



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

EFECTO DE LA COMBINACIÓN DE TOLUENO Y
DIAZEPAM SOBRE LAS CONVULSIONES INDUCIDAS
POR PENTILENTETRAZOL

Tesis que presenta

p.Q.F.B. Ixchel Ruiz Pérez

Para obtener el grado de

Licenciada en Químico Farmacobiología

Directora de Tesis

D.C Marcia Ivette Gauthereau Torres

Morelia, Michoacán., Abril de 2011.

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.

DEDICATORIA

A mis Padres

Leticia Pérez Medina y Martín Ruiz Montelongo, esta tesis está dedicada a ustedes con todo mi cariño, admiración y agradecimiento por ser un excelente ejemplo a seguir, por estar junto a mi con todo su apoyo y comprensión en cada una de las etapas de mi vida. Los quiero mucho.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora D. C. Marcia Yvette Gauthereau Torres. Porque sin todo su apoyo y paciencia este trabajo no hubiera sido posible. Le estoy muy agradecida por compartir conmigo una parte de sus conocimientos y despertar en mi el interés por la ciencia. Gracias por brindarme tantas oportunidades y sobre todo por crear un ambiente de amistad, confianza y respeto tanto dentro como fuera del laboratorio.

A mis sinodales:

Q.F.B Armida Sánchez Gallegos

D.C. Rosalío Mercado Camargo

D.C. Daniel Godínez Hernández

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

En especial le agradezco a usted Doctor Daniel por haber sido mi asesor alguna vez y al igual que la Doctora Marcia apoyarme y brindarme su amistad.

A mi hermana Xocho y a mi cuñado César porque siempre me han dado muy buenos consejos y mucho apoyo en todos los aspectos de mi vida e innumerables momentos divertidos junto con mis sobrinitas Sofi y Mati, de corazón muchas gracias, los quiero mucho.

A mi hermano Ulises, porque cada día aprendo algo nuevo de ti..... sobre todo a tener paciencia y aunque casi nunca lo logro sabes que te quiero.

A mis amigos de la facultad Fax, Gaby, Maye, Luis (Ratón), Chucho. Por darme su amistad y apoyo incondicionalmente. Por hacerme pasar momentos divertidísimos llenos risas y ocurrencias en todo momento. Gracias, porque definitivamente Farma no hubiera sido lo mismo sin ustedes, los quiero muchísimo.

A mis amigos del laboratorio Ana, Kari, Leslie, Ratón, Angel, Gabriel y sé que puedo incluir a la Doctora Marcya y al Doctor Fernando, gracias porque con ustedes hasta los días de trabajo y los de exposición de artículos son muy divertidos.

Pero en especial me gustaría agradecerles a dos personas:

Fax, mennis un millón de gracias por todo tu apoyo y tu cariño. Por estar conmigo cuando más te he necesitado sin importar la hora o el lugar. Por escucharme llorar, por hacerme reír. Porque siempre tienes un abrazo y las palabras exactas para hacerme sentir bien. Sabes que eres mi mejor amiga y todo lo que significas para mí.

Ratón, otro millón de gracias, por ser mi mejor amigo y mi novio. Gracias por estar conmigo dándome paz y mucho amor, por apoyarme y comprenderme día con día. Gracias por estar junto a mí incondicionalmente, por hacer de lo nuestro algo increíblemente especial, gracias por todo el respeto, la confianza, el cariño, los abrazos, las risas y todos los momentos que hemos pasado juntos, por regalarme una de las mejores historias de mi vida, por todo eso y mucho más... Te amo.

ÍNDICE GENERAL

Índice general.....	i
Índice de figuras.....	iii
Índice de tablas.....	v
Lista de abreviaturas.....	Vi
Resumen.....	vii
I. Introducción.....	1
1. Inhalables.....	1
1.1 Deficnición.....	1
1.2 Clasificación.....	1
2. Generalidades.....	3
2.1 Tolueno.....	5
2.1.1 Propiedades Fisicoquímicas.....	5
2.1.2 Usos.....	6
2.1.3 Farmacocinética.....	6
2.1.4 Mecanismo de acción.....	7
2.2 Efectos de los disolventes de abuso sobre el SNC.....	10
2.2.1 Efectos conductuales agudos.....	10
2.2.2 Efectos conductuales crónicos.....	13
2.2.3 Efecto anticonvulsivante.....	15
3. Receptor GABA.....	16
3.1 Receptor GABA _A y convulsiones.....	18
3.2 Agente convulsivante.....	20
3.2.1 Pentilentetrazol (PTZ).....	20
3.2.1.1 Mecanismo de acción.....	20
3.2.1.2 Convulsiones inducidas por PTZ.....	21
3.3 Agente anticonvulsivante.....	22
3.3.1 Diacepam (DZP).....	22
II. Justificación.....	25
III. Hipótesis.....	26
IV. Objetivo.....	27
1. Objetivo general.....	27
2. Objetivos específicos.....	27
V. Materiales y métodos.....	28

1. Animales.....	28
2. Sustancias.....	28
3. Exposición al disolvente.....	29
4. Protocolos experimentales.....	32
4.1 Protocolo 1. Grupo control. Administración de PTZ.....	32
4.2 Protocolo 2. Administración del DZP y del PTZ.....	32
4.3 Protocolo 3. Exposición al tolueno y administración del PTZ.....	33
4.4 Protocolo 4. Exposición al tolueno y administración del DZP y PTZ.....	33
VI. Variables evaluadas.....	34
VII. Análisis de datos.....	34
VIII. Resultados.....	35
1. Efecto de la exposición a tolueno (1000 ó 2000 ppm) y de la administración de DZP sobre las convulsiones inducidas por PTZ...	35
2. Efecto de la exposición a tolueno (1000 ó 2000 ppm) y de la administración de DZP sobre la latencia de presentación de MC....	38
3. Efecto de la exposición a tolueno (1000 ó 2000 ppm) y de la administración de DZP sobre el número de MC.....	40
4. Efecto de la exposición a tolueno (1000 ó 2000 ppm) y de la administración de DZP sobre la latencia de presentación de CC.....	42
5. Efecto de la exposición a tolueno (1000 ó 2000 ppm) y de la administración de DZP sobre el número de CC.....	44
6. Efecto de la exposición a tolueno (1000 ó 2000 ppm) y de la administración de DZP sobre la latencia de presentación de CCT...	46
IX. DISCUSIÓN.....	48
X. CONCLUSIÓN.....	60
XI. REFERENCIAS.....	61

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Estructura química del tolueno.....	5
2. Modelo estructural del receptor GABA _A	17
3. Transmisión sináptica incrementada del receptor GABA _A	19
4. Estructura química del DZP.....	22
5. Cámara de exposición estática.....	30
6. Efecto del tolueno (2000 ppm) y/o DZP sobre el porcentaje de ratas que presentaron CCT inducidas por PTZ.....	37
7. Efecto del tolueno (1000 ppm) y/o DZP sobre el porcentaje de ratas que presentaron CCT inducidas por PTZ.....	37
8. Efecto del tolueno (2000 ppm) y/o DZP sobre la latencia de aparición de MC inducidas por PTZ.....	39
9. Efecto del tolueno (1000 ppm) y/o DZP sobre la latencia de aparición de MC inducidas por PTZ.....	39
10.Efecto del tolueno (2000 ppm) y/o DZP sobre el número de MC inducidas por PTZ.....	41
11.Efecto del tolueno (1000 ppm) y/o DZP sobre el número de MC inducidas por PTZ.....	41
12.Efecto del tolueno (2000 ppm) y/o DZP sobre la latencia de aparición de CC inducidas por PTZ.....	43
13.Efecto del tolueno (1000 ppm) y/o DZP sobre la latencia de aparición de CC inducidas por PTZ.....	43
14.Efecto del tolueno (2000 ppm) y/o DZO sobre el número de CC inducidas por PTZ.....	45
15.Efecto del tolueno (1000 ppm) y/o DZO sobre el número de CC	

inducidas por PTZ.....	45
16.Efecto del tolueno (2000 ppm) y/o DZP sobre la latencia de aparición de CCT inducidas por PTZ.....	47
17.Efecto del tolueno (1000 ppm) y/o DZP sobre la latencia de aparición de CCT inducidas por PTZ.....	47

ÍNDICE DE TABLAS

1. Clasificación de los disolventes de acuerdo a su estructura química.....	3
2. Propiedades químicas del tolueno.....	5
3. Información general del DZP.....	24

LISTA DE ABREVIATURAS

BZD	Benzodiacepina
CC	Convulsión clónica
CCT	Convulsión clónica tónica
Cl ⁻	Ion cloruro
CO ₂	Dióxido de carbono
DE ₇₀	Dosis efectiva 70
DE ₉₈	Dosis efectiva 98
DL _{min}	Dosis letal mínima
DL ₁₀₀	Dosis letal 100
DZP	Diazepam
g	gramo
GABA	Ácido γ -amino butírico
h	Hora
i.p.	Intraperitoneal
MC	Mioclonia
mg/kg	Miligramo por kilogramo
min	Minuto
ml/g	Mililitro por gramo
NMDA	N-metil D-aspartato
ppm	Partes por millón
PTX	Picrotoxina
PTZ	Pentilentetrazol
SNC	Sistema nervioso central
5-HT ₃	Receptor serotoninérgico tipo 3

RESUMEN

El término convulsión se refiere a un trastorno de la conducta, causado por la activación desordenada, sincrónica y rítmica de poblaciones enteras de neuronas cerebrales. Los neurotransmisores que median dicha transmisión en el cerebro de mamíferos son los aminoácidos: GABA y glutamato, inhibidor y excitador, respectivamente. Se ha demostrado que el tolueno, un disolvente de abuso con efecto depresor del sistema nervioso central (SNC), potencia la actividad del receptor GABA_A, *in vitro*. Por lo anterior, es lógico postular que podría tener una acción anticonvulsivante. Asimismo, las benzodiazepinas, como el diazepam (DZP), poseen un efecto anticonvulsivo como resultado de su capacidad para intensificar los incrementos en la conducción de Cl⁻ inducidos por GABA. Por otra parte, el pentilentetrazol (PTZ) es un convulsivante químico que actúa como un antagonista del receptor GABA_A e inhibe la conductancia a Cl⁻ inducida por GABA. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de la coadministración del tolueno y DZP sobre las convulsiones inducidas por PTZ. Se emplearon ratas Wistar macho, las cuales fueron clasificadas en 4 grupos. En el primer grupo (control), se administró el agente convulsivante (PTZ) i.p. (50 mg/kg) e inmediatamente después se colocó a la rata de manera individual en una cámara de exposición estática exponiéndola solo a aire y evaluando la presentación de mioclonias (MC), convulsiones clónicas (CC) y clónico-tónicas (CCT). El segundo grupo fue expuesto a tolueno (1000 ó 2000 ppm) durante 30 min, posteriormente se le administró el agente convulsivante y nuevamente fue expuesto a tolueno para evaluar la posible presentación de convulsiones. Al tercer grupo, se le administró DZP i.p. (0.3 mg/kg) y 30 min después se les administró el agente convulsivante. Finalmente, al cuarto grupo se le administró DZP y simultáneamente se expusieron los animales a tolueno (1000 ó 2000 ppm) durante 30 min, una vez transcurrido este tiempo, se les administró PTZ y se expusieron nuevamente a tolueno durante 30 min. Los parámetros que se registraron fueron el porcentaje de animales que presentaron CCT, así como el número de aparición de MC, CC y CCT al igual que sus latencias. De acuerdo a los resultados obtenidos la exposición a tolueno (1000 ó 2000 ppm) genera un efecto protector ante las convulsiones inducidas por PTZ. Por su parte, la administración de DZP mostró tener este mismo efecto protector, así como ser capaz de aumentar la latencia de aparición de MC, CC. Por otro lado, solo utilizando la concentración de 1000 ppm de tolueno es posible proponer que la coadministración de tolueno y DZP producen una potenciación del efecto anticonvulsivante y que dicho efecto parece estar mediado por una acción sobre los receptores GABA_A.

I. INTRODUCCIÓN

1. INHALABLES

1.1 DEFINICIÓN

Los inhalables se definen como aquellas sustancias volátiles a temperatura ambiente, que se inhalan para inducir un estado alterado de la conciencia (Marjot y Mcleo, 1989). Dentro de este grupo se encuentran sustancias muy distintas entre sí que solo comparten la vía de administración y el hecho de ser utilizadas como drogas de abuso (Páez-Martínez et al., 2003).

Es importante hacer notar que aquellas drogas que son inhaladas pero no son volátiles a temperatura ambiente (por ejemplo: cocaína, tabaco, marihuana, etc.) no son consideradas inhalables (Cruz y Scott Bowen, 2008).

