros de sueño (media \pm S.E.M.) durante 24 h en ratas.	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título de la figura	Página
Figura 1.	Características de las ondas durante la vigilia.	16
Figura 2.	Características de las ondas durante la fase 1 del sueño.	17
Figura 3.	Características de las ondas durante las fases 2 del sueño.	18
Figura 4.	Características de las ondas durante la fase 3 del sueño.	18
Figura 5.	Características de las ondas durante la fase de sueño MOR.	19
Figura 6.	Ubicación del Instituto Nacional de Rehabilitación.	35
Figura 7.	Concentración media de contenido de monoaminas del mesencéfalo.	38
Figura 8.	Concentración del contenido de monoaminas en estriado.	39
Figura 9.	Concentración del contenido de serotonina (5-HT).	40
Figura 10.	Concentración del contenido de ácido 5-hidroxiindolacético.	40,41
Figura 11.	Volumen de dopamina (DOPAC+HVA/DA) en el mesencéfalo y estriado.	41
Figura 12.	Volumen de serotonina (relación 5-HIAA/5-HT) en el mesencéfalo y puente.	42

ÍNDICE DE IMAGENES

Imagen	Título de la imagen	Página
Imagen 1.	Rasurado y embrocado de la parte dorsal del cráneo de una rata Wistar.	29
Imagen 2.	Incisión en la parte dorsal del cráneo para identificar la unión de suturas craneales denominada “Bregma”.	30
Imagen 3.	Identificación de la unión de suturas craneales denominada “Bregma”.	30
Imagen 4.	Realización del trepano para continuar con la colocación de la cánula guía de acero inoxidable.	31
Imagen 5.	Implantación de una cánula guía de acero inoxidable.	31
Imagen 6.	Lectura de coordenadas (-3.2 mm antero-posterior, +/- 3.2 mm lateral y -5.5 mm ventral a partir de “Bregma” según Paxinos <i>et al.</i> 2004).	31
Imagen 7.	Implantación de electrodos bipolares de acero inoxidable.	32
Imagen 8.	Electrodo soldado y asegurado al cráneo con acrílico dental.	32

RESUMEN

Durante los últimos años se ha presentado una tendencia de aumento en el abuso de drogas o agentes inhalantes comúnmente utilizados por trabajadores y jóvenes. El metilbenceno es uno de los solventes orgánicos aplicados en pinturas, pegamentos, gasolina y limpiadores de PVC. Esta problemática, ha sido asociada a la presencia de alteraciones en los trastornos del sueño en personas que laboran en fábricas de productos hechos con solventes como el metilbenceno. El objetivo del presente trabajo consistió en evaluar el efecto del metilbenceno sobre los patrones del sueño y el contenido de monoaminas en cerebros de ratas wistar. Se utilizaron 20 ratas Wistar macho, las cuales fueron distribuidas de forma aleatoria para integrar dos grupos. El grupo I o control, recibió Na Cl al 0,9% y el grupo II recibió 1,5 g de tolueno por kg de peso corporal 15 minutos antes del registro electroencefalográfico (EEG). Los animales fueron eutanaziados después de 24 h de la administración de tolueno. Se encontró que la administración del tolueno afectó la organización de los patrones de sueño ya que el Sueño de Ondas lentas (SOL) aumentó de manera significativa (* $p < 0.01$), el Sueño Paradójico (SP) disminuyó significativamente (** $p < 0.002$) y la Vigilia (V) presentó un déficit (* $p < 0.01$). Respecto al contenido de monoaminas, se encontró que dopamina (DA) y su metabolito noradrenalina (NA) aumentaron a nivel del estriado. El contenido de receptores de serotonina (5-HT) a nivel del mesencéfalo aumento en el puente y produjo disminución en el hipotálamo y estriado. El aumento de Ácido 5-Hidroindolacético (5-HIAA) en el puente, mesencéfalo y estriado fue notorio, aunque disminuyó en el hipotálamo. La administración de tolueno en dosis únicas induce cambios en el sistema serotoninérgico y dopaminérgico. Este estudio mostró un aumento del proceso inhibitor que induce la excitación por el uso de tolueno.

INTRODUCCIÓN

Durante la última década, se ha registrado un incremento en el abuso de drogas o agentes inhalantes, tendencia dramáticamente marcada en los jóvenes. El tolueno es uno de los solventes orgánicos aplicados en pinturas, pegamentos, gasolina y limpiadores de PVC (Anderson y Loomis, 2003; Echeverría *et al.*, 1991; Lucchini, 2000). La inhalación de los productos que contienen tolueno provoca alteraciones sobre el sistema nervioso central y periférico, que se manifiestan con dolor, dolor de cabeza, vértigo, olvido, fatiga, lasitud, pérdida o disminución del apetito, insomnio y trastornos del sueño.

La inhalación de tolueno altera la función de una gran variedad de canales iónicos activados por ATP, y actúan sobre; acetilcolina, GABA, glutamato y serotonina (5-HT), así como canales de sodio y calcio dependientes del voltaje (Chien-Lu *et al.*, 2007; Bale *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 2005). La administración repetida de tolueno provoca una disminución grave sobre la conducta, sobre todo en el estado de alerta en los animales (Takeuchi y Hisanga, 1977; Chen y Lee, 2002). Hasta la fecha, se han propuesto diversos mecanismos que tratan de explicar los efectos tóxicos del tolueno. Una de estas explicaciones, señala que el tolueno podría interrumpir la función de la membrana neural mediante una división no específica dentro de la bicapa lipídica y actúa sobre la región hidrofóbica de las proteínas integrales de la membrana. Respecto a la conducta del sueño, se sabe que el insomnio parcial y la hiperactividad inducidas por tolueno están asociadas con concentraciones reducidas de 5-HT, aumento en los niveles de noradrenalina cortical (NA) y ácido 5-Hidroxiindolacético (5-HIAA) (Von Euler *et al.*, 1998; Yamawaki *et al.*, 1982; Arito *et al.*, 1985). Además, se ha postulado que la exposición aguda de tolueno en modelos animales, afecta la actividad eléctrica del corazón. El objetivo del presente estudio consistió en realizar la administración aguda de metilbenceno y evaluar su efecto sobre los patrones del sueño y contenido de monoaminas en cerebro de ratas wistar.

REVISIÓN DE LITERATURA

1.- Problemática de agentes inhalatorios y drogas en jóvenes

Durante los últimos años, se ha presentado una tendencia en aumento del abuso de drogas o agentes inhalantes. Un estudio realizado por Medina-Mora *et al.* (1997) señalaron que dentro de las causas de inhalación de los jóvenes se incluyen el maltrato o abuso sexual, así como por haber perdido un familiar cercano. Otras causas pueden ser los problemas cotidianos con comerciantes e incluso la violencia policiaca. Finalmente, y no menos importante, la falta de programas de prevención del uso de drogas o de disminución de riesgos asociados con la inhalación de inhalantes (Gutiérrez y Vega, 1999).

Encuestas realizadas con niñas y niños, señalan que cuando están bajo los efectos de drogas inhalantes, aumenta el riesgo de abuso sexual, dejan de comer o beber agua, además de sufrir accidentes o participar en peleas. La mayoría de los llamados “niños de la calle” usan inhalantes a base de tolueno o metilbenceno para drogarse, olvidar, distraerse, consolarse, relajarse o simplemente porque no pueden dejar de hacerlo, pues, según ellos, es su vicio. Todos ellos tienen varios motivos para querer cambiar su estado de ánimo que, conforme al modelo modificado de estrés social, se debe a las vicisitudes graves, los problemas cotidianos, los vínculos sociales y la falta de recursos institucionales (OMS/PSA, 1995).

Aunque en México, hay recursos gubernamentales para elaborar programas que podrían o deberían ayudar a las niñas y niños a evitar o a disminuir el uso de inhalables, así como los riesgos que esto implica, no se han hecho programas para trabajar en las calles, si no solo para atender a poblaciones diferentes a la de los niños “callejeros”, y casi siempre están destinados a curarlos cuando acuden a los consultorios. Aunque hay algunos dedicados a la prevención fuera de las instituciones, casi todos están dirigidos a los niños que van a la escuela (Gutiérrez y Vega, 1999).

Otra problemática reportada, ha sido asociada a la presencia de alteraciones en los trastornos del sueño en personas que laboran en fábricas de productos hechos con solventes como el metilbenceno. El tolueno es uno de los solventes orgánicos aplicados en pinturas, pegamentos, gasolina y limpiadores de PVC (Anderson y Loomis, 2003; Echeverría *et al.*; 1991; Lucchini, 2000). Su inhalación provoca síntomas que alteran el sistema nervioso

central y autónomo, generando insomnio y trastornos del sueño (Chien-Lu *et al.*, 2007; Bale *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 2005).

2.- Tolueno

Es un líquido incoloro transparente, considerado como solvente, es producido en el proceso de manufactura de la gasolina y de otros combustibles a partir del petróleo crudo y en la manufactura de coque a partir del carbón. Se usa en la fabricación de pinturas, diluyentes de pinturas, barniz para las uñas, lacas, adhesivos, caucho, imprenta y curtido de cueros, manufactura de benceno, nylon, plásticos, poliuretano, síntesis de trinitrotolueno (TNT), ácido benzoico, cloruro de benzoilo y tolueno diisocianato. También se añade a la gasolina junto a benceno y xileno para mejorar el octanaje.

2.1 Caracterización del tolueno

El tolueno puede ser liberado al aire, agua y suelo en lugares donde se produce o usa, se encuentra comúnmente en el aire, especialmente cuando hay mucho tráfico de vehículos. En Estados Unidos se ha realizado monitoreo del aire libre, demostrando que el tolueno está presente en niveles aproximados de 1 a 35 partes por billón en volumen (ppbv). También se ha demostrado que en los espacios o sitios donde se usan productos como son: diluyentes de pintura, solventes, o productos de tabaco, los niveles de tolueno son más altos que en espacios abiertos. El tolueno se evaporará fácilmente al aire, si se encuentra en la superficie del suelo se evapora rápidamente al aire o puede ser degradado rápidamente a otras sustancias químicas por microorganismos.

2.2 Relación Tolueno-hombre-animal

El tolueno puede ingresar al organismo si es transportado en aire, agua o suelo. La exposición se da al inspirar tolueno disperso en el aire libre. La gasolina y otros productos que se usan en el trabajo o en el hogar, por ejemplo, solventes o diluyentes de pintura, contienen tolueno. El tolueno inhalado pasa directamente a la sangre a través de los pulmones, los factores asociados a la edad, sexo, índice de masa corporal y estado de salud afectan la disposición de tolueno en el cuerpo.

2.3 Efecto del Tolueno en el organismo

Existe posibilidad de que el tolueno afecte el sistema nervioso, los efectos sobre el sistema nervioso pueden ser pasajeros, destacando dolores de cabeza, mareo o pérdida del conocimiento. Sin embargo, efectos tales como incoordinación, alteraciones mentales y pérdida de la visión y la audición pueden transformarse en permanentes con exposición repetida, especialmente en concentraciones asociadas con inhalación intencional de solventes. La exposición a niveles altos de tolueno durante el embarazo, como los asociados con inhalación intencional de solventes, puede producir retraso mental y alteraciones del crecimiento en niños. Otros efectos que pueden causar preocupación incluyen los efectos negativos sobre el riñón, hígado y sistema reproductor. Exposiciones únicas a tolueno o exposiciones repetidas durante unas semanas puede producir dolores de cabeza y somnolencia y puede alterar la capacidad para pensar claramente. Dependiendo de la concentración y exposición a la que se estuvo expuesto, serán las consecuencias negativas a nivel genético, sobre todo cuando se es adicto al solvente. Por lo que la exposición continua provoca somnolencia y hasta la pérdida del conocimiento, esto se agrava hasta producir la muerte, al interferir con la respiración y las contracciones del corazón. Cuando la exposición cesa, la somnolencia y el mareo desaparecerán y puede llegar a un estado normal.

