



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE  
HIDALGO**

**FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA**

**“EFECTO DE LA EXPOSICIÓN AGUDA Y CRÓNICA A TOLUENO SOBRE LAS  
CONVULSIONES INDUCIDAS POR PENTILENTETRAZOL EN RATONES”**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

**PRESENTA**

**pQFB OSMAR ANTONIO JARAMILLO MORALES**

**ASESOR**

**D.C. MARCIA YVETTE GAUTHEREAU TORRES**

**MORELIA, MICH., MAYO DE 2010**



Durante la realización del presente trabajo se contó con el apoyo de la Coordinación de la Investigación Científica-UMSNH a través del proyecto 26.10.

## Agradecimientos

A mi asesora: D.C. Marcia Yvette Gauthereau Torres, por ser parte de mi formación académica, por creer en mí, apoyarme en todo momento, por la paciencia, el respeto y la amabilidad por enseñarme el andar científico, por brindarme la oportunidad de conocer lo maravilloso de la investigación, por sus consejos de seguir superándome día con día y sobre todo por soportarme por todo un año a pesar de todas las locuras que cometía. Muchas gracias asesora.

A mis sinodales:

D.C. Daniel Godínez Hernández

D.C. Rosalío Mercado Camargo

Q.F.B. Armida Sánchez Gallegos

Por su disposición y sus comentarios que enriquecieron el presente trabajo de investigación.

A mis amigos, especialmente a Lalo, Delil, Rey, Gerardo, Eduardo, Esli, Hector, Tiva y a todos mis amigos de la Facultad, así como externos a ella, por caminar junto a mí, enseñarme muchas cosas, entre ellas la amistad y sobre todo por darme sus consejos en los momentos difíciles y fáciles que compartimos juntos, muchas gracias.

A las señoras de la biblioteca, especialmente a Claudia, Alejandra y María de los Ángeles, por el gran apoyo que brindaron, sus consejos, las regañadas que me daban y por soportar todas las locuras que hice en la biblioteca por aproximadamente 6 años, de corazón muchas gracias.

## **Dedicatoria**

A Dios, por permitirme vivir y cumplir uno de mis principales objetivos en esta vida, por todas tus bondades, por los momentos que me has dado día con día y por vivir esta experiencia tan maravillosa. De corazón gracias.

A mis padres José Antonio y Josefina, por haberme dado principalmente la vida, su amor, cariño, apoyo, la confianza incondicional, por dirigirme siempre por el buen camino, por su sacrificio que hacen día con día para que a mis hermanas y a mí no nos haga falta nada, por estar siempre conmigo en los momentos más difíciles, por siempre inculcarme el deseo de superarme día con día y sobre todo por apoyarme siempre en las decisiones tan importantes que he tomado en el transcurso de mi vida. No tengo palabras para agradecerles todo lo que han hecho por mí, de corazón muchas gracias.

A mis hermanas Nallely y Nubia Edith, por su gran apoyo, por todas las alegrías, tristezas que juntos hemos vivido y por siempre darme ánimo para seguir adelante. Y por todas esas cosas que hemos vivido juntos, muchas gracias de corazón, mis hermanitas de mi corazón.

A mi abuela Antonina, por el gran amor que me ha dado, por sus consejos, por siempre preocuparse por mí, por estar siempre ocupando un lugar muy importante en mi vida, muchas gracias mama.

Y a una persona que es muy especial en mi vida, a mi novia Nereida, por tu amor, la confianza, el respeto, la amistad, por estar siempre conmigo apoyándome en los momentos más difíciles de mi vida, por esos momentos maravillosos que hemos pasado día con día, por tu apoyo incondicional y por siempre darme esas palabras de aliento para continuar con esta lucha de seguir superándome, gracias mi gorda. Te amo.

# ÍNDICE GENERAL

|                                                                                                      |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Índice general.....                                                                                  | i         |
| Abreviaturas.....                                                                                    | iii       |
| Resumen.....                                                                                         | iv        |
| <b>I. Introducción.....</b>                                                                          | <b>1</b>  |
| 1. Inhalables.....                                                                                   | 1         |
| 1.1. Definición.....                                                                                 | 1         |
| 1.2. Clasificación.....                                                                              | 1         |
| 1.2.1. Alquil nitritos volátiles.....                                                                | 1         |
| 1.2.2. Óxido nitroso.....                                                                            | 2         |
| 1.2.3. Disolventes volátiles, combustibles y anestésicos.....                                        | 2         |
| 1.3. Generalidades.....                                                                              | 2         |
| 1.4. Marco legal de los inhalables.....                                                              | 4         |
| 1.5. Farmacocinética.....                                                                            | 5         |
| 2. Tolueno.....                                                                                      | 6         |
| 2.1. Propiedades fisicoquímicas.....                                                                 | 6         |
| 2.2. Usos.....                                                                                       | 6         |
| 2.3. Farmacodinamia.....                                                                             | 7         |
| 2.3.1. Comparación de los efectos del tolueno y etanol.....                                          | 8         |
| 2.3.2. Efectos neurofarmacológicos de los inhalables.....                                            | 12        |
| 2.3.2.1. Efectos a nivel celular.....                                                                | 12        |
| 2.3.2.2. Efectos neurofarmacológicos de los inhalables: La expresión del receptor/ neuroquímica..... | 14        |
| 2.3.2.3. Efectos de los disolventes sobre el sistema dopaminérgico.....                              | 15        |
| 2.3.2.4. Efectos de los disolventes sobre la formación de radicales libres.....                      | 16        |
| 2.3.2.5. Efectos de la exposición prenatal a disolventes.....                                        | 16        |
| 2.4. Efectos crónicos de los disolventes.....                                                        | 17        |
| 2.4.1. Tolerancia, dependencia y sensibilización.....                                                | 17        |
| 2.5. Complicaciones médicas.....                                                                     | 18        |
| 2.6. Efectos anticonvulsivantes.....                                                                 | 20        |
| 3. Neurotransmisores.....                                                                            | 21        |
| 3.1. Síntesis de GABA.....                                                                           | 22        |
| 3.2. Mecanismo de acción del GABA.....                                                               | 23        |
| 3.3. Estructura del receptor GABA <sub>A</sub> .....                                                 | 25        |
| 3.4. Convulsiones y sistema GABAérgico.....                                                          | 27        |
| 3.5. Pentilentetrazol (PTZ).....                                                                     | 28        |
| <b>II. Justificación.....</b>                                                                        | <b>29</b> |
| <b>III. Hipótesis.....</b>                                                                           | <b>31</b> |

|                                                                                                                 |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>IV. Objetivos.....</b>                                                                                       | <b>32</b> |
| 1. Objetivo general.....                                                                                        | 32        |
| 2. Objetivos particulares.....                                                                                  | 32        |
| <b>V. Materiales y métodos.....</b>                                                                             | <b>33</b> |
| 1. Animales.....                                                                                                | 33        |
| 2. Sustancias.....                                                                                              | 33        |
| 3. Exposición a disolventes.....                                                                                | 33        |
| 4. Protocolos experimentales.....                                                                               | 35        |
| 4.1. Protocolo 1. Curva dosis-respuesta.....                                                                    | 35        |
| 4.2. Protocolo 2. Pre-exposición.....                                                                           | 35        |
| 4.3. Protocolo 3. Exposición crónica.....                                                                       | 35        |
| 5. Variables evaluadas.....                                                                                     | 36        |
| 6. Análisis de datos.....                                                                                       | 36        |
| <b>VI. Resultados.....</b>                                                                                      | <b>37</b> |
| 1. Curvas dosis respuesta para PTZ.....                                                                         | 37        |
| 2. Efecto de la pre-exposición a tolueno sobre las convulsiones inducidas por PTZ.....                          | 38        |
| 3. Efecto de la pre-exposición a tolueno sobre la muerte inducida por PTZ.....                                  | 40        |
| 4. Efecto de la exposición repetida a tolueno sobre el porcentaje de presentación de CCT inducidas por PTZ..... | 41        |
| 5. Efectos de la exposición a tolueno sobre el porcentaje de presentación de CC inducidas por PTZ.....          | 43        |
| 6. Efectos de la exposición a tolueno sobre el número de presentación de CC inducidas por PTZ.....              | 45        |
| 7. Efectos de la exposición a tolueno sobre la latencia de presentación de CC inducidas por PTZ.....            | 47        |
| <b>VII. Discusión.....</b>                                                                                      | <b>48</b> |
| <b>VIII. Conclusiones.....</b>                                                                                  | <b>56</b> |
| <b>IX. Referencias.....</b>                                                                                     | <b>57</b> |

## ABREVIATURAS

|                   |                                       |
|-------------------|---------------------------------------|
| 5-HT <sub>3</sub> | Receptor serotoninérgico tipo 3       |
| AR                | Autoreceptor                          |
| BZD               | Benzodiacepinas                       |
| CC                | Convulsiones clónicas                 |
| CCT               | Convulsiones clónico-tónicas          |
| DE <sub>100</sub> | Dosis efectiva 100                    |
| DE <sub>50</sub>  | Dosis efectiva 50                     |
| DL <sub>100</sub> | Dosis letal 100                       |
| DL <sub>50</sub>  | Dosis letal 50                        |
| ENA               | Encuesta Nacional de Adicciones       |
| GABA              | Acido $\gamma$ -Aminobutírico         |
| i.p.              | Intraperitoneal                       |
| min               | Minuto                                |
| mg/kg             | Miligramo/kilogramo                   |
| mM                | Micromolar                            |
| NIDA              | Instituto Nacional de Abuso de Drogas |
| NMDA              | N- metil D-aspartato                  |
| NT                | Neurotransmisor                       |
| ppm               | Partes por millón                     |
| PTX               | Picrotoxina                           |
| PTZ               | Pentilentetrazol                      |
| SNC               | Sistema Nervioso Central              |
| TCE               | 1,1,1-tricloroetano                   |

## RESUMEN

El abuso de inhalables constituye un problema de magnitud mundial que repercute en la salud pública, no sólo porque afecta a grandes grupos sociales, muchos de ellos marginados, sino porque se presenta a edades tempranas y provoca graves secuelas para la salud. Los inhalables de abuso se definen como aquellas sustancias volátiles a temperatura ambiente que se inhalan para producir un estado alterado de conciencia. Un reporte reciente señala que la prevalencia de consumo es más alta en la Ciudad de México y que el tolueno (presente en pegamentos, pinturas acrílicas y disolvente de pinturas) es el disolvente de preferencia en la capital del país. De acuerdo a estudios *in vitro*, se ha visto que el tolueno incrementa la actividad de los receptores GABA<sub>A</sub>, con lo que se produce un efecto depresor. Al observar el efecto de los disolventes en los usuarios y gracias a estudios conductuales realizados con animales de laboratorio, se estableció que los disolventes tienen acciones semejantes a los depresores clásicos del Sistema Nervioso Central (SNC). Con base en ello se ha propuesto que estas sustancias podrían compartir algunos mecanismos de acción y que podrían tener efectos anticonvulsivantes, así como que el tratamiento crónico con disolventes de abuso, como el tolueno, podría producir tolerancia a dichos efectos, al igual que lo que sucede con algunos depresores del SNC. Se usaron ratones macho CD1 (25-35 g), se siguieron 3 protocolos experimentales: 1. Se administró pentilentetrazol (PTZ, antagonista del receptor GABA<sub>A</sub>) i.p., a los ratones e inmediatamente después se les colocó de manera individual en una cámara de exposición estática durante 30 min, con el fin de hacer una curva dosis-respuesta para determinar la dosis convulsionante 100. 2. (Pre-exposición) Los animales se expusieron al disolvente (tolueno 4000 ppm) o aire durante 30 min, una vez transcurrido este tiempo se sacaron de la cámara, se le administró el agente convulsionante y se introdujeron en una segunda cámara donde fueron expuestos al disolvente o al aire durante 30 min. 3. (Crónico) Los animales se expusieron a tolueno 4000 ppm o a aire durante 30 min, 2 veces al día, por 60 días y el día 61 los animales evaluaron de acuerdo al protocolo de pre-exposición. Se determinó que la dosis convulsivante 100 de PTZ correspondió a 60 mg/kg. De acuerdo a los resultados obtenidos en la exposición aguda (pre-exposición) se encontró que el tolueno tuvo un efecto anticonvulsivante y de protección contra la muerte inducida por PTZ, lo cual podría ser debido a una potenciación de los receptores GABA<sub>A</sub>. Por otro lado, el tolueno, en administraciones repetidas, perdió en parte su efecto protector en contra de las convulsiones producidas por PTZ al aumentar el número de convulsiones clónicas en comparación con los ratones de los experimentos de la fase aguda, lo cual podría deberse, al menos en parte, a una regulación en la baja de los receptores GABA<sub>A</sub>.



## **I. INTRODUCCIÓN**

### **1. INHALABLES**

#### **1.1. DEFINICIÓN**

El tolueno es un disolvente de abuso que pertenece al grupo de los inhalables, los cuales se definen como aquellas sustancias volátiles a temperatura ambiente que se administran por inhalación con el fin de alterar la conciencia y el estado de ánimo y así alcanzar la intoxicación (Dinwiddie, 1994).

El abuso de inhalables involucra la inhalación de una sustancia directamente en su contenedor, colocando un trapo empapado en la materia sobre la nariz y/o la boca o vertiendo la sustancia en una bolsa de plástico y respirando los humos (Carrie y col., 2003).

#### **1.2. CLASIFICACIÓN**

Existen muchas maneras de clasificar las sustancias químicas que son sujeto de abuso por inhalación. Algunas veces se clasifican con base en su estructura química y otras veces con base en su uso comercial. Sin embargo, tomando en cuenta sus perfiles farmacológicos comunes y sus efectos conductuales pueden dividirse en tres grupos (Balster, 1998):

##### **1.2.1. ALQUIL NITRITOS VOLÁTILES**

El prototipo de éstos es el amil nitrito, el cual es usado en el tratamiento de la angina de pecho. La mayoría de la evidencias señalan que los efectos vasodilatadores y relajantes del musculo liso son la base para el uso de estos productos (Balster., 1998). Los nitritos también son usados comúnmente durante la actividad sexual por hombres homosexuales para tener una experiencia relajante e intensificada en la actividad sexual (Goode y Troiden, 1979).

### **1.2.2. ÓXIDO NITROSO**

Es un anestésico gaseoso ampliamente usado (Balster, 1998). El abuso de este anestésico está reportado por profesionales de la salud y estudiantes (Rosenberg y col., 1979). El óxido nitroso es conocido como “gas hilarante” y se ha encontrado que produce un perfil único de efectos (Dohrn y col., 1992). También produce un patrón subjetivo y efectos en el comportamiento que difieren de los producidos por concentraciones sub-anestésicas de anestésicos generales volátiles (Zacny y col., 1994; Galinkin y col., 1997).

### **1.2.3. DISOLVENTES VOLÁTILES, COMBUSTIBLES Y ANESTÉSICOS**

Es un grupo de inhalables de abuso muy diverso y químicamente grande. Los compuestos prototipo de esta clase incluyen al tolueno, el cual es ampliamente utilizado como disolvente (Balster, 1998).

## **1.3. GENERALIDADES**

El término inhalable se utiliza para describir una variedad de sustancias cuya característica principal es que, rara vez o nunca, son usadas por otra vía que no sea la inhalación (NIDA, 2005). El abuso de inhalables constituye un problema de magnitud mundial que repercute en la salud pública, no sólo porque afecta a grandes grupos sociales, muchos de ellos marginados, sino porque se presenta a edades muy tempranas y provoca graves secuelas para la salud, incluida la presentación ocasional de muertes súbitas (Dinwiddie, 1994; Dreiem y col., 2002; Kosel y col., 1995). Los disolventes se encuentran en productos de uso comercial, su posesión es legal, son baratos y la inhalación de sus vapores no se considera una conducta de alto riesgo (Páez y col., 2003). El hombre puede entrar en contacto con estos compuestos en condiciones laborales, por inhalación voluntaria y por intoxicación accidental. Los niveles de exposición pueden ir desde unas

cuantas partes por millón (ppm) hasta varias decenas de miles de ppm durante una intoxicación voluntaria o accidental (Marjot y Mcleod, 1989).

De acuerdo con estudios recientes, en Estados Unidos la prevalencia de uso, de al menos una vez en la vida entre estudiantes a nivel de enseñanza media superior, es de alrededor del 15% (NIDA, 2002). En México, esta cifra es de aproximadamente 5% en el Distrito Federal (Villatoro y col., 2001) y de 1% a nivel nacional de acuerdo con la Encuesta Nacional de Adicciones (ENA, 2002), pero es mucho mayor, de 22%, en la población de los niños que trabajan y/o viven en la calle (Medina y Berenzon, 1995).

La mayoría de los individuos que experimentan con inhalables se inician en esta práctica debido a las siguientes causas:

- Curiosidad, que es intensa en niños.
- Influencia de grupo, factor de gran peso en la iniciación y mantenimiento del consumo.
- Costo, el cual es un factor decisivo, ya que son baratos en comparación con otras drogas de abuso.
- Disponibilidad, debido a que se consiguen en establecimientos comerciales o en el hogar.
- Conveniencia de manejo, ya que vienen empaquetados en forma sencilla y práctica, lo que evita sofisticados manejos para su administración.
- Legalidad, la posesión de inhalables no se encuentra penada por lo que resulta más fácil a los menores adquirirlos.
- Alteraciones del estado de ánimo, los efectos tanto eufóricos como de evasión de situaciones desagradables inducidos por los inhalables se han reportado como placenteros.

Reportes de la literatura indican que uno de los disolventes de abuso de mayor uso es el tolueno (Arlien-Soborg, 1992; ATSDR, 1994; Medina- Mora y col., 1997; Balster, 1998). El tolueno se encuentra en productos comerciales como el “thinner”, la gasolina, las pinturas en aerosol, pegamentos de plásticos. Se sabe que este disolvente causa daño al cerebro (pérdida de la masa de tejido cerebral, deterioro cognitivo, problemas con la marcha, pérdida de la coordinación y del

equilibrio, espasmos en las extremidades, pérdida auditiva y de visión), daño al hígado y al riñón.

En México, el “thinner” se vende a granel en botellas de litro, sin etiqueta que indique su contenido. En realidad es una mezcla de disolventes; sin embargo, por la escasez de materias primas, las fórmulas del “thinner” difícilmente se mantienen constantes, lo que da origen a la sustitución de sus componentes por compuestos más tóxicos (Flowers, 2005).

La inhalación deliberada de sustancias volátiles (inhalables) puede causar daños graves al sistema nervioso central y perturbar el desarrollo psicológico, emocional y neurobiológico (Balster, 1998; Kurtzman y col., 2001; Bowen y col., 2006; Lubman y col., 2006). Muchos estudios de los efectos de los disolventes de abuso se han hecho tratando de reproducir la situación de la exposición ocupacional. Pocos grupos en el mundo han llevado a cabo estudios controlados de laboratorio de exposiciones cortas a altas concentraciones de disolvente. Existen todavía muchas preguntas por responder acerca de los mecanismos de acción de estos fármacos, pero dado que las consideraciones éticas claramente limitan los estudios en humanos, la mayoría de los estudios para la caracterización de los efectos del abuso de inhalables se realizan por medio de la investigación en animales (Gauthereau, 2002).

#### **1.4. MARCO LEGAL DE LOS INHALABLES**

Los inhalables se engloban dentro de la Ley General de Salud como: “las sustancias psicotrópicas que carecen de valor terapéutico y se utilizan corrientemente en la industria y que se determinarán en las disposiciones reglamentarias correspondientes”. La Secretaría de Salud, para evitar y prevenir el consumo de sustancias inhalables, dispone que se determinen y ejerzan medios de control en el expendio donde se venden inhalables; que se establezcan sistemas de vigilancia en los establecimientos destinados al expendio; que se brinde atención médica a las personas que hayan consumido inhalables y que se lleven a cabo campañas permanentes de información y orientación al público para

la prevención de daños a la salud provocados por el consumo de sustancias inhalables.