1.2 CLASIFICACIÓN

Existen distintas maneras de clasificar a las sustancias que son sujetas de abuso vía inhalación. En ocasiones son clasificadas de acuerdo a su estructura química y en otras de acuerdo a su uso comercial (Balster, 1998). Por otro lado, se ha sugerido otra clasificación tomando en cuenta el perfil farmacológico y el efecto conductual ocasionado por dichos compuestos (Balster, 1998). De esta forma se dividen en:

- Alquil nitritos volátiles.
- Óxido nitroso
- Disolventes volátiles, combustibles y anestésicos.

ALQUIL NITRITOS VOLÁTILES

El prototipo de los alquil nitritos volátiles es el amil nitrito. Este compuesto ha sido usado para el tratamiento de la angina de pecho, aunque su uso ha sido reemplazado substancialmente por la nitroglicerina y otros nitritos orgánicos (Balster, 1998).

ÓXIDO NITROSO

El óxido nitroso es usado ampliamente como gas anestésico (Murray y Murray, 1980).

Dohrn y colaboradores (1992) encontraron que el óxido nitroso produce un perfil único de efectos, con algunas similitudes con aquellos producidos por las sustancias estimulantes, depresoras y alucinógenas.

DISOLVENTES VOLÁTILES, COMBUSTIBLES Y ANESTÉSICOS

Estas sustancias forman un gran grupo de inhalables de abuso. Los compuestos prototipo de esta clase incluyen al tolueno y al 1,1,1-tricloroetano (TCE), los cuales son ampliamente usados como disolventes (Sharp, 1992).

Los disolventes, a su vez, se clasifican en varios grupos de acuerdo a su estructura química (tabla 1) (Páez-Martínez et al., 2003):

TABLA 1 Clasificación de los disolventes de acuerdo a su estructura química

Grupo	Estructura química característica	Ejemplos
Hidrocarburos alifáticos	Cadenas lineales o ramificadas de carbono e hidrógeno	Hexano, heptano
Hidrocarburos aromáticos	Estructuras que contienen 6 átomos de carbono con un átomo de hidrógeno por carbono. Contiene 3 dobles ligaduras y varias formas resonantes.	Benceno, tolueno, xileno, etil-benceno, propil-benceno (alquilbencenos).
Hidrocarburos halogenados	Hidrocarburos con un átomo de algún halógeno que reemplaza uno o más átomos de hidrógeno.	1,1,1-tricloroetano (TCE), cloroformo, fluorotil.
Hidrocarburos cíclicos	Anillos de hidrocarburos saturados o insaturados	Ciclohexanos
Alcoholes	Estructuras que contiene un grupo hidroxilo (-OH)	Etanol, metanol
Éteres	Contienen una ligadura C-O-C	Dietil éter, isopropil éter
Ésteres	Estructuras que contienen un grupo carboxilo (-COOH) en el interior de una cadena de hidrocarburo	Etil acetato, isopropil acetato
Aldehídos	Son compuestos con un grupo carbonilo (-CO) al final de una cadena de hidrocarburo	Formaldehído, acetaldehído
Cetonas	Contiene un grupo carbonilo entre la estructura del hidrocarburo	Acetona, meti- etil-cetona, ciclohexanona

Modificado de Ayres y Taylor, 1989.

2. GENERALIDADES

Los disolventes orgánicos, tal como el tolueno, forman parte de una gran lista de inhalables de abuso que se encuentran tanto en productos comerciales como industriales, los cuales incluyen pinturas, *thinner*, adhesivos, pegamentos, gasolina, agentes de limpieza, entre otros (Arlien-Soborg, 1992).

La inhalación del vapor del tolueno es la principal fuente de exposición humana a este disolvente, la cual puede ocurrir durante la producción, transporte y uso de gasolina o de tolueno o por inhalación voluntaria. El mayor riesgo de exposición accidental al tolueno tiende a

ocurrir entre los pintores, fabricantes de tintes y los trabajadores de la industria química y petroquímica. La exposición de los consumidores puede ocurrir a través del uso de los productos que contienen este disolvente como la gasolina, los cosméticos, los adhesivos, el esmalte para uñas, los quitamanchas, los tintes y el humo del cigarro (ATSDR, 2000).

Además de la exposición ocupacional (Indulki et al., 1992), el tolueno y otros disolventes relacionados son sujeto de abuso por vía de la inhalación (Balster, 1998). El abuso de estos disolventes forma parte de un serio problema social y médico de importancia mundial (Johnston et al., 2003), que se ha convertido particularmente en un problema entre adolescentes, especialmente en aquellos que viven en países menos desarrollados (Morton, 1987; Balster, 1997).

Según la Encuesta Nacional de Adicciones (ENA) de 2008, el consumo de drogas ilegales y médicas en la población rural y urbana entre 12 y 65 años de edad ha aumentado de un 5% observado en 2002 a un 5.7% en este periodo. Asimismo, se registró un aumento en el consumo de las drogas ilegales (mariguana, cocaína y sus derivados, heroína, metanfetaminas, alucinógenos, inhalables y otras drogas) de un 4.6 a 5.2% entre esos mismos periodos.

Aunque la ENA muestra que la marihuana ha ocupado los primeros lugares de preferencia entre la población y que la cocaína desplaza a los inhalables en la preferencia de uso, es importante señalar que el abuso de los inhalables ha ido en considerable crecimiento según los datos obtenidos a través de esta encuesta.

2.1 TOLUENO

2.1.1 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

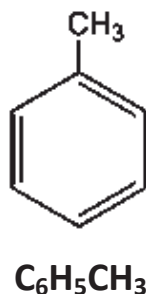


Figura 1. Estructura química del tolueno

El tolueno, también conocido como toluol, fenilmetano, metilbenceno, monometil benceno y metácido, a temperatura ambiente es un líquido de color ámbar claro de olor picante. Además, reacciona fuertemente con una gran cantidad de químicos, particularmente con aquellos que se componen de nitrógeno y con algunos plásticos (ATSDR, 2000; NTP, 2001). (Fig. 1, tabla 2).

Tabla 2. Propiedades químicas del tolueno.

Peso molecular	92.14g/mol
Densidad	0.867 g/mL
Presión de vapor	28.4 mmHg a 25°C
Solubilidad en agua	0.59 mg/mL a 25°C
Factor de conversión	1ppm = 3.77 mg/m ³ (25°C, 750 mmHg)

2.1.2 USOS

El tolueno es un hidrocarburo aromático parecido al benceno que es usado principalmente como componente de la gasolina (92%), la cual contiene de 5 a 7% de tolueno con respecto a su peso (ATSDR, 1989; Verschueren, 1977). Este disolvente es usado también en la producción de una gran número de químicos industriales (benceno, tolueno disociado, fenol, derivados bencílicos y benzoílicos, ácido benzoico, nitrotolueno, vinil tolueno y sacarina) y es un subproducto de la producción de estireno y en las operaciones de la quema de coque (combustible derivado del carbón). También, su demanda es cada vez mayor para la producción de pinturas, adhesivos, cosméticos, perfumes y anticongelantes (United States Environmental Protection Agency, 1994).

2.1.3 FARMACOCINÉTICA

El tolueno entra a nuestro cuerpo cuando inhalamos sus vapores, ingerimos alimentos o bebemos agua contaminada, cuando se trabaja con sustancias que lo contienen, o bien cuando se usan productos cosméticos que contienen este disolvente, ya que es capaz de atravesar la piel y llegar hasta el torrente sanguíneo. Cuando esto ocurre, el tolueno es llevado directamente hacia los pulmones y condiciones tales como la edad, el sexo, la composición corporal y el estado de salud intervienen en lo que ocurrirá una vez que el tolueno se encuentre en nuestro organismo (ATSDR, 2000).

Según algunos estudios, se sugiere que el tolueno tiende a acumularse más en el cerebro que en el hígado cuando la exposición es vía

inhalación, mientras que tras una exposición vía oral, el hígado contiene la mayor concentración de tolueno (ATSDR, 2000).

El hígado es el principal sitio donde se metaboliza el tolueno, lo cual ocurre mediante reacciones de hidroxilación y oxidación para reducirlo a ácido benzoico. La conjugación de la glicina con el ácido benzoico para formar ácido hipúrico constituye la principal ruta de desintoxicación y eliminación del tolueno (ATSDR, 2000).

Estudios tanto en animales como en humanos han demostrado que la mayoría del tolueno presente en el organismo es eliminado a través de la orina, principalmente como metabolitos (Löf et al., 1990, 1993; Turkall et al., 1991; Tardif et al., 1992, 1998). Una cantidad menor, pero significativa de tolueno inhalado es eliminada en el aire exhalado (Pellizzari et al., 1992; Monster et al., 1993). Turkall y colaboradores (1991) estimaron que aproximadamente el 22% de una dosis oral única de tolueno en ratas es eliminada al exhalar y que el resto se elimina principalmente a través de la orina. Kostrzewski y Piotrowski (1991) demostraron que la eliminación inicial del tolueno, una vez terminada la exposición es rápida, en cuestión de pocos minutos.

2.1.4 MECANISMO DE ACCIÓN

A pesar de su significativa incidencia de abuso, el mecanismo de acción de los inhalables no se conoce del todo. Los efectos depresores del sistema nervioso central (SNC) producidos por el etanol, agentes anestésicos volátiles y los inhalables, sugieren la posibilidad de que estos

compuestos tengan un mecanismo de acción similar. Trabajos previos han encontrado que canales iónicos activados por neurotransmisores pueden ser sitios primarios de acción de los alcoholes y los agentes anestésicos volátiles (Beckstead et al., 2000).

Se sabe que el tolueno actúa sobre diferentes objetivos moleculares con diferente afinidad y eficacia. El tolueno, al igual que el etanol, es un depresor del SNC debido a su capacidad de bloquear el principal sistema glutamatérgico excitatorio, al actuar como un antagonista no competitivo del receptor NMDA (N-metil D-aspartato). Basado en su estructura molecular, se han identificado muchos subtipos del receptor NMDA, entre los cuales, aquellos canales formados por las subunidades NR1 y NR2B son las más sensibles a los efectos inhibitorios del tolueno (Cruz et al., 2000). El efecto inhibitorio sobre el receptor NMDA también ha sido reportado para otros disolventes, incluyendo al benceno, al xileno, al TCE, al etilbenceno y al propilbenceno (Cruz et al., 2000).

Otro efecto relevante del tolueno, el tricloroetileno y el TCE es que aumentan la función de dos receptores inhibitorios ligados a un canal iónico: GABA_A y glicina (Beckstead et al., 2000). En 2000, Beckstead y cols. demostraron que el tolueno, el TCE y el tricloroetileno aumentan significativa y reversiblemente la corriente iónica a través del receptor para el ácido γ -amino butírico (GABA_A) expresado en ovocitos de *Xenopus laevis*. Por su parte, Lopreato y cols. (2003) reportaron que el tolueno, el TCE y el tricloroetileno incrementan la corriente iónica activada por la serotonina a través del receptor 5-HT₃. Otros receptores inhibidos por el tolueno son el receptor nicotínico $\alpha_4\beta_2$ y aquellos formados por las

subunidades α_7 , este efecto fue visto también con el percloroetileno (Bale et al., 2002, 2005).

La acción de los disolventes de abuso sobre los canales iónicos dependientes de voltaje también han sido materia de investigación. De acuerdo con Tillar y cols. (2002), el tolueno inhibe los canales de calcio sensibles al voltaje expresados en células de feocromocitoma de un modo reversible y dependiente de la dosis. Estos efectos ocurren a concentraciones micromoleculares que no comprometen la integridad de la membrana celular y que son relevantes al abuso de disolventes. Se ha reportado también, que el tolueno inhibe los canales cardiacos de sodio ($Na_v 1.5$) con un CI_{50} de aproximadamente 300 μg en ovocitos de *Xenopus* (Cruz et al., 2003) y que estos efectos podrían ser responsables en parte, por la acción arritmogénica del tolueno (Bass, 1970; Taylor y Harris, 1970; Shepherd, 1989; Wilcosky y Simonsen, 1991; Einav et al., 1997).

Además el tolueno puede excitar directamente a las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral, según se ha observado en registros de rebanadas de cerebro (Riegel et al., 2007); también puede estimular células no dopaminérgicas *in vitro* (Riegel et al., 2007), pero no *in vivo* (Riegel y French, 1999), sugiriendo que podría estar involucrado un efecto depresor adicional al aumento de la inhibición gabaérgica (Riegel et al., 2004, 2007).