La exposición diaria en el trabajo a cantidades bajas o moderadas puede producir cansancio, confusión, debilidad, sensación de embriaguez, pérdida de la memoria, náusea y pérdida del apetito. La exposición de tolueno en el trabajo por un período prolongado puede generar cierto grado de sordera y pérdida de la visión. El uso de ciertos medicamentos, como por ejemplo aspirina y paracetamol, durante exposición al tolueno puede agravar los efectos del tolueno sobre la audición. Aún se desconoce si los niveles bajos de tolueno respirados en el trabajo pueden producir efectos permanentes en el cerebro o en el cuerpo luego de muchos años de exposición.

Los efectos del tolueno en animales como la rata y el ratón *balb-c*, son similares a los observados en seres humanos. Los animales expuestos a cantidades moderadas o altas de tolueno también pueden experimentar efectos adversos en hígado, riñones, pulmones y sistema inmune.

3.- Sueño

El sueño es una actividad fisiológica necesaria para la homeostasis de los seres vivos, sin embargo, es considerado altamente susceptible a sufrir alteraciones por diversos factores externos y como consecuencia modificar la fisiología del organismo. De manera normal, el embarazo provoca cambios en los patrones del sueño que persisten y predisponen a la madre a sufrir alteraciones anormales, así como modificar la actividad fetal y el sueño neonatal. A continuación, se identifican las fases del sueño y sus alteraciones durante el embarazo normal y/o anormal, así como los cambios cíclicos en la actividad eléctrica cerebral y en otros parámetros fisiológicos.

La importancia del estudio del sueño y su relación con muchas otras funciones del organismo radica en su actividad bioquímica y en la información que nos ofrece. Llaguno *et al.* (2015), realizaron estudios en el ser humano, indicando que el sueño es una parte integral y básica del ciclo “actividad-reposo”, la cual resulta ser necesaria para la homeostasis, independientemente de la etapa de desarrollo y que se encuentra presente en todas las formas de vida. Este fenómeno se caracteriza por una posición reclinada, ojos cerrados, disminución del movimiento y disminución de la capacidad de respuesta al ambiente interno y externo (Markov y Goldman, 2006). Aunque el sueño es un fenómeno del SNC, se puede considerar altamente susceptible a alteraciones debido a factores estresantes que se originan fuera del SNC (Rose *et al.*, 2001). Por lo tanto, el buen dormir resulta de importancia en la homeostasis del organismo.

El sueño no es un proceso único, es decir, sigue un patrón determinado denominado hipnograma. En el humano está constituido por 2 fases del dormir. El sueño sin movimientos oculares (NMOR), constituido por tres estadios y una fase de sueño paradójico o sueño de movimientos oculares rápidos (MOR), procesos naturales y fisiológicamente importantes e indispensables para la reparación a nivel físico y mental.

Su estudio y cuantificación son llevados a cabo mediante técnicas electrofisiológicas, fisiológicas y de índices conductuales.

3.1 Caracterización de los patrones de sueño

El electroencefalograma (EEG), se define como la actividad eléctrica de un tipo alterno registrado desde la superficie del cuero cabelludo después de ser recogido por electrodos metálicos y medios conductores. Es un testimonio de función o disfunción integrada de materia blanca y gris, y permanece como una medición importante de la integridad del sistema nervioso central (SNC), que ha permitido el establecimiento de diferentes estados electrofisiológicos y conductuales (Teplan, 2002). Baghdoyan y Lydic, (2002) señalaron que el EEG está “desincronizado” durante la vigilia y el sueño MOR (en contraste con la sincronización durante el sueño con NMOR), dejando evidencia de que durante los estados excitados del cerebro (vigilia y sueño MOR) hay activación de la formación reticular mesencefálica y actividad oscilatoria en la banda de frecuencias gamma (<30Hz), además de mejora en la sincronización de las respuestas corticales, las cuales juegan un papel importante en el procesamiento de señales sensoriales.

3.2. Fases de sueño

Si existe alguna característica que define verdaderamente al sueño, es su falta de uniformidad. A lo largo de la noche, suceden numerosos cambios cíclicos en la actividad eléctrica cerebral y en otros parámetros fisiológicos y de comportamiento, que han servido como criterio para dividir al proceso del sueño en diversas fases (Salín-Pascual, 2009).

Cuando un sujeto se dispone a dormir, la actividad eléctrica de su cerebro cambia al pasar del estado de vigilia al de sueño, dicho cambio no es constante para toda la noche, sino que a lo largo de ella se modifica varias veces. Los cambios observados son tan claros que han permitido clasificar varias fases de sueño.

A la técnica de registro continuo y simultáneo de las variables fisiológicas que definen las etapas del sueño y la vigilia se denomina polisomnografía. Los tres parámetros básicos de registro son la actividad cerebral, registrada a través de EEG, tono muscular, registrado a través de electromiograma (EMG) y los movimientos oculares, a través de electrooculograma (EOG) (Markov y Goldman, 2006). El electrocardiograma (EKG), el registro de flujo aéreo respiratorio y registro de movimientos de los miembros inferiores son otras variables, a menudo incluidas en el registro polisomnográfico (RPSG).

Tradicionalmente, el ciclo sueño-vigilia en el adulto es determinado por distintos patrones de EEG conocidos como "las fases de vigilia y sueño", las cuales se correlacionan bien con

alguna de las características fisiológicas, bioquímicas y conductuales observadas durante estos procesos. Esas fases son vigilia (V), sueño NMOR y sueño MOR.

3.2.1. Vigilia

El ritmo beta es característico del estado de vigilia activa; se presenta cuando el sujeto realiza alguna operación mental, o se le aplica algún estímulo sensorial, cuando abre los ojos, o al dirigir su atención visual hacia algún objeto. La vigilia relajada se caracteriza por ritmo alfa de bajo voltaje, que consiste en ondas sinusoidales rítmicas de 9 a 10 Hz registradas sobre la región occipital de la cabeza con ojos cerrados. La medición de frecuencia cardíaca y respiratoria, no suelen ser suficientes para reconocer las fases, de éste modo, el incremento en el tono muscular puede ayudar a identificar el estado de vigilia del sujeto (Figura 1) (Zeng *et al.*, 2012).

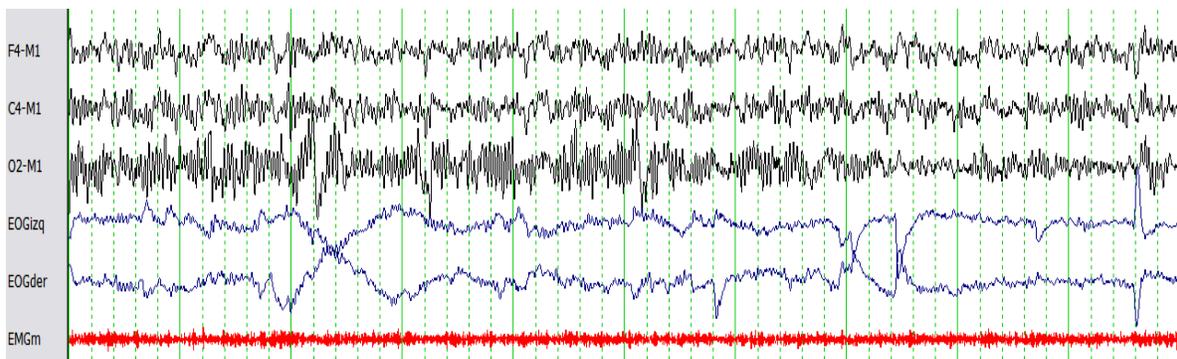


Figura 1. Características de las ondas durante la vigilia. Las letras F-4-M1, C-4 M1 y O2-M1, son electrodos en el cuero cabelludo, para leer el EEG, que da información sobre si se está dormido o despierto, y sobre la fase de sueño en la que se encuentra. Los electrodos oculares, ojo izquierdo (EOGizq) y ojo derecho (EOGder) miden los movimientos oculares y el EMGm mide la actividad muscular o tono muscular.

3.2.2. Sueño NMOR

3.2.2.1 Fase 1

También llamada de somnolencia, aumenta la frecuencia y regularidad de la actividad theta (4-7 HZ) en el hipocampo. Se presentan alternadas las ondas beta (15-20 HZ) que

representan la actividad cortical rápida. Esta fase corresponde a la transición sueño-vigilia, aún cuando se mantiene cierto contacto con la realidad. La fase 1 aparece fundamentalmente durante la transición de la vigilia al sueño, o después de movimientos corporales durante el sueño. Durante el sueño normal, la fase 1 tiende a ser relativamente corta, dentro de un rango de 1 a 7 minutos. La fase 1 de sueño normalmente ocupa de 4-5% del tiempo total de sueño (Figura 2).

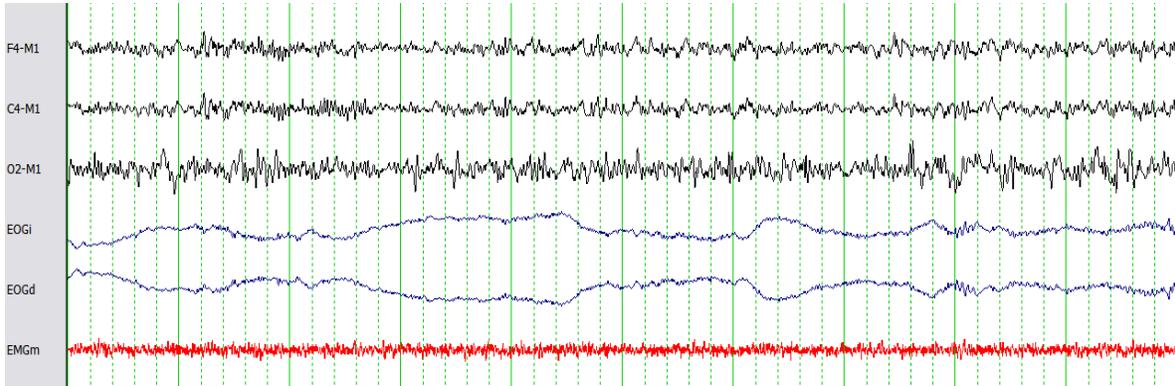


Figura 2. Características de las ondas durante la fase 1 del sueño. Las letras F-4-M1, C-4 M1 y O2-M1, son electrodos en el cuero cabelludo, para leer el EEG, que muestra las ondas alfa y beta, características en esta fase de sueño. Los electrodos oculares, ojo izquierdo (EOGi) y ojo derecho (EOGd) presentan los movimientos musculares y el EMGm muestra el tono muscular que se encuentra activo.

3.2.2.2 Fase 2

Posterior a la fase 1, se acentúa la expresión de la actividad talámica; además aparecen husos de sueño (12-14 HZ). En esta etapa también aparecen, principalmente en el vértex los denominados complejos K (Onda negativa de alto voltaje seguida de un componente positivo). Así, esta fase se define por la presencia de husos del sueño o complejos K y por la ausencia de suficientes ondas lentas difásicas, de gran amplitud (0.5 segundos aproximadamente) que define la presencia de fase 3. No se presentan movimientos oculares rápidos. Usualmente ocupa de 45-55% del tiempo total de sueño (Figura 3).

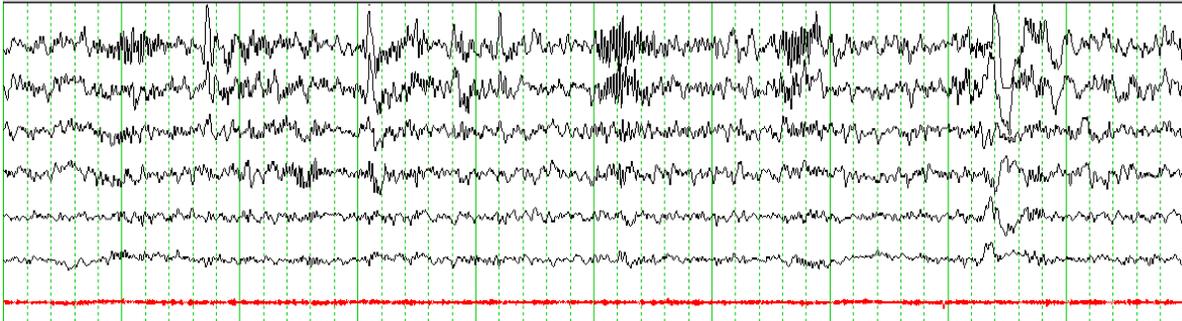


Figura 3. Características de las ondas durante las fases 2 del sueño. Las letras F-4-M1, C-4 M1 y O2-M1, son electrodos en el cuero cabelludo, para leer el EEG, nótese la presencia de husos de sueño en la corteza cerebral. Los electrodos oculares, ojo izquierdo (EOGizq) y ojo derecho (EOGder) muestran ausencia de movimientos oculares mientras que el EMGm detecta que el tono muscular se mantiene activo.