Por otra parte, en el Código Penal, los inhalables no se incluyen entre los productos sancionados penalmente. Por lo tanto, la posesión o uso de inhalables no son considerados como delito y lo único que puede imputarse al usuario es que está dañando su salud y obligarlo a recibir tratamiento (Ley general de salud, última reforma, 2009).

## **1.5. FARMACOCINÉTICA**

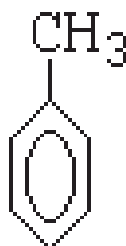
La vía de administración de los disolventes de abuso es inhalatoria. Los inhalables se absorben rápidamente a través del aparato respiratorio, por la amplia superficie pulmonar, pasando directamente a la sangre. Debido al alto poder liposoluble que tienen las sustancias inhaladas, cruzan con facilidad la barrera hematoencefálica, alcanzando inmediatamente el sistema nervioso central (SNC). Los efectos clínicos se observan inmediatamente y tienen una duración breve.

El tolueno es rápidamente absorbido a través de los pulmones y ampliamente distribuido en el tejido graso, la mayoría del tolueno inhalado es oxidado en el hígado a ácido benzoico conjugado con glicina en forma de ácido hipúrico y con ácido glucurónico en forma de benzoilglucónido (Ayres y Taylor, 1989; Benignus, 1981). El metabolito del tolueno que se produce en mayor cantidad es el ácido hipúrico, el cual es excretado en la orina. Este metabolito puede ser usado como un marcador biológico de la exposición a tolueno, tanto en la sangre y como en la orina (Thiesen y col., 2007).

Casi todos los inhalables de abuso (con excepción de los nitritos), producen un efecto placentero al deprimir el SNC. La evidencia presentada por estudios realizados en animales sugiere que éstos poseen efectos neuroconductales y mecanismos de acción similares a aquellos producidos por los depresores del SNC, entre los cuales se encuentra el alcohol y medicamentos tales como los sedantes y anestésicos (NIDA, 2005).

## 2. TOLUENO.

### 2.1. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS



Tolueno

**Figura 1.** Estructura química del tolueno.

El tolueno, toluol, fenilmetano, metil benzol, metil benceno o mono metil benceno (fig. 1), es un líquido incoloro con un olor fuerte a benceno, su solubilidad en agua es 0.59 mg/ml a 25°C (Flowers, 2005). Su peso molecular es de 92.13 g/mol. Posee un densidad de 0.8669 g /cm<sup>3</sup> a 20 °C. Su punto de fusión es de -95 °C y el de ebullición de 110.6 °C, su coeficiente de partición sangre/aire es de 11.2-15.6 a 37 °C y posee una presión de vapor de 28.4 mm Hg a 25 °C (Arlie – Soborg, 1992; ATSDR, 1994).

### 2.2. USOS

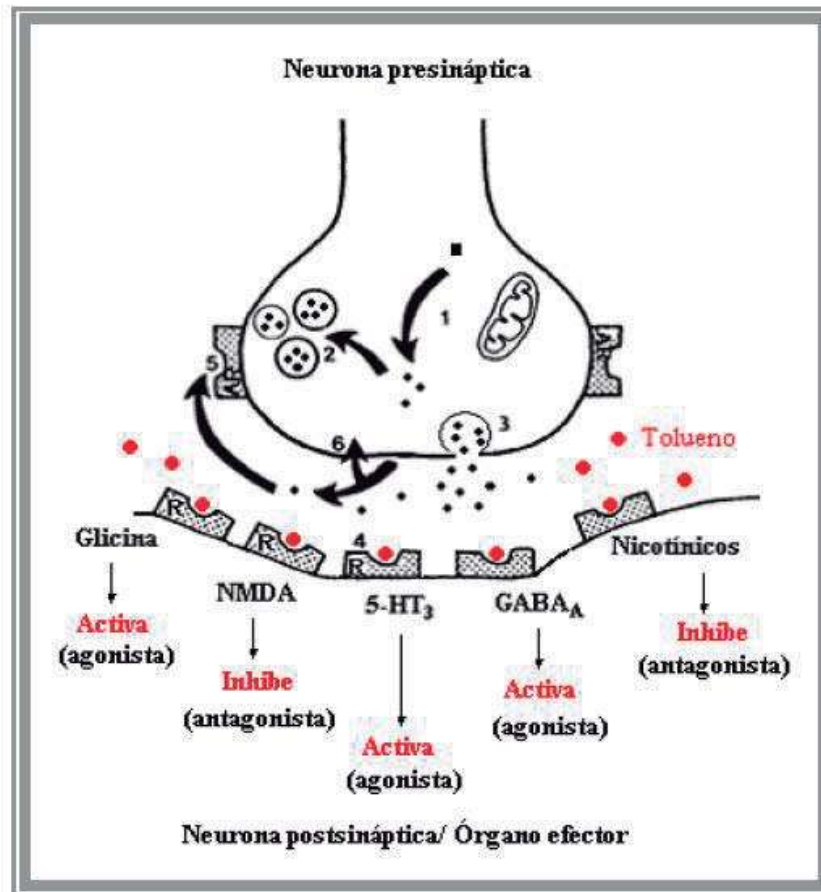
El tolueno es un hidrocarburo aromático producido principalmente durante la refinación del petróleo (Cruz y Bowen, 2008) y es un constituyente natural del aceite crudo (Cruz y Bowen, 2008). Es usado como aditivo en la mezcla de la gasolina, incrementando el índice de octano, llegando a contener de un 5-7% de tolueno (Cruz y Bowen, 2008). También es empleado en la producción del benceno y como disolvente en pinturas, tinta, adhesivos y limpiadores. Además, es usado en la producción de nylon, plásticos, y poliuretanos (Flowers, 2005). Se encuentra además en productos de uso doméstico como el “thinner”, pinturas en aerosol, pegamentos, tintas y barniz de uñas (Arlie-Soborg, 1992; Flanagan,

1994; Budavari, 1996). También está presente en el humo de los cigarros, absorbiéndose de 80-100 µg de este disolvente por cigarro.

### **2.3. FARMACODINAMIA**

Un estudio realizado por Rea y col. en 1984, indica que el tolueno activa el sistema dopaminérgico cerebral. Se ha demostrado que el sistema dopaminérgico desempeña un papel importante en los efectos gratificantes de muchas de las drogas de abuso (NIDA, 2005). Al liberar dopamina, se produce una alteración de la conducta que se manifiesta en un deseo compulsivo de búsqueda e ingestión de la sustancia (Abbota, 1992). De acuerdo con estudios realizados, la inhalación de 1000 ppm de tolueno durante ocho horas aumenta el contenido de dopamina en el tejido estriado en ratas (Read y col., 1984), lo mismo sucede cuando los animales se exponen a 1000 y 2000 ppm de tolueno durante dos horas (Stengard y col., 1994).

En el 2000 se evaluó la participación de los receptores GABA<sub>A</sub> y glicina como posibles blancos moleculares de los disolventes de abuso (Beckstead y col., 2000). El tolueno ejerce su efecto mediante un mecanismo doble, al inhibir la estimulación producida por la actividad normal de los receptores NMDA (Cruz y col., 1998) y nicotínicos (Bale y col., 2002) y al acrecentar la actividad de los receptores GABA<sub>A</sub>, glicina (Beckstead y col., 2000) y 5HT<sub>3</sub> (Lopreto y col., 2003), con lo que aumenta la inhibición (fig. 2).



**Figura 2.** Mecanismo de acción del tolueno sobre diferentes receptores. 1. Síntesis del neurotransmisor (NT) (glicina, glutamato, serotonina, GABA y acetilcolina). 2. Almacenamiento del NT en vesículas. 3. Receptores postsinápticos (donde el tolueno actúa como agonista o antagonista de los diferentes receptores). 4. Receptores presinápticos o autoreceptores (AR), que controlan la retroalimentación. 5. Recaptura del NT desde la hendidura sináptica. Tomada de Fuentes y col., 2000.

### 2.3.1 COMPARACION DE LOS EFECTOS DEL TOLUENO Y DEL ETANOL

Las investigaciones recientes han demostrado que los disolventes de abuso tienen un mecanismo de acción complejo muy similar al del etanol; esto no debería extrañar, puesto que el etanol es también un disolvente, sólo que se administra por vía oral. En la tabla número 1 se hace una comparación de las concentraciones efectivas en que el tolueno (el disolvente mejor estudiado a la fecha) y el etanol ejercen sus efectos sobre varios sistemas de receptores. El etanol inhibe los receptores NMDA y nicotínicos y potencia los receptores GABA<sub>A</sub>, glicina y 5-HT<sub>3</sub>, a concentraciones entre 10 y 100 veces mayores que las del



tolueno. Aunque algunas de las diferencias podrían estar dadas por variaciones en las condiciones experimentales, parece ser constante que el tolueno es mucho más potente que el etanol (Páez y col., 2003).

Hay informes sobre las características clínicas que produce la intoxicación aguda del tolueno desde la década de 1960 (Filley y col., 2004). Los signos y síntomas de la intoxicación por tolueno dependen de la intensidad, duración y frecuencia de la exposición. Normalmente, las personas que han estado expuestas a concentraciones altas de tolueno muestran signos semejantes a los observados con la embriaguez, es decir, una excitación inicial seguida de una inhibición más prolongada, mareos, pérdida de la coordinación y estupor (Eisenberg, 2003). Se han reportado casos de muerte súbita en personas que abusan de tolueno, en los que la asfixia fue descartada y la causa de la muerte fue atribuida a las arritmias cardíacas (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, ATSDR, 2001). La exposición repetida al tolueno se ha asociado con déficits neurológicos que se manifiestan por falta de concentración, pérdida progresiva de memoria y disfunción cerebelosa. Las pruebas de la encefalopatía crónica de tolueno provienen de estudios clínicos e informes neuropsicológicos, estudios de imagenología y autopsias. En las personas que abusan de tolueno se pueden producir, a largo plazo, daños a la materia blanca del cerebro y deterioro de las destrezas cognitivas, lo cual se correlaciona directamente con la gravedad de la leucoencefalopatía. Basado en esto, el tolueno se considera una toxina para la mielina (Filley y col., 2004). Otro efecto perjudicial del abuso crónico de tolueno es la pérdida de la audición, ya que destruye las células en el oído interno (Campo y col., 1997). El tolueno actúa en diferentes blancos moleculares, con variaciones en la afinidad y en la eficacia. El tolueno, al igual que el etanol, es un depresor del sistema nervioso central (SNC), ya que bloquea principalmente el sistema glutamatérgico excitatorio, actuando como un antagonista no competitivo de los receptores NMDA; basándose en su estructura molecular, se han identificado varios subtipos del receptor NMDA y se ha visto que los canales formados por las subunidades NR1 y NR2B son los más sensibles al efecto inhibitorio del tolueno (Cruz y col., 1998; Bale y col., 2005). En estudios con animales se ha demostrado

que la exposición prolongada al tolueno aumenta los niveles de los receptores NMDA en el cerebro (William y col., 2005), un hallazgo que es coherente con lo que se ha reportado para la exposición prolongada al etanol, tanto en animales como en humanos. Otro efecto del tolueno, del tricloroetileno y del 1,1,1-tricloroetano es que aumentan la inhibición de dos receptores acoplados a canales iónicos : GABA<sub>A</sub> y glicina (Beckstead y col., 2000). Otros receptores inhibidos por el tolueno son los receptores colinérgicos nicotínicos formados por las subunidades  $\alpha_4\beta_2$  y  $\alpha_7$ . Este efecto también se ha visto con percloroetileno (Bale y col., 2002; Bale y col., 2005). Lopreato y col. en un estudio en el 2003 informaron que tanto el tolueno como el tricloroetileno mejoran la función del subtipo 3 del receptor de la serotonina (5-HT<sub>3</sub>). Muchos de estos efectos se han estudiado *in vitro* utilizando ovocitos de rana *Xenopus laevis* inyectados con DNA para que expresen diferentes subtipos de receptores específicos (Bowen y col., 2005), mientras que otros utilizan cultivos de tejidos de personas (Tillar y col., 2002). Por otro lado, el tolueno también bloquea los canales de calcio (Tillar y col., 2002) inhibiendo parcialmente el cruce de sus uniones, (Del Re y Woodward, 2005). No es de extrañar que el tolueno, al igual que otras drogas de abuso, modula la transmisión de la dopamina, la cual tiene una acción relacionada con los efectos de recompensa (Riegel y French, 1999; Riegel y col., 2007; Gerasimov y col., 2002; Stergand y col., 1994). En resumen, el tolueno actúa en diferentes blancos moleculares con una eficacia que depende de la concentración. Esto es similar a lo que ha sido descrito para el etanol, otra droga de abuso depresora del SNC. En comparación, el tolueno resulta ser bastante más potente que el etanol. Por ejemplo, la concentración efectiva 50 (CE<sub>50</sub>) para bloquear los receptores NMDA recombinantes expresados en ovocitos es de 0.17 mM para el tolueno y de 100 mM para el etanol. En la misma preparación experimental, el rango de concentración eficaz para aumentar la función del receptor GABA<sub>A</sub> es de 0.2-0.9 mM para el tolueno y de 50-40 mM para el etanol.

**Tabla. 1.** Comparación de las potencias del etanol y el tolueno. Tomada de Páez-Martínez y col., 2003.

| Receptor                    | Efecto      | Tolueno                                                                    | Etanol                                                                   | Preparación                                                |
|-----------------------------|-------------|----------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| NMDA                        | Disminuye   | 1. $Cl_{50}$ -0.2 mM (Cruz y col., 1998)                                   | 1. $Cl_{50}$ -100 mM (Mirshait y Woodward, 1995).                        | 1. Ovocitos.                                               |
|                             |             |                                                                            | 2. $Cl_{50}$ -30 mM (Lovinger y col., 1989).                             | 2. Neuronas hipocampales.                                  |
|                             |             |                                                                            | 3. $Cl_{50}$ -146 mM (Wirkner y col., 2002)                              | 3. Neuronas corticales en cultivo.                         |
| GABA <sub>A</sub>           | Aumenta     | 1. ~0.2-0.9 mM (Beckstead y col., 2000)                                    | 1. 50-400 mM (Mihic y col., 1994).                                       | 1. Ovocitos                                                |
|                             |             |                                                                            | 2. 15-50 mM (Allan y Harris, 1986)                                       | 2. Membranas de cerebro de ratón.                          |
|                             |             |                                                                            | 3. 20-50 mM (Suzdak y col., 1986).                                       | 3. Sinaptosomas.                                           |
|                             |             |                                                                            | 4. 50 mM (Ticku y col., 1986)                                            | 4. Neuronas de la médula espinal.                          |
|                             |             |                                                                            | 5. 10-50 mM (Weiner y col., 1994).                                       | 5. Neuronas hipocampales.                                  |
| GLICINA                     | Aumenta     | 1. ~0.2-0.9 mM (Beckstead y col., 2000)                                    | 1. 10-200 mM (Mascias y col., 1996).                                     | 1. Ovocitos.                                               |
|                             |             |                                                                            | 2. 50 mM (Celentano y col., 1988).                                       | 2. Neuronas espinales de pollo.                            |
|                             |             |                                                                            | 3. 1-200 mM (Aguyo y col., 1996).                                        | 3. Neuronas espinales de ratón.                            |
| NICOTÍNICOS                 | Disminuye * | 1. Disminuye $\alpha_7$ , $\alpha_4\beta_2$ ~0.2-2 mM (Bale y col., 2000). | 1. Disminuye $\alpha_7$ 5-100 mM (Cardoso y col., 199; Yu y col., 1996). | 1. Ovocitos                                                |
|                             |             | 2. $Cl_{50}$ = 1.1 mM (Bale y col., 2000).                                 | 2. Aumenta $\alpha_4\beta_2$ 30-300 mM (Lovinger y Zhou, 1994)           | 2. Neuronas hipocampales.                                  |
| 5-HT <sub>3</sub>           | Aumenta     | 1. <1 mM (Lopreato y col., 2003)                                           | 1. 50-200 mM (Machu y Harris, 1994)                                      | 1. Ovocitos.                                               |
|                             |             |                                                                            | 2. 25 -100 mM (Lovinger, 1994).                                          | 2. Células de neuroblastoma.                               |
|                             |             |                                                                            | 3. 10-100 mM (Lovingerd y Zhou, 2002).                                   | 3. Rec. 5-HT <sub>3</sub> transgénicos en células renales. |
| CANALES DE CA <sup>2+</sup> |             | 1. Aumenta $Cl_{25}$ = 0.02 mM (Tillar y col, 2002).                       | 1. Disminuye 25 mM (Mullikin, 1993).                                     | 1. Células de feocromocitoma.                              |
|                             |             | 2. Disminuye 0.01-0.03 mM (Westerink y col., 2002).                        | 2. Disminuye 10-50 mM (Wang y col., 1994)                                | 2. Neurohipófisis de rata.                                 |

\*El tolueno tiene un efecto inhibitorio sobre todos los tipos de receptores nicotínicos probados a la fecha (Bale y col., 2002), mientras que el etanol tiene un efecto inhibitorio sobre algunos subtipos y excitatorio sobre otros (Aistrup y col., 1999; Cardoso y col., 1999).

## 2.3.2 EFECTOS NEUROFARMACOLÓGICOS DE LOS INHALABLES

### 2.3.2.1 EFECTOS A NIVEL CELULAR

En comparación con otras drogas de abuso, se conoce relativamente poco sobre los efectos neurofarmacológicos del uso indebido de inhalables. Sin embargo, durante la última década se han llevado a cabo muchos estudios preclínicos sobre los efectos de la exposición aguda a inhalables en los animales adultos (Bowen y col., 2006). Aunque los perfiles psicofarmacológicos de los inhalables son diferentes, cada vez hay más pruebas que indican que actúan sobre blancos moleculares comunes. La mayoría de los efectos sobre la conducta se producen a concentraciones micromolares de inhalables y esto parece estar respaldado por cambios en la actividad del receptor y/o de los canales iónicos de membrana (Bowen y col., 2006). Sin embargo, a altas concentraciones de disolventes, pueden producirse interacciones no específicas debidas a cambios en la permeabilidad membranal. (Bowen y col., 2006 ).

La exposición aguda a disolventes como el tolueno, benceno, etilbenceno, propilbenceno, m-xileno y el 1,1,1 tricloroetano parecen producir la inhibición de los receptores NMDA, observándose la mayor inhibición con la combinación de las subunidades NR1-NR2B (Cruz y col., 1998; 2000). Cruz y col. (1998), informaron que el tolueno produce una inhibición rápida, no competitiva, casi completa y reversible de las corrientes catiónicas a través de los receptores NMDA, utilizando receptores recombinantes expresados en ovocitos de *Xenopus* ( $CI_{50}$ = 0.17mM). Este efecto no fue debido a cambios inespecíficos de la membrana ni a alteraciones en la integridad membranal, ya que ésta fue afectada solamente a altas concentraciones (> 20 mM). Bale y col. (2005) demostraron de manera similar que, en neuronas cultivadas de hipocampo de rata expuestas a tolueno, se produce la inhibición aguda de los receptores NMDA ( $IC_{50}$ = 1.5mM). Sin embargo, también examinó la exposición al tolueno de una manera semi-crónica (4 días) y observó un aumento del receptor NMDA con una respuesta en la disminución del receptor GABA. En paralelo, las subunidades del receptor NMDA (NR2A y NR2B)

fueron sensibilizadas (Bale y col., 2005). En conjunto, estos hallazgos podrían ser compatibles con un estado de hiper-excitabilidad de los receptores glutamatérgicos después de terminada la exposición crónica, una situación que se asemeja a la producida durante la abstinencia al alcohol (Chen y col., 1999). Existen estudios que indican que la inhalación de tolueno (575 ppm) en ratas alcanza una concentración de 18 ppm en los cerebros. (Benigno y col., 1981), lo que sugiere que aproximadamente el 3% de la dosis inhalada accede al cerebro en las condiciones empleadas. Por consiguiente, en preparaciones *in vitro*, una  $Cl_{50}$  de 1.5mM (como se describió anteriormente) equivale a una exposición inhalada de aproximadamente 4600 ppm (el peso molecular del tolueno es de  $92.13 \text{ g mol}^{-1}$ ), lo cual es coherente con las concentraciones inhaladas por la mayoría de los humanos que abusan de estas sustancias.