2.2 EFECTO DE LOS DISOLVENTES DE ABUSO SOBRE EL SNC

Los compuestos orgánicos volátiles, tal como el tolueno, comparten diversos efectos con los depresores de SNC, como lo son el etanol, los barbitúricos, las benzodiacepinas (BZD) y los anestésicos volátiles (Evans y Balster, 1991). Se sabe que los efectos conductuales producidos por estas sustancias y otros disolventes de abuso son similares a aquellos producidos por los depresores del SNC. Éstos incluyen deterioro psicomotor (Moser y Balster, 1986), excitación seguida de una inhibición de la actividad locomotora (Bushnell et al., 1985; Warren et al., 2000) y pérdida de los reflejos y sedación (Tegeris y Balster, 1994). Además de esto, los disolventes poseen efectos anticonvulsivantes y ansiolíticos (Echeverria et al., 1991; Wood et al., 1984) y poseen propiedades estímulo discriminativas en ratas, al igual que el etanol (Rees et al., 1987). Finalmente, el tolueno y otros disolventes producen efectos dependientes de la concentración sobre las medidas de la actividad cognitiva tanto en animales (Bushnell et al., 1994) como en el hombre (Echeverria et al., 1991).

2.2.1 EFECTOS CONDUCTUALES AGUDOS

EVALUACIÓN DE PROPIEDADES ESTÍMULO-DISCRIMINATIVAS

En estos experimentos se entrenan a los animales a lo largo de varias sesiones para que discriminen entre los efectos de la administración de un fármaco y la de un vehículo. Después de recibir el fármaco de referencia (por ejemplo, una BZD), el animal aprende a presionar una palanca para obtener comida, mientras que después de la

administración del vehículo la obtiene sólo cuando presiona la otra palanca. Tras varias sesiones de entrenamiento, los animales aprenden a distinguir entre el estímulo que les produce el fármaco y el que perciben con el vehículo. En ese momento se prueba la sustancia en estudio con el fin de determinar si los animales perciben sus efectos como similares o diferentes a los del fármaco en entrenamiento. Si el de prueba produce un estímulo similar al de entrenamiento, se dice que lo sustituye y se asume que sus efectos son similares (Iversen e Iversen, 1981).

PROPIEDADES DE REFORZAMIENTO

Cuando un sujeto realiza una conducta que tiene como resultado un efecto placentero o “recompensa”, la conducta se refuerza; es decir, aumenta la probabilidad de que se repita (Nestler et al., 2001).

Existen varios modelos experimentales para analizar el efecto reforzador de los fármacos: a) la autoadministración; b) la preferencia espacial condicionada; y c) la autoadministración intracerebral.

En el modelo de la autoadministración, se le coloca al animal un catéter intranasal dentro de una cámara con dos palancas y ahí se le enseña a asociar la administración de vapores de disolventes con la acción de presionar una palanca en particular (Yanagita et al., 1970).

El modelo de preferencia espacial condicionada consiste en utilizar una cámara con dos compartimentos claramente distinguibles entre sí (cada uno con diferentes estímulos visuales y táctiles), donde se condiciona al animal para que asocie un compartimento con la

administración de la droga de abuso y el otro con la administración del vehículo (Stoleman, 1992).

El modelo de estimulación intracraneal consiste en implantar un electrodo en un área cerebral relacionada con el llamado “circuito de recompensa” (sistema mesolímbico-dopaminérgico). Los animales implantados se entrenan para asociar la acción de apretar una palanca con la obtención de un estímulo eléctrico intracraneal. Este estímulo activa el circuito de recompensa, lo que se asocia con un efecto placentero.

EFFECTOS SOBRE LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA ESPONTÁNEA

Se sabe que en concentraciones bajas el tolueno y el TCE aumentan la conducta ambulatoria, mientras que en concentraciones altas la disminuyen. Este patrón bifásico sobre la conducta ambulatoria se ha descrito también para otros depresores del SNC, como el etanol, las benzodiacepinas y los barbitúricos (Evans y Balster, 1991).

EFFECTOS ANSIOLÍTICOS

Existen reportes que demuestran que los disolventes de abuso producen efectos ansiolíticos en diferentes modelos conductuales. En el modelo Geller-Seifter – que consiste en inhibir una conducta previamente aprendida (como apretar una palanca para obtener una recompensa) mediante la aplicación de un estímulo aversivo (por ejemplo: un choque eléctrico) –, los ansiolíticos benzodiacepínicos restauran la conducta e incrementan el número de choques que recibe el animal. Lo mismo sucede con el tolueno (Geller et al., 1983; Páez-Martínez y Silvia Fihlo et al., 1991).

EFFECTOS SOBRE NOCICEPCIÓN

Se han empleado dos modelos experimentales para el estudio de estos efectos. En el primer caso se coloca una pinza en el último tercio de la cola del ratón y se registra el tiempo en el que éste reacciona tratando de liberarse de la presión, ya sea mordiendo la pinza o con un latigazo de la cola. En este modelo de mecano-nocicepción, el tolueno tuvo un efecto pronociceptivo, mientras que el TCE fue inactivo.

Por su parte, el modelo de la plancha caliente consiste en colocar a un ratón en una superficie que se calienta a 53 ± 0.5 °C y luego se registra la latencia de presentación de una respuesta característica; en este caso, lamarse las patas. Un incremento en la latencia de la respuesta se considera como un efecto antinociceptivo, mientras que una disminución se considera como un efecto pronociceptivo. Los resultados indicaron que el tolueno, el TCE, el ciclohexano y el etilbenceno poseen efectos pronociceptivos, mientras que el hexano, el benceno ni el propilbenceno carecieron de efecto (Cruz et al., 2001).

2.2.2 EFECTOS CONDUCTUALES CRÓNICOS

TOLERANCIA

Se define como tolerancia a la disminución del efecto de un fármaco después de administraciones repetidas o a la necesidad de usar dosis cada vez mayores para poder obtener el efecto inicial (Goudi y Emmett-Oglesby, 1989).

Tras emplear el modelo conductual de campo abierto, Himnan (1984) reportó el desarrollo de tolerancia a los efectos del tolueno en dos conductas específicas: la ataxia y el número de *rearings* (conductas exploratorias dirigidas al aire). La exposición aguda a tolueno (2 500- 15 000 ppm/15min) disminuyó el número de *rearings* y aumentó la ataxia. Sin embargo, en animales expuestos repetidamente a este disolvente no se observaron dichos efectos.

SENSIBILIZACIÓN

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-Oglesby, 1989).

Existen diversos estudios que reportan una sensibilización a los efectos producidos por el tolueno. Por ejemplo, Arito y cols. (1985) administraron tolueno por vía intraperitoneal (i.p) aguda y con una frecuencia crónica, y observaron diferentes conductas como la actividad locomotora y la ingesta de líquidos. En todos los casos se observó que la administración crónica del tolueno producía efectos mayores a la administración aguda.

DEPENDENCIA

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.

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 trabajo, se expuso a ratones a concentraciones de 500 a 4 000 ppm de TCE 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 (Páez-Martínez et al., 2003).

Es importante señalar que se encontró 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 cols. (2003) reportaron que la administración repetida de tolueno (250 ppm/4 días) produce también este síndrome de abstinencia.

2.2.3 EFECTO ANTICONVULSIVANTE

Con base en la similitud del perfil farmacológico 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 del receptor GABA_A, que produce convulsiones clónico-tónicas a los pocos segundos de su administración. En estos 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, incrementan la latencia de presentación de convulsiones y protege contra los efectos letales del PTZ (Wood et al., 1984).

3. RECEPTOR GABA

Los receptores GABA y glicina constituyen el mayor sistema de neurotransmisores inhibitorios en el cerebro y en columna vertebral, respectivamente, formando una superfamilia de receptores multiméricos que poseen diversos grados de homología en sus secuencias de aminoácidos (Ortells y Lunt, 1995).

Los receptores GABA han sido clasificados en tres subtipos basándose, respectivamente, en sus propiedades farmacológicas:

- GABA_A: receptor/canal que es inhibido por la bicuculina (Curtis et al., 1970).
- GABA_B: receptor sensible al antagonista baclofeno (Hill y Bowery, 1981).
- GABA_C: receptor/canal sensible tanto a la bicuculina como al baclofeno (Johnston, 1994; Bormann y Feigenspan, 1995).

Tanto el receptor GABA_A como el GABA_C forman canales de cloruro activados por ligandos, mientras que el GABA_B pertenece a la familia de los receptores acoplados a proteínas G, además de estar acoplado a los canales de K⁺ y Na⁺ (Davies et al., 1997; Cutting et la., 1991).

El receptor GABA_A puede estar compuesto de diferentes subunidades (α , β , γ , ϵ , y π), que se coensamblan para formar una estructura heteromérica (DeLorey y Olsen, 1992). Se piensa que la mayoría de los receptores nativos GABA_A contienen las subunidades α , β , γ (McKernan y Whiting, 1996).

El receptor GABA_A está ligado a un canal de cloruro (Cl⁻) y media la transmisión sináptica inhibitoria rápida en el SNC de los mamíferos

(Barnard et al., 1998). Cuando es activado, el canal de Cl^- del receptor se abre y se produce una entrada de Cl^- al interior de la célula y la neurona se hiperpolariza. Dicho receptor posee una gran variedad de sitios de unión alostéricos, a través de los cuales diferentes fármacos pueden modular la corriente de Cl^- mediada por GABA. Las benzodiacepinas y los barbitúricos son conocidos por potenciar dicha corriente de manera alostérica (Hevers y Iuddens, 1998). Por el contrario, fármacos convulsivantes, como la picrotoxina (PTX), el TBPS y muchos insecticidas son conocidos por deprimir la corriente mediada por GABA (Bloomquist, 1996) (Fig. 2).

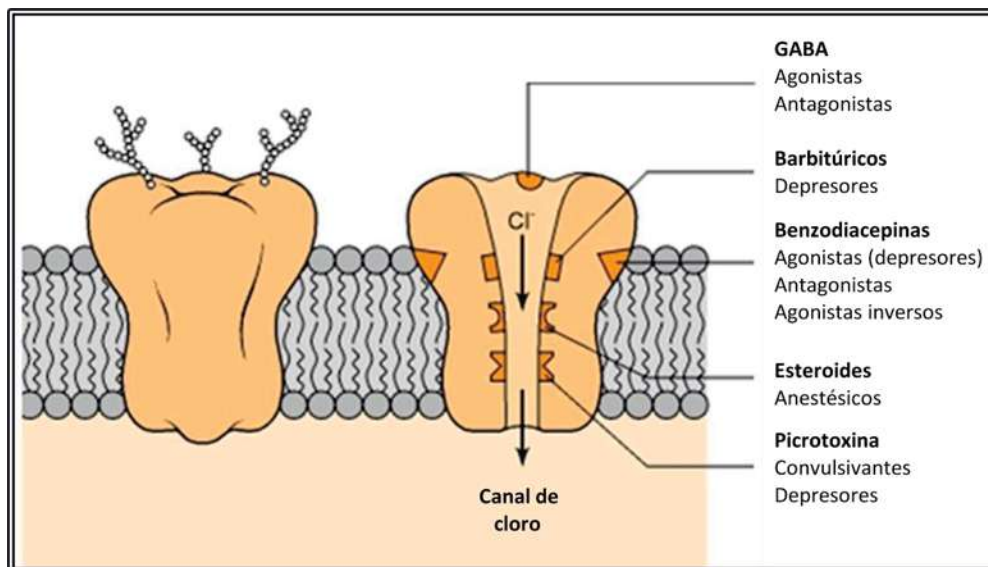


Figura 2. Modelo estructural del receptor GABA_A. En la figura se muestran los sitios de unión para algunas sustancias como benzodiacepinas, barbitúricos y anestésicos (Siegel et al., 1999).

3.1 RECEPTOR GABA_A Y CONVULSIONES

El término convulsión se refiere a un trastorno transitorio del comportamiento, causado por la activación desordenada, sincrónica y rítmica de poblaciones enteras de neuronas cerebrales.

Se considera que las convulsiones se originan en la corteza cerebral, y no en otras estructuras del SNC, como tálamo, tallo encefálico o cerebelo. La función primordial de la sinapsis para mediar la comunicación entre las neuronas en el encéfalo de 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 excitatoria desencadenaran una crisis convulsiva; estudios farmacológicos acerca de las convulsiones dieron cierto apoyo a este concepto.

Los neurotransmisores que median de manera global la transmisión sináptica en el cerebro del mamífero son aminoácidos, teniendo al ácido γ aminobutírico (GABA) y al glutamato como principales neurotransmisores inhibitorios y excitatorios, respectivamente. Los estudios farmacológicos pusieron en claro que los antagonistas del receptor GABA_A o los agonistas de diferentes subtipos de receptores glutamatérgicos (N-metil-D-aspartato, ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico o ácido kaínico) desencadenan convulsiones en animales de experimentación *in vivo*. A la inversa, los agentes farmacológicos que estimulan la inhibición sináptica mediada por el GABA inhiben las convulsiones en diversos modelos. Los antagonistas del receptor glutamatérgico bloquean también las convulsiones en varios modelos,

entre ellas las evocadas por electrochoque y por convulsivantes químicos como pentilentetrazol (PTZ) (Charney, 2007).