3.2.2.3 Fase 3

Llamada sueño de ondas lentas, sueño delta o sueño sincronizado. Se caracteriza primariamente por la aparición de grandes ondas lentas delta (0.5-3HZ y de 70 a 90 μ v). La actividad delta principalmente se presenta en la primera parte de la noche (cuando es mayor la necesidad de dormir), y junto con su amplitud disminuye a lo largo de la noche (Figura 4), constituye del 20-65% del total de sueño. En esta fase, el tono muscular está disminuido en relación con las fases anteriores. En general, durante la fase NMOR se producen disminuciones en la frecuencia cardíaca, la presión arterial, el volumen minuto respiratorio, el tono muscular esquelético y el flujo sanguíneo cerebral (Krahn *et al.*, 2010).

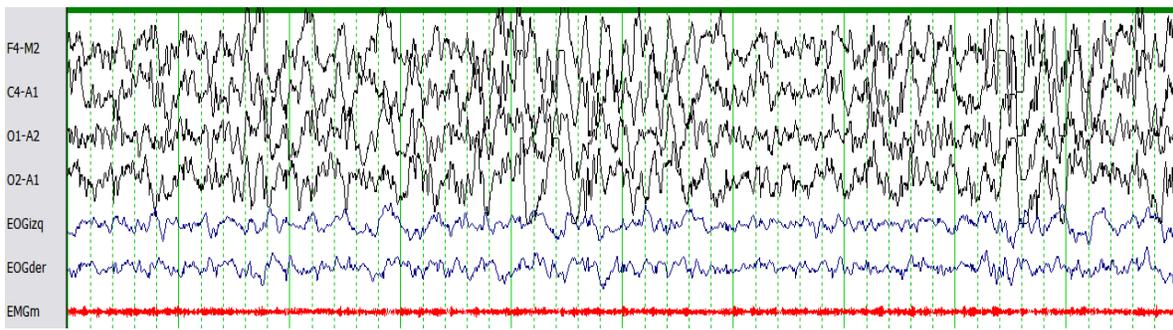


Figura 4. Características de las ondas durante la fase 3 del sueño. Las letras F-4-M1, C-4 M1 y O2-M1, son electrodos en el cuero cabelludo, para leer el EEG, nótese las ondas delta u ondas lentas en la corteza cerebral. Los electrodos oculares, ojo izquierdo (EOGizq) y ojo

derecho (EOGder) muestran poca actividad y el EMGm detecta que la actividad muscular está presente.

3.2.3. Sueño MOR

El sueño MOR está compuesto de componentes tanto tónicos (que ocurren a lo largo de todo el ciclo MOR) como fásicos (que ocurren intermitentemente durante el ciclo MOR). Cada uno de estos elementos es generado, modulado y ejecutado por diferentes grupos neuronales ubicados en múltiples niveles, desde la corteza cerebral a la médula espinal (Lydic y Baghdoyan, 1998).

El sueño MOR se caracteriza por activación cortical, se observa actividad de baja amplitud y frecuencia mixta, con ráfagas de onda que semejan a las ondas theta solo que más agudas, por lo que se les ha denominado ondas dientes de sierra (6 Hz y amplitud de 40 a 100 mV) aparecen alrededor de la zona del vértex. En la EOG aparecen movimientos oculares rápidos en ráfagas, mientras en la EMG pérdida del tono muscular, sin embargo, comúnmente se aprecian episodios de temblor con duración de 0.25 segundos. La actividad del músculo esquelética sólo persiste en el diafragma, los músculos extraoculares y los músculos del oído medio. El sueño MOR abarca del 20-25% del tiempo total de sueño (Figura 5) (Krahn *et al.*, 2010). Muchos fenómenos de sueño MOR son similares a la respuesta de alerta que se observa en la vigilia. Algunas regiones del tronco cerebral afectan la supresión motora en el sueño MOR (Lydic y Baghdoyan, 1998).

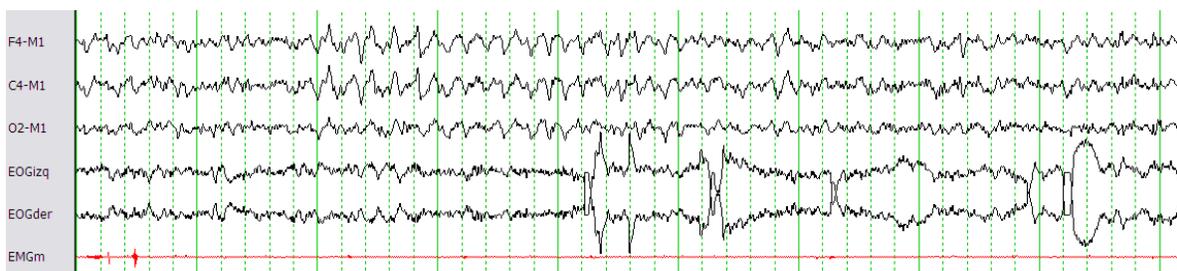


Figura 5. Características de las ondas durante la fase de sueño MOR. Las letras F-4-M1, C-4 M1 y O2-M1, son electrodos en el cuero cabelludo, para leer el EEG, nótese las ondas en forma de sierra en la corteza cerebral. Los electrodos oculares, ojo izquierdo (EOGizq) y ojo derecho (EOGder) presentan ráfagas de movimientos oculares, mientras el EMGm detecta que el tono muscular está casi ausente.

3.3 La importancia del buen dormir

Aunque existen estructuras cerebrales cuya estimulación favorece más a uno u otro estado (sueño o vigilia), no existe propiamente un centro del sueño o la vigilia, además, si consideramos la actividad de neuronas individuales encontramos que la mayoría se mantienen activas tanto al dormir como al velar y lo que se altera ante todo es su pauta de actividad de descarga (Salín-Pascual, 2009). Durante el sueño se llevan a cabo cambios en el resto del organismo, además de los observados en la actividad eléctrica cerebral. En el caso del sueño NMOR se ha denominado a la fase 1 y 2 como sueño ligero; la 3 como sueño profundo y juntas abarcan del 75 al 80% del periodo total del sueño. De éstas, las fases de sueño profundo proporcionan una función reparadora a nivel físico debido a que las funciones reguladas por el sistema nervioso periférico, como las frecuencias respiratoria y cardiaca se tornan constantes y sincronizadas, es en este momento cuando se lleva a cabo la liberación de ciertas hormonas debido a la función antagónica de los sistemas simpático y parasimpático que se encuentran disminuidas existiendo por ende relajación, con pocos movimientos musculares además de ausencia de movimientos oculares.

En el caso de sueño MOR, se da una activación de los procesos corporales. Al iniciarse un episodio de sueño MOR, la respiración se hace irregular, el pulso y la presión sanguínea exhiben fluctuaciones breves. En el sueño MOR, estudios en el hombre y en animales concuerdan con la existencia de un aumento significativo del flujo sanguíneo cerebral. Se presenta una desincronización en los ritmos cardiaco y respiratorio además de un incremento en la actividad endocrina. Se le atribuye una estimulación endógena sobre el cerebro con el fin de continuar con su desarrollo y programación genética principalmente en el feto y en el humano recién nacido, etapas cuyo periodo de duración es el más prolongado. En la edad preescolar y escolar en los niños, al sueño MOR se le asocia con procesos de consolidación de la memoria, aprendizaje, madurez cerebral y de continuidad de la estimulación endógena (Salín-Pascual, 2009; Beebe y Lee, 2007).

La duración del sueño insuficiente y la mala calidad del sueño se consideran endémicas en la sociedad moderna. Los hallazgos de estudios experimentales y epidemiológicos indican que la pérdida parcial crónica de sueño está asociada con un aumento de los riesgos de obesidad y una gran cantidad de trastornos relacionados con la obesidad, incluyendo

tolerancia a la glucosa, hipertensión, síndrome metabólico o cardiopatía coronaria (Qui *et al.*, 2010), así mismo se asocia con mayor riesgo la depresión (Krishnan y Collop, 2006; Hobson *et al.*, 1975), mientras que la corta duración del sueño es asociada con una mayor incidencia de la diabetes (Van Cauter, 1990; Seron-Ferre *et al.*, 1993), obesidad (Spiegel *et al.*, 1994; Eriksson *et al.*, 1989), así como el aumento de mortalidad por todas las causas anteriores. De todas las enfermedades que resultan asociadas a la falta de sueño, la enfermedad cardiovascular es de especial importancia en varias complicaciones durante el embarazo, como la preeclampsia, con restricción del crecimiento intrauterino, parto prematuro y nacimiento (Okun *et al.*, 2009).

Sanford *et al.* (2001), mencionan que, aunque existe una evidencia mínima de los beneficios del buen dormir, así como de las interferencias de un mal sueño en el organismo, si es posible relacionar las enfermedades ya mencionadas con las alteraciones que presentan las ratas crónicamente privadas al sueño, que incluyen hipermetabolismo e incapacidad para termorregular adecuadamente, y susceptibilidad a infecciones oportunistas.

La alternancia vigilia-sueño es un ciclo endógeno, sigue un ritmo circadiano que es controlado principalmente por el núcleo supraquiasmático del hipotálamo (Reloj biológico interno), esta estructura promueve la vigilia influyendo en la actividad neuronal en el tallo cerebral (Lee *et al.*, 2004). Lo que nos lleva a que el sueño es controlado por dos factores: el circadiano y el homeostático. En el adulto el promedio de sueño es de aproximadamente 8 horas por 16 de vigilia, aunque tal relación puede verse afectada por el grado de luminosidad ambiental, ciertos aspectos socioeconómicos y culturales y determinadas características individuales de tipo genético o constitucional (Regal *et al.*, 2009).

4.- Electroencefalograma

El flujo y el procesamiento de la información ocurren en el cerebro de forma eléctrica y química, por lo que es preciso observar como varían estos procesos a lo largo del tiempo para entender su función. Las técnicas electrofisiológicas se basan en registrar de forma cercana o distante la corriente eléctrica que circula a través de las membranas neuronales, o de corrientes secundarias que se derivan de éstas. Los potenciales que se registran en el electroencefalograma (EEG) provienen de la actividad eléctrica de los tejidos excitables, y se captan midiendo la diferencia de potencial existente entre un electrodo explorador y otro

de referencia (Grave de Peralta *et al.*, 2004). La mayor ventaja de las técnicas del EEG consiste en que miden directamente, aunque a distancia, el fenómeno a estudiar en una preparación no invasiva, con una resolución del orden de milisegundos, que se corresponde con la ventana temporal en la que ocurre el procesamiento de información en el cerebro. Su mayor inconveniente es que, debido a su carácter macroscópico y la diversidad de configuración de fuentes posibles, a priori es imposible la determinación unívoca de los generadores del EEG o el magnetoencefalograma (MEG).

4.1 Aplicación clínica del EEG

Aparte de su valor teórico abstracto en el marco de las aplicaciones biomédicas de la física y la matemática, estos métodos pueden producir imágenes de alto valor clínico, comparables en cuanto al contenido de información a otras técnicas hemodinámicas conocidas por su alto costo (RM funcional) o su invasividad, entre ellas, las tomografías por emisión como PET o SPECT (Grave de Peralta-Mendez *et al.*, 2004). No obstante, las imágenes tomográficas funcionales derivadas del EEG o el MEG, presentan ventajas por su alta resolución temporal y espacial respecto a la obtenida por las tomografías por emisión PET o SPECT.