Por medio de la expresión de subunidades de receptores en ovocitos de *Xenopus*, se ha visto que la administración aguda del tolueno (0.3-2 mM) produce un incremento en la actividad de los receptores  $GABA_A$  ( $\alpha_1\beta_1$ ), glicina ( $\alpha_1$ ) y  $5HT_3$  (Beckstead y col., 2000; Lopreato y col., 2003). También hay evidencia de que el tolueno y el percloroetileno inhiben los receptores colinérgicos nicotínicos (en particular receptores formados por las subunidades  $\alpha_4\beta_2$ ,  $\alpha_3\beta_2$  y  $\alpha_7$ ) (Bale y col., 2002; 2005). Además, se ha visto que la exposición aguda a tolueno regula los receptores muscarínicos del hipocampo (Tsuga y Honma, 2000). Curiosamente, el tolueno (0.5 mM) inhibe los canales dependientes de calcio-potasio y los acoplados a proteína G, dentro de los ovocitos mediados por corriente, un efecto que es opuesto al etanol dentro de este sistema (Del Re y col., 2006). Aunque los experimentos en ovocitos son difíciles de comparar con las investigaciones *in vivo*, la concentración efectiva de tolueno coincide en los estudios tanto en animales como en seres humanos (Benigno y col., 1981; Garriotty y col., 1981). Los trabajos recientes en los sistemas de expresión celular sugieren que el tolueno interrumpe la actividad de numerosos canales iónicos dependientes de voltaje (Tillar y col., 2002; Cruz y col., 2003; Gauthereau y col., 2005), la señalización del calcio (Westerink y Viverberg, 2002), ATPasas (Calderón- Guzmán y col., 2005) y las proteínas G (Tsuga y col., 1999; Tsuga y Honma., 2000). Sin embargo, se

necesitan más investigaciones para determinar las consecuencias conductuales de estos hallazgos.

### **2.3.2.2 EFECTOS NEUROFARMACOLÓGICOS: LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR/NEUROQUÍMICA**

La exposición crónica a tolueno tiene un sinnúmero de efectos en la química del cerebro y en la expresión de receptores. Por ejemplo, una exposición a 80 ppm de tolueno, 6 horas al día, 5 días a la semana durante 3 meses provocó una reducción en la corteza orbital vinculada con neurotensina [ $^3\text{H}$ ], pero aumentó en la unión accumbal vinculada con la [ $^3\text{H}$ ] etorfina de los receptores opiáceos (Von Euler y col., 1988). Más recientemente, la exposición aguda a tolueno demostró incrementar la proteína del receptor  $\mu$  opioide en los núcleos del tronco cerebral, incluida la parte dorsal y la gris periacueductal (Saracibar y col., 2001). Por otro lado, en un estudio donde se administraron 7 inyecciones diarias de tolueno ( $600 \text{ mgkg}^{-1}$  i.p.) a ratas, aumentaron los niveles de dopamina y de serotonina en los ganglios basales (Riegel y col., 2004).

Williams y col. en el 2005 expusieron ratas a tolueno (8000 ppm) durante 10 días (30 min al día) y demostraron que aumentaban las subunidades de los receptores NR1 y NR2B en la corteza prefrontal media y las subunidades NR2B en el núcleo accumbens, lo que sugiere un aumento en la excitabilidad neuronal debido a la exposición prolongada al disolvente. La exposición crónica a tolueno también provocó un aumento de los niveles de la subunidad  $\alpha 1$  del receptor  $\text{GABA}_A$  en la corteza prefrontal media, pero la expresión disminuyó en el mesencéfalo ventral (Williams y col., 2005). Aunque tales investigaciones ponen de relieve el potencial de daño neuronal excitotóxico debido a la exposición crónica a inhalables, la mayoría de los estudios en humanos han reportado daños en las estructuras de la materia blanca y el componente lipídico de la vaina de mielina (Rosenberg y col., 1988; Filley y col., 2004). Sin embargo, los mecanismos celulares de este daño tóxico siguen siendo desconocidos. Los estudios en animales que han intentado dilucidar los mecanismos fisiopatológicos que causan

encefalopatía por la exposición a tolueno, tienden a sugerir que la gliosis y la activación de los astrocitos en la sustancia blanca, en contra de la muerte neuronal, son los principales mecanismos responsables (Huang y col., 1992, 1993; Gotohday col., 2000). De acuerdo con esta idea, Aydin y col. (2003) utilizaron espectroscopia de resonancia magnética para demostrar que los niveles de *N*-acetilaspartato disminuían (un metabolito producido dentro de las mitocondrias neuronales que refleja la densidad neuronal y la viabilidad funcional) y aumentaba el mioinositol contenido en una muestra de consumidores crónicos de inhalables. Estos hallazgos sugieren que el abuso de inhalables no causa desmielinización activa o ruptura de la membrana neuronal, sino que puede conducir a una viabilidad funcional afectada como resultado de la lesión axonal difusa.

#### **2.3.2.3. EFECTOS DE LOS DISOLVENTES SOBRE EL SISTEMA DOPAMINÉRGICO.**

Las actividades que aseguran la supervivencia inmediata del individuo (comer y beber) y la supervivencia a largo plazo de las especies (actividad sexual y conducta maternal), son percibidas, al menos en mamíferos, como conductas placenteras. El sistema neuronal implícito en estas conductas es el sistema mesolímbico dopaminérgico. Se le denomina así, al circuito formado por una red neuronal que involucra varios núcleos cerebrales, entre los que destacan el área ventral tegmental, el núcleo accumbens y la corteza prefrontal. Este sistema actúa produciendo un aumento en la liberación de dopamina; la mayoría de las drogas de abuso activan este sistema, lo cual lleva a una alteración de la conducta, que se manifiesta en un deseo compulsivo de búsqueda e ingestión de la sustancia (Abbott, 1992).

De acuerdo con estudios realizados por Rea y col, (1984) la inhalación de 1000 ppm de tolueno durante ocho horas aumenta el contenido de dopamina en el tejido estriatal en ratas; lo mismo sucede cuando los animales se exponen a 1000 y 2000 ppm de tolueno durante dos horas (Stergard y col., 1994). Según otros

trabajos, la administración de 3000 ppm de tolueno también produce un aumento de dopamina en la corteza prefrontal, pero no en el núcleo accumbens.

Aunque aún no se conocen los mecanismos que intervienen en el aumento de la liberación de dopamina tras la exposición a disolventes, se ha sugerido que éste se puede asociar con una acción directa del tolueno sobre las neuronas dopaminérgicas (Riegel y French., 1999) o con la potenciación sobre los receptores GABA<sub>A</sub> (Beckstead y col., 2000).

#### **2.3.2.4. EFECTOS DE LOS DISOLVENTES SOBRE LA FORMACIÓN DE RADICALES LIBRES.**

De acuerdo con algunos investigadores, la formación de especies reactivas de oxígeno podría ser parte de los mecanismos de acción responsables de los efectos crónicos de algunos disolventes, como la producción de daño cerebral y hepático. En este sentido, se encontró que la administración i.p. de tolueno y de sus metabolitos: benzil alcohol y benzaldehído, produce una elevación de la frecuencia de formación de especies reactivas de oxígeno en el hígado y en el cerebro (Mattia y col., 1993). Con base a estos antecedentes, se propone que la formación de especies reactivas de oxígeno puede contribuir al desarrollo de encefalopatía tóxica crónica después de la exposición a disolventes (Dreiem y col., 2002).

#### **2.3.2.5. EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN PRENATAL A DISOLVENTES**

Estudios con humanos y animales de laboratorio muestran que la exposición a disolventes produce efectos teratogénicos. En muchos casos se reporta que el patrón de malformaciones es similar al producido en el síndrome alcohólico fetal (Wilkins, 1997). En estudios realizados en mujeres, los principales efectos producidos por la exposición maternal a disolventes son: muerte perinatal, retardo en el crecimiento fetal, nacimiento prematuro, bajo peso al nacer y anomalías craneo-faciales. Asimismo, siguiendo la evaluación pediátrica, se



ha encontrado retardo en el crecimiento y el desarrollo y trastornos en los procesos cognitivos, el lenguaje y las habilidades motoras (Arnold y col., 1994; Barroso y col., 1991; Donald y col., 1991; Pearson y col., 1994; Wilkins, 1997). En estudios realizados en animales, se ha observado disminución de peso al nacer, anomalías esqueléticas ocasionales, retardo en el desarrollo neuroconductual y alteración en las estructuras cerebrales fundamentales para el desarrollo de habilidades locomotoras y de nado (Donald y col., 1991; Jones y Balster, 1998; Lorenzana y Salas, 2000; Lorenzana y Salas, 1985).

## **2.4. EFECTOS CRÓNICOS DE LOS DISOLVENTES**

### **2.4.1. TOLERANCIA, DEPENDENCIA Y SENSIBILIZACIÓN**

La administración repetida de drogas de abuso en animales de laboratorio puede producir tolerancia y dependencia física. Se define como tolerancia a la disminución del efecto de un fármaco en administraciones repetidas o a la necesidad de usar dosis cada vez mayores para obtener el efecto inicial. Se conoce como sensibilización o tolerancia inversa al fenómeno que se produce cuando la administración repetida de la misma dosis del fármaco no disminuye el efecto, sino que lo intensifica (Goudi y Emmett, 1989). La dependencia física se describe como un estado adaptativo que se produce cuando se deja de administrar la droga y que se caracteriza por la presentación de un síndrome de abstinencia específico (Martínez y col., 2003). En la literatura aparecen sólo algunos reportes de los efectos producidos por la administración repetida de disolventes de abuso a animales de laboratorio. Por ejemplo, en un estudio se comparó el efecto hipnótico del tolueno tras una exposición aguda y una exposición crónica, encontrando que la exposición crónica a tolueno aumentó la latencia de presentación del efecto hipnótico en comparación con la latencia observada tras la exposición aguda (Lorenzana y Salas, 1990). También se han realizado estudios que analizan el efecto de la exposición crónica de diferentes disolventes en los modelos de conducta operante. En general, se ha reportado

que el tolueno, el TCE y el tricloroetileno, tras un tratamiento agudo, disminuyen el desempeño de los animales en esta prueba. Sin embargo, cuando se administran con una frecuencia crónica, el desempeño de los animales mejora significativamente (Bushnell y Oshiro, 2000; Moser y col., 1985; Rees y col., 1989).

Por otro lado, Arito y col. (1985) administraron tolueno por vía i.p. en forma aguda y crónica y observaron diferentes conductas, tales como la actividad locomotora y la ingesta de líquidos. En todos los casos encontraron que la administración crónica de tolueno producía efectos mayores que la administración aguda.

Sólo se dispone de un par de reportes sobre la dependencia física producida por la administración repetida de disolventes como el TCE y el tolueno. En el primer estudio se expuso a ratones a TCE (500 a 4000 ppm) de manera continua durante cuatro días. La supresión de la administración del disolvente produjo convulsiones inducidas al sujetar a los ratones por la cola. La reexposición de los animales a TCE durante el periodo de abstinencia redujo la frecuencia y la gravedad de las convulsiones. Es importante señalar que la exposición a tolueno, así como la administración de etanol, pentobarbital y midazolam, suprimió también las convulsiones producidas por la abstinencia a TCE (Evans y Balster, 1993). Posteriormente, en un trabajo similar, Wiley y col. (2003) reportaron que la administración repetida a tolueno (250 ppm/ 4 días) produce también este síndrome de abstinencia. Sin embargo, se requieren muchos más estudios en los que se evalúen los efectos de exposiciones breves pero repetidas a concentraciones altas de disolventes, como sucede en los casos de abuso.

## **2.5. COMPLICACIONES MÉDICAS**

El uso crónico de inhalables está asociado con efectos tóxicos importantes, incluyendo daño neurológico, renal, hepático y pulmonar (Marjot y McLeod, 1989; Dinwiddie, 1994; Kurtzman y col., 2001). El déficit neurológico persistente ha sido asociado con la exposición periódica a largo plazo (Fornazzari y col., 1983; Hormes y col., 1986; Lolín, 1989) e incluye neuropatía periférica, disfunción

cerebelosa, daño en los nervios craneales, atrofia cortical, encefalopatía y demencia. Sin embargo, en estos estudios generalmente se incluyen muestras pequeñas de los usuarios adultos que se refieren al tratamiento y el efecto de los disolventes se puede confundir con otras causas potenciales de daño neurológico (por ejemplo, lesiones en la cabeza y la hipoxia), así como el abuso de otras sustancias. Sin embargo, no parece haber una relación clara entre la naturaleza del daño neurológico y del tipo de productos químicos que se trate (Spencer y Schaumburg, 1985). Mientras que el abuso crónico de tolueno está asociado con la enfermedad cerebelosa, encefalopatía y demencia (Lolín, 1989), también hay una creciente evidencia de que existe una fuerte relación entre las alteraciones neurológicas y la frecuencia y duración de la exposición (Maruff y col., 1998). Maruff y col. (1998) informaron de las altas tasas de alteraciones neurológicas sutiles en un grupo de consumidores crónicos de gasolina que no presentaron encefalopatía, con una fuerte correlación entre la duración del uso y la magnitud de los déficits neurológicos. Un estudio de seguimiento comprobó que la gravedad de estas anomalías se reduce con la abstinencia, e incluso se normalizan por completo en algunos sujetos (Cairney y col., 2005).

Una serie de trastornos renales están asociados con el abuso crónico de inhalables (especialmente compuestos que contienen tolueno), incluyendo acidosis tubular renal, cálculos renales, glomerulonefritis e insuficiencia renal (O'Brien y col., 1971; Zimmerman y col., 1975; Streicher y col., 1981; Kaneko y col., 1992); además, también se han documentado hepatitis tóxica e insuficiencia hepática (O'Brien y col., 1971). Aunque se han reportado efectos neurológicos severos por la exposición crónica a inhalables, el mecanismo por el que las diferentes sustancias volátiles dañan tejidos y órganos sigue siendo poco claro. Este problema se complica aún más por el hecho de que muchos productos contienen más de un tipo de inhalable. Además, existe poca información referente a los efectos de sustancias volátiles sobre el desarrollo o las diferencias de género. Por lo tanto, la incidencia y la naturaleza de complicaciones médicas importantes entre esta población son en gran parte desconocidas, al igual que el grado en que estos efectos son reversibles después de la abstinencia.

## 2.6. EFECTOS ANTICONVULSIVANTES.

Con base en la similitud de los perfiles farmacológicos de los disolventes orgánicos y los depresores del SNC, desde 1984 se estudió la posible actividad anticonvulsivante de algunos disolventes. En dicho estudio, se utilizó como agente proconvulsivante el pentilentetrazol (PTZ), un antagonista de los receptores GABA<sub>A</sub>, que produce convulsiones clónico-tónicas a los pocos segundos de su administración, encontrándose que la administración i.p. de tolueno a ratones, así como la exposición de éstos a la inhalación de sus vapores, incrementa la latencia de presentación de convulsiones y protege contra los efectos letales del PTZ (Wood y col., 1984). A raíz del descubrimiento de que varios disolventes actúan *in vitro* como antagonistas no competitivos del receptor NMDA (Cruz y col., 1998; Cruz y col., 2000), se consideró interesante estudiar si además serían capaces de proteger contra las convulsiones inducidas por el agonista glutamatérgico NMDA. De esta forma se encontró que la inhalación de tolueno (1000 a 6000 ppm) durante 30 minutos protege contra las convulsiones y la muerte a ratones inyectados con NMDA (Cruz y col., 2003), lo cual puede considerarse como evidencia de que los efectos antagonistas NMDA descritos *in vitro* son relevantes *in vivo*.

En el estudio realizado por Cruz y col. en el 2003, donde utilizaban animales tratados con tolueno (4000 ppm) en forma aguda, se redujo de manera significativa el porcentaje de animales que convulsionaban. Sin embargo, en ratones expuestos repetidamente a la misma concentración de tolueno, hubo una pequeña disminución en el porcentaje de animales que convulsionaron, pero no fue estadísticamente significativo comparado con el porcentaje de ratones que convulsionaron que fueron expuestos a aire de manera repetida.

En resumen, el estudio que realizaron Cruz y col, (2003) muestra que el tolueno protege contra los efectos inducidos por NMDA, ya que: (a) reduce la cantidad de animales que convulsionaron, (b) reduce la gravedad de la escala neurológica de deterioro, (c) aumenta la latencia de la aparición de convulsiones, y (d) reduce la letalidad de efectos de una alta dosis de NMDA.

El efecto protector del tolueno en contra de las convulsiones inducidas por NMDA en el estudio realizado por Cruz y col. (2003) amplió los resultados de Wood y col. (1984) que demostraron que el tolueno y el xileno fueron efectivos en contra de las convulsiones inducidas por PTZ. Por otro lado, en un estudio realizado por Shi y col. (2001) se encontró que inyectando tricloroetileno, un disolvente clorado, se aumentaba significativamente el umbral para la presentación de convulsiones y las dosis letales en ratones tratados con una variedad de agentes convulsivantes, incluyendo PTZ, picrotoxina y NMDA.

Es importante mencionar que algunos disolventes pueden tener efectos proconvulsivantes, pero esto sólo se ha observado después de exposiciones repetidas o en concentraciones mucho mayores que las utilizadas en los estudios mencionados anteriormente (Contreras y col., 1979; Silva- Filho y col., 1991).

### **3. NEUROTRANSMISORES**

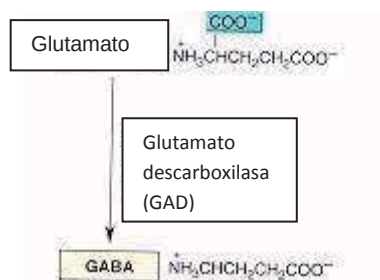
Un neurotransmisor (NT) es una sustancia química liberada selectivamente de una terminación nerviosa por la acción de un potencial de acción, que interacciona con un receptor específico en una estructura adyacente y que, si se recibe en cantidad suficiente, produce una determinada respuesta fisiológica.

Los NT pueden tener efectos mínimos en las propiedades bioeléctricas, pero pueden activar o inactivar mecanismos bioquímicos necesarios en las reacciones de otros circuitos. O bien la acción de un NT puede variar según el contexto de los sucesos sinápticos que se están produciendo y de esta forma intensificar la excitación o la inhibición. De manera clásica, los signos electrofisiológicos de la acción de un NT auténtico encajan en dos categorías principales: excitación (en la cual se abren los canales iónicos para permitir la entrada neta a la célula de iones de carga positiva, lo que da por resultado despolarización, con reducción de la resistencia eléctrica de la membrana, e inhibición (en el cual los movimientos de los iones selectivos generan hiperpolarización, también con disminución de la resistencia de la membrana) (Bloom, 1996).

### 3.1. SÍNTESIS DE GABA

Es claro que los aminoácidos están entre los neurotransmisores más abundantes en el SNC y que la mayoría de las neuronas utilizan ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA) y glutamato como neurotransmisores. El GABA y el glutamato regulan la excitabilidad de muchas neuronas en el cerebro (GABA es un aminoácido inhibitorio, mientras que glutamato es un aminoácido excitatorio) y por tanto están implicados en procesos fisiológicos importantes, así como en eventos patofisiológicos. Usualmente se percibe al SNC como un conjunto de células excitadas; las células nerviosas no solamente excitan a sus vecinas, sino que también las inhiben. La inhibición está mediada por el GABA, que fue identificado como constituyente químico único del encéfalo y es considerado como NT inhibitorio desde 1950; aunque su potencia como depresor del SNC no fue reconocida de inmediato, es uno de los principales NT inhibitorios.