La activación del receptor GABA_A conduce a la apertura de su canal iónico con un incremento en la conductancia a Cl^- , resultando en un potencial postsináptico inhibitorio. Diversos modelos experimentales de epilepsia o de incremento en la susceptibilidad a convulsiones han demostrado que la presentación de convulsiones parece estar asociada con una variación de los receptores GABA_A ya sea en función o en número (Löscher y Schwark, 1985; Olsen et al., 1985; Yu et al., 1986; Spreafico et al., 1993). A la inversa, la ocurrencia de la actividad convulsiva puede afectar al receptor GABA_A (Shin et al., 1985; Corda et al., 1990; Titulaer et al., 1994) (Fig. 3)

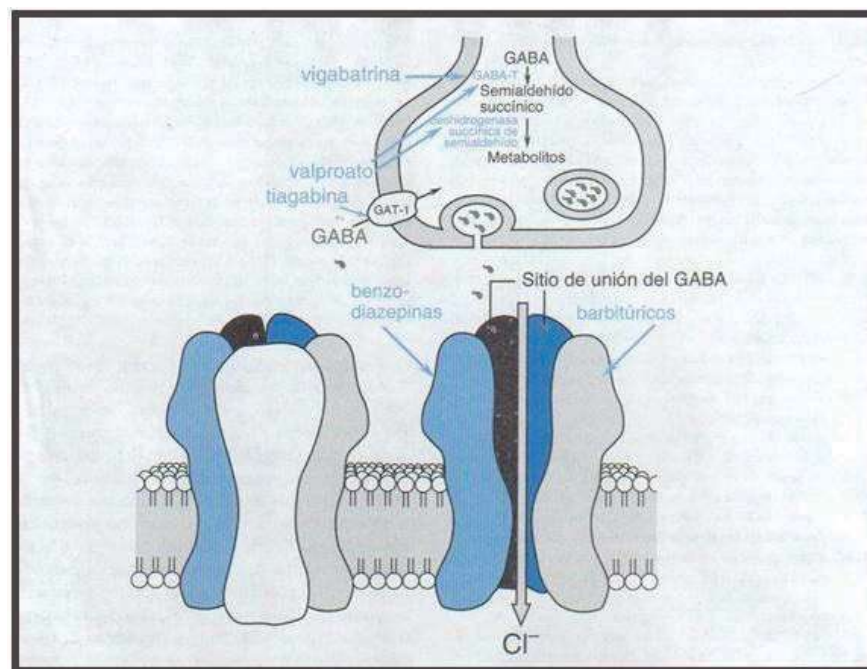


Figura 3. Transmisión sináptica incrementada del receptor GABA_A . En presencia del GABA, el receptor GABA_A (estructura del lado izquierdo) se abre, lo cual permite la entrada del Cl^- , que a su vez incrementa la polarización de la membrana, algunos

anticonvulsivos (cuyos nombres se indican con letra azul) actúan mediante la reducción del metabolismo del GABA

3.2 AGENTE CONVULSIVANTE

3.2.1 PENTILENTETRAZOL (PTZ)

El PTZ es un estimulante del SNC, que se usa desde hace muchos años en modelos experimentales de epilepsia (Everett y Richards, 1944; Orloff et al., 1949; Swinyard, 1949; Swinyard et al., 1952) debido a su efecto convulsivante en ratas y ratones (Yonekawa et al., 1980; Corda y Biggio, 1986).

3.2.1.1 MECANISMO DE ACCIÓN

El mecanismo por el cual el PTZ produce actividad convulsiva aun no se define completamente. Las convulsiones suscitadas por el PTZ parecen ser diferentes a aquellas ocasionadas por la estriknina, pero similares a aquellas producidas por la picrotoxina (Woodbury, 1980). Aunque se ha reportado que el PTZ actúa mediante diversos mecanismos (Woodbury, 1980), existe evidencia en la que se indica que podría actuar mediante la inhibición de la transmisión inhibitoria mediada por GABA. Por lo tanto se ha reportado que el PTZ:

- i. Inhibe las respuestas mediadas por GABA en cultivos de neuronas de mamíferos (MacDonald y Barker, 1977).
- ii. Reduce la duración del potencial inhibitorio postsináptico en rebanadas de corteza olfativa (Scholfield, 1980).

- iii. Bloquea las respuestas del GABA en el núcleo cuneiforme (Simmonds, 1978; 1982).
- iv. Bloquea la neurotransmisión (incluyendo al GABA) inducida por la conductancia a Cl^- (Pellmar y Wilson, 1977).

Se sabe que el PTZ inhibe los canales activados por GABA (Macdonald y Barker, 1978). Los estudios iniciales de unión de radioligando sugirieron que el sitio de acción del PTZ era el mismo sitio en el receptor GABA_A que para las benzodiazepinas (Rehavi et al., 1982). Estudios de unión subsecuentes, indican que el sitio de acción del PTZ es probablemente el sitio del receptor para la picrotoxina (Ramamjaneyulu y Ticku, 1984; Squires et al., 1984).

Además, las BZD, que actúan facilitando la transmisión GABAérgica, antagonizan las convulsiones inducidas por PTZ (Tallman et al., 1980). Por otro lado, se ha demostrado también, que el PTZ inhibe competitivamente la unión de las BZD (Muller et al., 1978; Marangos et al., 1979; Rehavi et al., 1982).

3.2.1.2 CONVULSIONES INDUCIDAS POR PTZ

Tras la administración del PTZ, el ratón experimenta una serie de signos convulsivos, dicha actividad es definida mediante un criterio similar al de Orloff y col., 1949, en la cual la secuencia de las convulsiones inducidas por PTZ, se dividen en 3 fases (Wayne D., et al, 1980):

- I. Mioclonias (MC): Se define como un espasmo repentino e involuntario de un músculo o grupo de ellos.

- II. Convulsión clónica (CC): Manifestada por espasmos clónicos y con frecuencia seguida por estupor o una postura inusual.
- III. Convulsión clónico-tónica (CCT): Esta es una extensión, usualmente letal, de las CC.

3.3 AGENTE ANTICONVULSIVANTE

3.3.1 DIAZEPAM

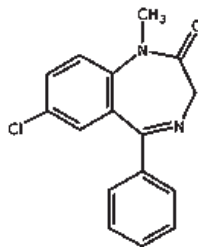


Figura 4. Estructura química del Diazepam

La observación de que las drogas sedantes-hipnóticas, las cuales están clasificadas conductualmente como depresoras del SNC, podían aumentar las propiedades inhibitorias del GABA, se estableció por primera vez en 1975, usando técnicas electrofisiológicas, tanto para BZD como para barbitúricos (Steven, 1995).

En la actualidad, se tiene claro que la mayoría de las acciones mediadas por las BZD, como son, su efecto ansiolítico, anticonvulsivante, relajante muscular y propiedades anestésicas-sedantes, son mediadas por los receptores benzodiazepínicos. Además, se ha demostrado que los receptores benzodiazepínicos, descubiertos en 1977, son en realidad los receptores GABA_A (Steven M. Paul, 1995).

Aunque las BZD y los barbitúricos se unen al receptor GABA_A para potenciar la respuesta mediada por GABA, lo hacen de diferente manera. Los barbitúricos presentan una acción dual al unirse al receptor GABA_A que media la conductancia del ion Cl^- (Steven M. Paul, 1995). A bajas concentraciones (subanestésicas), los barbitúricos aumentan la afinidad del receptor GABA_A por el GABA e incrementan el tiempo de apertura del canal inducido por GABA. A altas concentraciones (anestésicas), los barbitúricos incrementan directamente la apertura del canal, incluso en la ausencia de GABA. Por otro lado, las BZD no tienen efecto directo sobre la apertura del canal, sino que sólo incrementan la afinidad del receptor por el GABA, así como la frecuencia de apertura del canal activado por GABA (Steven M. Paul, 1995).

Se tiene bien establecido que la administración sistémica de diazepam produce un efecto rápido anticonvulsivante cuando se administra durante episodios de convulsiones. En su mayoría el diazepam y otras BZD producen su efecto farmacológico modulando al complejo del receptor GABA_A -BZD de manera alostérica, para producir una neurotransmisión inhibitoria mediada por GABA en el SNC (Macdonald and Olsen, 1994; Costa and Guidatti, 1996; HoogerKamp et al, 1996). Además, se ha sugerido que parte del mecanismo de acción de las BZD está mediado por un incremento en la concentración de adenosina (Phillis and O'Regan, 1988).

Tabla 3. Información general del diazepam.

COMPUESTO (NOMBRE COMERCIAL)	VIA DE ADMINISTRACIÓN	EJEMPLO DE APLICACIONES TERAPÉUTICAS+	COMETARIOS	HORAS	DOSIFICACIÓN SEDANTE E HIPNÓTICA ORDINARIA (mg)
Diazepam (VALIUM, otros)	Oral, IM, IV, rectal	Transtornos de ansiedad, estado epiléptico, relajación del músculo estriado, premedicación anestésica.	Benzodiacepina prototípica	43 ± 13	5-10, tid-qid*

IM, inyección intramuscular; IV, administración intravenosa; tid, tres veces al día; qid, cuatro veces al día. *Aprobado como sedante-hipnótico solo para el tratamiento de la supresión de alcohol; las dosis en el individuo no tolerante serían menores.

II. JUSTIFICACIÓN

De acuerdo con reportes de la literatura, se sabe que el tolueno, así como otros disolventes de abuso, producen un efecto depresor del SNC, al igual que el etanol, los barbitúricos y las BZD. Basándose en la similitud en su perfil farmacológico, se propuso que posiblemente el tolueno podría presentar un efecto anticonvulsivante.

Investigaciones posteriores sugirieron que el mecanismo de acción del tolueno es similar al de los depresores del SNC, es decir, actúa bloqueando a los receptores glutamatérgicos excitatorios del tipo NMDA y aumentando la función inhibitoria de los receptores GABA_A y glicina. De acuerdo a estudios *in vitro* se ha visto que el tolueno tiene la capacidad de incrementar la actividad de los receptores GABA_A, produciendo así su efecto depresor, lo cual también apoya el efecto anticonvulsivante del tolueno.

Por otro lado, se tiene bien establecido que el efecto anticonvulsivante del diazepam es mediado principalmente a través del receptor GABA_A y que dicha unión aumenta la afinidad del receptor por el GABA.

Con base a lo anterior, en el presente proyecto proponemos que el tolueno podría tener un efecto protector ante las convulsiones inducidas por PTZ en ratas y que además dicho efecto podría verse potencializado al coadministrar el disolvente con el DZP.

III. HIPÓTESIS

- i. La coadministración de tolueno y DZP producirá una potenciación del efecto anticonvulsivante ante las convulsiones inducidas por PTZ.

IV. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de la coadministración de tolueno y DZP sobre las convulsiones inducidas por PTZ.

2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Estudiar el efecto de la administración de una dosis convulsivante 100 de PTZ en ratas.
- Estudiar el efecto de la administración de una dosis sub-efectiva de DZP sobre las convulsiones inducidas por PTZ en ratas.
- Estudiar el efecto de la administración de una concentración sub-efectiva de tolueno sobre las convulsiones inducidas por PTZ en ratas.
- Determinar el efecto producido por la administración simultanea de dosis sub-efectivas de tolueno y DZP, sobre las convulsiones inducidas por PTZ en ratas.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

1. ANIMALES

Se emplearon ratas Wistar macho con un peso aproximado de 200 a 250 g, las cuales se mantuvieron bajo 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

- Se empleó el tolueno como disolvente de abuso representativo. Los animales se expusieron a concentraciones sub-efectivas de 1000 ó 2000 ppm de tolueno.
- Se utilizó PTZ como agente convulsivante, este agente se disolvió en solución salina y se administró por vía i.p. en un volumen de 0.1 ml/100g del peso de la rata.
- Se utilizó el DZP como agente anticonvulsivante, este agente se disolvió en solución salina con una cuarta parte de propilenglicol y se administró por vía i.p. en un volumen de 0.1 ml/100g del peso de la rata.

3. EXPOSICIÓN AL DISOLVENTE

Se utilizó una cámara de exposición estática de cristal con forma cilíndrica con un volumen de 22.75 L (Fig. 5). 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 el disolvente.

Para llevar a cabo la exposición, cada rata se coloca de manera individual dentro de la cámara, la tapa se cierra de manera hermética y posteriormente 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 homogénea del disolvente. La concentración de vapor deseada se alcanza en un tiempo menor a 1 minuto (min) y permanece constante durante el tiempo de exposición (30 min).



Figura 5. Cámara de exposición estática.

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

$$\frac{V \cdot M \cdot C \cdot D \cdot P}{R \cdot T}$$

Donde:

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

= peso molecular del disolvente (g/mol).