Por ejemplo, las evaluaciones del método EPIFOCUS con mediciones simultáneas en el cuero cabelludo y 10 electrodos intracraneales (Lantz *et al.*, 2001), muestran por primera vez un método lineal distribuido capaz de diferenciar entre la actividad epiléptica generada por diferentes posiciones del lóbulo temporal utilizando, únicamente, 22 electrodos de EEG. Estudios adicionales (Lantz *et al.*, 2003) muestran que EPIFOCUS es el único método lineal con un 100% de localización de fuentes dipolares simples para configuraciones de 100 o más electrodos, y que, seguido de LAURA, con un 50%, es el mejor localizador lineal de actividad dipolar (Grave de Peralta-Mendez *et al.*, 2002). Estudios más extensos que evalúan las imágenes funcionales de EPIFOCUS muestran una efectividad comparable o superior a las demás técnicas tomográficas.

Considerando el nivel de eficacia obtenido y el bajo costo de estas imágenes, resulta claro que las imágenes funcionales tomográficas derivadas del EEG tienen un gran futuro por delante.

5. Uso de la rata como modelo animal de laboratorio

El uso de animales en experimentación ha ido en paralelo al desarrollo de la biomedicina. Un animal de laboratorio se define como un ser vivo no humano, vertebrado o invertebrado, usado para la experimentación y otros fines científicos, su uso se basa, fundamentalmente, en la analogía fisiológica con la especie humana (Guillen, 2012). La ciencia de los animales de laboratorio surge para proporcionar a la comunidad científica la formación y directrices en todos los aspectos relacionados con la experimentación animal. Su marco ético plantea que los animales no deben ser sometidos a sufrimiento físico o psicológico y se regula por estrictas normas bioéticas. El uso de animales en experimentación es ético cuando no hay otra alternativa y su propósito está vinculado con la obtención de un bien mayor (National Research Council, 2011).

El lugar donde se alojan los animales de experimentación se denomina bioterio, animalario o estabulario, y se define como la instalación dedicada a la crianza, mantenimiento, cuidado y uso de los animales de laboratorio (Kollmus *et al.*, 2014). El bioterio no solo debe cubrir las necesidades de los animales, sino también del personal que trabaja en él. El personal capacitado ha de evaluar el estado de salud de los animales de forma rutinaria, no solo por obligación legal y moral, sino también para garantizar resultados fiables y repetibles. Es necesario que esta evaluación sea más amplia y frecuente en procedimientos invasivos, quirúrgicos y a la llegada del animal al bioterio.

A pesar del alto costo y la dificultad que representa el desarrollo de un modelo animal, su uso nos permite estudiar la fisiopatología de una enfermedad inducida o espontánea, y el comportamiento animal. Dadas las posibles variaciones en las respuestas fisiológicas, es necesario tener un amplio conocimiento de la fisiología y anatomía comparada del modelo a emplear. Además, es aconsejable constatar la validez del modelo para el estudio. El ratón es el animal de laboratorio mejor caracterizado genéticamente. Si a ello sumamos su pequeño tamaño, fácil manejo, corto período gestacional, camadas grandes y rápida madurez sexual, todo ello lo convierte en una especie óptima para la creación de modelos. (Romero-Fernandez *et al.*, 2016).

JUSTIFICACIÓN

Una de las principales problemáticas que se presentan a nivel mundial con jóvenes de 16 a 23 años, es el uso de drogas de bajo costo, destacando aquellas como son los agentes inhalados que están fabricados a base de tolueno, entre ellos el thinner, las pinturas a base de aceite, los limpiadores PVC y pegamentos. Otra problemática de la cual se tiene registró, son las alteraciones en el sueño, como el insomnio, el cual se presenta en el personal que labora y que tiene contacto directo con este tipo de sustancias. Se tiene conocimiento que los agentes a base de tolueno provocan alteraciones en el sistema nervioso y autónomo. Con base en la problemática antes planteada, es menester realizar experimentos en modelos animales como la rata de laboratorio (cepa Wistar), bajo el esquema y en apego estricto a las Normas Oficiales Mexicanas sobre cuidado y uso de animales de experimentación, que permitan dilucidar si la exposición aguda al tolueno causa alteraciones en las fases del sueño y alteraciones en la actividad bioeléctrica a nivel cerebral. Los hallazgos pueden ayudar a comprender el mecanismo de acción en el sistema nervioso de aquellos individuos expuestos a tal sustancia.

HIPÓTESIS

La administración aguda de 0.15 g de Tolueno por cada 100 g de peso corporal administrada vía intraperitoneal, altera el contenido de monoaminas en el cerebro de ratas por lo que se ve afectado el ciclo Sueño-Vigilia.

OBJETIVOS

GENERAL

Determinar el efecto de la administración aguda de metilbenceno sobre los patrones del sueño y el contenido de monoaminas en cerebro de ratas Wistar.

ESPECÍFICOS

Analizar los contenidos de dopamina (DA), noradrenalina (NA), serotonina (5-HT) y metabolitos de ácido homovanílico (HVA), ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) y ácido 5 hidroxindolacético (5HIAA) mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con un detector electroquímico.

MATERIAL

- **Material Biológico**

Ratas wistar

- **Fármacos**

NaCL al 9%

Tolueno

Ketamina

Xilacina

Ácido perclórico

Metabisulfito de sodio

Buffer de fosfatos

- **Material Para Bioterio**

Luz

Lámpara

Agua

Alimento en forma de Pellets

Cajas de policarbonato

Viruta de madera

Bebederos

Jabón neutro

- **Material Para El Muestreo**

Aparato de cirugía estereotáxico

Campo quirúrgico estéril

Tornillos quirúrgicos (3x5 mm)

Cemento acrílico

Electrodos bipolares de acero inoxidable

Acrílico dental

Jaula

Hielo

Cromatógrafo de líquidos Perkin-Elmer LC-250 con un detector electroquímico metrohm

Columna analítica marca Alltech adsorbosfera catecolamina 3U con un tamaño de partícula de 3 μm

- **Material Para Consulta**

Artículos Científicos

Internet

Base de Datos (PubMed, Medline, Redalib y Scopus)

Programa Microsoft Office Excel, Word

Programa Estadístico

MÉTODOLÒGIA

Número de Animales y Localización.

Se utilizaron 20 ratas Wistar macho adultas (peso medio 292 ± 12 g), las cuales se alojaron individualmente en el cuarto de manejo experimental, o bioterio, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMéx). El manejo de los animales y las condiciones internas del bioterio se adecuaron a los estándares de la NOM-062 (1999) y de la “Guide for the care and use of laboratory animals” (2011) (Olfert *et al.*, 1993).

Dentro del bioterio se mantuvo un ciclo luz-oscuridad modificado de 12:12. De manera automática, la luz se encendió a la 8:00 horas y se apagó a las 20:00 horas. Para la iluminación se utilizó una lámpara con un foco de 60 Watts (si se requería iluminación durante la fase oscura se utilizaba un foco de luz roja de 60 Watts). La temperatura se mantuvo entre 20° y 26° C y la humedad entre el 40% y el 50%. A los animales se les proporcionó agua potable *ad libitum* y pellets de Rodent Chow de la marca Purina *ad limitum*, y se alojaron en cajas de policarbonato (45 cm de largo, 25 cm de ancho y 20 cm de alto) con tapa de acero inoxidable y viruta de madera de pino como material de cama. La limpieza se realizó 3 veces a la semana, lavando las cajas, bebederos y comederos con agua y jabón neutro, además de colocar viruta de madera limpia, agua y alimento fresco.

1.2. Manipulación

La limpieza de las cajas y la manipulación de las ratas fueron realizadas por la misma persona desde las cruces hasta el término del experimento. Se evitó en lo posible la manipulación de las crías y de la madre durante los primeros 10 días postparto, ya que, si se realizaba un manejo excesivo durante estos días, la hembra podría matar a la camada, o los sistemas neuroendocrinos de las crías se podían ver afectados (Bales *et al.*, 2011). A los 11 días post-nacimiento se les asignó un grupo a las crías de sexo masculino y se marcaron sobre la cola con plumones indelebles no tóxicos. Además de tomar el peso cada tercer día, las crías fueron manipuladas gentilmente durante 2 minutos para habituarlas al experimentador. El día del destete (día 21) se separaron a las crías macho, y a partir del día 24 comenzó la manipulación necesaria para el experimento.

Diseño experimental.

Cuadro 1.- Tratamientos, grupo control y grupo experimental.

Los animales fueron divididos de forma aleatoria en dos grupos para cada condición:

	GRUPO 1 (CONTROL)	GRUPO 2 (EXPERIMENTAL)
INDIVIDUOS	10 Ratas	10 Ratas
TRATAMIENTO	Na Cl al 9%	0.15 g Tolueno/ 100 g PV

Los tratamientos fueron administrados vía intraperitoneal en una sola dosis 15 minutos antes del registro electrográfico.

Técnica para el registro electroencefalográfico (EEG)

Cirugía estereotáxica: Implantación quirúrgica de los electrodos de registro para EEG

El procedimiento de implantación de los electrodos se realizó conforme a lo descrito previamente por Carvalho *et al.*, 2016 y Jhaveri *et al.*, 2008. Los sujetos experimentales fueron anestesiados siguiendo el protocolo sugerido por Dasilva *et al.* 2014 para cirugía estereotáxica. Anestesia con xilacina (Procin® 2%: 20 mg/1 mL) a una dosis de 10 mg/kg + ketamina (Anesket® 10%: 100 mg/1 mL) a una dosis de 50 mg/kg. La combinación de ambos medicamentos se administró por vía intraperitoneal. Una vez que el sujeto

experimental presentó signos de un plano anestésico profundo, se colocó en el aparato de cirugía estereotáxico David Kopf®, posicionando a la rata en decúbito ventral. Se rasuro la zona dorsal del cráneo, se embrocó y se dispuso de un campo quirúrgico estéril (Imagen 1).



Imagen 1.- Rasurado y embrocado de la parte dorsal del cráneo en rata Wistar.

Posteriormente, se realizó una incisión de 2 a 3 cm procediendo a debridar el tejido conjuntivo hasta identificar la unión de suturas craneales denominada “Bregma” (Imagen 2,3).

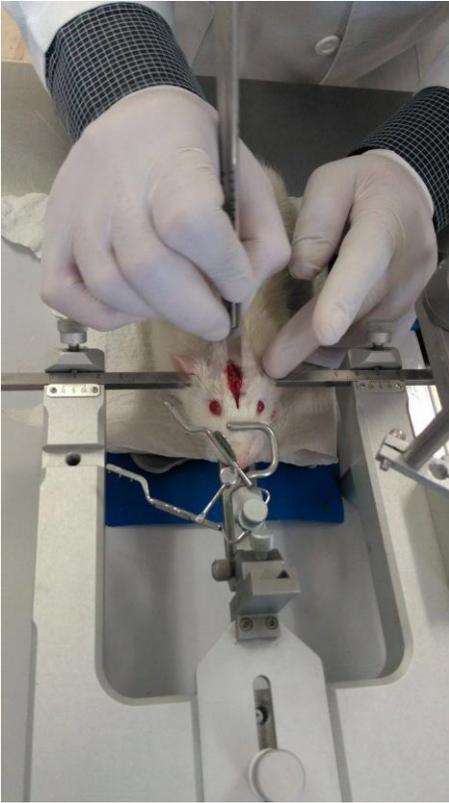


Imagen 2.- Incisión en la parte dorsal del cráneo para identificar la unión de suturas craneales denominada “Bregma”.



Imagen 3.- Identificación de la unión de suturas craneales denominada “Bregma”.

Se realizó un trepano en el cráneo (Imagen 4) y se implanto un electrodo bipolar de acero inoxidable (calibre 22 G, 28 mm de largo) en el área ventral posterior lateral derecho e izquierdo de la corteza sensoriomotora utilizando las siguientes coordenadas: -3.2 mm antero-posterior, +/- 3.2 mm lateral y -5.5 mm ventral a partir de “Bregma” según Paxinos *et al.* 2004 (Imagen 5,6). Los electrodos fueron fijados al cráneo con tornillos quirúrgicos (3x5 mm) e implantados en cemento acrílico.



Imagen 4.- Realización del trepano para la colocación de los electrodos de acero inoxidable.