El GABA es sintetizado a partir de la descarboxilación del glutamato, por medio de la enzima glutamato descarboxilasa (GAD) (Fig. 3). Una vez sintetizado, el GABA es introducido en vesículas y está listo para salir de la neurona presináptica. Cuando se produce el estímulo nervioso, el GABA es liberado de la neurona presináptica y llega hasta la neurona postsináptica donde es reconocido por los receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub>. (Bloom, 1996)



**Figura. 3.** Ruta metabólica para la síntesis del receptor GABA a partir del glutamato.

### 3.2. MECANISMO DE ACCIÓN DEL GABA

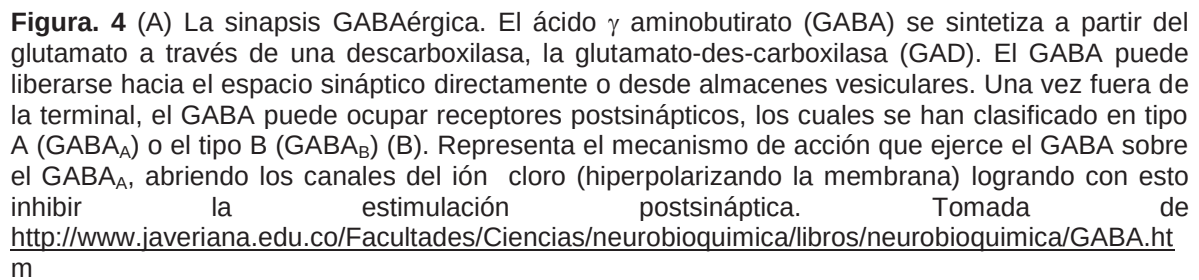
El GABA es el neurotransmisor inhibitor predominante del SNC en su parte supraespinal (*grosso modo*, la porción intracraneal). En los años 50 y gracias a técnicas neuroquímicas más sensibles, se observó que el GABA ( $\gamma$ - amino butirato) no sólo estaba en el cerebro, sino que además era el órgano que más GABA contenía (Brailowsky,1995).

El GABA ha satisfecho los criterios requeridos para considerarlo como neurotransmisor en la unión neuromuscular de crustáceos. En esta preparación, el GABA imitó los efectos observados con la estimulación del nervio inhibitor. Kravitz y col. en 1963, demostraron que el GABA era el único aminoácido inhibitor que se encontraba exclusivamente en los nervios inhibidores del crustáceo, y que la potencia inhibitoria de los extractos de estos medios se debía a su contenido de GABA. La descarga de GABA se correlacionó, a continuación, con la frecuencia de la estimulación nerviosa. Los registros intracelulares del músculo indicaron que la estimulación del nervio inhibitor y la administración de GABA producían incrementos idénticos de la conductancia de  $\text{Cl}^-$  en el músculo. Esta observaciones satisfacen por completo, en consecuencia, los criterios para la identificación de un transmisor (Otsuka, 1973).

Se cuenta con gran número de datos a favor de que el GABA media las acciones inhibitorias de las interneuronas locales en el cerebro, y que pueden mediar también la inhibición presináptica dentro de la médula espinal. Los fármacos de mayor utilidad para confirmar la mediación GABAérgica han sido la bicuculina y picrotoxina; sin embargo muchos convulsivos (penicilina y feniltetrazol) pueden actuar también como antagonistas relativamente selectivos de la acción del GABA (Macdonald y Mclean, 1982).

El GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio en el SNC del mamífero. Se han dividido sus receptores en dos tipos principales (Figura 4). El subtipo de receptor de GABA más relevante, el receptor  $\text{GABA}_A$ , es un canal de  $\text{Cl}^-$  de compuerta ligando que se abre después de la descarga de GABA a partir de las neuronas presinápticas, produciendo un potencial inhibitorio (una







Un segundo receptor, el receptor GABA<sub>B</sub>, es un miembro de la familia de los receptores acoplados con proteínas G que actúan tanto en las vías bioquímicas como en la regulación de los canales de iones (Bonnano y Raiteri, 1993; Bowery, 1993).

### 3.3. ESTRUCTURA DEL RECEPTOR GABA<sub>A</sub>

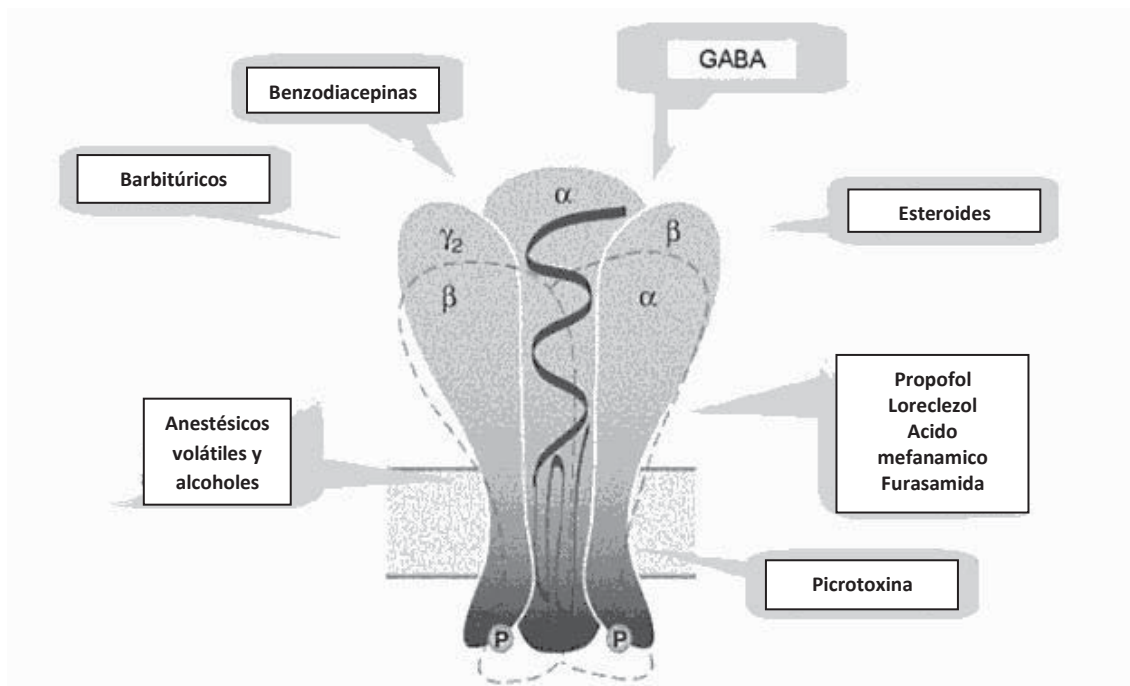
El receptor GABA<sub>A</sub> es un hetero-oligómero pentamérico compuesto por diferentes subunidades. Basadas en una secuencia homóloga, estas subunidades tienen diferentes clases designadas:  $\alpha$  (1-6),  $\beta$  (1-4),  $\gamma$  (1 – 3),  $\delta, \epsilon, \pi$  (Hevers y Luddens, 1998), y recientemente descubierto  $\theta$  (Bonnert y col., 1999).

El receptor GABA<sub>A</sub> posee una variedad de sitios alostéricos a través de los cuales diferentes fármacos pueden modular la corriente de cloruro mediada por GABA. Se sabe que las benzodiazepinas (BZD) y los barbitúricos potencian alostéricamente la corriente mediada por GABA (Hevers y Luddens, 1998). Por el contrario, los fármacos convulsivantes como la picrotoxina (PTX), TBPS y varios insecticidas se sabe que deprimen las corrientes mediadas por GABA (Fig. 4) (Bloomquist, 1996).

El receptor GABA<sub>A</sub> es un complejo oligomérico que contiene:

- Un canal iónico permeable a iones cloruro.
- Sitios alostéricos adicionales de unión de otros fármacos: benzodiazepinas, barbitúricos, esteroides, zinc y etanol.
- Sitio del agonista endógeno: donde se une el ligando endógeno GABA y el cual es modulado por los fármacos que se unen a los sitios alostéricos adicionales.
- Sitio de reconocimiento de baja afinidad, preferentemente antagonizado por las benzodiazepinas.
- Sitio de reconocimiento de alta afinidad, que es una forma desensibilizada del receptor.
- Sitio del agonista exógeno, a donde se unen las BZD, las cuales aumentan la unión del GABA con el sitio de reconocimiento del receptor GABA<sub>A</sub>.

- Sitio de los agonistas inversos: reducen el flujo de cloro inducido por GABA y son las beta carbolinas.
- Sitio de los agonistas parciales: poseen afinidad y actividad menor que el agonista total y son las ciclopirrolonas.
- Sitio del coagonista: es inhibitorio y es la glicina.
- Sitio de los antagonistas selectivos: bicuculina y SR95531.
- Sitio de los antagonistas no selectivos: tienen afinidad pero su actividad es nula, no influyendo sobre el canal de cloro, pero sí antagonizan las acciones de los agonistas. Un ejemplo de antagonista no selectivo es el flumazenil. (Enna, 2007)



**Figura. 5.** Representación esquemática del receptor GABA<sub>A</sub>. Se ilustra la estructura pentamérica y los diferentes sitios de acción para los fármacos que interactúan con estos sitios. La P representa el sitio de fosforilización. Tomada de Enna, 2007.

### 3.4. CONVULSIONES Y SISTEMA GABAÉRGICO

Hace más de un siglo, John Hughlings Jackson, postuló que las convulsiones eran causadas por descargas ocasionales, repentinas, excesivas, rápidas y locales de la sustancia gris.

Por lo tanto una definición de convulsión es aquella que se refiere a un trastorno transitorio de la conducta, causado por la activación desordenada, sincrónica y rítmica de las poblaciones enteras de las neuronas cerebrales (Mc Namara, 1996).

La función primordial de la sinapsis para mediar la comunicación entre las neuronas en el cerebro del mamífero sugirió que la función sináptica defectuosa podría originar convulsiones. Es decir, cabría esperar que la reducción de la actividad sináptica inhibitoria y el fomento de la actividad sináptica excitadora desencadenaran una crisis convulsiva. Los neurotransmisores que median de manera global la transmisión sináptica en el cerebro del mamífero son aminoácidos, ácido  $\gamma$  aminobutírico (GABA) y glutamato, como principales neurotransmisores inhibidores y excitadores, respectivamente. Los estudios farmacológicos pusieron en claro que la microinyección de antagonistas del receptor GABA<sub>A</sub> o de los agonistas en diferentes subtipos de receptores del glutamato (NMDA, AMPA o ácido caínico) desencadenan convulsiones en animales de experimentación in vivo. Los agentes farmacológicos que estimulan la inhibición sináptica mediada por el GABA inhiben las convulsiones en diversos modelos (McNamara, 1996).

La información obtenida acerca de los mecanismos de las convulsiones sugiere que el incremento de la inhibición sináptica mediada por el GABA reduciría la excitabilidad neuronal y elevaría el umbral convulsivo. Se supone que diversos fármacos bloquean las convulsiones al regular la inhibición sináptica mediada por GABA a través de una actividad en sitios distintos de la sinapsis (MacDonald y Kelly, 1993). El principal receptor postsináptico del GABA descargado a nivel de la sinapsis se denomina receptor GABA<sub>A</sub>. La activación de este inhibe a la célula postsináptica, al incrementar el flujo de los iones de Cl<sup>-</sup> hacia el interior de la célula

lo cual tiende a despolarizar a la neurona. Existen numerosas sustancias que interactúan con receptores GABAérgicos. Todas las que interfieren con su funcionamiento producen aumento de la excitabilidad cerebral hasta el punto de producir crisis convulsivas.

Sustancias que producen sueño (los barbitúricos), o que se utilizan como ansiolíticos (las benzodiazepinas), actúan en buena parte porque favorecen la transmisión GABAérgica, este mecanismo tal vez sea subyacente a la eficacia de estos compuestos contra las convulsiones parciales y tónicoclónicas en el ser humano.

### **3.5. PENTILENTETRAZOL (PTZ)**

El pentilentetrazol (PTZ) es un convulsivante que actúa en el SNC. Desde hace muchos años se sabe que el PTZ es un inhibidor de los canales activados por GABA (McDonald y Barker, 1978). Inicialmente los estudios sugirieron que el sitio de acción del PTZ era el sitio de unión para las benzodiazepinas del receptor GABA<sub>A</sub> (Rehavi y col., 1982). Sin embargo, estudios subsecuentes, indicaron que el sitio de acción del PTZ es el sitio de unión de la picrotoxina del receptor GABA<sub>A</sub> (Ramamjaneyulu y Ticku, 1984; Squires y col., 1984). Basados en estos estudios, en general hoy en día se acepta que el PTZ actúa en el sitio de unión de la picrotoxina del canal acoplado al receptor GABA<sub>A</sub>.

La administración de PTZ produce diversas fases de actividad convulsiva en los ratones: se inicia con mioclonias generalizadas, definidas como una sacudida de alguna de sus extremidades, seguidas de la presentación de la cola de Straub; convulsiones clónicas definidas como una sacudida del cuerpo completo, manifestadas por espasmos clónicos frecuentemente seguidos por estupor o postura inusual y un componente usualmente letal, la extensión tónica (Yonekawa y col., 1980).

## II. JUSTIFICACIÓN

El abuso de inhalables es un problema mundial que repercute en la salud pública y afecta de manera importante a los niños y adolescentes, no sólo porque afecta a grandes grupos sociales, muchos de ellos marginados, sino porque se presenta a edades tempranas y provoca graves secuelas para la salud. Se ha reportado que la administración de los disolventes es una práctica que se presenta en mayor proporción en niños que trabajan en la calle, en comparación con los niños que tienen la oportunidad de asistir a la escuela.

A pesar de su impacto en la salud pública, los inhalables son hasta ahora el grupo de fármacos de abuso menos estudiado. De acuerdo con varios autores, los adictos a inhalables pueden exponerse por unos cuantos minutos a varios miles de partes por millón de disolventes volátiles. Desde hace algunos años se ha visto que los disolventes de abuso comparten un perfil farmacológico con los depresores clásicos del SNC, por lo que se les ha agrupado en esta categoría junto con los barbitúricos, las benzodiacepinas, los anestésicos y el etanol; además, existen evidencias que indican que los disolventes pueden generar anestesia y conducir a un deterioro neurofisiológico que puede progresar hasta la muerte.

De acuerdo a estudios *in vitro* se ha visto que el tolueno incrementa la actividad de los receptores GABA<sub>A</sub>, con lo que se produce un efecto depresor. Debido a que los disolventes de abuso, como el tolueno, tienen acciones semejantes a los depresores clásicos del SNC, se ha propuesto que estas sustancias podrían compartir algunos mecanismos de acción y tener efectos anticonvulsivantes, al igual que algunos depresores del SNC.

Existen todavía muchas preguntas por responder acerca de los mecanismos de acción de estos fármacos, pero dado que las consideraciones éticas claramente limitan los estudios en humanos, la mayoría de los estudios para la caracterización de los efectos del abuso de inhalables se realizan por medio de la investigación en animales.

Con base en lo anterior, proponemos que el tolueno podría tener un efecto anticonvulsivante en contra de las convulsiones inducidas por PTZ y que dicho efecto protector podría desaparecer después de una exposición crónica a dicho disolvente.

### **III. HIPÓTESIS**

La exposición aguda a tolueno tendrá un efecto anticonvulsivante en contra de las convulsiones inducidas por PTZ, y la exposición repetida al tolueno producirá una disminución del efecto anticonvulsivante y/o la aparición de un efecto convulsivante.

## **IV. OBJETIVOS**

### **1. OBJETIVO GENERAL**

Estudiar los efectos del tolueno sobre las convulsiones inducidas por PTZ bajo 2 protocolos experimentales.

### **2. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Administrar pentilentetrazol a diferentes dosis (20, 40, 60, 80 y 100 mg/Kg) i.p., a los ratones, con el fin de hacer una curva dosis-respuesta para determinar la dosis convulsivante 100.
- Estudiar el efecto de la pre-exposición a una concentración de 4000 ppm de tolueno sobre las convulsiones producidas por una dosis de 60 mg/kg de PTZ.
- Determinar el efecto de la administración repetida de tolueno sobre las convulsiones inducidas por PTZ.
- Comparar el posible efecto anticonvulsivante producido en el protocolo de pre-exposición con el protocolo de exposición crónica sobre las convulsiones producidas por PTZ.



## **V. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1. ANIMALES**

Se utilizaron ratones macho de la cepa CD1 de 25 a 35 g, los cuales se mantuvieron con un ciclo controlado de luz/oscuridad (12 h/12 h) y temperatura constante (20–25°C). Los animales se albergaron en cajas en grupos de 5 con libre acceso al agua y al alimento.

### **2. SUSTANCIAS**

En este proyecto se empleó el tolueno como disolvente de abuso representativo. Los animales se expusieron a una concentración de 4000 ppm de tolueno. El agente convulsivante que se utilizó fue el PTZ, este agente se disolvió en solución salina y se administró por vía intraperitoneal (i.p.) en un volumen de 0.01 ml/g. Se realizaron curvas dosis-respuesta para determinar las dosis del agente convulsivante a emplear en el proyecto.

### **3. EXPOSICIÓN A DISOLVENTES**

Se utilizó una cámara de exposición estática de cristal con forma cilíndrica con un volumen de 22.75 l (Fig. 6). Esta cámara consiste en una jarra cromatográfica con una tapa de acrílico. La tapa tiene puertos de inyección y se encuentra unida en su parte externa al motor de un ventilador, cuyas aspas proyectan hacia el interior de la cámara. Bajo las aspas se encuentra una malla metálica en donde se coloca un papel filtro para administrar ahí los disolventes. Para llevar a cabo la exposición, cada ratón se coloca de manera individual en el fondo de la cámara, la tapa se cierra herméticamente, una cantidad determinada de disolvente se inyecta sobre el papel filtro y el ventilador se enciende a fin de permitir la inmediata evaporación y distribución del disolvente. Las

concentraciones de vapor deseadas se alcanzan en un tiempo menor a 1 minuto (min) y permanecen constantes durante el tiempo de exposición (30 min).



**Figura 6.** Cámara de exposición estática

Para calcular el volumen de tolueno que es necesario administrar en la cámara, se utilizó la siguiente ecuación (Nelson, 1971):

$$V = \frac{PM \cdot C_{ppm} \cdot V_s}{d} \cdot \frac{P (10^{-6})}{RT}$$

Donde:

V = volumen de disolvente que se necesita inyectar para obtener la concentración deseada (ml).

PM = peso molecular del disolvente (g/mol).

Cppm = concentración deseada (ppm).

Vs = volumen de la cámara de exposición (l).

d = densidad del disolvente (g/ml).

P = presión atmosférica (atm).

R = constante general de las gases ( $l \text{ atm mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ )

T = temperatura absoluta (K).

## **4. PROTOCOLOS EXPERIMENTALES**

### **4.1 PROTOCOLO 1. CURVA DOSIS-RESPUESTA**

Se administraron diferentes dosis de PTZ (antagonista del receptor GABA<sub>A</sub>) a los ratones (i.p.) e inmediatamente después se les colocó de manera individual en una cámara de exposición estática durante 30 min, con el fin de evaluar la presentación de convulsiones y hacer una curva dosis-respuesta para determinar la dosis convulsivante 100.

### **4.2 PROTOCOLO 2. PRE-EXPOSICIÓN**

Los animales se expusieron al disolvente (tolueno 4000 ppm) o aire durante 30 min, una vez transcurrido este tiempo se sacaron de la cámara, se les administró el agente convulsivante y se introdujeron en una segunda cámara donde fueron expuestos al disolvente o al aire durante 30 min. Cabe mencionar que el procedimiento entre el final de la primera exposición y el comienzo de la segunda se realiza en un tiempo menor a 1 min.

### **4.3 PROTOCOLO 3. EXPOSICIÓN CRÓNICA**

Los animales se expusieron a tolueno 4000 ppm o a aire durante 30 min, 2 veces al día, por 60 días, el día 61 los animales se expusieron al disolvente por 30 min y posteriormente se les administró PTZ y fueron expuestos nuevamente al

disolvente. El tiempo de observación para la evaluación de las convulsiones en todos los protocolos fue de 30 min.

## **5. VARIABLES EVALUADAS**

Las variables que se evaluaron en los tres protocolos fueron el porcentaje de animales que presentaron convulsiones clónicas (CC), convulsiones clónico-tónicas (CCT) y muerte, así como la latencia para la presentación de cada una de las respuestas y el número de veces en que presentaron cada una de las variables.