= concentración deseada (ppm).

= volumen de la cámara de exposición (L).

= densidad del disolvente.

= presión atmosférica (atm).

= constante general de los gases ($\text{L atm mol}^{-1} \text{K}^{-1}$).

= temperatura absoluta (K).

4. PROTOCOLOS EXPERIMENTALES

4.1 PROTOCOLO 1. GRUPO CONTROL

ADMINISTRACIÓN DE PTZ

Se colocó cada rata en el interior de la cámara de exposición estática durante 30 min, exponiéndose sólo a aire. Terminado este tiempo, se le administró el agente convulsivante (PTZ) i.p. (50 mg/kg) y se volvió a introducir al animal en la cámara exponiéndolo sólo a aire nuevamente, durante este lapso (30 min) se observaron y registraron los signos convulsivos que presentó el animal.

4.2 PROTOCOLO 2. ADMINISTRACIÓN DE DZP Y PTZ.

Se le administró a cada rata el diacepam por vía i.p. (0.3 mg/kg) e inmediatamente después se introdujo en la cámara de exposición estática donde se expuso sólo a aire (30 min). Terminado este periodo de tiempo se le administró el agente convulsivante vía i.p e inmediatamente después se le colocó en la cámara de exposición estática donde fue expuesto solamente a aire (30 min) y se evaluó la presencia de signos convulsivos.

4.3 PROTOCOLO 3. EXPOSICIÓN TOLUENO Y PTZ

Se expuso cada rata al tolueno (1000 ó 2000 ppm) durante 30 min, una vez transcurrido este tiempo se sacó de la cámara y se le administró PTZ (50 mg/kg) e inmediatamente después se le introdujo nuevamente a la cámara en donde se le volvió a exponer a tolueno (1000 ó 2000 ppm) durante otros 30 min para evaluar la presencia de signos convulsivos.

4.4 PROTOCOLO 4. EXPOSICIÓN AL TOLUENO Y ADMINISTRACIÓN DZP Y PTZ.

Se le administró a cada rata diacepam por vía i.p (0.3 mg/kg) e inmediatamente después se introdujo en la cámara para exponerla a tolueno (1000 ó 2000 ppm) durante 30 min, una vez transcurrido este tiempo se sacó de la cámara y se le administró PTZ (50 mg/mkg) e inmediatamente después se le introdujo nuevamente a la cámara en donde se le volvió a exponer a tolueno (1000 ó 2000 ppm) por otros 30 min para evaluar si existe la presencia de signos convulsivos.

VI. VARIABLES EVALUADAS

Las variables que se evaluaron en los cuatro protocolos fueron:

- Latencia para la presentación de mioclonias (MC).
- Latencia para la presentación de convulsiones clónicas (CC).
- Latencia para la presentación de convulsiones clónico-tónicas (CCT).
- El porcentaje de animales que presentaron convulsiones clónico-tónicas.
- El número de episodios presentados de MC, de CC y de CCT.

Cuando el animal no presentó algún signo convulsivo, se asignó como latencia el punto de corte del experimento (30 min).

VII. ANÁLISIS DE DATOS

Para comparar el porcentaje de animales que presentaron determinados signos convulsivos en diferentes grupos experimentales, se utilizó la prueba exacta de Fisher. Para comparar si existen diferencias significativas entre las latencias para la presentación de convulsiones y en el número de signos convulsivos se utilizó la prueba t-student. En todos los casos, se consideró que las diferencias eran estadísticamente significativas con un valor de $p < 0.05$.

VIII. RESULTADOS

1. EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A TOLUENO (1000 ó 2000 PPM) Y DE LA ADMINISTRACIÓN DE DZP SOBRE LAS CONVULSIONES INDUCIDAS POR PTZ

En las figuras 6 y 7 se muestra el porcentaje de animales que presentaron convulsiones CCT bajo los distintos tratamientos a los que fueron sometidos (aire o tolueno y tolueno y/o DZP). En la figura 6 se observa el efecto producido por la exposición de ratas a 2000 ppm de tolueno, mientras que en la figura 7 se utilizó una concentración de 1000 ppm.

Claramente se puede observar en la figura 6 que la pre-exposición a tolueno 2000 ppm generó una protección completa sobre las CCT inducidas por una dosis convulsivante 100 de PTZ (50 mg/kg) y que la administración de DZP (0.3 mg/kg) no tuvo un efecto protector sobre las CCT cuando los animales se pre-expusieron a tolueno y además de les administró DZP, se observó el mismo resultado que con la pre-exposición a tolueno, es decir, hubo una protección completa en contra de las CCT inducidas por PTZ, por lo que no fue posible apreciar el efecto de la combinación del disolvente y la benzodiacepina.

Por otro lado, con la pre-exposición a 1000 ppm de tolueno (fig. 7) la protección total desaparece, ya que se obtuvo sólo un 10% de protección contra las CCT. Sin embargo, administrar de manera conjunta tolueno y DZP (0.3 mg/kg) generó una buena protección del 90% en contra de las CCT inducidas por el convulsivante, observándose una potenciación del efecto anticonvulsivante, ya que el tolueno y el DZP de, de manera individual, previnieron 10 y 30%, respectivamente, la presentación de CCT, por lo que la protección esperada de la suma de los efectos del disolvente

y la BZD corresponde a un 40%, mientras que el efecto observado fue de un 90% de protección.

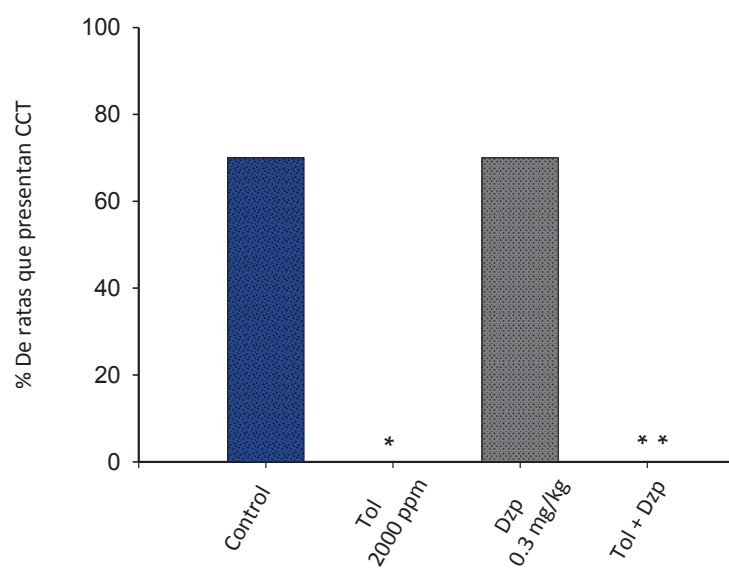


Figura 6. Efecto del tolueno (2000 ppm) y/o DZP (0.3 mg/kg) sobre el porcentaje de ratas que presentaron CCT inducidas por PTZ (50 mg/kg). * $p < 0.01$ Tolueno vs Control, Tolueno vs Dzp; ** $p < 0.01$ Tol+Dzp vs Control, Tol+Dzp vs Dzp; prueba exacta de Fisher. $n = 10$.

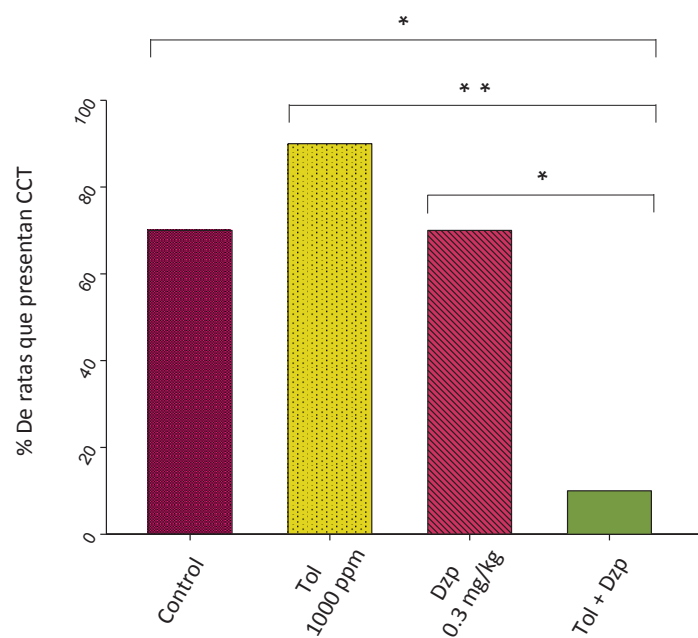


Figura 7. Efecto del tolueno (1000 ppm) y/o DZP (0.3 mg/kg) sobre el porcentaje de ratas que presentaron CCT inducidas por PTZ (50 mg/kg), * $p < 0.05$ Control vs Tol+Dzp, Dzp vs Tol+Dzp; ** $p < 0.01$ Tol vs Tol+Dzp; prueba exacta de Fisher. $n = 10$.

2. EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A TOLUENO (1000 ó 2000 PPM) Y DE LA ADMINISTRACIÓN DE DZP SOBRE LA LATENCIA DE PRESENTACIÓN DE MC

En la figura 8 se observa el efecto de la pre-exposición de tolueno y de la administración de DZP (0.3 mg/kg), solos o en combinación, sobre la latencia de presentación de MC inducidas por PTZ. Se aprecia que, al seguir el protocolo de pre-exposición a tolueno, disminuye la latencia de aparición de las MC en comparación con el tiempo registrado para el grupo control, siendo también menor que la latencia producida por la administración de DZP (0.3mg/kg). En contraste, al administrar la combinación de tolueno y DZP (protocolo 4), aumentó la latencia para la aparición de las MC.

En la figura 9, que corresponde a la administración de tolueno a una concentración de 1000 ppm, el tolueno disminuye la latencia de aparición de las MC con respecto al grupo control y el DZP la aumenta.

Sin embargo, a diferencia de lo observado en la figura 8, en la figura 9 se observa que la latencia registrada para la combinación de tolueno y DZP (protocolo 4) es mayor que la de la pre-exposición a tolueno, pero menor que la de la administración de DZP; no obstante, las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

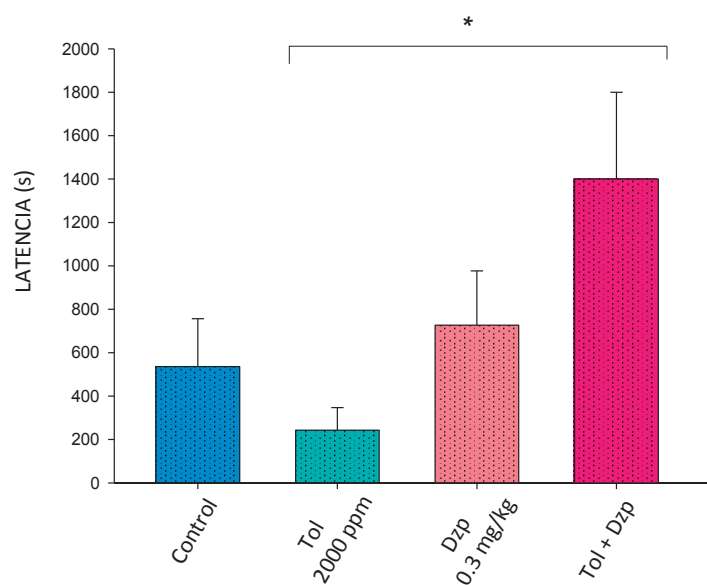


Figura 8. Efecto del tolueno (2000 ppm) y/o DZP (0.3 mg/kg) sobre la latencia de aparición de MC inducidas por PTZ (50 mg/kg). * $p < 0.05$. $n = 10$.

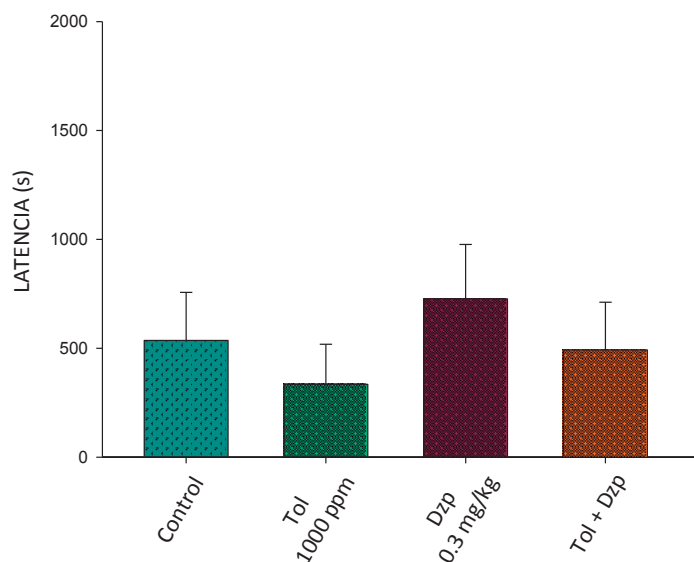


Figura 9. Efecto del tolueno (1000 ppm) y/o DZP (0.3 mg/kg) sobre la latencia de aparición de MC inducidas por PTZ (50 mg/kg). $n = 10$.

3. EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A TOLUENO (1000 ó 2000 PPM) Y DE LA ADMINISTRACIÓN DE DZP SOBRE EL NÚMERO DE MC

En la figura 10 y en la figura 11 se observa que la exposición a tolueno aumentó el número de MC en comparación con su respectivo grupo control, mientras que la administración de DZP, las disminuyó.

Por otro lado, al coadministrar tolueno 2000 ppm y DZP (0.3 mg/kg), el número de MC disminuyó; sin embargo, este efecto fue similar al de la administración de DZP solo (fig. 11). Por su parte, la combinación de tolueno 1000 ppm y DZP mostró una tendencia a aumentar el número de MC con respecto a la administración de DZP y a disminuirlas en comparación con el grupo pre-expuesto a tolueno 1000 ppm.

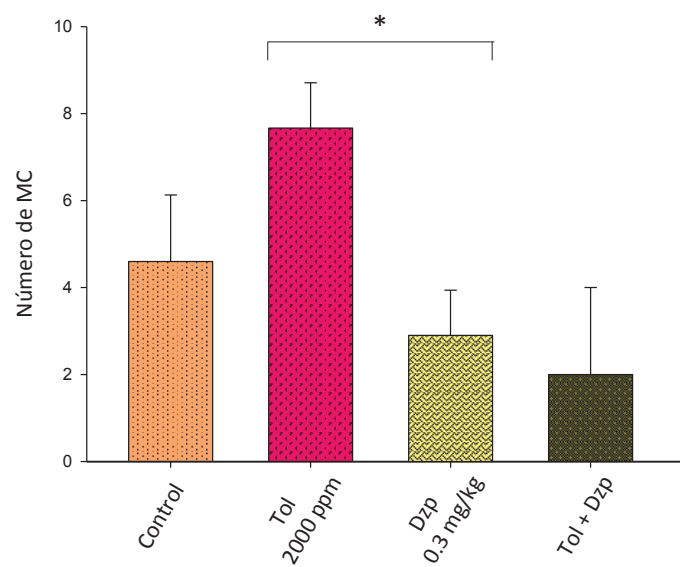


Figura 10. Efecto del tolueno (2000 ppm) y/o DZP (0.3 mg/kg) sobre el número de MC inducidas por PTZ (50 mg/kg). * $p < 0.05$ Tolueno vs Dzp. $n = 10$.

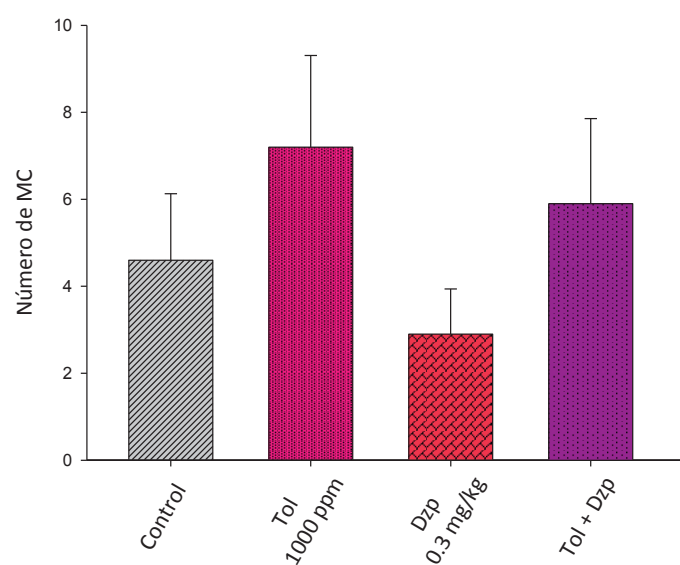


Figura 11. Efecto del tolueno (1000 ppm) y/o DZP (0.3 mg/kg) sobre el número de MC inducidas por PTZ (50 mg/kg). Para cada grupo $n = 10$.

4. EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A TOLUENO (1000 ó 2000 PPM) Y DE LA ADMINISTRACIÓN DE DZP SOBRE LA LATENCIA DE PRESENTACIÓN DE CC

En la figura 12 y 13 se muestra el efecto de la exposición a tolueno y de la administración de DZP, solos o en combinación, sobre la latencia de presentación de CC. En la figura 12 se observa que el tolueno, a una concentración de 2000 ppm, retarda la presentación de CC con respecto al grupo control, mientras que el DZP y la combinación de tolueno y diacepam no parecen modificar la latencia para presentación de CC.

En contraste, la pre-exposición a tolueno a una concentración de 1000 ppm (fig.13) parece tener un efecto inverso al de la concentración de 2000 ppm (fig. 12), ya que el disolvente disminuye la latencia para la aparición de CC con respecto al grupo control, pero con la co-administración de tolueno y diacepam se retarda la presentación de CC, al compararlo con el grupo que solamente fue expuesto a tolueno.

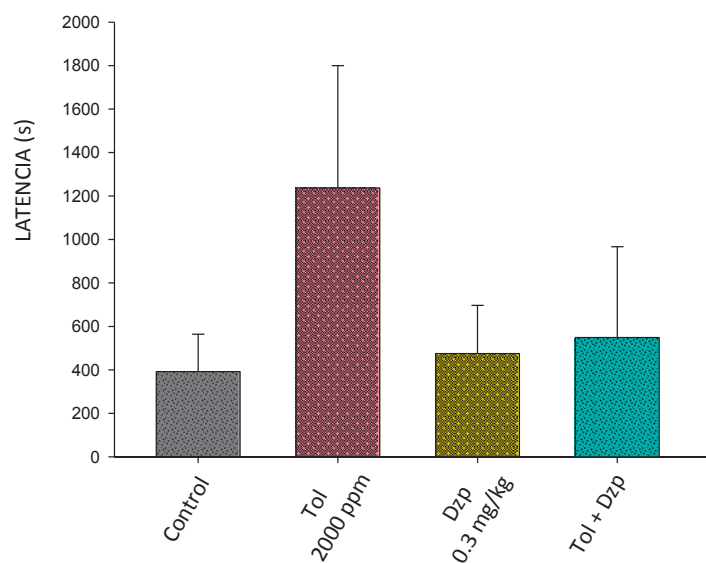


Figura 12. Efecto del tolueno (2000 ppm) y/o DZP (0.3 mg/kg) sobre la latencia de aparición de CC inducidas por PTZ (50 mg/kg). $n = 10$.

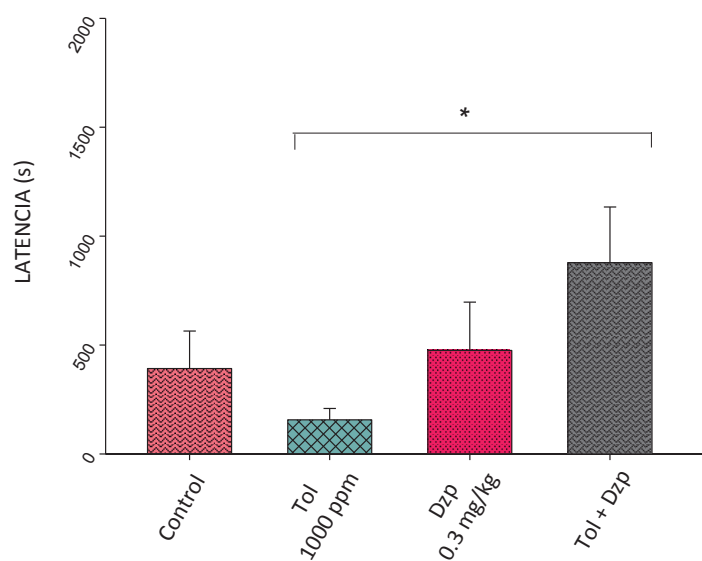


Figura 13. Efecto del tolueno (1000 ppm) y/o DZP (0.3 mg/kg) sobre la latencia de aparición de CC inducidas por PTZ (50 mg/kg). * $p < 0.05$. $n = 10$.

5. EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A TOLUENO (1000 ó 2000 PPM) Y DE LA ADMINISTRACIÓN DE DZP SOBRE EL NÚMERO DE CC

Con respecto al número de CC que presentaron los animales bajo los distintos protocolos, se observó que la inhalación de tolueno (2000 ppm) mostró una tendencia a disminuir el número de de CC inducidas por PTZ; en contraste, la combinación de tolueno y DZP parece aumentar el número de CC, sin embargo, las diferencias no son estadísticamente significativas.

Por su parte, ni la pre-exposición a tolueno 1000 ppm, ni la administración de DZP modifican el número de convulsiones con respecto al grupo control. Solamente la combinación de tolueno y DZP tiende a disminuir el número de CC, al compararlo con el grupo control y los grupos tratados únicamente con el disolvente o la BZD.

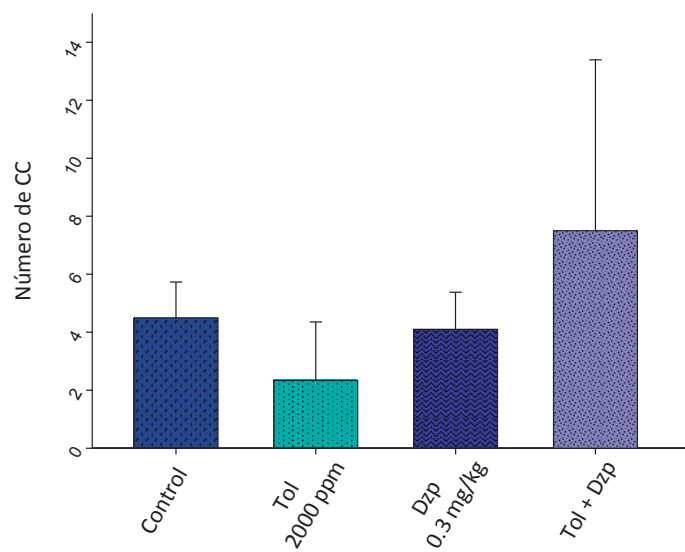


Figura 14. Efecto del tolueno (2000 ppm) y/o DZP (0.3 mg/kg) sobre el número de CC inducidas por PTZ (50 mg/kg). n = 10.

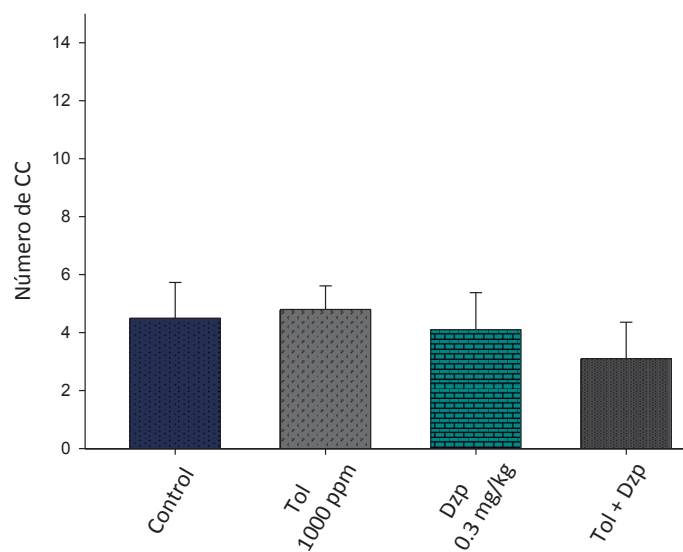


Figura 15. Efecto del tolueno (1000 ppm) y/o DZP (0.3 mg/kg) sobre el número de CC inducidas por PTZ (50 mg/kg). n = 10.

6. EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A TOLUENO (1000 ó 2000 PPM) Y DE LA ADMINISTRACIÓN DE DZP SOBRE LA LATENCIA DE PRESENTACIÓN DE CCT

En la figura 16, donde se utilizó una concentración de tolueno de 2000 ppm, se observa que tanto con la exposición al tolueno, como con la combinación de tolueno y DZP, no se produjeron CCT, por lo que la latencia representada en la gráfica corresponde al punto de corte del experimento (30 min). Por su parte, la administración de DZP no modificó la latencia para la presentación de CCT.

En contraste, la pre-exposición a tolueno 1000 (fig. 17) ppm produjo una tendencia a disminuir la latencia para la producción de CCT y la combinación del disolvente y el DZP aumentó aproximadamente al triple el tiempo necesario para la presentación de CCT.