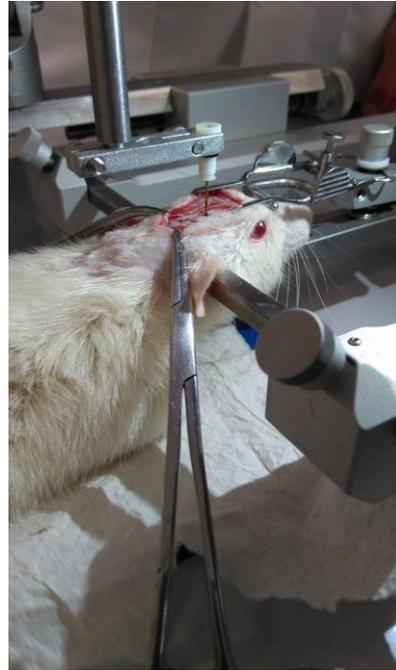


Imagen 5.- Implantación de los electrodos de acero inoxidable.



Imagen 6.- Lectura de coordenadas (-3.2 mm antero-posterior, +/- 3.2 mm lateral y -5.5 mm ventral a partir de “Bregma” según Paxinos *et al.* 2004).

Se implantaron electrodos bipolares de acero inoxidable (Bore 0.010in, Coated 0.013in, AM Systems, Inc., Carlsborg, WA) en la corteza sensorimotora derecha (2 mm de longitud) para el registro electroencefalográfico (EEG) (Imagen 7).



Imagen 7.- Implantación de electrodos bipolares de acero inoxidable.

Un tornillo fue implantado en el servidor del cráneo como una fuente de referencia indiferente. Los electrodos fueron soldados a miniconectores y asegurados al cráneo con acrílico dental (imagen 8).



Imagen 8.- Electrodo soldado y asegurado al cráneo con acrílico dental.

Siete días después de la recuperación postoperatoria, las ratas fueron colocadas en una cámara de registro sonoamortiguada con acceso libre a alimentos y agua, bajo condiciones de luz y oscuridad controladas (08: 00 - 20: 00 h), y sin restricción de los movimientos. Después de 5 días de habituación, se les realizó un registro del EEG durante 24 h para cada condición experimental Grupo Control, n=10 (Na Cl 0.9 %) y Grupo 2 n=10, experimental (1.5 g de tolueno /Kg Peso, i.p 15 min antes del registro).

Técnica para la determinación de monoaminas

Después de 5 días de habituación, se les inyectó vía i.p para cada condición experimental Grupo 1 Control, n=10 (Na Cl 0.9 %) y Grupo 2 experimental, n=10 (1.5 g de tolueno /Kg Peso vía i.p 15 min antes del sacrificio). Las ratas fueron sacrificadas mediante el proceso de decapitación de acuerdo a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Posteriormente se empleó la técnica de Globinski e Iversen para realizar la disección del hipotálamo, el puente de Varolio, el mesencéfalo y el estriado. La intención, fue obtener muestras de cada tejido para posteriormente colocarlas inmediatamente sobre hielo y someterlas al proceso de homogenización del tejido mediante un sonicador con ácido perclórico al 0.4 N con 0.1 % (p/v) de metabisulfito de sodio y centrifugarlas a 15.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. El proceso de sonicación consistió en que la muestra biológica del sujeto de estudio fue sometida a vibración ultrasonográfica para fragmentar las células, macromoléculas y membranas. Los sobrenadantes fueron mantenidos en un proceso de congelación a -70 °C hasta que se realizó el análisis cromatográfico. Se analizaron los contenidos de dopamina (DA), noradrenalina (NA), serotonina (5-HT) y sus metabolitos ácido homovanílico (HVA), ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) y ácido 5 hidroxindolacético (5HIAA) respectivamente. Posteriormente mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con un detector electroquímico de acuerdo a la técnica establecida previamente por Alfaro-Rodríguez *et al.* (2006). Se utilizó un cromatógrafo de líquidos Perkin-Elmer LC-250 con un detector electroquímico metrohm. Las curvas de calibración para monoaminas se realizaron mediante concentraciones conocidas de patrones preparados en solución de metabisulfito perclórico (20\ mu l) que se inyectaron en el loop

del cromatógrafo. El programa Perkin Elmer LC 1020 fue utilizado para integrar los picos observados, mientras que las concentraciones de monoaminas de cada muestra se obtuvieron por interpolación en sus respectivas curvas estándar.

Se utilizó una columna analítica marca Alltech adsorbosfera catecolamina 3U con un tamaño de partícula de 3 μm . La fase móvil consistió de una solución Buffer de fosfato (0.1 M, pH 3.2) que contenía; 0.2 mM de octil-sulfato sódico, 0.1 mM de EDTA y 14% v/v de metanol. La tasa de flujo fue de 1.2 mL/min. El potencial fue fijado a 0.80 V contra un electrodo de referencia ag/agCl.

ANÁLISIS DE DATOS.

Las monoaminas y los valores de concentración de metabolitos y neurotransmisores fueron analizados estadísticamente con un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) y la comparación dentro de los grupos se realizó mediante una prueba de Tukey.

LIMITE DE ESPACIO

El presente proyecto de investigación se realizó en la Torre de investigación del Instituto Nacional de Rehabilitación, Calz. México-Xochimilco 289, Col. Arenal de Guadalupe, Delegación Tlalpan, Cd. de México, México a $19^{\circ}17'21''$ de latitud norte y a los $99^{\circ}08'56''$ de longitud oeste.

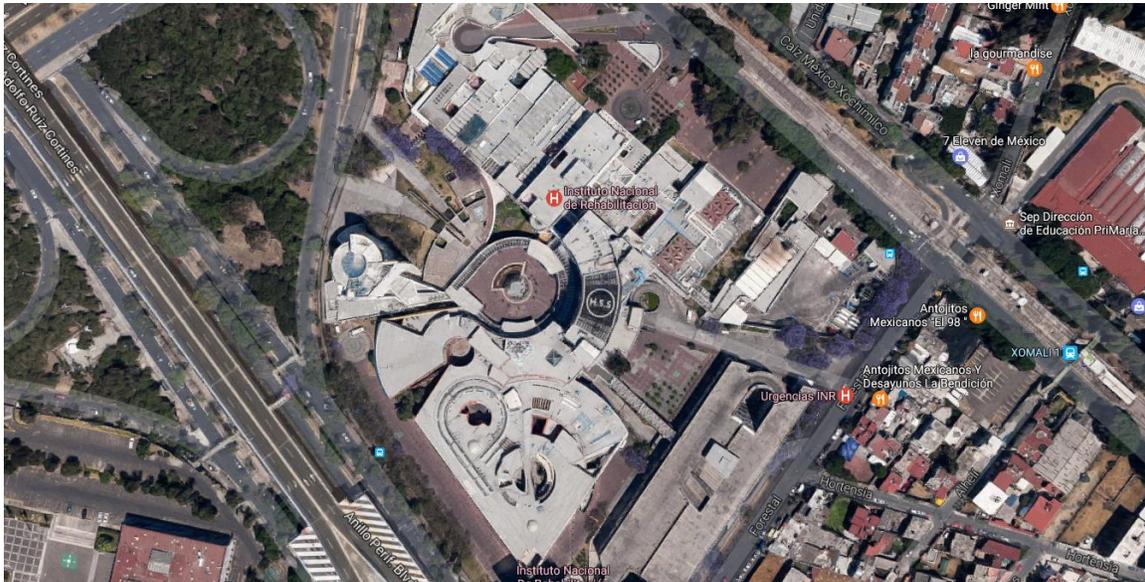


Figura 6.- Ubicación del Instituto Nacional de Rehabilitación

LÍMITE DE TIEMPO

Cuadro 2.- CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Actividades por realizar	abril	mayo	junio	julio	agosto	septiembre
Capacitación						
• Capacitación y entrenamiento con el uso de distintos equipos	X	X				
Cirugía Estereotáxica	X	X				
EEG	X	X				
Ejecución de la fase experimental		X	X	X		
Monitoreo del análisis		X	X	X		
Determinación de los parámetros del sueño		X	X	X		
Realización de EEG		X	X	X		
Análisis Estadístico				X	X	
Redacción de Resultados					X	
Redacción de tesis					X	
Trámites en el Departamento de Titulación						X
Obtención del título						X

RESULTADOS

En el presente estudio se encontró que la administración de una sola dosis aguda de tolueno a razón de 1.5 g de tolueno /Kg Peso disminuyó significativamente la V y el SP, mientras que el tiempo en SOL fue significativamente mayor. La exposición de los animales al tolueno resultó en un incremento lineal en el tiempo total gastado en SOL, mientras que se observó una disminución en MOR de aproximadamente la mitad de los valores reportados del grupo control. Tanto la frecuencia como el promedio de la duración de los períodos MOR, fueron dependientes de la concentración y disminuyeron significativamente en comparación con el grupo control. La latencia de MOR mostró un retraso por acción de tolueno. Por el contrario, la latencia de SOL aumentó después de 3:30 h de administración de tolueno, mientras que MOR después de 6 h (cuadro 3).

Cuadro 3.- Parámetros de sueño (media \pm S.E.M.) durante 24 h en ratas.

Parámetros de sueño (media \pm S.E.M.) durante 24 h en ratas		
	Control (n=10)	Tolueno (1.5 g/kg) (n=10)
Vigilia V (min)	698.45 \pm 16.1	557.2 \pm 21.0 *
Sueño de ondas lentas		
SOL (min)	605.33 \pm 18.9	823.34 \pm 38.6*
duración media; min	7.25 \pm 0.60	8.15 \pm 0.65
Latencia;min	39.89 \pm 6.5	189.16 \pm 12.8**
sueño de movimientos oculares rápidos		
MOR (min)	135.45 \pm 7.99	58.84 \pm 4.9*
MOR (Frecuencia)	55.10 \pm 2.1	29.20 \pm 1.9 **
MOR (Duración media; min	2.7 \pm 0.9	1.5 \pm 0.2*
MOR (Latencia;min)	48.21 \pm 6.8	365.17 \pm 24.50**

V, Tiempo total en estado de vigilia.

SOL, Tiempo total en el Sueño de Ondas Lentas.

MOR, Tiempo total del Sueño de Movimientos Oculares Rápidos.

El análisis estadístico se realizó con la prueba t de student *p \leq 0.01, **p \leq 0.001.

La vigilia disminuyó 20,22% (* $p < 0,01$) en relación a los valores del grupo control, mientras que SOL incrementó en un 36,91% (* $p < 0,01$) y MOR mostró una reducción de 60,25%. Se identificó que el SP fue el más afectado (** $p < 0,002$).

Por otro lado, cuando se analizó el promedio de la concentración de monoaminas ($\mu\text{g} / \text{g}$ de tejido) por regiones, se observó que, en el mesencéfalo, la DA y su metabolito NA aumentaron. Además, este aumento en los niveles de catecolaminas tiene relación con el comportamiento del sueño. En contraste, los valores de los metabolitos DA, DOPAC y HVA no cambiaron respecto a los valores identificados en el grupo control (Figura. 7).

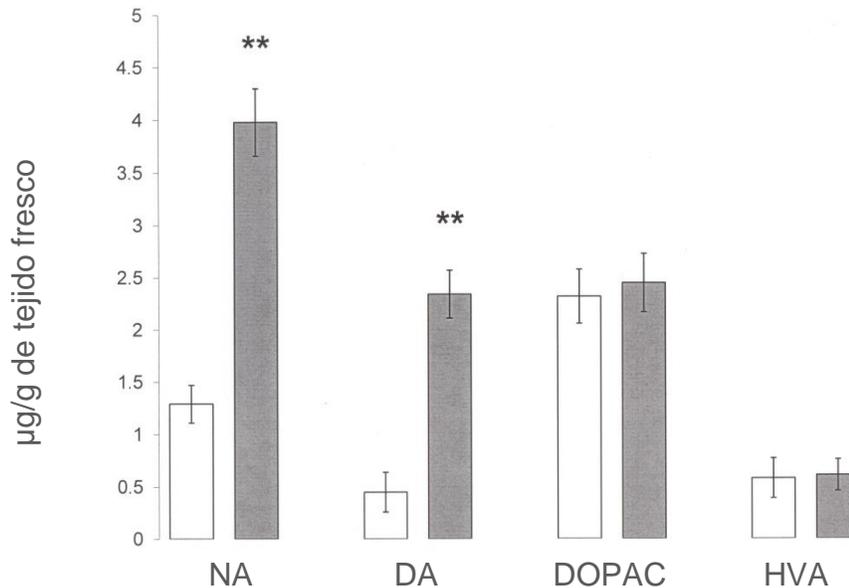


Figura 7.- Promedio de la concentración del contenido de monoamina del mesencéfalo expresada en $\mu\text{g/g}$ de tejido fresco, evaluada en el grupo control (barras blancas) y después de la inyección de tolueno 1.5 g de tolueno /Kg Peso (barras grises). La noradrenalina (NA), la dopamina (DA), el ácido 3,4 (dihidroxifenilacético (DOPAC) y el ácido homovanílico (HVA) fueron medidos mediante cromatografía de líquidos HPLC. El promedio de los valores fueron comparados estadísticamente utilizando un ANOVA de una sola vía con un nivel de significancia ($p < 0,05$), posteriormente se realizó la comparación entre los grupos mediante una prueba de Tukey ** $p < 0,01$.