## **6. ANÁLISIS DE DATOS**

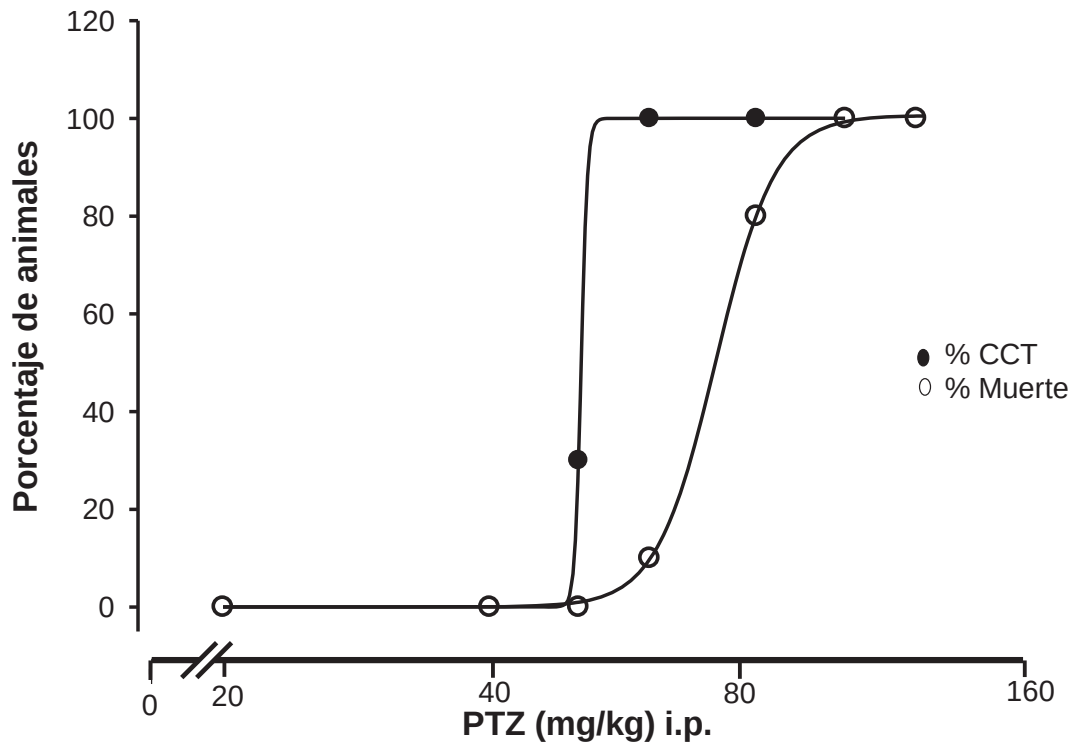
Para comparar el porcentaje de los animales que presentaron determinados signos en diferentes grupos experimentales se utilizó la prueba exacta de Fisher. Para comparar si existen diferencias significativas en las mediciones de los grupos se utilizó la prueba t-student.

## VI. RESULTADOS

### 1. CURVAS DOSIS RESPUESTA PARA PTZ

Para elegir la dosis del agente convulsivante a emplear en el proyecto se realizaron curvas cuantales dosis-respuesta para PTZ, en las cuales se evaluaron el porcentaje de animales que presentaron convulsiones y/o muerte a diferentes dosis: 20, 40, 50, 60, 80 y 100 mg/kg de PTZ.

La figura 7 muestra las curvas dosis-respuesta para PTZ. Como se puede apreciar, dosis mayores a 40 mg/kg indujeron convulsiones clónico-tónicas (CCT), mientras la muerte se presentó a dosis mayores de 50 mg/kg. Las dosis menores a 40 mg/kg no produjeron CCT en los animales, solamente produjeron signos menores de actividad convulsiva, como mioclonias o cola de Straub. A partir del ajuste de las curvas se determinó que la dosis efectiva al 50% ( $DE_{50}$ ) para la presentación de convulsiones fue de 50.47 mg/kg (48.71- 52.23), mientras que la dosis letal 50 ( $DL_{50}$ ) fue de 71.61 mg/kg (69.85- 73.37). Con base en estos datos se escogieron dos dosis de PTZ, la de 60 mg/kg, como la dosis mínima para producir convulsiones en el 100 % de los animales ( $DE_{100}$ ) y la dosis de 100 mg/kg como la dosis letal mínima ( $DL_{100}$ ).



**Figura 7.** Curvas cuantales dosis-respuesta para PTZ. Se evaluó el porcentaje de animales que presentaron convulsiones clónicas (CCT) y el porcentaje de animales que murieron.

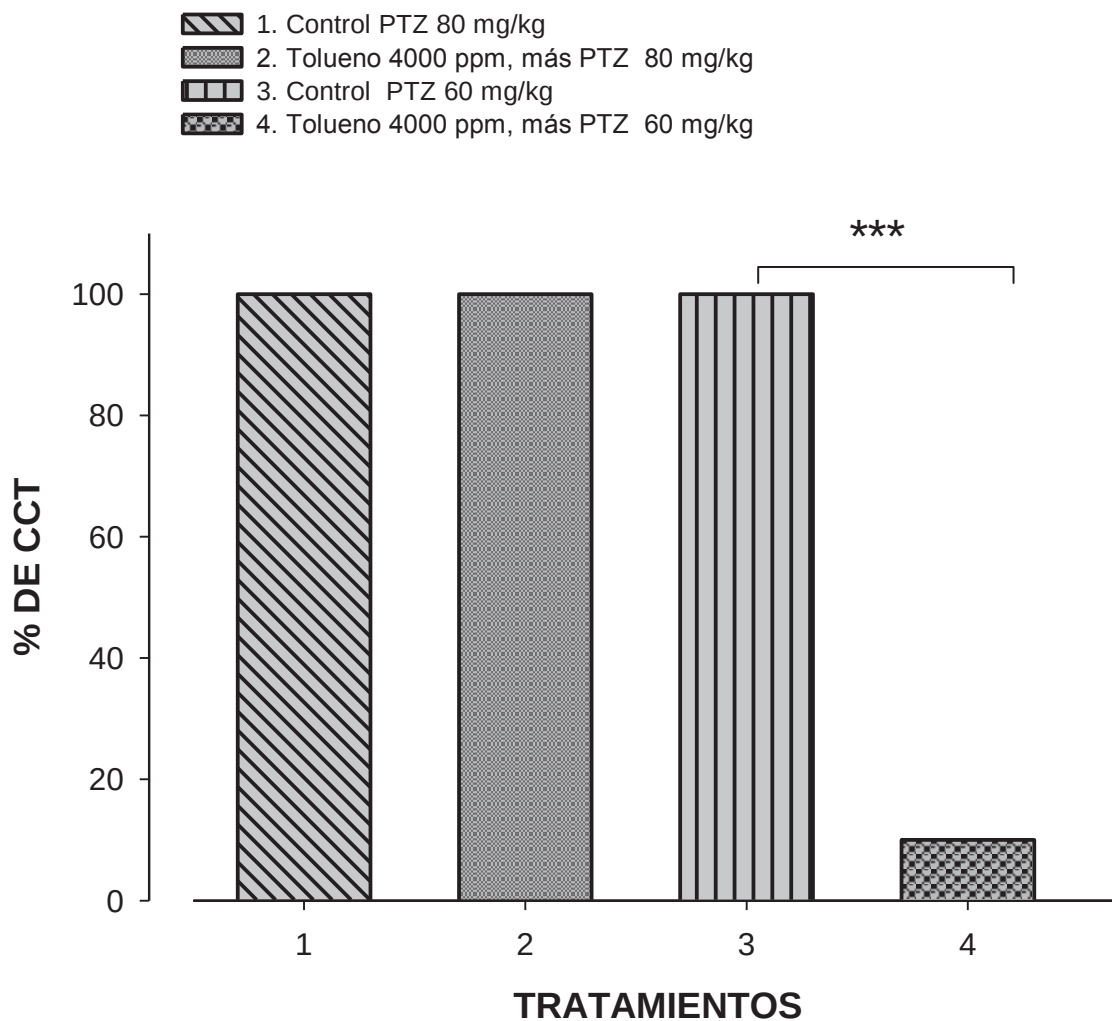
## 2. EFECTO DE LA PRE-EXPOSICIÓN A TOLUENO SOBRE LAS CONVULSIONES INDUCIDAS POR PTZ

Después de determinar la dosis de PTZ que se iba a utilizar, se evaluó los efectos que producía el tolueno.

En la figura 8 se muestra la gráfica para el efecto del tolueno sobre la presentación de CCT inducidas por PTZ 80 mg/kg (barra 1 y 2) y 60 mg/kg (barras 3 y 4), en condiciones donde se siguió el protocolo de pre-exposición al disolvente.

Se observa que el tolueno no protegió contra la presentación de CCT inducidas por la dosis de 80 mg/kg de PTZ en el protocolo de pre-exposición

Por otro lado, a la dosis de 60 mg/kg de PTZ, se observó que el tolueno protegió contra la presentación de CCT en el protocolo de pre-exposición, ya que a esta dosis disminuyó significativamente el porcentaje de animales que presentaron convulsiones.

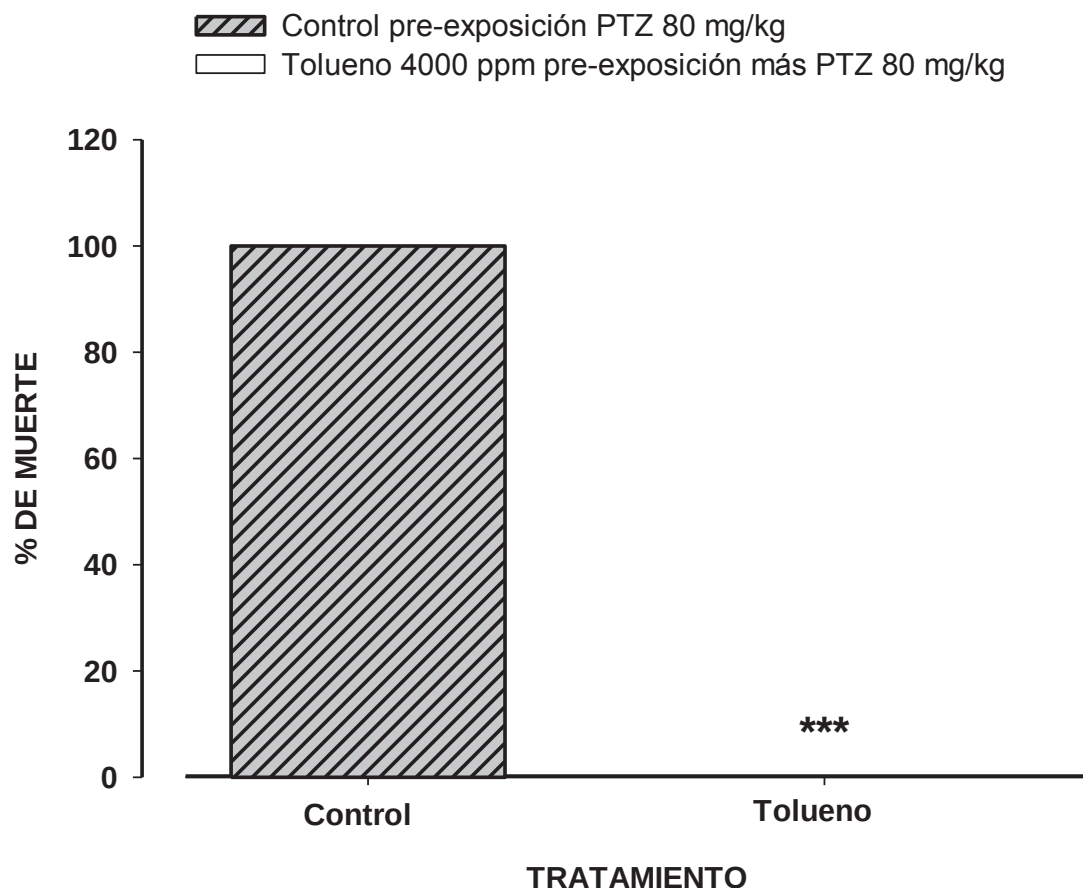


**Figura 8.** Efecto del tolueno sobre la presentación del porcentaje de CCT producidas por la administración de PTZ 80 y 60 mg/kg siguiendo los protocolos de pre-exposición \*\*\*  $p < 0.001$  control vs tolueno (pre-exposición PTZ 60 mg/kg), prueba exacta de Fisher. Se encontró que el tolueno tuvo un efecto anticonvulsivante y de protección contra la muerte inducida por PTZ 60 mg/kg.

### 3. EFECTO DE LA PRE-EXPOSICIÓN A TOLUENO SOBRE LA MUERTE INDUCIDAS POR PTZ

En la figura 9 se muestra la gráfica para el efecto del tolueno sobre la muerte inducida por PTZ 80 mg/kg (barra 1 y 2), en condiciones donde se siguió el protocolo de pre-exposición al disolvente.

Se observa que el tolueno protegió contra la muerte inducida por la dosis de 80 mg/kg de PTZ en el protocolo de pre-exposición, comparado con el grupo control, aún cuando a esta dosis no fue capaz de proteger en contra de las CCT (fig. 8).



**Figura 9.** Efecto del tolueno sobre la muerte producida por la administración de PTZ 80 mg/Kg siguiendo el protocolo de pre-exposición, \*\*\*  $p < 0.001$  control vs tolueno (pre-exposición); prueba exacta de Fisher.

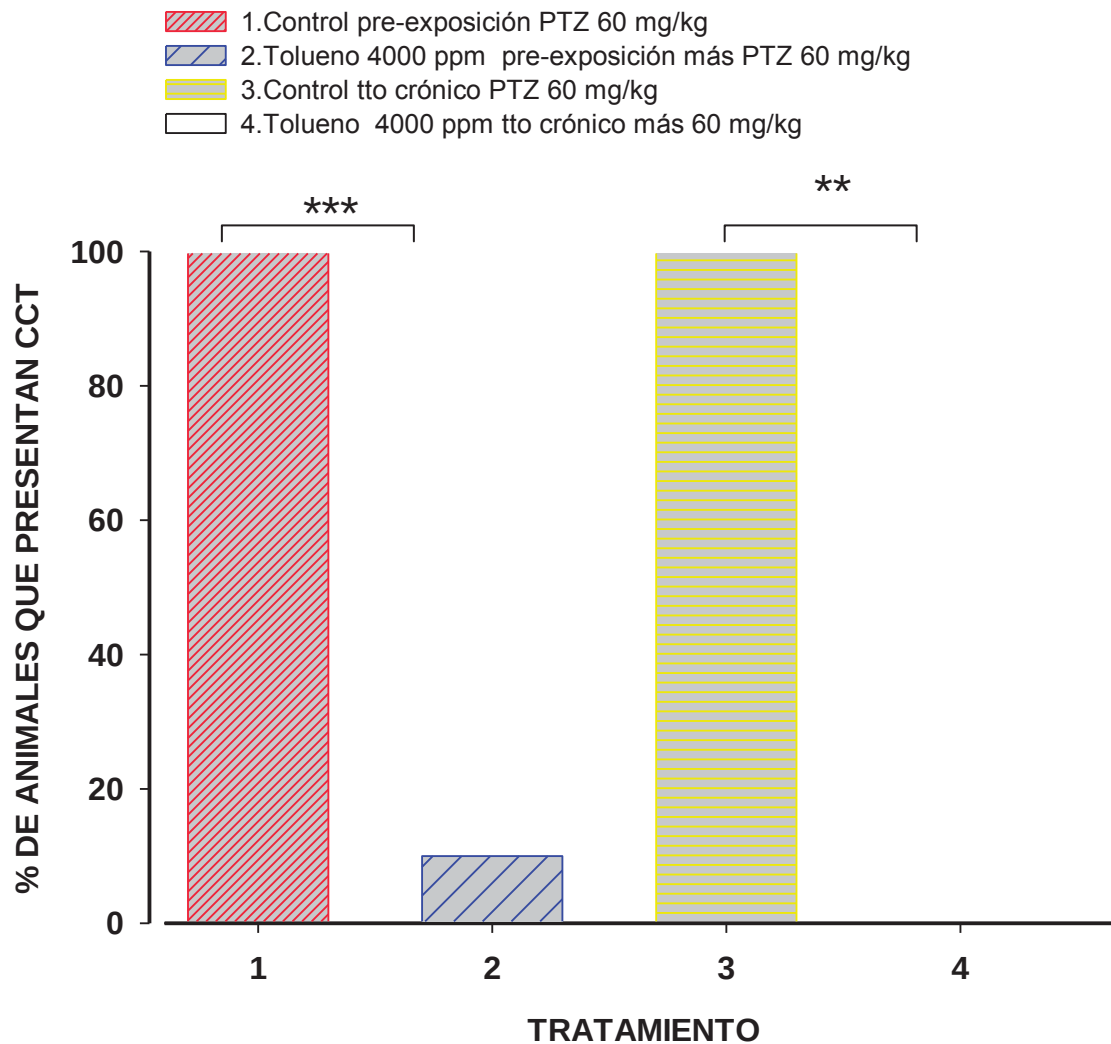


#### **4. EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN REPETIDA A TOLUENO SOBRE PORCENTAJE DE PRESENTACIÓN DE CCT INDUCIDAS POR PTZ.**

Como se mencionó anteriormente, uno de los objetivos de este trabajo fue determinar el efecto de administraciones repetidas de tolueno sobre la susceptibilidad hacia las convulsiones inducidas por PTZ (60 mg/kg).

La figura 10 muestra el efecto de exposición repetidas a tolueno 4000 ppm (30 min, 2 veces al día, 60 días) sobre el porcentaje de presentación de CCT como resultado de la administración del PTZ (barras 2 y 3) y su comparación con el protocolo de pre-exposición a tolueno 4000 ppm (barras 1 y 2).

Se observó que en el protocolo de pre-exposición, el resultado observado es significativo ya que efectivamente se demuestra el efecto anticonvulsivante que tiene el tolueno sobre la presentación de CCT inducidas por PTZ. Por otro lado, en el tratamiento crónico no hubo una diferencia significativa con respecto al tratamiento agudo, ya que no hubo presentación de CCT con la exposición repetida al disolvente, por lo que es probable que con tiempos más prolongados de exposición al disolvente se pudieran apreciar diferencias significativas en este parámetro.