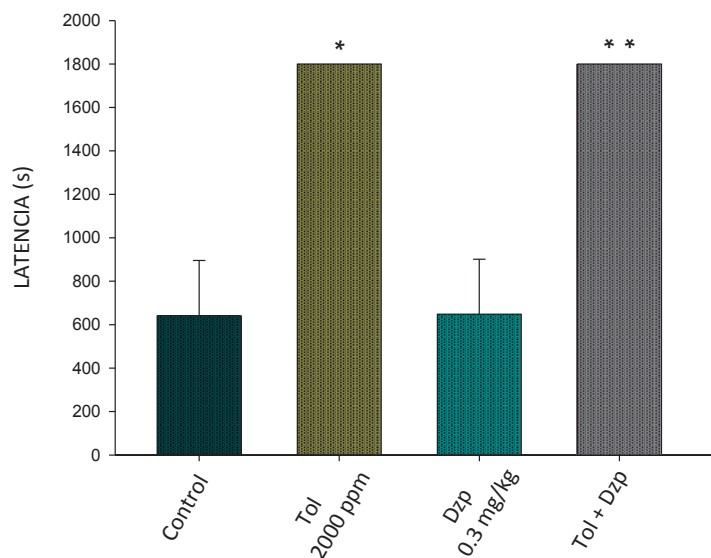


Figura 16. Efecto del tolueno (2000 ppm) y/o DZP (0.3 mg/kg) sobre la latencia de aparición de CCT inducidas por PTZ (50 mg/kg). n = 10.

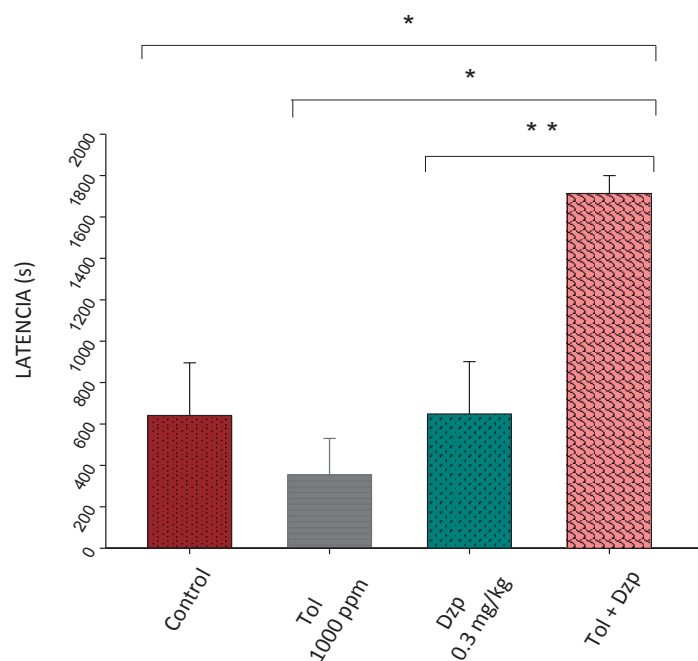


Figura 17. Efecto del tolueno (1000 ppm) y/o DZP (0.3 mg/kg) sobre la latencia de aparición de CCT inducidas por PTZ (50 mg/kg), * $p > 0.05$ control vs Tol+Dzp, Tol vs Tol+Dzp ; ** $p > 0.01$ Dzp vs Tol+Dzp. n = 10.

IX. DISCUSIÓN

Durante varios años se han llevado a cabo estudios de los efectos *in vivo* de la exposición a disolventes orgánicos industriales, pudiéndose dividir los modelos animales en dos categorías:

- a. Aquellos que imitan las condiciones de exposición ocupacional.
- b. Aquellos que imitan las condiciones de abuso.

En el primer caso, el animal es expuesto a bajas concentraciones del disolvente durante un periodo prolongado (varios días o semanas), por 6 a 8 h (Bukowski, 2001; Ritchie, et al., 2001). Los niveles bajos equivalen a concentraciones menores a los 1000 ppm, aunque esto depende del disolvente. Este modelo es una réplica efectiva de la exposición humana a los disolventes en el ámbito ocupacional.

Otro modelo animal puede ser usado para imitar las condiciones en las que se abusa de los disolventes. En humanos, la exposición a los disolventes durante episodios de abuso dura pocos minutos (<10 min) e involucra altas concentraciones (>6000 ppm, dependiendo del disolvente). Los modelos animales confiables de exposición a disolventes que siguen ese patrón poseen las siguientes características:

- I. Administración vía inhalación.
- II. Una rápida entrada de altas concentraciones al torrente sanguíneo.
- III. Exposiciones breves.

Para aquellos experimentos en los que se ha tratado de representar ya sea a la exposición ocupacional o a la de abuso, se han usado cámaras

de exposición estáticas y dinámicas para hacer circular el vapor del disolvente.

Los sistemas estáticos son relativamente simples y baratos, sólo se requiere colocar al animal con una concentración ya establecida del disolvente dentro de una cámara sellada herméticamente durante un periodo específico de tiempo. El disolvente es colocado a través de un puerto de inyección sobre un papel filtro o una toalla de papel, el cual está fijo dentro de la cámara y es volatilizado y distribuido por un ventilador que se encuentra montado en la tapa de la cámara de exposición (Bowen y Balster, 1996; Bowen, et al., 2005). Una limitante del sistema estático es que el nivel del dióxido de carbono (CO_2) puede acumularse con el tiempo, pero esto puede minimizarse si la exposición del animal se realiza durante periodos cortos de tiempo en cámaras de exposición lo suficientemente grandes y/o realizando mediciones del interior de la cámara para confirmar que no ocurra una intoxicación por CO_2 .

En las cámaras de exposición dinámica se minimiza la posibilidad de acumulación de CO_2 y tienen la ventaja de que pueden ser usadas por periodos largos de exposición al vapor del disolvente. En este sistema, el animal es colocado dentro de una cámara sellada herméticamente la cual se une a un puerto de salida y una de entrada. Una corriente constante de aire mezclado con la concentración deseada del disolvente es bombeada al interior de la cámara a través del puerto de entrada y posteriormente es evacuada a través del puerto de salida (Bowen y Balster, 1998). Por lo tanto, el sistema dinámico permite:

- I. Un rápido inicio y final de la exposición.
- II. El uso de cámaras más pequeñas.

- III. Un cambio rápido en la concentración del disolvente al que el animal está expuesto sin una manipulación excesiva de él.

Apoyados en la información anterior, para el presente trabajo se utilizaron cámaras de exposición estática, debido a que el tiempo de exposición del animal al disolvente es breve y las características físicas de la cámara son las necesarias para evitar la acumulación de CO₂ en ella y evitar que los resultados se vean alterados o bien que ocurra una intoxicación del animal por dicha acumulación.

Los tetrazoles, como el PTZ, pueden producir convulsiones al actuar sobre el sitio sensible a la picrotoxina del complejo del receptor GABA-benzodiacepinas (Ramanjaneyulu et al., 1984), inhibiendo el incremento en la conductancia a cloro inducida por el GABA, en cultivos de neuronas de cordón espinal de ratón (De Deyne y MacDonald, 1989).

Para el presente trabajo, se utilizó un modelo experimental de convulsiones inducidas por PTZ, un antagonista del receptor GABA_A que, como se mencionó anteriormente, actúa en el sitio de unión de la PTX (Ramanjaneyulu et al., 1984; Dibas y Dillon, 2000) y que es uno de los compuestos de elección para el cernimiento de fármacos anticonvulsivantes.

Los signos convulsivos que se observaron en los animales después de la administración i.p. de PTZ fueron MC, CC y CCT. La descripción de estas observaciones fueron similares a las descritas por Wayne., et al, en 1980. La dosis de PTZ utilizada en nuestro trabajo para generar las convulsiones en rata fue la dosis mínima para producir convulsiones en la mayoría de las ratas (DE₇₀) y la dosis más baja capaz de producir la muerte (DL_{min}).

Los resultados obtenidos para el protocolo 1 (administración de PTZ), fueron similares a los obtenidos por James et al. (1980), quienes encontraron que, tras la administración única de una dosis convulsivante de PTZ (100 mg/kg) i.p., se produjeron, en todos los ratones, MC generalizadas aproximadamente 60 seg después de su administración, las cuales fueron seguidas, rápidamente por CC generalizadas. Después de varias MC y CC adicionales, más del 90% de los animales presentaron una convulsión clónico-tónica dentro de los 4-10 min posteriores a la administración de PTZ, a diferencia de nuestros resultados, por lo general, morían inmediatamente después.

Algunas diferencias de nuestro trabajo con el de James et al., (1980), es que en su trabajo los animales empleados fueron ratones, en los cuales las dosis administradas causaron convulsiones clónico-tónicas al 100% de los animales, mientras que durante nuestro proyecto se trabajó con ratas, de las cuales solo el 70% presentó CCT. Estas diferencias pueden deberse a variaciones en las condiciones del laboratorio (temperatura, ciclo luz/oscuridad, humedad), al uso de las especies distintas de animales, y también a las variaciones estacionales en la susceptibilidad hacia las convulsiones inducidas por PTZ, ya que se ha descrito que se presentan umbrales más altos entre febrero y abril y más bajos entre julio y septiembre (Löscher y Fiedler, 1996).

Los inhalables, al igual que otros depresores del SNC, disminuyen la ansiedad (Geller et al., 1983), producen tolerancia después de administraciones repetidas y pueden producir dependencia física (Evans y Balster, 1993). Los disolventes, además, pueden autoadministrarse por animales de laboratorio (Yanagita et al., 1979; Knisely et al., 1990). En

conjunto, estas evidencias indican que los inhalables deben ser considerados junto al resto de los fármacos depresores del SNC que son capaces de producir adicción.

Se ha propuesto que los 2 posibles mecanismos de acción principales que explican los efectos de los depresores del SNC son:

- i. Potenciación de los efectos de aminoácidos inhibitorios, particularmente del GABA.
- ii. Inhibición de la neurotransmisión excitatoria.

Existe evidencia de que la exposición de animales a algunos disolventes produce efectos similares a aquellos producidos por drogas clásicas depresoras del SNC y por el alcohol. El perfil de los efectos depresores del SNC ha sido descrito en la literatura (Harvey, 1985 y Sepinwall et al., 1978) e incluye efectos sobre la actividad motora, actividad locomotora espontánea, efectos anticonvulsivantes, interrupción de la conducta operante, efectos ansiolíticos, el desarrollo de tolerancia y de dependencia, efectos estímulo-discriminativos o de reforzamiento y la habilidad de incrementar los efectos de la administración de drogas depresoras.

Se ha establecido en trabajos previos que los sitios primarios de acción de los alcoholes y los anestésicos volátiles son los canales iónicos activados por neurotransmisores (Lovinger, 1997 y Mihic, 1999). Beckstead (2000) et al., encontraron que el tolueno, el TCE y el tricloroetileno tenían la capacidad de aumentar la función de dos receptores inhibitorios: GABA_A y glicina. Este efecto se evaluó tras estudiar la acción de los disolventes sobre receptores GABA_A y glicina presentes

rebanadas de hipocampo y sobre receptores recombinantes expresados en ovocitos de *Xenopus*.

Debido a las similitudes en los efectos de la exposición aguda a algunos disolventes de abuso y fármacos depresores del SNC, Wood et al., (1984) estudiaron los efectos anticonvulsivantes del tolueno. Estos investigadores estudiaron los efectos de dicho disolvente sobre las convulsiones inducidas por PTZ en ratones y encontraron que la exposición prolongada al tolueno (2h) fue capaz de retrasar la aparición de signos convulsivos y prevenir los efectos letales de las dosis altas del PTZ en una manera dependiente de la concentración. La inhalación de tolueno ($DE_{50} = 1311$ ppm, después de 4 h de exposición) también protegieron de la muerte inducida por PTZ.

En el año 2002, Gauthereau expuso ratones a tolueno (1000 ó 2000 ppm) durante 30 min, transcurrido este tiempo, se sacó el animal de la cámara y se le administró PTZ (80 ó 100 mg/kg) para posteriormente ser re-expuesto a tolueno y encontró que este disolvente produjo solo una protección parcial contra la presentación de CCT producidas por ambas dosis de PTZ, ya que solo a las concentraciones altas disminuyó significativamente el porcentaje de animales que presentaron convulsiones.

Gauthereau (2002) probó el efecto anticonvulsivante del tolueno con dos agentes convulsivantes con diferentes mecanismos de acción: NMDA y PTZ. Se escogieron dos dosis de cada fármaco, basándose en reportes de la literatura: la dosis efectiva necesaria para producir convulsiones en la mayoría de los animales (DE_{98}) y la dosis letal (DL_{100}). Inmediatamente después de la inyección i.p. del fármaco convulsivante, el

ratón fue colocado dentro de la cámara de exposición y fue expuesto a una concentración predeterminada de tolueno por 30 min.