En el estudio, se identificó que en el cuerpo estriado los niveles de DA, NA y DOPAC aumentaron después de la administración de tolueno, mientras que los niveles de HVA no cambiaron después de la administración del tolueno (Figura 8).

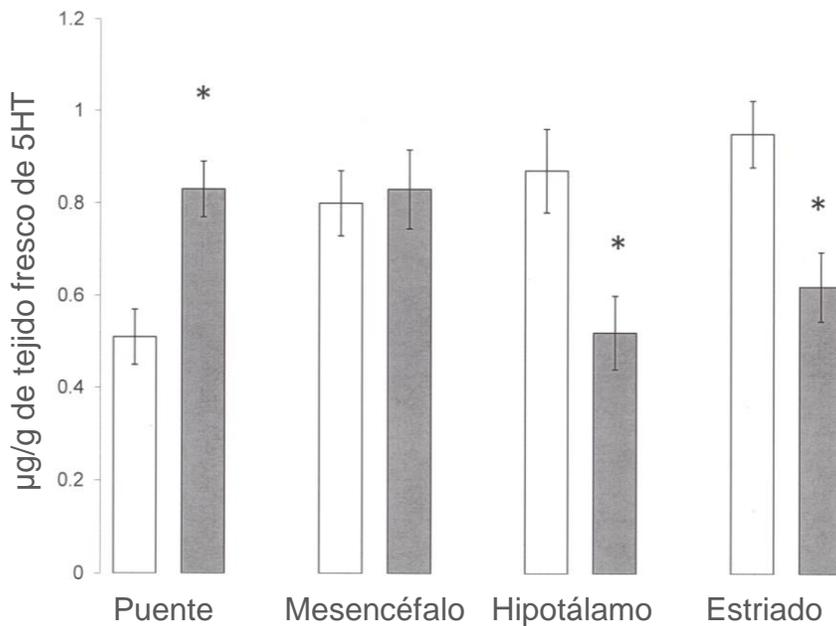


Figura 8. Promedio de la concentración del contenido de monoaminas en estriado expresado en $\mu\text{g/g}$ de tejido fresco evaluada como parte del grupo control (barras blancas) y después de la inyección de tolueno 1.5 g de tolueno /Kg Peso (barras grises). La noradrenalina (NA), la dopamina (DA), el ácido 3,4 dihidroxifenilacético (DOPAC) y el ácido homovanílico (HVA) se midieron por cromatografía de líquidos HPLC. El promedio de los valores fueron estadísticamente comparados utilizando un ANOVA de una sola vía con un nivel de significancia $p < 0,05$, posteriormente se realizó la comparación entre los grupos mediante una prueba de Tukey * $p < 0,05$.

El contenido de 5-HT expresado en $\mu\text{g/g}$ de tejido en el mesencéfalo, no cambió, pero mostró un aumento significativo en la concentración del neurotransmisor a nivel del puente, mientras que se observó una reducción significativa de este neurotransmisor a nivel del hipotálamo y estriado (Figura 9). En lo que respecta al contenido de 5-HIAA, se observó un aumento significativo a nivel del puente,

mesencéfalo y estriado, con una disminución significativa de dicho neurotransmisor en el hipotálamo (Figura 10). El contenido de 5-HT disminuyó a nivel de cuerpo estriado, sin embargo, su metabolito 5-HIAA aumentó posterior a la exposición con el tolueno (Figuras 9-10).

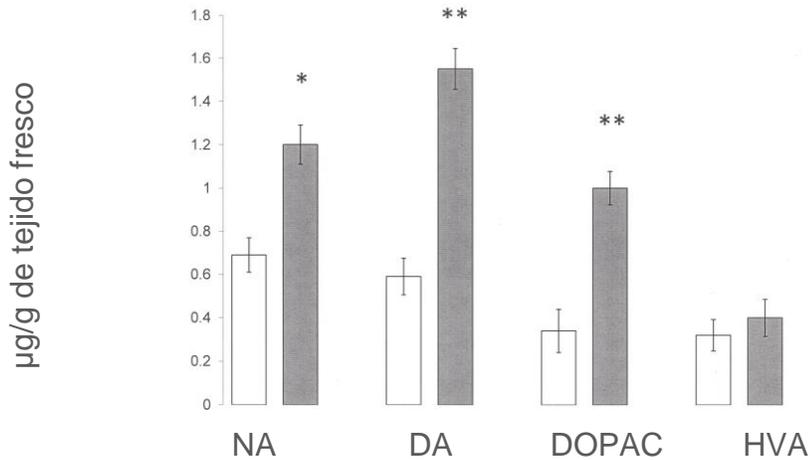


Figura 9. Promedio de la concentración del contenido de serotonina (5-HT) expresada en µg/g de tejido fresco en diferentes regiones del cerebro. El grupo control se expresa en (barras color blanco), después de la inyección de tolueno 1.5 g/kg identificada con (barras en color gris). El promedio de los valores fueron comparados estadísticamente utilizando un ANOVA de una sola vía ($p < 0,05$) y la comparación entre grupos se realizó con el apoyo de una prueba de Tukey * $p < 0,05$.

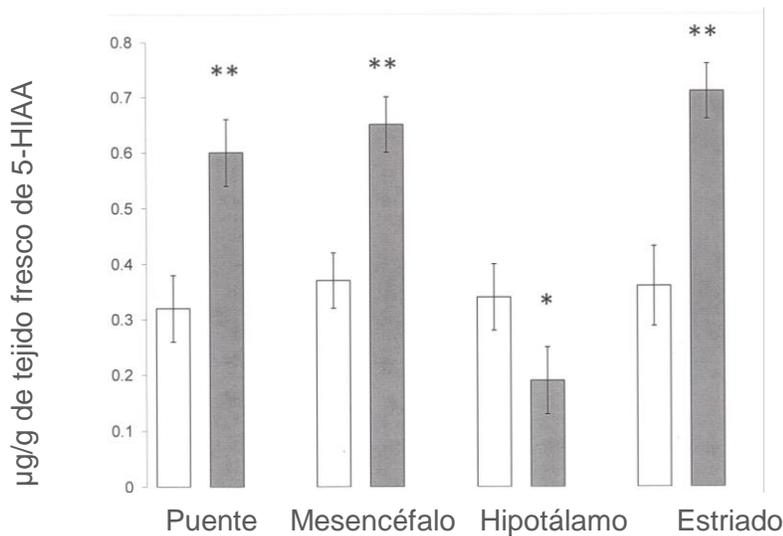


Figura 10. Promedio de la concentración del contenido de ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) ($\mu\text{g/g}$ de tejido fresco) en diferentes regiones del cerebro. Grupo control (barras blancas) y posterior a la inyección de tolueno 1.5 g de tolueno /Kg Peso (barras grises). El promedio de los valores se compararon estadísticamente utilizando ANOVA de una vía ($p < 0,05$) y posteriormente se realizó la comparación entre grupos mediante una prueba de Tukey * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$.

El análisis del volumen de dopamina mostró que después de la exposición al tolueno, la DA aumentó significativamente más que los metabolitos DOPAC y HVA, tanto en el mesencéfalo como en el estriado (Figura 11).

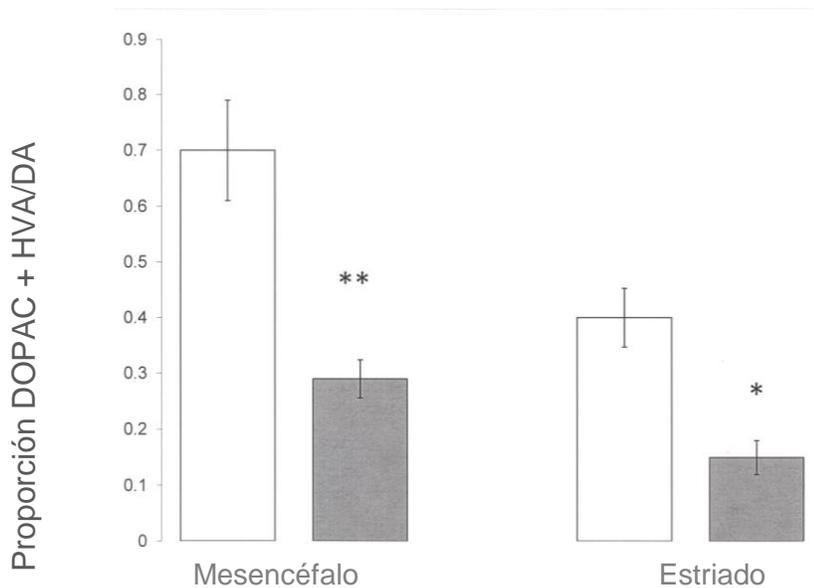


Figura 11. Volumen de dopamina (DOPAC+HVA/DA) en el mesencéfalo y estriado. Grupo control (barras blancas) y después de la inyección de tolueno 1.5 g de tolueno /Kg Peso (barras grises). Los valores medios se compararon estadísticamente utilizando ANOVA de una vía ($p < 0,05$) y posterior comparación dentro de los grupos mediante una prueba de Tukey * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$.

Por el contrario, el análisis de rotación de la serotonina reveló que el metabolito 5-HIAA aumentó significativamente más que su precursor tanto en el mesencéfalo como en el puente (Figura 12).

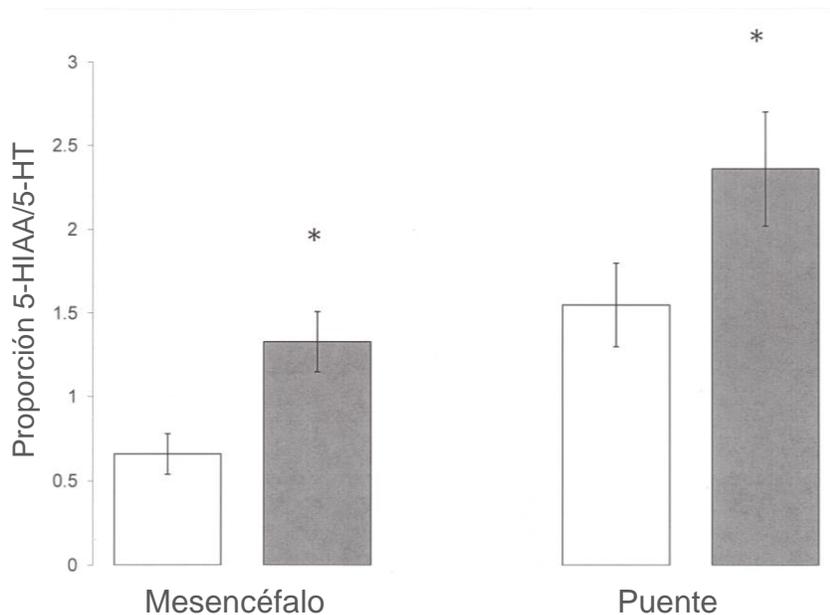


Figura 12.- Representación del volumen de serotonina (relación 5-HIAA/5-HT) en el mesencéfalo y puente. Grupo control (barras blancas) y después de la inyección de 1.5 g de tolueno /Kg Peso (barras grises). Los valores medios se compararon estadísticamente utilizando ANOVA de una vía ($p < 0,05$) y la comparación posterior entre grupos se realizó con una prueba de Tukey * $p < 0,05$.