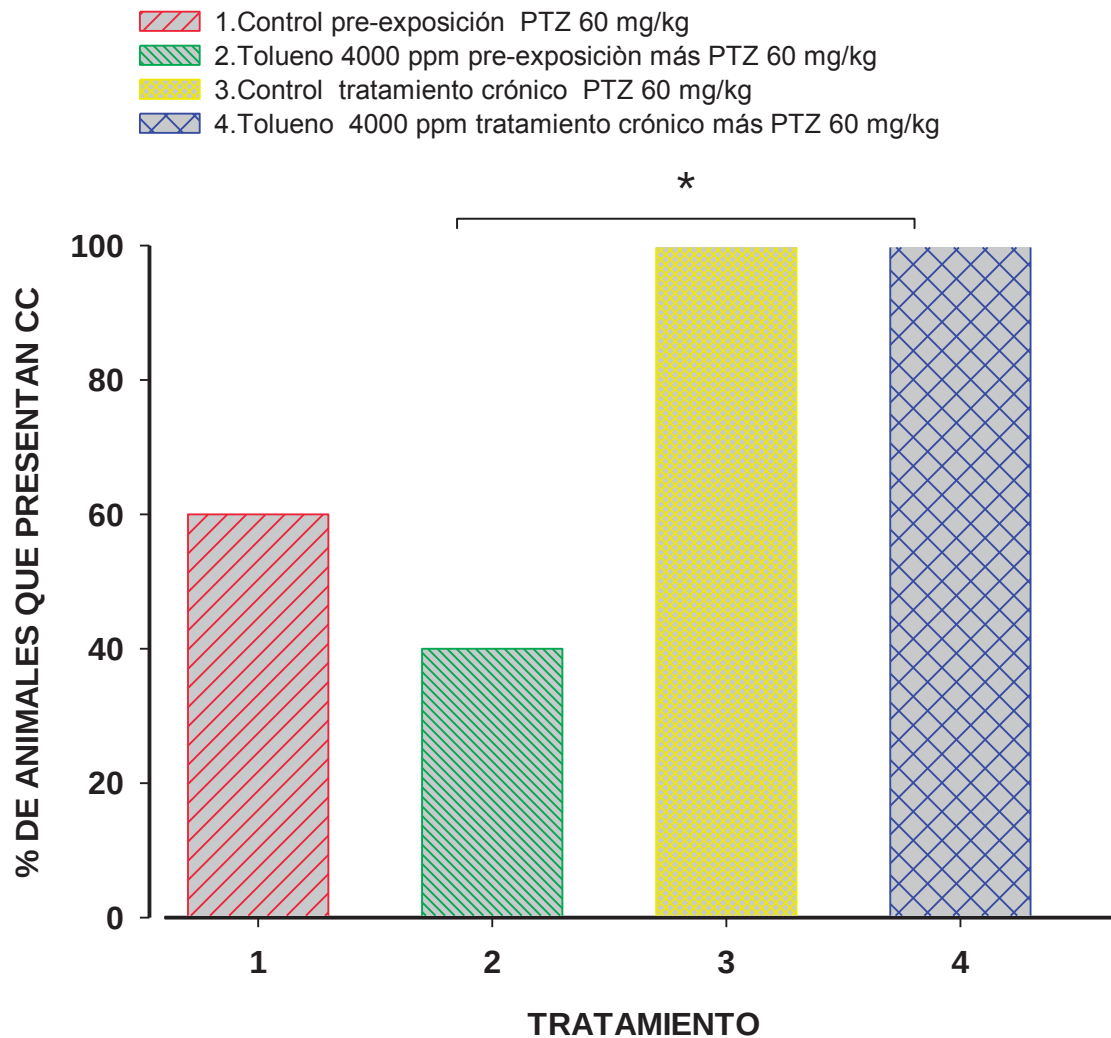


**Figura 10.** Efecto del tolueno sobre la presentación del porcentaje de CCT producidas por la administración de PTZ 60 mg/Kg siguiendo los protocolos de pre-exposición y tratamiento crónico  
 \*\*\*  $p < 0.001$  control vs tolueno (pre-exposición), \*\*  $p < 0.01$  control vs tolueno tratamiento crónico; prueba exacta de Fisher.

## **5. EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN REPETIDA A TOLUENO SOBRE PORCENTAJE DE PRESENTACIÓN DE CC INDUCIDAS POR PTZ**

La figura 11 muestra el efecto de exposición repetida a tolueno 4000 ppm (30 min, 2 veces al día, 60 días) sobre el porcentaje de presentación de CC como resultado de la administración de PTZ 60 mg/kg (barras 2 y 3) y su comparación con el protocolo de pre-exposición a tolueno 4000 ppm (barras 1 y 2).

Se observó que no hubo diferencia entre los grupos control y los tratados con tolueno tanto en el protocolo de pre-exposición, como en el tratamiento crónico; sin embargo, al comparar el porcentaje de CC entre los animales tratados crónicamente con tolueno y los correspondientes al tratamiento agudo con el disolvente, se observó que aumentó de manera significativa el porcentaje de animales que presentaron CC, lo cual sugiere la aparición de un efecto proconvulsivante.

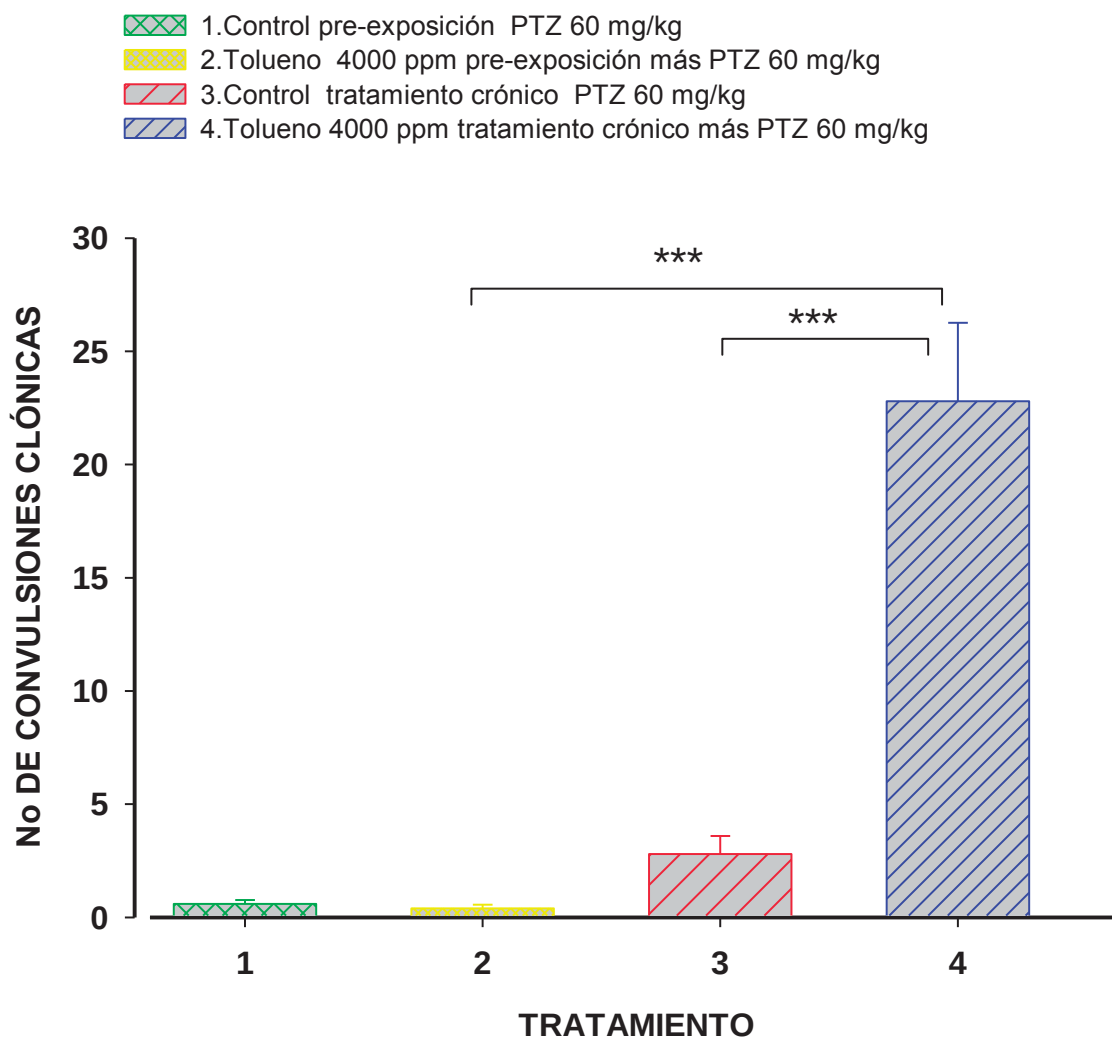


**Figura 11.** Efecto del tolueno sobre la presentación del porcentaje de CC producidas por la administración de PTZ 60 mg/Kg siguiendo los protocolos de pre-exposición y tratamiento crónico  
\*  $p < 0.05$  tolueno vs tolueno (tratamiento de pre-exposición con el crónico), prueba exacta de Fisher.

## **6. EFECTO DE LA EXPOSICIÓN REPETIDA A TOLUENO SOBRE EL NUMERO DE CC INDUCIDAS POR PTZ**

La figura 12 muestra el efecto de la exposición repetida a tolueno 4000 ppm (30 min, 2 veces al día, 60 días) sobre el número de CC como resultado de la administración de PTZ 60 mg/kg (barras 2 y 3) y su comparación con el protocolo de pre-exposición a tolueno 4000 ppm (barras 1 y 2).

Se observó que en el protocolo de pre-exposición no hubo una diferencia significativa entre los animales control y los expuestos a tolueno; no obstante, en el tratamiento crónico se observa un gran cambio, ya que en lugar de proteger contra las convulsiones, se apreció la aparición de un efecto proconvulsivante, al aumentar de manera significativa el número de CC presentadas en los animales expuestos de manera crónica a tolueno.

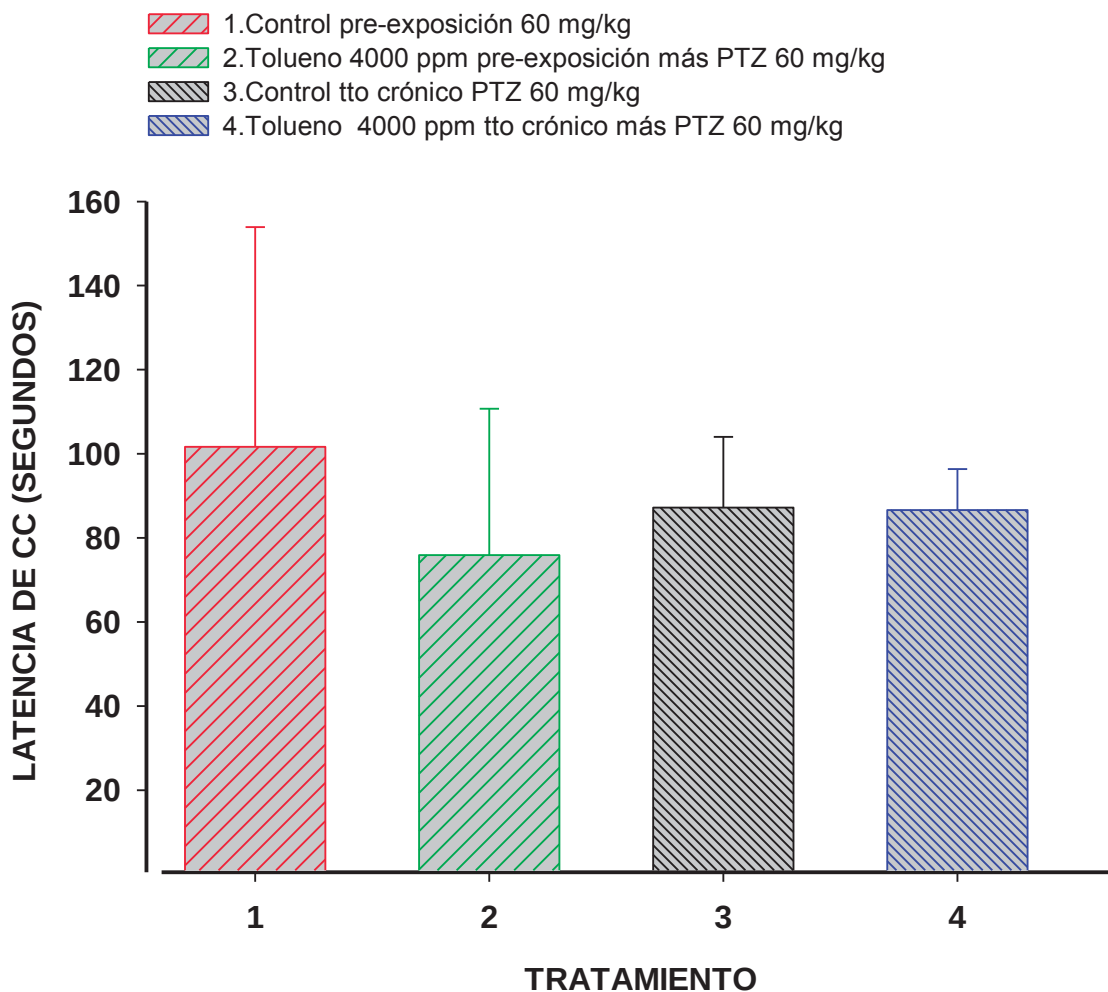


**Figura 12.** Efecto del tolueno sobre la presentación de número de CC producidas por la administración de PTZ 60 mg/Kg siguiendo los protocolos de pre-exposición y tratamiento crónico  
 \*\*\*  $p < 0.001$  vs tolueno (pre-exposición), tolueno (tratamiento crónico), \*\*\*  $p < 0.001$  control vs tolueno tratamiento crónico: prueba t student.

## 7. EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN REPETIDA A TOLUENO SOBRE LA LATENCIA DE PRESENTACIÓN DE CC INDUCIDAS POR PTZ

La figura 13 muestra el efecto de exposiciones repetidas a tolueno 4000 ppm (30 min, 2 veces al día, 60 días) sobre la latencia de presentación de CC como resultado de la administración del PTZ (barras 3 y 4) y su comparación con el protocolo de pre-exposición a tolueno 4000 ppm (barras 1 y 2).

Se observa que tanto en el protocolo de pre-exposición, como en el tratamiento crónico, no hubo diferencia significativa en la latencia para la presentación de CC en los animales control y en los expuestos a tolueno.



**Figura 13.** Efecto del tolueno sobre la latencia de presentación de CC producidas por la administración de PTZ 60 mg/kg durante los protocolos de pre-exposición y tratamiento crónico.

## VII. DISCUSIÓN

Los principales hallazgos de este trabajo se pueden resumir en los siguientes puntos:

- El tolueno tuvo actividad anticonvulsivante.
- El tolueno protegió contra la presentación de las convulsiones y protegió contra la muerte producida por las dosis altas de PTZ (60 y 80 mg/kg).
- El tolueno perdió su efecto anticonvulsivante en administraciones repetidas contra las convulsiones inducidas por PTZ.
- El tolueno en el tratamiento crónico tuvo una actividad proconvulsivante.

Para analizar los efectos conductuales de los disolventes se utiliza preferentemente la vía de inhalación, para ello se emplean cámaras de exposición estáticas (Gerasimov y col., 2002; Vidrio y col., 1986; Woolverton y Balster, 1981) o dinámicas selladas herméticamente (Moser y Balster, 1985; Wood y col., 1984). Las primeras son contenedores de vidrio de diferentes volúmenes en donde se introduce al animal o un grupo de animales y se inyecta un volumen determinado del disolvente, el cual se evapora y homogeniza mediante calentamiento o ventilación (Geller y col., 1983; Gerasimov y col., 2002; Woolverton y Balster, 1981). Las cámaras estáticas se utilizan para evaluar concentraciones altas de disolventes durante periodos cortos de exposición, ya que la respiración de los animales produce una acumulación de  $\text{CO}_2$ , el cual debe mantenerse en niveles bajos para no interferir con el experimento. Las cámaras dinámicas, por su parte, mantienen un flujo constante de los vapores del disolvente durante la exposición. En este trabajo se utilizaron las cámaras estáticas, las cuales tienen grandes ventajas que son indispensables para que no interfieran con los resultados de nuestros experimentos, ya que son grandes y mantienen la acumulación de  $\text{CO}_2$  por debajo del límite de intoxicación para el animal en experimentación.

Durante mucho tiempo se aceptó la teoría de Meyer y Overton de principios del siglo pasado que postulaba que el efecto anestésico general de varios compuestos, incluido el etanol, se relacionaba directamente con la lipofilicidad de los compuestos (estimada por el coeficiente de partición lípido/agua:  $\log P$ ). Esta



hipótesis consideraba que los anestésicos tenían un mecanismo de acción inespecífico dado por su capacidad de penetrar la membrana y producir cambios en su fluidez. Durante 80 años, esta teoría gozó de gran aceptación porque parecía establecer una excelente correlación entre el coeficiente de partición y la eficacia de varios de los compuestos estudiados. Con el tiempo, la misma teoría se explicó por extensión a los disolventes orgánicos industriales. Gradualmente, sin embargo, se acumularon pruebas en contra de que el etanol actuara por este mecanismo. Tales pruebas son las siguientes:

- Si bien es cierto que el etanol produce perturbación membranal, esto sucede en concentraciones que producen intoxicaciones muy graves o letales (Harris y Schroeder, 1981).
- El A<sub>2</sub>C, un compuesto sintético diseñado para perturbar la membrana lipídica, no mimetiza, *in vivo* o *in vitro*, los efectos del etanol (Buck y col., 1989).
- Los pequeños cambios en la temperatura capaces de producir los cambios en la fluidez membranal producidos por el etanol no son capaces de reproducir sus efectos *in vivo* (Woodward, 1996).
- Aunque el log P de n-alcanos y alcoholes aumenta con la longitud de los compuestos, existe un punto de corte en el cual un aumento en la lipofilidad ya no se traduce en un aumento en eficacia (Franks y Lieb, 1985).

No es de sorprender que a finales de la década de 1980 aparecieran los primeros trabajos que presentaban hipótesis alternativas. En 1986, Allan y Harris reportaron que el etanol actúa como agonista del receptor ionotrópico GABA<sub>A</sub> en membranas de cerebelo de ratón en concentraciones menores que las requeridas para alterar la fluidez membranal. En estudios posteriores se demostró que el etanol también inhibe selectivamente los receptores glutamatérgicos ionotrópicos del tipo NMDA en concentraciones relevantes para el consumo humano. La explicación de los efectos producidos por los disolventes ya no parecía justificarse por un mecanismo inespecífico de cambios en la fluidez membranal, por lo que las

investigaciones se orientaron entonces hacia la exploración del efecto de los disolventes sobre los receptores acoplados a canales iónicos.

En el 2000, Beckstead y col. evaluaron la participación de los receptores GABA<sub>A</sub> y glicina como posibles blancos moleculares de los disolventes de abuso. Tras estudiar unas rebanadas de hipocampo y la expresión de receptores recombinantes en ovocitos, estos autores encontraron que el tolueno, el tricloroetileno y el tricloroetano aumentaban de forma reversible las corrientes inhibitorias mediadas por el receptor GABA<sub>A</sub> en concentraciones de ~0.2-0.9 mM.

El tolueno es considerado como un componente químico principal que contribuye a la morbilidad asociada con el abuso de disolventes. Disponibilidad ilimitada, bajo costo, facilidad de uso y efectos intensos y rápidos, contribuyen a la popularidad de estas sustancias entre los niños y los adolescentes que buscan experimentar con las drogas que alteran el estado de ánimo (Mackesy-Amity y Fendrich, 1999; McGarvey y col., 1999; Morita y col., 1994).

Con base en la similitud del perfil farmacológico de los efectos de los disolventes orgánicos y el alcohol, desde 1984 se estudió la posible actividad anticonvulsivante de algunos disolventes. Para ello se utilizó como agente proconvulsivante el pentilentetrazol (PTZ), un antagonista de los receptores GABA<sub>A</sub> que produce convulsiones clónico-tónicas a los pocos segundos de su administración.

En el presente estudio se utilizó un modelo experimental de convulsiones inducidas por PTZ, un antagonista del receptor GABA<sub>A</sub> que actúa en el sitio de unión de la picrotoxina (Ramanjaneyulu y col., 1984; Dibas y Dillon, 2000) y que es uno de los compuestos de elección para el cernimiento de fármacos anticonvulsivantes (Martínez, 1991).

Los signos que observamos en los animales luego de la administración de PTZ fueron cola de Straub, mioclonias, CC y CCT. Sin embargo, en nuestro estudio sólo analizamos las CC y CCT porque no fue posible obtener curvas dosis-respuestas claras para los otros signos, ya que con las dosis altas de PTZ, en ocasiones no se presentaban los signos bajos de actividad convulsiva (cola de Straub, mioclonias). Estas observaciones en nuestro trabajo fueron similares a las

descritas por primera vez por Yonekawa y col. (1980) y Wood y col. (1984). La dosis de PTZ utilizada en nuestro trabajo de pre-exposición y tratamiento crónico fue la más baja capaz de producir convulsiones en la totalidad de los animales ( $DE_{100}$ ) y la dosis mínima capaz de producir la muerte ( $DL_{100}$ ) de 100 mg/kg. La dosis seleccionada como  $DE_{100}$  fue de 60 mg/kg, la cual fue diferente a la empleada por otros autores, ya que Yanekawa y col. en 1980 utilizaron una dosis de 85 mg/kg como  $DE_{40}$  mientras que Wood y col. en 1984 emplearon una dosis de PTZ de 110 mg/kg como  $DL_{100}$ . Por otro lado, Gauthereau (2002) escogió dos dosis de PTZ, la de 80 mg/kg como la dosis mínima para producir convulsiones en el 100 % de los animales ( $DE_{100}$ ) y dosis letal 35 ( $DL_{35}$ ) y la de 100 mg/kg como la dosis letal mínima ( $DL_{100}$ ).