Los resultados de esta investigación, son consistentes con los resultados de algunos estudios publicados, cabe señalar que la concentración utilizada en este documento difiere de otros en el estudio de sueño y monoaminas.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que la dosis aguda de tolueno de 0.15 g de Tolueno por cada 100 g PV altera significativamente los diferentes estadios de vigilia. Estos resultados sugieren que los cambios observados en MOR no ocurren de manera compensatoria después de un aumento en la cantidad total de SOL, pero aparecen como resultado de un deterioro en los mecanismos que participan en la generación y mantenimiento de MOR.

Recientemente ha sido propuesto que el MOR es generado por neuronas de tipo colinérgicas localizadas a nivel del puente. En este estudio, se identificó que las lesiones del área tegmental laterodorsal (LTG) y del núcleo tegmental pedunculopontino (PPT) afectaron significativamente el tiempo del MOR (Shouse y Siegel 1992; Masri *et al.*, 2006; Mathis *et al.*, 2007).

El registro extracelular de estos núcleos mostró un incremento en su tasa de disparo mucho antes de la desincronización con el EEG asociada con el MOR (Steriade, 1992; Steriade y McCarley, 1990). Por otra parte, recientemente ha sido reportado que las inyecciones de 5-HT inducen hiperpolarización en las neuronas ubicadas en LDT y PPT (Kayama y Koyama, 2003). En este estudio, se ha encontrado una disminución significativa del MOR en el registro total del sueño y un aumento de SOL en la administración de tolueno con una dosis de 0.15 g de Tolueno por cada 100 administradas por vía i.p. en ratas que mostraron altos niveles de 5-HT a nivel del puente. Se ha propuesto que la 5-HT está relacionada con la regulación de SOL (Steriade, 2004). El presente estudio demuestra que el tolueno aumenta los niveles de DA y su metabolito HVA permaneció sin verse afectado por alguna causa relacionada al experimento. Está bien documentado que la dopamina influye en la liberación de acetilcolina (Tan y Bullock, 2008, Millan *et al.*, 2007, Stengard, 1995). Se sabe que la privación del sueño produce una elevación en la SOL, la cual está relacionada con el aumento en la tasa de rotación de la 5-HT (Glowinski y Iversen, 1966, Senthilvelan *et al.*, 2006a, Senthilvelan *et al.*, 2006b). En el presente estudio, se encontró un aumento en la

tasa de rotación de 5-HT en las regiones cerebrales que contienen las mayores poblaciones neuronales de las células serotoninérgicas junto con un aumento en la cantidad total de SOL.

En este estudio, se encontró un aumento de 5-HT a nivel del puente, con una disminución concomitante de este neurotransmisor en el hipotálamo. Estas diferencias pueden ser explicadas por los efectos inhibitorios que la 5-HT exagera sobre los autoreceptores del núcleo del rafe dorsal que a su vez induce una disminución en la liberación y el metabolismo de la 5-HT en el núcleo supraquiasmático (SCN). El hipotálamo (SNC) es una estructura considerada como el sitio primario de la regulación del reloj circadiano en las especies mamíferos, y se sabe que está bajo el control del sistema 5-HT (Glass *et al.*, 2003). El receptor 5-HT₇ está altamente expresado en el SNC de las ratas, lo que sugiere que este receptor puede alterar el control de los ritmos circadianos (Pouzet, 2002; Ehlen *et al.*, 2001). Se ha sugerido que este receptor esté alterado por los efectos de la inyección de tolueno. Los efectos fisiológicos producidos por la inyección intraperitoneal de tolueno, como una reducción significativa en el MOR y el aumento de la latencia de SOL, se producen a partir de las primeras 3:30 horas.

Por otro lado, el metabolito, los niveles de 5-HIAA aumentaron en el mesencéfalo y estriado. Además, se encontró que la dopamina y los metabolitos NA y DOPAC en su totalidad, aumentaron a nivel del estriado; Sin embargo, los niveles de HVA no se modificaron ni en el estriado ni en el mesencéfalo. Estos resultados demuestran que sólo los metabolitos que se descomponen por la monoamino oxidasa (MAO) aumentaron significativamente, en especial en el estriado donde hay sinapsis de serotoninérgicos y dopaminérgicos. El HVA, que utiliza catecol-o-metiltransferasa (COMPT) para su síntesis, no se vio afectado por la simple dosis de tolueno. Los resultados mostraron que la inyección de tolueno podría aumentar la MAO y disminuir la COMT.

La exposición subcrónica a 40 ppm de tolueno en ratas mostró significativamente una sensibilización a la narcosis inducida por el tolueno, el ruido y la disminución en la actividad de cría, y las alteraciones en los niveles de dopamina y las

transmisiones de 5-HT pueden conducir a cambios adversos en las funciones neurocomportamentales y neuroquímicas (Berenguer *et al.*, 2004 y Berenguer *et al.*, 2003).

Otros estudios demuestran que la inhalación de tolueno inducen estados de comportamiento anormal que se asemejan al síndrome serotoninérgico en ratas, el cual se caracteriza por reposo, tremor, temblor del miembro posterior, y rigidez del tejido de la cabeza. Estos resultados indican que el síndrome de serotonina puede ser una consecuencia de cambios en los mecanismos serotoninérgicos (Von Euler *et al.*; 1998, Yamawaki, 1982, Castilla-Serna, 1993).

Riegel *et al.* (2004), proponen que los tratamientos con tolueno generan el aumento en los niveles de dopamina y serotonina en el núcleo caudado, la sustancia negra y el núcleo accumbens. Además las mediciones del metabolito DOPAC sugieren un cambio en la concentración de monoaminas. Este cambio en las monoaminas sugiere que la neurotoxicidad inducida por el tolueno puede ser mediada a través de la generación de radicales libres. Calderón-Guzmán *et al.* (2005), sugieren que el grupo hidroxilo funcional (OH) se aleja del grupo funcional metilo (CH₃) unido al anillo aromático de disolventes, aminas biógenas, peroxidación de lípidos y Na⁺, K⁺-ATPasa y la actividad de la enzima ATPasa total tiende a sufrir cambios importantes, indicando que el efecto de impedimento estérico y el efecto inductivo producido en el anillo aromático de disolventes juegan un papel importante en la respuesta del metabolismo de amina biogénica (Calderón-Guzmán *et al.*, 2005a; Calderón-Guzmán *et al.*, 2005b). El tolueno aumenta la afinidad del ATP con su enzima (LeBel y Schatz RA, 1989; LeBel y Schatz, 1990) modificando la fluidez de la membrana, lo que a su vez facilita las interacciones estructura-actividad y dinámica de la membrana (Calderón-Guzmán, 2005). Además de los daños causados en la fluidez de la membrana, se debe tomar en cuenta que posiblemente los niveles cerebrales de tolueno, desde que este pasa fácilmente a través de la barrera hematoencefálica hasta el cerebro (LeBel y Schatz RA, 1989; LeBel y Schatz, 1990; Ogata *et al.*, 1974; Benignus *et al.*, 1981). De acuerdo a Brukner y Peterson (1981) quienes reportaron una correlación altamente positiva entre el tolueno en la sangre y las manifestaciones

del comportamiento del sistema nervioso central. El aumento de SOL y el déficit de MOR en este estudio muestran una elevación del proceso inhibitor que inducen la excitación mediante el uso de solventes tales como tolueno. Los resultados de este trabajo están sustentados por estudios que sugieren que la sincronización de EEG viene de la inhibición activa de las neuronas tálamo-corticales (Steriade y Contreras, 1995; Steriade *et al.*, 1990). La administración de una dosis única de tolueno indujo cambios en los sistemas serotoninérgico y dopaminérgico.

CONCLUSIÓN

El análisis de los cambios de los disolventes orgánicos como el tolueno, en el ciclo del sueño y el contenido de monoaminas puede ser considerado útil para aclarar los efectos de los disolventes en el cerebro y los mecanismos de alteración del sueño en los trabajadores y jóvenes expuestos a tales disolventes.

LITERATURA CITADA

- Alfaro-Rodríguez A, González-Piña R, González-Maciél A, Arch-Tirado E. 2006. Serotonin and 5-hydroxy-indole-acetic acid contents in dorsal raphe and suprachiasmatic nuclei in normal, malnourished and rehabilitated rats under 24 h of sleep deprivation. *Brain Res.* 1110(1):95-101.
- Anderson, C.E., Loomis, G.A. 2003. Recognition and prevention of inhalant abuse. *Am. Fam. Physicia.* 68: 869-874.
- Arito, H., Tsuruta, H., Nakagaki, K., Tanaka, S. 1985. Partial insomnia, hyperactivity and hyperdipsia induced by repeated administration of toluene in rats: their relation to brain monoamine metabolism. *Toxicology.* 37(1-2): 99-110.
- Baghdoyan, H.A., Lydic, R. 2002. Neurotransmitters and neuromodulators regulating sleep, in sleep and epilepsy: The Clinical Spectrum (Bazil, C., Malow, B. and Sammaritano, M. eds.) Elsevier Science, and New York, pp 17-44.
- Bale, A.S., Tu, Y., Carpenter-Hyland, E.P., Chandler, L.J., Woodward, J.J. 2005. Alterations in glutamatergic and gabaergic ion channel activity in hippocampal neurons following exposure to the abuse inhalant toluene. *Neuroscience.* 130:197-206.
- Beebe KR., Lee KA. 2007. Sleep Disturbance in Late Pregnancy and Early Labor. *J Perinat Neonat Nurs.* 23(2): 103–108.
- Benignus V A, Muller KE, Barton CN, Bittikofer JA. 1981. Toluene levels in blood and brain of rats during and after respiratory exposure. *Toxicol. App. Pharmacol.* 61: 326.
- Berenguer P, Soulage C, Fautrel A, Péquignot JM, Abraini JH. 2004. Behavioral and neurochemical effects induced by subchronic combined exposure to toluene at 40 ppm and noise at 80 dB-A in rats. *Physiol. Behav.* 81(3):527-34.
- Berenguer P, Soulage C, Perrin D, Péquignot JM, Abraini JH. 2003. Behavioral and neurochemical effects induced by subchronic exposure to 40 ppm toluene in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 74(4):997-1003.
- Bruckner JV, Peterson RG. 1981. Evaluation of toluene and acetone inhalant abuse. I. Pharmacol and Pharmacodynamics. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 61: 27.

- Calderón-Guzmán D, Espitia-Vázquez I, López-Domínguez A Hernández-García E et al. 2005a. Effect of toluene and nutritional status on serotonin, lipid peroxidation levels and Na^+/K^+ -ATPase in adult rat brain. *Neurochem Res.* 30(5):619-24.
- Calderón-Guzmán, D., Hernández-Islas, J. L., Espitia-Vázquez, et al. 2005b. Effect of toluene and cresols on $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase, and serotonin in rat brain. *Reg. Toxicol. Pharm.* 41:1-5.
- Castilla-Serna L, Barragán-Mejía MG, Rodríguez-Pérez RA, García Rillo A, Reyes-Vázquez C. 1993. Effects of acute and chronic toluene inhalation on behavior, monoamine metabolism and specific binding (3H-serotonin and 3H-norepinephrine) of rat brain. *Arch Med Res.* 24(2):169-76.
- Chen, H.H., Lee, Y.F. 2002. Neonatal toluene exposure selectively alters sensitivity to different chemoconvulsant drug in juvenile rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 73: 921-927.
- Chien-Lu, L., Yi-Ruu, L., Ming-Huan, C.H., Hwei-Hsien, C.H. 2007. Effects of toluene exposure during brain growth spurt on GABA a receptor-mediated functions in juvenile Rats. *Toxicol Sci.* 95(2): 443-451.
- Echeverria, D., Fine, L., Langolf, G., Schork, T., Sampaio, C. 1991. Acute behavioral comparisons of toluene and ethanol in human subjects. *British Journal of Industrial medicine.* 48: 750-761.
- Ehlen JC, Grossman GH, Glass JD. 2000. In vivo resetting of the hamster circadian clock by 5-HT₇ receptors in the suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci.* 21(14):5351-7.
- Eriksson L., Eden S., Holst J., Lindstedt G., Von Schultz B. 1989. Diurnal variations in thyrotropin, prolactin and cortisol during human pregnancy. *Gynecol Obstet Invest.* 27:78-83.
- Gerasimov M, Schiffer W K, Mastellar D, Ferrieri R, AlexoFF D, Dewey S I. 2002. Toluene inhalation produces regionally specific changes in extracellular dopamine. *Drug and Alcohol Dependence.* 65: 243-251.
- Glass JD, Grossman GH, Farnbauch L, DiNardo L. 2003. Midbrain raphe modulation of nonphotic circadian clock resetting and 5-HT release in the mammalian suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci.* 23(20):7451-60.

- Glowinski J, Iversen LL. 1966. Regional studies of catecholamines in the rat brain. Disposition of 3H-norepinephrine, 3Hdopamine and 3H-DOPA in various regions of the brain. *J Neurochem.* 13:655–669.
- Grave de Peralta-Menéndez R, González-Andino S, Gómez-González C.M. 2004. Comparison of algorithms for the localization of focal sources: Evaluation with simulated data and analysis of experimental data. *International Journal of Bioelectromagnetism.* 39(8): 748-756.
- Grave de Peralta-Menéndez R, González-Andino S. 2002. Comparison of algorithms for the localization of focal sources: Evaluation with simulated data and analysis of experimental data. *International Journal of Bioelectromagnetism.*
- Guillen J. 2012. FELASA guidelines and recommendations. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 51(3):311-321.
- Gutiérrez, R., Vega L. 1999. Informe preliminar de un programa para disminuir los daños asociados con la inhalación de tolueno en lils niños de la calle. *Salud Mental*, Número especial. 75-78.
- Hobson JA., McCarley RW., Wyzinski PW. 1975. Sleep cycle oscillation: reciprocal discharge by two brainstem neuronal groups. *Science.* 189:55-58.
- Kayama Y, Koyama Y. 2003. Control of sleep and wakefulness by brainstem monoaminergic and cholinergic neurons. *Acta Neurochir Suppl.* 87:3-6.
- Kollmus H, Post R, Brielmeier M, Fernandez J, Fuchs H, McKerlie C, et al. 2012. Structural and functional concepts in current mouse phenotyping and archiving facilities. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 51(4):418-435.
- Krahn LE., Silber MH., Morgenthaler TI. 2010. Atlas of Sleep Medicine. CRC Press, United States of America, Pp 30.
- Krishnan V., Collop NA. 2006. Gender differences in sleep disorders. *Current Opinion in Pulmonary Medicine.* 12:383–389.
- Laguno S.N., Concalves, P.M.L., Machado A.A.F., Jose A:M., Harumi T.M., Moreira P.E. 2015. Polysomnography assessment of sleep and wakefulness in premature newborns. *Rev Bras Enferm.* 68(6):799-805.
- Lantz G, Grave de Peralta-Menéndez R, González S, Michel CM. 2001. Noninvasive localization of electromagnetic epileptic activity. II. Demonstration of sublobar

- accuracy in patients with simultaneous surface and depth recordings. *Brain Topogr.* 14: 139-47.
- Lantz G, Grave de Peralta-Menéndez R, Spinelli L, Seeck M, Michel CM. 2003. Epileptic source localization with high density EEG: how many electrodes are needed? *Clin Neurophysiol.* 114: 63-9.
- LeBel, CP, Schatz RA. 1989. Effect of toluene on rat synaptosomal phospholipid methylation and membrane fluidity. *Biochem. Pharmacol.* 38:4005–4011.
- Lebel CP, Schatz RA. 1990. Altered synaptosomal phospholipid metabolism after toluene: possible relationship with membrane fluidity, Na⁺,K⁺-adenosine triphosphatase and phospholipid methylation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 253: 1189–1197.
- Lee KA., Landis C., Chasens ER., Dowling G., Merritt S., Parker KP., Redeker N., Richards KC., Rogers AE., Shaver JF., Umlauf MG., Weaver TE. 2004. Sleep and chronobiology: recommendations for nursing education. *Nurs Outlook.* 52:126–133.
- Lucchini R. 2000. Mechanism of neurobehavioral alteration. *Toxicol Lett.* 112:35-39.
- Lydic R., Baghdoyan HA. 1998. Handbook of Behavioral State Control: Cellular and Molecular Mechanisms. CRC Press, United States of America, Pp 143-152.
- Markov D., Goldman M. 2006. Normal sleep and circadian rhythms: Neurobiologic mechanisms underlying sleep and wakefulness. *Sleep Medicine Clinics.* 7(3):417-426.
- Masri R, Trageser JC, Bezdudnaya T, Li Y, Keller A. 2006. Cholinergic regulation of the posterior medial thalamic nucleus. *J Neurophysiol.* 96(5):2265-73.
- Mathis J, Hess CW, Bassetti C. 2007. Isolated mediotegmental lesion causing narcolepsy and rapid eye movement sleep behaviour disorder: a case evidencing a common pathway in narcolepsy and rapid eye movement sleep behaviour disorder. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 78(4):331-2.
- Millan MJ, Di Cara B, Dekeyne A, Panayi F, De Groote L, Sicard D, Cistarelli L, Billiras R, Gobert A. 2007. Selective blockade of dopamine D(3) versus D(2) receptors enhances frontocortical cholinergic transmission and social memory in rats: a parallel neurochemical and behavioural analysis. *J Neurochem.* 100(4):1047-61.

- National Research Council Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 2011. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Press WNA, editor.
- Ogata M, Kira S, Hasegawa T, Watanabe S. 1974. Distribution of toluene in mouse tissues. *Jpn. J. Ind Health.* 16, 23.
- Okun ML., Roberts JM., Marsland AL., Hall M. 2009. How Disturbed Sleep May Be a Risk Factor for Adverse Pregnancy Outcomes A Hypothesis. *Obstetrical and gynecological survey.* 64(4): 273–280.
- Olfert ED, Cross BM, McWilliam AA. 1993. Guide for the care and use of experimental animals. *Can Council Animal Care* 1:211.
- Pouzet B. 2002. SB-258741: $\alpha 5$ -HT7 receptor antagonist of potential clinical interest. *CNS Drug Rev.* 8(1): 90-100.
- Qui C., Enquobahrie D., Frederick IO., Abetew D., Williams MA. 2010. Glucose intolerance and gestational diabetes risk in relation to sleep duration and snoring during pregnancy: a pilot study. *BMC Womens Health.* 10: 17.
- Regal A.R., Amigo M.C., Cebrián E. 2009. Sueño y mujer. *Rev Neurol.* 49 (7): 376-382.
- Riegel AC, Ali SF, Torinese S, French ED. 2004. Repeated exposure to the abuse inhalant toluene alters levels of neurotransmitters and generates peroxynitrite in nigrostriatal and mesolimbic nuclei in rat. *Ann N Y Acad Sci.* 1025: 543-51.
- Romero-Fernandez, W., Batista-Castro, Z., De Lucca, M., Ruano, A., García-Barceló M., Rivera-Cervantes, M., García-Rodríguez, J., Soledad Sánchez-Mateos. 2016. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 288-299.
- Rose M., Sanford A., Thomas C., Opp MR. 2001. Factors altering the sleep of burned children. *Sleep.* 24(1):45-51.
- Salín-Pascual R. 2009. *Trastornos del dormir.* Mc Graw Hill, México, Pp 37-48.
- Sanford LD, Silvestri AJ, Ross RJ, Morrison AR. 2001. Influence of fear conditioning on elicited ponto-geniculo-occipital waves and rapid eye movement sleep. *Arch Ital Biol.* 139:169–83.
- Senthilvelan M, Ravindran R, Samson J, Devi RS. 2006a. Serotonin turnover in different duration of sleep recovery in discrete regions of young rat brain after 24 h REM sleep deprivation. *Brain Dev.* 28(8):526-8.

- Senthilvelan M, Ravindran R, Samson J, Devi RS. 2006b. Serotonin turnover in discrete regions of young rat brain after 24 h REM sleep deprivation. *Neurochem Res.* 31(1):81-4.
- Seron-Ferre M., Ducsay CA., Valenzuela GJ. 1993. Circadian rhythms during pregnancy. *Endocr Rev.* 14:594-609.
- Shouse MN, Siegel JM. 1992. Pontine regulation of REM sleep components in cats; integrity of the pedunculopontine tegmentum (PPT) is important for phasic events but unnecessary for atonia during REM sleep. *Brain Res.* 571, 50-63.
- Spiegel K., Folleniw M., Simon C., Saini J., Ehrhart J., Brandenberger G. 1994. Prolactin secretion and sleep. *Sleep.* 17:20-27.
- Steingard K, Höglund G, Ungstedt U. 1994. Extracellular dopamine levels within the striatum increase during inhalation exposure to toluene: a microdialysis study in awake, freely moving rats. *Toxicology Letters.* 71: 245-255.
- Stengard K. 1995. Tail pinch increases acetylcholine release in rat striatum even after toluene exposure. *Pharmacol. Biochem and Behav.* 52(2):261-264.
- Steriade M. 2004. Slow-wave sleep: serotonin, neuronal plasticity, and seizures. *Arch Ital Biol.* 2004. 142(4):359-67.
- Steriade, M. 1992. Basic mechanisms of sleep generation. *Neurology (Suppl. 6)*, 9-17.
- Steriade M, McCarley RW. 1990. Neuronal control of the sleep-wake status. In Steriade, M and McCarley R W, (Eds). *Brainstem control of Wakefulness and sleep*, Plenum, New York, 1990. pp326-353.
- Steriade M, Contreras D. 1995. Cellular basic of EEG slow rhythms: a study of dynamic corticothalamic relationships. *J. Neurosci.* 15:604-622.
- Steriade M, Gloor P, Llinas RR, López DA, Silva FH, Mesulam MM. 1990. Basic mechanisms of cerebral rhythmic activities. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 76:481-508.
- Takeuchi, Y., Hisanga, N. 1977. The neurotoxicity of toluene: EEG changes in rats exposed to various concentrations. *British Journal of Industrial medicine.* 34: 314-324.
- Tan CO, Bullock D. 2008. A dopamine-acetylcholine cascade: Simulating learned and lesion-induced behavior of striatal cholinergic interneurons. *J Neurophysiol.* PMID: 18715897.

- Teplan M. 2002. Fundamental of EEG measurement. *Meas. Sci. Rev.* 2: 1-11
- Van Cauter E. 1990. Diurnal and ultradian rhythms in human endocrine function: a minireview. *Horm Res.* 34:45-53.
- Von Euler, G., Fuxe, K., Hansson, T., Ogren, S.O., Agnati, L.F., Eneroth, P., Härfstrand, A., Gustafsson, J.A. 1998. Effects of cronic toluene exposure on central monoamine and peptide receptors and their interactions in the adult male rat. *Toxicology.* 14; 52(1-2): 103-26.
- Williams, J.M., Stanfford, D., Steketee, J.D. 2005. Effects of repeated inhalation of toluene on ionotropic GABA_A and glutamate receptor subunit levels in rat brain. *Neurochem. Int.* 46: 1-10.
- Yamawaki, S., Segawa, T., Sarai, K. 1982. Effects of acute and chronic toluene inhalation on behavior and (3H)-serotonin binding in rat. *Life Sci.* 7; 30(23):1997-2002.
- Zeng T., Mott C., Mollicone D., Sanford LD. 2012. Automated determination of wakefulness and sleep in rats based on non-invasively acquired measures of movement and respiratory activity. *J Neurosci Methods.* 204(2): 276–287.

GLOSARIO

NACL: por sus siglas, cloruro de sodio

EEG: por sus siglas Electroencefalograma

SOL: Sueño de Ondas Lentas

SP: Sueño Paradójico

V: Vigilia

DA: Dopamina

NA: Noradrenalina

5HT:

5-HIAA: Ácido 5-Hidroxindolacético

NMOR: Sueño sin movimientos oculares

MOR: Sueño paradójico o sueño de movimientos oculares rápidos

SNC: Sistema nervioso central

EMG: Electromiograma

EOG: Electrooculograma

EKG: Electrocardiograma

RPSG: Registro Polisomnográfico

EOGizq: Electroodos oculares, ojo izquierdo

EOGder : Electroodos oculares ojo derecho