Nuestros resultados obtenidos en el protocolo de pre-exposición fueron similares a los descritos por Wood y col. (1984) quienes encontraron que la exposición de ratones a tolueno (1780-5600 ppm) durante 2 h en una cámara dinámica, retrasaba la presentación de muerte inducida por PTZ 110 y 200 mg/kg, de una manera dependiente de la concentración, también reportaron que en el pretratamiento con tolueno (200-400 mg/kg, i.p.) se retrasaba la aparición de signos convulsivos y se prevenía la presentación de la fase de extensión tónica de una manera dependiente de la dosis. Gauthereau (2002) expuso ratones a tolueno (4000 ppm) durante 30 min, una vez transcurrido este tiempo se sacaron de la cámara, se les administró PTZ (80 mg/kg) y se re-expusieron nuevamente al tolueno y encontró que disminuyó significativamente el porcentaje de animales que convulsionaron. Además, a fin de determinar la aportación de una exposición doble al efecto de los disolventes observado con el protocolo de pre-exposición, se estudió otro grupo de animales expuestos a tolueno 8000 ppm de manera simultánea a la administración de PTZ 80 mg/kg durante 30 min, demostrándose una protección similar a la producida por el tolueno a 4000 ppm siguiendo el protocolo de pre-exposición seguida de re-exposición. En otros estudios se observó que la administración i.p. de tolueno y xileno a ratones, así como la exposición de éstos a la inhalación de sus vapores, incrementa la latencia de presentación de convulsiones y protege contra los efectos letales del PTZ (Yu y

col., 1996). Entre las diferencias que encontramos con respecto a nuestro estudio se encuentran las dosis empleadas de PTZ, ya que se obtuvieron resultados semejantes pero a diferentes dosis. Estas diferencias pueden deberse a variaciones en las condiciones del laboratorio (temperatura, ciclo luz/oscuridad, humedad), distintas cepas de ratones utilizados y las diferentes épocas del año para la realización de los experimentos, ya que se han descrito que existen variaciones estacionales en la susceptibilidad hacia las convulsiones inducidas por PTZ, presentándose umbrales más altos entre febrero y abril y más bajos entre julio y septiembre (Lôscher y Fiedler, 1996), todos estos factores mencionados anteriormente revelan una gran importancia en la selección adecuada de la dosis y de las condiciones de experimentación.

Aunque sólo hay unos pocos informes clínicos sobre estudios de abuso de inhalables (Flanagan e Ives, 1994; Miller y col, 2002), existen efectos anticonvulsivantes y convulsivos que se han observado en animales tras la exposición a disolventes siguiendo patrones de abuso. Efectos de protección se han informado en contra de las convulsiones provocadas por varias sustancias químicas en los ratones. En concreto, la exposición aguda a tolueno (1000 - 6000 ppm) inhibe las convulsiones y la muerte inducida por NMDA en forma dependiente de la concentración (Cruz y col., 2003). Una sola inyección de tolueno (100-1000 mg / kg, iv) aumentó los umbrales para la presentación y muerte inducida por nicotina, NMDA, bicuculina y picrotoxina, pero no las inducidas por estriknina (Chan y col., 2006). Inyecciones de tricloroetileno aumentan significativamente los umbrales de convulsión y de dosis letales en ratones tratados con PTZ, picrotoxina o NMDA (Shih y col., 2001). La inhalación de propilbenceno, etilbenceno, tolueno y m-xileno reduce el porcentaje de animales que presenta convulsiones inducidas por PTZ (datos no publicados), mientras que el tolueno también protege contra las convulsiones inducidas por electroshock (0.2-0.4 g / kg) (Silva Filho y col., 1992). Estos datos están en línea con el informe inicial de Wood y col. (1984), que demuestra que el tolueno inyectado i.p. (0.2-0.4 mg / kg) y m-xileno (0.2-0.5 mg / kg) protegen contra las convulsiones producidas por PTZ; en otras palabras, ellos fueron los primeros que demostraron que el

tolueno tiene actividad anticonvulsivante en relación a la dosis, concentración y duración de la exposición y es independiente de la ruta de administración. Sin embargo, estos resultados contrastan con lo informado para el flurothyl, un vapor convulsivante (Koblin y col., 1981) y con la acción proconvulsivante descrita para altas dosis de tolueno administrado i.p. (1-2 g / kg), acetato de etilo (0.75-1.5 g / kg) y n -hexano (8-10 g / kg) (Silva- Filho y col., 1992). Por otra parte, la exposición aguda a tricloroetano no resulta en efectos anticonvulsivantes en dosis que son conductualmente activas (8000 y 12000 ppm) (Cruz y col., 2003). Convulsiones inducidas por manipulación se han observado en ratones al término de una exposición continua a 1,1,1- tricloroetano (500-2000 ppm) (Balster y col., 1992; Evans y Balster., 1993) o a 250 ppm de tolueno durante 4 días (Wiley y col., 2003). Curiosamente, se observaron resultados similares en ratones al extraerlos de la cámara después de completar 20 minutos de exposición a 2000 ppm de acetato de etilo y acetato de n-butilo (Bowen y Balster, 1997) o 300-1330 ppm flurothyl ( Bowen y col, 1996). En animales expuestos crónicamente, la reactividad a la manipulación puede ser considerada un signo de abstinencia, pero es difícil pensar que la dependencia se produce después de 20 minutos de exposición a disolventes. No existe una explicación definitiva para este hallazgo hasta este punto. En resumen, varios disolventes de abuso en tratamiento agudo, parecen tener efectos anticonvulsivos. Esta acción protectora podría estar relacionada con su capacidad para inhibir los receptores NMDA y los nicotínicos, para potenciar los receptores GABA<sub>A</sub> y/o para liberar dopamina. Otros disolventes son inactivos o tienen actividad proconvulsivante. El flurothyl es un antagonista GABA<sub>A</sub>, pero los mecanismos de acción de muchos de los disolventes son todavía desconocidos.

Las concentraciones altas de cualquier disolvente pueden tener efectos no específicos en la reactividad del SNC. Todavía queda por investigar si la exposición crónica resulta en acciones opuestas para los vapores anticonvulsivantes.

Uno de los objetivos de este trabajo fue determinar el efecto que tiene la exposición repetida a altas concentraciones de tolueno, ya que la mayoría de los estudios hasta ahora se han realizado fundamentalmente con el propósito de

reproducir lo que ocurre en la exposición ocupacional, es decir cuando se está expuesto a concentraciones bajas de disolventes por periodos prolongados. Encontramos pocas referencias que centraran su atención en los efectos de exposición repetidas a disolventes de abuso. Para la realización de este trabajo se tomó como referencia una concentración de 4000 ppm de tolueno, de acuerdo a los estudios realizados por Gauthereau en el 2002, quien demostró que la exposición repetida a tolueno (30 min, 2 veces al día, 7 días) producía una pérdida del efecto anticonvulsivante en contra de las convulsiones inducidas por PTZ 80 mg/kg. En otro estudio realizado por Páez- Martínez, (2000) se observó que fue posible desarrollar tolerancia a los efectos pronociceptivos de 4000 ppm de tolueno, siguiendo el mismo protocolo de exposición durante 30 min, 2 veces al día, durante 7 días, por lo cual es razonable suponer que este protocolo es apropiado para simular exposiciones crónicas al disolvente.

Existen datos que sugieren que la exposición repetida a 8000 ppm de tolueno en ratas durante 10 días (30 min / día) (Williams y col., 2005) aumentan las subunidades  $\alpha 1$  del receptor GABA<sub>A</sub>, las subunidades NR1 Y NR2B del receptor NMDA y las subunidades GluR2 /3 (pero no GluR1) del receptor AMPA en la corteza prefrontal media, también produce un incremento modesto en los niveles de la subunidad  $\alpha 1$  del receptor GABA<sub>A</sub> en el estriado dorso-lateral y la disminución de esta subunidad dentro del área ventral tegmental y de la sustancia nigra compacta, así como una disminución de los niveles de la subunidad NR1 en la sustancia nigra compacta y un ligero aumento en los niveles de la subunidad NR2B en el núcleo acumbens.

Con base en estas referencias realizamos el protocolo de exposición crónica a 4000 ppm de tolueno durante 30 minutos, 2 veces al día, por 60 días, observando que nuestros resultados están de acuerdo con el trabajo de Gauthereau (2002), ya que efectivamente nosotros encontramos que en los animales tratados con PTZ 60 mg/kg, el efecto anticonvulsivante del tolueno observado durante el protocolo de pre-exposición se perdió cuando los animales recibieron exposiciones repetidas a dicho disolvente, previas a la administración del agente convulsivante y exposición simultánea a tolueno. Sin embargo, a

diferencia del estudio antes mencionado, nosotros empleamos una dosis menor de PTZ (80 mg/kg vs 60 mg/kg) y encontramos que se produjo un efecto proconvulsivante en el protocolo de exposición repetida, al aumentar el número de convulsiones clónicas en comparación con los ratones de los experimentos de la fase aguda, lo cual sugerimos que podría deberse, al menos en parte, a una regulación a la baja de los receptores GABA<sub>A</sub>.

## VIII. CONCLUSIONES

El tolueno mostró actividad anticonvulsivante ante el PTZ.

El tolueno protegió contra las convulsiones y muerte inducidas por PTZ en el protocolo de pre-exposición.

El tolueno en administraciones repetidas, perdió su efecto protector contra las convulsiones producidas por PTZ, tuvo efecto proconvulsivante.

Por otra parte, la pérdida de protección del tolueno en contra de las convulsiones inducidas por PTZ luego de la exposición crónica al disolvente, podría deberse, al menos en parte, a una disminución en el número de los receptores GABA<sub>A</sub>.



## IX: REFERENCIAS

Abbott A: Neurobiological perspectives on drugs of abuse. Trends Pharmacol Sci, 13:169, 1992.

Aguayo LG, Tapia JC, Panacetti FC: Potentiation of the Glycine-activated Cl<sup>-</sup> current by athanol in cultured mouse spinal neurons. J Pharmacol Exp. Ther, 279:1116-1122, 1996.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toluene toxicity monograph, 2001. In: <http://www.atsdr.cdc.gov/HEC/CSEM/>

Aistrup GL, Marszalec W, Narahashi T: Ethanol modulation of nicotinic acetylcholine receptor currents in cultured corical neurons. Mol Pharmacol, 55:39-49,1999.

Allan AM, Harris RA: Gamma- aminobutyric acid and alcohol actions: neurochemical studies of long sleep and short sleep mice. Life sci, 39:2005-2015, 1986.

Arito H, Tsuruta H, Nakagaki K, Tanaka S: partial Insomnia, Hyperactivity and hyperdipsia induced by repeated administration of toluene in rats: their relation to brain monoamine metabolism. Toxicology, 37:99-110, 1985

Arnold GL, Kirby RS, Langerdoerfer S, Wilkins HL, Toluene embryopathy: clinical delineation and developmental follow-up. Pediatrics, 93: 216-20, 1994

ATSDR. Agency for toxic substances and disease registry. U.S. Departament of health and human services. Toxicological profile for toluene. Atlanta, Georgia. Pp 1-111, 1994.

Aydin K, Sencer S, Ogel K, Genchellac H, Demir T, Minareci O (2003). Single-voxel proton MR spectroscopy in toluene abuse. Magn Reson Imaging 21: 777-785.

Ayres, P.H., and Taylor, W.D. 1989, Solvents. In: Hayes, A.W. (Ed). Principles and Methods of Toxicology, Second Edition, Raven Press, Ltd. New York.

Arlien- Soborg P. Solvent neurotoxicity. CRC Press. Boca Ratón, Florida, pp 61-106, 291 -306, 1992.

Bale AS, Meacham CA, Benignus VA, Bushnell PJ, Shafer TJ (2005a). Volatile organic compounds inhibit human and rat neuronal nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus* oocytes. Toxicol Appl Pharmacol 205: 77-88.

Bale AS, Smothers CT, Woodward JJ (2002). Inhibition of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by the abused solvent, toluene. Br J Pharmacol 137: 375-383.

Bale AS, Tu Y, Carpenter-Hyland EP, Chandler LJ, Woodward JJ (2005). Alterations in glutamatergic and gabaergic ion channel activity in hippocampal neurons following exposure to the abused inhalant toluene. Neuroscience 130: 197-206.

Balster RL. Neural basis of inhalant abuse. Drug and Alcohol Dependence. 51: 207-214, 1998.

Balster, R.L. Wiley, J.L. Tokarz, M.E Knisely, J.S. Effects of ethanol and toluene on fixed-ratio performance in short sleep and long sleep mice, Drug Alcohol Depend. 31 (1992) 65-75.

Barroso, MR, Villeda HJ, Mendez AM: Teratologic cranio-encephalic effects of chronic thinner inhalation in progenitors, in rats and humans. *Gac Med Mex*, 127:493-500, 1991.

Beckstead MJ, Weiner JL, Eger II EI, Gong DH, Mihic SJ (2000). Glycine and gamma-aminobutyric acid(A) receptor function is enhanced by inhaled drugs of abuse. *Mol Pharmacol* 57: 1199–1205.

Beckstead VA, Weiner JL, Eger EI, Gong DH, Mihic SJ: Glycine and  $\gamma$ -aminobutyric acid, receptor function is enhanced by inhaled drugs of abuse. *Mol Pharmacol*, 57:1119-1205, 2000.

Benignus, V.A. 1981, *Neurotoxicol.*, 2, 567.

Benignus VA, Muller KE, Barton CN, Bittikofer JA (1981). Toluene levels in blood and brain of rats during and after respiratory exposure. *Toxicol Appl Pharmacol* 61: 326–334.

Bloom, F. E, Neurotransmisión y Sistema Nervioso Central. En Goodman and Gilman`s. Las Bases Farmacologicas de la Terapeutica. Harman JG y Limbird LE (eds) 9ª. Edición. McGraw- Hill. Pág. 294-295. 1996.

Bloomquist JR (1996) Ion channels as targets for insecticides. *Annu Rev Entomol* 41:163–190.

Bonano, G. and Raitere, M. Multiple GABA receptors, *Trends Pharmacol. Sci.*, 1993, 14: 259-261.

Bonnert TP, McKernan RM, Farrar S, le Bourdelles B, Heavens RP, Smith DW, Hewson L, Rigby MR, Sirinathsinghji DJS, Brown N, et al. (1999)  $\theta$ , a novel  $\gamma$ -aminobutyric acid type A receptor subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:9891–9896.

Bowen, S.E. Balster, R.L. A comparison of the acute behavioral effects of inhaled amyl, ethyl, and butyl acetate in mice, *Fundam. Appl. Toxicol.* 35 (1997) 189–196.

Bowen SE, Batis JC, Paez-Martinez N, Cruz SL (2006). The last decade of solvent research in animal models of abuse: mechanistic and behavioral studies. *Neurotoxicol Teratol* 28: 636–647.

Bowen SE, Wiley JL, Balster RL. The effects of abused inhalants on mouse behavior in an elevated plus-maze. *Eur J Pharmacol* 1996;312:131\_6.

Bowen, S.E. Wiley, J.L. Evans, E.B. Tokarz, M.E. Balster, R.L. Functional observational battery comparing effects of ethanol, 1,1,1-trichloroethane, ether, and flurothyl, *Neurotoxicol. Teratol.* 18 (1996) 577–585.

Bowery, N. G. GABA<sub>B</sub> receptor pharmacology. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1993, 14:259-261.

Brailowsky S, Las sustancias de los sueños: Neuropsicofarmacología. 1ª edición, México, DF. Capitulo V Neurotransmisores, 1995.

Buck KJ, Allan AM, Harris RA: Fluidization of brain membranes by A2C does not produce anesthesia and does not muscimol stimulated <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> influx. *Eur J pharmacol*, 160: 359-367, 1989.

Bundari S., editor. The Merck Index. Tewelfth edition. Merck and Co. U.S.A p 1626,1642-1643, 1996

Bushnell PJ, Oshiro WM: Behavioral components of tolerance to repeated inhalation of trichloethylene (TCE) in rat. *Neurotoxicol teratol*, 22:221-229,2000.

Calderon-Guzman D, Hernandez-Islas JL, Espitia Vazquez IR, Barragan- Mejia G, Hernandez-Garcia E, Del Angel DS et al. (2005). Effect of toluene and cresols on Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase, and serotonin in rat brain. *Regul Toxicol Pharmacol* 41: 1–5.

Cairney S, Maruff P, Burns CB, Currie J, Currie BJ (2005). Neurological and cognitive recovery following abstinence from petrol sniffing. *Neuropsychopharmacology* 30: 1019–1027.

Carrie E. Anderson, M.D, Glenn A. Loomis, M.D. Recognition and Prevention of Inhalant Abuse, american family physician volume 68, number 5, 2003.

Celentano JJ, Gibbs TT, Faeb DH: Ethanol potentiates GABA- and glycine induced chloride currents in chick spinal cord neurons. *Brain Res*, 455: 377-380, 1988.

Chan, M.H. Lee, C.C, Chen, H.H. Effects of toluene on seizures induced by convulsants acting at distinct ligand-gated ion channels, *Toxicol. Lett.* 160 (2006) 179–184.

Chen F, Jarrott B, Lawrence AJ (1999). Up-regulation of cortical AMPA receptor binding in the fawn-hooded rat following ethanol withdrawal. *Eur J Pharmacol* 384: 139–146.

Contreras CM, Gonzalez- Estrada T, Zarabozo D, Fernandez- Guardiola A. petit mal and grand seizures produced by toluene or benzene intoxication in the cat. *Electroencephalography Clin Neurophysiol*, 46: 290-301, 1979.

Cruz SL, Balster RL, Woodward JJ: Effects of volatile solvents on recombinant N-methyl-D-aspartate receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Br J Pharmacol*, 131: 1303-8, 2000.

Cruz SL, Bowen SE; Inhalant Abuse, Neural Mechanisms of Action of Drugs of Abuse and Natural Reinforcers, *J Pharmacol*, 2008: 61-87, 2008.

Cruz SL, Gauthereau MY, Camacho CM, López RC, Balster RL. Effects of inhaled toluene and 1,1,1-Trichloroethane on seizures and death produced by N-methyl-D-aspartic acid in mice. *Behav Brain Res*, 140: 195-202, 2003.

Cruz SL, Mirshahi T, Thomas B, Balster RL, Woodward JJ: Effects of the abused solvent toluene on recombinant N-Methyl-D-Aspartate and non-N-Methyl-D-Aspartate receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *J Pharmacol Exp Ther*, 286:334-340, 1998.

Cruz SL, Paez-Martinez N, Pellicer F, Salazar LA, Lopez- Rubalcava C. Toluene increases acute thermonociception in mice. *Behav Brain Res* 2001;120:213\_20.

Del Re AM, Dopico AM, Woodward JJ (2006). Effects of the abused inhalant toluene on ethanol-sensitive potassium channels expressed in oocytes. *Brain Res* 1087: 75–82.

Dinwiddie S H: Abuse of inhalants: a review. *Addiction* 89:925-939,1994.

Dreiem A, Myhre O, Fonnum F: Relationship between lipophilicity of C6-C10 hydrocarbon solvents and their ROS-inducing potency in rat cerebellar granule cell. *Neurotoxicology*, 23:701-709, 2002.

Dohrn, C., Lichtor, J.L., Finn, R.S., Uitvlugt, A., Coalson, D.W., Rupani, G., de Wit, H., Zacny, J.P., 1992. Subjective and psychomotor effects of nitrous oxide in healthy volunteers. *Behav. Pharmacol.* 3, 19-30.

Donald JM, Hooper K, Hopenhayn RC: Reproductive and developmental toxicity of toluene: a review. *Environ Health Perspect*, 94: 237-44, 1991.

Enna S. J. The GABA receptors. 3ª edición. Humana Press, New Jersey. Pp 1-7, 2007.

Encuesta Nacional de Adicciones (ENA,2002)CONADIC/SSA, IMP,INEGI. Informe Ejecutivo, México, 2003.

Evans, E.B. Balster,R.L. 1,1,1-trichlorethane-produced physical-dependence in mice — effects of drugs and vapors on withdrawal, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 264 (1993) 726–733.

Filley CM, Halliday W, Kleinschmidt-DeMasters BK (2004). The effects of toluene on the central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 63: 1–12.

Flanagan R. J, Ives, R.J. Volatile substance abuse, *Bull. Narc.* 46 (1994) 49–78.

Flanagan RJ: Volatile Substance abuse. *Bulletion on Narcotics.* 46 (2): 49-78, 1994.

Flowers, L, Toxicological review of toluene, CAS No. 108-88-3, EPA/635/R-05/004, 2-3, 2005.

Franks NP, Lieb WR: Mapping of general anaesthetic target sites provides a molecular basis for cutoff effects, *Nature*, 316: 349-351, 1985.

Fornazzari L, Wilkinson DA, Kapur BM, Carlen PL (1983). Cerebellar, cortical and functional impairment in toluene abusers. *Acta Neurol Scand* 67: 319–329.

Galinkin, J.L., Janiszewski, D.J., Young, C.J., Klafta, J.M., Klock, P.A., Coalson, D.W., Apfelbaum, J.L., Zacny, J.P., 1997. Subjective, psychomotor, cognitive, and analgesic effects of subanesthetic concentrations of sevoflurane and nitrous oxide. *Anesthesiology* 87, 1082-1088.

Garriott JC, Foerster E, Juarez L, de la Garza F, Mendiola I, Curoe J (1981). Measurement of toluene in blood and breath in cases of solvent abuse. *Clin Toxicol* 18: 471–479

Gauthereau-Torres MY. 2002. Efecto del Tolueno y del 1,1,1-Tricloroetano sobre las Convulsiones Inducidas por Petilentetrazol y NMDA en Ratones. Tesis de Maestría. Departamento de farmacobiología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, 3-4 p.

Geller I, Hartmann R J, Mendez V, Gaus EM: Toluene inhalation and anxiolytic activity: Possible synergism with diazepam. *Pharmacol Biochem Behav*, 19: 899-903, 1983.

Gerasimov MR, Schiffer WK, Marsteller D, Ferrieeri R, Alexoff D, Dewey SL: Toluene inhalation produce regionally specific changes in extracellular dopamine. *Drug alcohol Depend*, 65:243-251,2002.

Goode, E., Troiden, R.R., 1979. Amyl nitrite use among homosexual men. *Am. J. Psychiatry* 136, 1067-1069.

Gotohda T, Tokunaga I, Kubo S, Morita K, Kitamura O, Eguchi A (2000). Effect of toluene inhalation on astrocytes and neurotrophic factor in rat brain. *Forensic Sci Int* 113: 233–238.

Goudi AJ, Emmett- Oglesby MW: *Psichoactive Drugs: Tolerance and Sensitizacion*. Humana Press, Nueva Jersey, 1989.

Harris RA, Schroeder F: Ethanol and the physical properties of brain membranes: Fluorescence studies. *Mol Pharmacol*, 20:128-137, 1981.

Hevers W and Luddens H (1998) The diversity of GABAA receptors: pharmacological and electrophysiological properties of GABAA channel subtypes. *Mol Neurobiol* 18:35–86.

Hormes JT, Filley CM, Rosenberg NL (1986). Neurologic sequelae of chronic solvent vapor abuse. *Neurology* 36: 698–702.

Huang J, Asaeda N, Takeuchi Y, Shibata E, Hisanaga N, Ono Y et al. (1992). Dose dependent effects of chronic exposure to toluene on neuronal and glial cell marker proteins in the central nervous system of rats. *Br J Ind Med* 49: 282–286.

Jones HE, Baster RL: Inhalant abuse in pregnancy. *Obstet Gynecol*, 25: 153-67, 1998.

Kaneko T, Koizumi T, Takezaki T, Sato A (1992). Urinary calculi associated with solvent abuse. *J Urol* 147: 1365–1366.

Koblin, D.D , Eger,E.I , Johnson,B.H. Collins, P, Terrell,R.C , Speers,L. Are convulsant gases also anesthetics? *Anesth. Analg.* 60 (1981) 464–470.

Kosel N, Sloboda Z, de la Rosa M (eds): *Epidemiology of Inhalant Abuse: An International Perspective*. NIDA. Res. Monograph series No.148. Department of Health and Human Services, Rockville, 1995.

Kravitz, E. A., Kuffler, S.W., and Potter, D. D Gamma-aminobutyric acid and other blocking compounds in Crustacea. Their relative concentrations in separated motor and inhibitory axons. *J. Neurophysiol.*, 1963, 26:739-751.

Kurtzman TL, Otsuka KN, Wahl RA (2001). Inhalant abuse by adolescents. *J Adolesc Health* 28: 170–180.

Lolin Y (1989). Chronic neurological toxicity associated with exposure to volatile substances. *Hum Toxicol* 8: 293–300.

Lopreato GF, Phelan R, Borghese CM, Beckstead MJ, Mihic SJ (2003). Inhaled drugs of abuse enhance serotonin-3 receptor function. *Drug Alcohol Depend* 70: 11–15.

Lorenzana Jimenez M, Salas M. Behavioral affects of chronic toluene exposure in the development of the rat. *Neurobehav Toxicol Teratol*, 5: 295-9, 1983.

Lorenzana Jimenez M, Salas M: Effects of neonatal toluene exposure on the development of evoked and spontaneous cortical activity in the rat. *Neurotoxicol Teratol*, 12: 215-220, 1985.

Lovinger DM, White G, Weight FF: Ethanol inhibits NMDA-Activated ion current in hippocampal neurons. *Science*, 243: 1721-1724, 1989,

Lovinger DM: Ethanol potentiates ion current mediated by 5- HT<sub>3</sub> receptors on neuroblastoma cells and isolated neurons. *Alcohol Alcohol Suppl*, 1: 181-185, 1991.

Lovinger DM, Zhou Q: Alcohols potentiate ion current mediated by recombinant 5 HT3RA receptors expressed in a mammalian cell. *Neuropharmacology*, 33: 1567-1572, 1994.

Lubman DI, Hides L, Yu"cel M (2006). Inhalant misuse in youth: the need for a coordinated response. *Med J Aust* 185: 327–330.

Macdonald RL and Barker JL (1978) Specific antagonism of GABA-mediated postsynaptic inhibition in cultured mammalian spinal cord neurons: a common mode of convulsant action. *Neurology* 28:325–330.

Macdonald R.L., and Kelly, K. M. Antiepileptic drug mechanism of action. *Epilepsia*, 1993, 34 Suppl, 5:S1-S8.

Macdonald R.L., and McLean, M.J. Cellular bases of barbiturate and phenytoin anticonvulsant drug action. *Epilepsia*, 1982, 23 Suppl. S:S7-S18.

Machu TK, Harris RA: Alcohols and anesthetics enhance the function of 5- hydroxytryptamine 3 receptors expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J Pharmacol Exp: Ther*, 271: 898-905, 1994.

Mackesy-Amiti, M.E., Fendrich, M., 1999. Inhalant use and delinquent behavior among adolescents: a comparison of inhalant users and other drug users. *Addiction* 94, 555–564.

Marjot R, Mcleod AA: Chronic non-neurological toxicity from volatile substance abuse. *Hum Toxicol*, 8:301-6, 1989.

Mascia MP, Mihic SJ, Valenzuela CF, Schofield PR, Harris RA: A single amino acid determines differences in ethanol actions on strychnine sensitive glycine receptors. *Mol Pharmacol*, 50: 402-406, 1996.

McNamora, J. O, Fármacos eficaces para el tratamiento de las epilepsias. En Goodman and Gilman`s. Las Bases Farmacologicas de la Terapeutica. Harman JG y Limbird LE (eds) 9ª. Edición. McGraw- Hill. Pág. 491-495. 1996.

McGarvey, E.L., Clavet, G.J., Mason, W., Waite, D., 1999. Adolescent inhalant abuse: environments of use. *Am. J. Drug Alcohol Abuse* 25, 731– 741.

Maruff P, Burns CB, Tyler P, Currie BJ, Currie J (1998). Neurological and cognitive abnormalities associated with chronic petrol sniffing. *Brain* 121: 1903–1917.

Mattia CJ, Adams JD Jr, BOnDY SC: Free radical induction in the brain and liver by products of toluene catabolism. *Biochem Pharmacol*, 46: 103-110, 1993.

Medina- Mora Me, Berenzon S:Epidemiology of Inhalant Abuse in Mexico. En Kosel N, Slovada Z,De la Rosa M (eds). *Epidemiology of Inhalant Abuse: An International Perspective*. NIDA Research Monograph Series No. 148. Rockville, 1995.

Mihic SJ, Whiting PJ, Harris RA: Aneesthetic concentrations of alcohols potentiate GABAA receptor-mediated currents:lack of subunit specificity. *Eur J Pharmacol*, 268: 209- 214, 1994.

Miller P. W, Mycyk, M.B. Leikin, J.B. Ruland, S.D. An unusual presentation of inhalant abuse with dissociative amnesia, *Vet. Hum. Toxicol.* 44 (2002) 17–19.

Mirshahi T, Woodward JJ: Ethanol sensitivity of heteromeric NMDA receptors effects of subunit assembly, glycine and NMDAR1 Mg(2+) insensitive mutants. *Neuropharmacology*, 34 : 347- 355, 1995.

Moser VC, Balster RL: Effects of toluene, halothane and etanol vapor on fixed-ratio performance in mice. *Pharmacol Biochem Behav*, 22: 797-802, 1985.

Moser VC, Balster RL. The effects of acute and repeated toluene exposure on operant behavior in mice. *Neurobehav Toxicol Teratol* 1981;3:471\_ 5.

Moser VC, Balster RL. The effects of inhaled toluene, halothane, 1,1,1-trichloroethane, and ethanol on fixed-interval responding in mice. *Neurobehav Toxicol Teratol* 1986;8:525\_ 31.

Moser VC, Scimeca JA, Balster RL: Minimal tolerance to the effects of 1,1, 1 –trichlorethane on fixed-radio responding in mice. *Neurotoxicol*, 6: 35-42, 1985.

Morita, N., Satoh, S., Oda, S., Tomita, H., Shoji, M., Seno, E., Abe, K., Konishi, T., 1994. A study of relationships among solvent inhalation, personality and expectancy; especially on affinity to hallucination, sensation seeking and neurotic tendency. *Arukuru Kenkyu to Yakubutsu Izon* 29, 445– 468.

Mulliking-Kilpatrick D, Treistman SN. Electrophysiological studies on calcium channels in naive and etanol treated PC12 cells. *Alcohol Alcohol Suppl*, 2: 385-389, 1993.

NIDA Instituto Nacional sobre el abuso de drogas, Abuso de inhalantes, NIH Publicación Número 05-3818 (S), <http://www.drugabuse.gov> , 2005

NIDA (National Institute on Drug Abuse). 2002 Monitoring the Future Survey: <http://www.drugabuse.gov> .

O'Brien ET, Yeoman WB, Hobby JA (1971). Hepatorenal damage from toluene in a 'glue sniffer'. *BMJ* 2: 29–30.

Otsuka, M. Gamma-aminobutyric acid and some other transmitter candidates in the nervous system. In, *Pharmacology and the Feture of Man:Proceedings of the Fifth International Congresso n Pharmacology*, Vol. 4. (Acheson, G.H., and Bloom, F.E., Eds.) S. Karger, Basel, 1973, PP 186-201.

Páez- Martínez N, López-Rubalcava C, Cruz LS. Avances de la investigación básica de los efetos in vivo de los disolventes de abuso. *Salud mental*. Vol. 26 No. 6, 2003.

Páez- Martínez N, López-Rubalcava C, Cruz LS. Avances recientes en la investigación de los mecanismos celulares de acción de abuso. *Salud mental*. Vol. 26 No. 5, 2003.

Pearson MA, Hoyme HE, Seaver LH, Rimsza ME: Toluene embryopathy: delineation of the pheanotype and comparison with fetal alcohol syndrome. *Pediatrics*, 93: 211-5, 1994.

Piazza M, dorimitzer CM, Bejarano J, Sanchez M, Lescano G, Anthony JC: Cinical and social features of recent inhalant user among adolescents in the PACARDO region of the Americans. *Drug Alcohol Depen* ( en prensa)

Ramamjaneyulu R and Ticku MH (1984) Interactions of pentamethylenetetrazol and tetrazole analogues with the picrotoxinin site of the benzodiazepine-GABA receptor- ionophore complex. *Eur J Pharmacol* 98:337–345.

Rea TM, Nash JF, Zabik JE, Born GS, Kessler WV. Effects of toluene inhalation on brain biogenic amines in the rat. *Toxicology*. 31: 143-150,1984

Rehavi M, Skolnick P and Paul SM (1982) Effects of tetrazole derivatives on [3H]diazepam binding in vitro: correlation with convulsant potency. *Eur J Pharmacol* 78:353–356.

Rees DC, Knisely JS, Breen TJ, Balster RL. Toluene, halothane, 1,1,1-trichloroethane and oxazepam produce ethanol-like discriminative stimulus effect in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1987;243:931\_ 7.

Rees DC, Wood RW, Laties VG: evidence of tolerance following repeated exposure to toluene in the rat. *Pharmacol Biochem Behav*, 32: 283-91, 1989.

Riegel AC, Ali SF, French ED (2003). Toluene-induced locomotor activity is blocked by 6-hydroxydopamine lesions of the nucleus accumbens and the mGluR2/3 agonist LY379268. *Neuropsychopharmacology* 28: 1440–1447.

Riegel AC; French ED. An electrophysiological analysis of rat ventral tegmental dopamine neuronal activity during acute toluene exposure. *Pharmacol Toxicol*, 85: 37-43, 1999.

Rosenberg, H., Orkin, F.K., Springstead, J., 1979. Abuse of nitrous oxide. *Anesth. Analg.* 58, 104-106.

Rosenberg NL, Kleinschmidt-DeMasters BK, Davis KA, Dreisbach JN, Hormes JT, Filley CM (1988a). Toluene abuse causes diffuse central nervous system white matter changes. *Ann Neurol* 23: 611–614.

Saracibar G, Hernandez ML, Echevarria E, Barbero I, Gutierrez A, Casis O (2001). Toluene alters mu-opioid receptor expression in the rat brainstem. *Ind Health* 39: 231–234.

Shi, C. L . Chen, H. H, Chiu,T.H. Acute exposure to trichloroethylene differentially alters the susceptibility to chemoconvulsants in mice, *Toxicology* 162 (2001) 35–42.

Silva-Filho AR, Nogueira ML, Shiotsuki N: Anticonvulsant and convulsant effects of organic solvents. *Pharmacol Biochem Behav*, 41: 79-82, 1991.

Silva-Filho, A.R., Pires, M.L.N, Shiotsuki,N. Anticonvulsant and convulsant effects of organic solvents, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 41 (1992) 79–82.

Squires RF, Saederup E, Crawley JN, Skolnick P and Paul SM (1984) Convulsant potencies of tetrazoles are highly correlated with action on GABA/benzodiazepine/ picrotoxin receptor complex in brain. *Life Sci* 35:1439–1444.

Spencer PS, Schaumburg HH (1985). Organic solvent neurotoxicity. Facts and research needs. *Scand J Work Environ Health* 11 (Suppl 1): 53–60.

Stengard K, Hoglund G, Ungerstedt U, Extracellular dopamine levels within the stratum increase during inhalation exposure to toluene. A microdialysis study in awake freely moving rats. *Toxicol lett*, 71:245 -255, 1994.

Streicher HZ, Gabow PA, Moss AH, Kono D, Kaehny WD (1981). Syndromes of toluene sniffing in adults. *Ann Intern Med* 94: 758–762.



Suzdak PD, Schawartz RD, Skolnick P, Paul SM: Ethanol stimulates gamma-aminobutyric acid receptor mediated chloride transport in rat brain synaptoneurosome. *Proc Natl Acad Sci USA*; 83: 4071-4075, 1986.

Thiesen, F.V., Noto, A.R., and Barros, H.M.T. 2007, *Clin. Toxicol.*, 45, 557.

Ticku MK, Lowmore P, Lehoullier P: Ethanol enhances GABA-induced  $^{36}\text{Cl}$ -influx in primary spinal cord cultured neurons. *Brain Res Bull*, 17: 123-126, 2002.

Tillar R, Shafer TJ, Woodward JJ: Toluene inhibits voltage-sensitive calcium channels expressed in pheochromocytoma cells. *Neurochem Int*, 41: 391-397, 2002.

Tsuga H, Honma T (2000). Effects of short-term toluene exposure on ligand binding to muscarinic acetylcholine receptors in the rat frontal cortex and hippocampus. *Neurotoxicol Teratol* 22: 603–606.

Tsuga H, Wang RS, Honma T (1999). Effects of toluene on regulation of adenylyl cyclase by stimulation of G-protein-coupled receptors expressed in CHO cells. *Jpn J Pharmacol* 81: 305–308.

Villatoro J, Medina-Mora ME, Fleiz C, Bermudez P, Castro P, Juarez F: ¿ Ha cambiado el consumo de drogas en los estudiantes? Resultados de la encuesta de los estudiantes. *Salud Mental*, 25: 43-54, 2001.

Vidrio H, Magos GA, Lorenza- Jimenez M: Electrocardiographic effects of toluene in the anesthetized rat. *Ach Int Pharmacodyn*, 279:121-129, 1986.

von Euler G, Fuxe K, Hansson T, Ogren SO, Agnati LF, Eneroth P et al. (1988). Effects of chronic toluene exposure on central monoamine and peptide receptors and their interactions in the adult male rat. *Toxicology* 52: 103–126.

Wang X, Wang G, Lemos JR, Treistman SN: ethanol directly modulates gating of a dihydropyridine-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  channel in neurohypophyseal terminals. *J Neurosci*, 14: 5453- 5460, 1994.

Westerink RH, Vijverberg HP (2002). Toluene-induced,  $\text{Ca}^{2+}$ - dependent vesicular catecholamine release in rat PC12 cells. *Neurosci Lett* 326: 81–84.

Weiner JL, Zhang L, Carlen PL: Potentiation of GABA<sub>A</sub> mediated synaptic current by ethanol in hippocampal CA1 neurons: possible role of protein kinase C. *J Pharmacol Exp Ther*, 268: 1388-1395, 1994.

Wiley, J.L . Bale, A. S . Balster, R.L Evaluation of toluene dependence and cross-sensitization to diazepam, *Life Sci*. 72 (2003) 3023–3033.

Wilkins- Haug L: Teratogen update: Toluene. *Teratology*, 55: 145-51, 1997.

Williams JM, Stafford D, Steketee JD (2005). Effects of repeated inhalation of toluene on ionotropic GABA A and glutamate receptor subunit levels in rat brain. *Neurochem Int* 46: 1–10.

Woodward JJ: Overview of the effects of alcohol on the cerebral nervous system. *Neurochem Int*, 35:93-94, 1999.

Wood RW, Coleman JB, Schuler R, Cox C, Anticonvulsant and antipunishment effects of toluene, *J pharmacol, Exp Ther*, 230: 407-12, 1984.

Woolverton WL, Balaster RL: Behavioral and lethal affects of combinations of oral ethanol and inhaled 1,1,1- trichloroethane in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, 59: 1-7, 1981.

Yu D, Zhang L, Eisele JL, Bertrand D, Changueux JP, Weight FF: Ethanol inhibition of nicotinic acetylcholine tipe alpha 7 receptors involves the amino-terminal domain of the receptor. *Mol Pharmacol*, 50:1010-1016, 1996.

Zacny, J.P., Sparacino, G., Hoffmann, P.M., Martin, R., Lichtor, J.L., 1994b. The subjective, behavioral and cognitive effects of subanesthetic concentrations of isoflurane and nitrous oxide in healthy volunteers. *Psychopharmacology* 114, 409-416.

Zimmerman SW, Groehler K, Beirne GJ (1975). Hydrocarbon exposure and chronic glomerulonephritis. *Lancet* 2: 199–201.