Todos los animales control, expuestos a aire e inyectados con PTZ (80 mg/kg, i.p.) presentaron convulsiones clónico-tónicas y 50% de ellos murieron. Con la dosis de 100 mg/kg de PTZ, todos los animales presentaron convulsiones y murieron. Según sus resultados, el tolueno disminuyó el porcentaje de animales que presentaron convulsiones clónico-tónicas en una manera dependiente de la concentración y además protegió completamente en contra de la muerte inducida por PTZ. Así mismo, sugirieron que el tolueno es más efectivo en contra de las convulsiones inducidas por PTZ que por NMDA ya que el tolueno solo protegió contra la muerte al 80% de los ratones a los cuales se les administró 120 mg/kg de NMDA y a un 10% con 170 mg/kg.

De acuerdo a los datos que en este proyecto se presentan para el protocolo 2 (administración de tolueno y PTZ), tras la exposición de la rata a 2000 ppm de tolueno, el 100% de los animales se vieron protegidos ante las convulsiones inducidas por PTZ, mientras que al exponerlas a 1000 ppm el 90% de ellas presentaron CCT. Cabe mencionar que al decir que una rata es protegida de las convulsiones inducidas por PTZ, nos referimos a que no presentaron convulsiones clónico-tónicas, ya que los animales durante el tiempo de observación sí presentaron MC y CC. También se observó que el tolueno en sus distintas concentraciones mostró tener efecto sobre la latencia de los signos convulsivos, al compararlo con el tiempo de aparición de los mismos signos en aquellos animales que no fueron expuestos a tolueno.

En el caso de las MC, su tiempo de aparición se vio disminuido tanto para la concentración de 1000 ppm de tolueno como para la de 2000 ppm, aunque curiosamente el uso de la concentración más baja fue la que registró tener una mayor latencia, es decir logró retrasar más la aparición de las MC en las ratas.

En cuanto a la presencia de CCT, para el grupo tratado con 2000 ppm de tolueno se registró un atraso en la aparición de este signo convulsivo en casi el doble de segundos con respecto al grupo control y de manera sorprendente para el grupo tratado con 1000 ppm de tolueno se observó que la latencia disminuyó.

Por otra parte, es bien sabido que el DZP, un fármaco depresor del SNC, posee efecto ansiolítico, anticonvulsivante, relajante muscular y propiedades sedativo-anestésicas. Y ha sido demostrado que el PTZ y sus análogos inhiben competitivamente la unión del diazepam al receptor GABA_A (Muller et al., 1978; Rehavi et al., 1982).

En 1977, en estudios de unión de radio ligando usando diazepam, se identificaron receptores benzodiazepínicos en el cerebro de la rata (Braestrup y Aquires, 1977; Mohler y Okada, 1977); más tarde, receptores similares fueron caracterizados en el cerebro humano utilizando flunitrazepam (Speth et al, 1978).

Todas las BZD empleadas en los seres humanos son capaces de estimular la unión del ácido γ aminobutírico, el principal neurotransmisor inhibitorio, a la subunidad del receptor GABA_A, el cual es un canal Cl⁻ regulado por ligando, y que posee múltiples subunidades. Por lo tanto, la

unión de las BZD a la subunidad α los receptores GABA_A aumenta el paso de corrientes iónicas inducidas por GABA a través de muchos canales.

Se piensa que mecanismos diferentes de acción contribuyen a los mecanismos sedantes-hipnóticos, miorrelajantes, ansiolíticos y anticonvulsivos de las BZD y las subunidades específicas del receptor GABA_A son las encargadas de ejercer las propiedades farmacológicas de esta familia de medicamentos.

Se han observado diversos efectos *in vivo* e *in vitro* del tipo de los producidos por las BZD, y se han clasificado como efectos agonistas completos (es decir, que imitan las acciones de medicamentos como el diazepam, con ocupación fraccionaria de los sitios de fijación relativamente baja) o efectos agonistas parciales (es decir, producen menos efectos máximos o requieren una ocupación relativamente alta en comparación con agentes como el diazepam) (Charney et al., 2007).

Se cree que las BZD ejercen la mayor parte de sus efectos al interactuar con receptores de neurotransmisores inhibitorios activados de manera directa por el GABA. Los receptores GABA son proteínas unidas a membrana que pueden dividirse en dos subtipos principales: receptores GABA_A y GABA_B. Los receptores ionotrópicos GABA_A están compuestos de 5 subunidades que se coensamblan para formar un canal integral de cloruro, este neurotransmisor causa la mayor parte de la neurotransmisión inhibitoria en el SNC. En contraste, los receptores GABA_B metabotrópicos son receptores acoplados a proteínas G.

Las BZD actúan sobre los receptores GABA_A, y no tienen ninguna acción sobre los receptores los GABA_B, al unirse de manera directa a un sitio específico diferente del sitio de unión del GABA. Al contrario de los

barbitúricos, las benzodiazepinas no activan de manera directa a los receptores GABA_A, pero requieren la unión del GABA para producir sus efectos: esto es, sólo regulan los efectos del GABA. Los agonistas benzodiazepínicos incrementan la corriente de cloruro generada por la activación del receptor GABA_A (Charney et al., 2007).

En nuestros resultados, se puede observar que el DZP (0.3 mg/kg), produjo una protección en contra de las CCT del 30% de las ratas que fueron administradas con PTZ (50 mg/kg), al igual que se vio un ligero aumento de latencia de aparición de signos convulsivos como MC y CC, así como protección de los animales contra la muerte.

Con base en la revisión bibliográfica mencionada anteriormente y de acuerdo con nuestros resultados, queda establecido que el PTZ es capaz de generar CCT, con la correspondiente aparición de otros signos convulsivos como lo son MC y CC, en la mayoría de las ratas que recibieron una dosis de 50 mg/kg. A su vez, la exposición de los animales a tolueno, los protege de las convulsiones clónico-tónicas, e incluso la muerte, inducidas por PTZ y aumenta la latencia de aparición de MC y CC. Por su parte, la administración de DZP provee también protección ante las CCT y la muerte inducida por PTZ, alargando, al igual que el tolueno, la latencia de aparición de MC y CC.

Sabiendo que tanto tolueno como el DZP actúan sobre el receptor GABA_A, fue de nuestro interés determinar si la coadministración de ambas sustancias podría producir una potenciación del efecto anticonvulsivante.

Para este propósito, iniciamos probando una concentración de 2000 ppm de tolueno, sin embargo, al analizar los resultados se sugirió que a dicha concentración no era posible determinar si se generaba una potenciación del efecto anticonvulsivante al coadministrar tolueno y DZP, ya que se obtuvo una protección en contra de las CCT en la totalidad de los animales al finalizar el protocolo 2 (fig. 6) y lo mismo ocurrió al término del protocolo 3 (administración de tolueno y DZP) lo que nos hizo suponer que la protección observada en este último protocolo era debida únicamente a la administración de tolueno 2000 ppm. Para solucionar dicho problema y con la finalidad de determinar si tal potenciación era posible, decidimos disminuir la concentración de tolueno a 1000 ppm. A esta concentración el tolueno disminuyó drásticamente su efecto protector, observándose que sólo un 10% de las ratas no presentaron CCT, sin embargo, al coadministrarlo con DZP, el cual mostró tener un efecto protector del 30%, se generó un 90% de protección de los animales ante las convulsiones inducidas por PTZ (fig. 2).

Se sabe que la administración conjunta de sustancias depresoras del SNC genera, al menos, un efecto aditivo (Bogan et al., 1967; Saldeen et al., 1967). Existen datos de investigaciones en animales que proporcionan evidencia de que los efectos producidos por tal combinación pueden ser aditivos o de potenciación. Geller et al., 1983, probaron tolueno y DZP, solos o en combinación, para determinar el efecto de ambas sustancias sobre el incremento de la respuesta suprimida por castigo en ratas y encontraron que, solos o en combinación, el tolueno y el DZP fueron capaces de incrementar la respuesta suprimida por castigo, así como la frecuencia.

De acuerdo a los datos obtenidos utilizando 1000 ppm de tolueno, es posible proponer que la coadministración de tolueno y DZP (0.3 mg/kg) producen una potenciación del efecto anticonvulsivante y que dicho efecto parece estar mediado por una acción sobre los receptores GABA_A.

En la actualidad existen investigaciones que involucran la administración simultánea de fármacos depresores del SNC con actividad anticonvulsiva con el fin de generar una potenciación en sus efectos terapéuticos, sin embargo con el presente trabajo no se pretende ofrecer una alternativa terapéutica, ya que es bien sabido que el tolueno genera adicción y presenta características tóxicas. La finalidad es ayudar a entender mejor el mecanismo de acción de los inhalables de abuso y ofrecer un perfil más amplio de la forma en que estas sustancias afectan a aquellas personas que, deliberadamente o no, están en contacto con cantidades significativas de disolventes.

X. CONCLUSIONES

- El tolueno es capaz de proteger ante las convulsiones y muerte inducidas por PTZ.
- El diacepam es capaz de proteger ante las convulsiones y muerte inducidas por PTZ.
- La administración de tolueno y diacepam prolongan la latencia de aparición de MC y CC.

La combinación de tolueno y diacepam produce una potenciación del efecto anticonvulsivante, lo cual se sugiere podría estar mediado por una acción sobre los receptores GABA_A.

XI. REFERENCIAS

1. Agency for Toxic Substance and Diseases Registry. Toxicological Profile for Toluene. U.S. Public Health Service (in collaboration with U.S. Environmental protection Agency), Atlanta, GA, 1989.
2. 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.
3. Arlien-Soborg, P., 1992. Solvent Neurotoxicity. RC Press, Boca Raton, Fl, pp. 61-106.
4. ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Toxicological profile for toluene. US Public health service (in collaboration with Environmental protection agency), Atlanta, GA, 1989.
5. ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). (2000) Toxicological profile for toluene. Available from ATSDR, Atlanta, GA, and <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/>>.
6. AYRES PH, TAYLOR DW: Solvents. En: Principles and Methods of Toxicology. Segunda Edición. Hayes W (ed). Raven Pres, Ltd, Nueva York, 1989.
7. Bale, A. S., Meacham, C. A., Benignus, V. A., busnell, P. J., and Shafer, T. J. 2005, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 205, 77.
8. Bale, A. S., Smothers, C. T. and Woodward, J. J. 2002, *Br. J. Pharmacol.* 137, 375.
9. Balster, R.L., 1997. College on problems of drug dependence presidential address 1996: inhalant abuse, a forgotten drug abuse problem. *NIDA Res. Monograph* 174, 3–8.
10. Balster, R.L., 1998. Neural basis of inhalant abuse. *Drug Alcohol Depend.* 51, 207–214.
11. Barnard, E. A., Skolnick, P., Olsen, R.W., Mohler, H., Sieghart, W., Biggio, G., Braestrup, C., Bateson, A. N., and Langer, S. Z. (1998). International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acid A receptors: Classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol. Rev.* 50, 291–313.
12. Bass M., 1970. Sudden sniffing death. *JAMA* 212, 2075-2079.

13. Beauvais F., Wayman J.C., Jumper-Thurman P., Plested B., Helm H., Inhalant abuse among American Indian, Mexican American, and non-Latino white adolescents, *Am. J. Drug Alcohol Abuse* 28 (2002) 171–187.
14. Beckstead, M. J., Weiner, J. L., Eger, E. I. 2nd, Gong, D. h., and Mihic S. J. 2000, *Mol. Pharmacol.*, 57, 1199.
15. Bloomquist JR (1996) Ion channels as targets for insecticides. *Annu Rev Entomol* 41:163–190.
16. Bogan J., Smith H.: Analytical investigations of barbiturate poisoning-description of methods and survey of results. *J. Forensic Sci. Soc.* 7:37-45; 1967.
17. Bormann, J., and Feigenspan, A. (1995) *Trends Neurosci.* 18, 515–519.
18. Bowen S.E., Balster R.L., Effects of inhaled 1,1,1-trichloroethane on locomotor activity in mice, *Neurotoxicol. Teratol.* 18 (1996) 77–81.
19. Bowen S.E., Balster R.L., A direct comparison of inhalant effects on locomotor activity and schedule-controlled behavior in mice, *Exp. Clin. Psychopharmacol.* 6 (1998) 235–247.
20. Bowen S.E., Batis J.C., Mohammadi M.H., Hannigan J.H., Abuse patterns of gestational toluene abuse and early postnatal development in rats, *Neurotoxicol. Teratol.* 27 (2005) 105–116.
21. Braestrup C. and Squires R.F., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 74 3805-380 (1977).
22. Bukowski J.A., Review of epidemiological evidence relating toluene to reproductive outcomes, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 33 (2001) 147–156.
23. Bushnell, P.J., Evans, H.L., Palmes, E.D., 1985. Effects of toluene inhalation on carbon dioxide production and locomotor activity in mice. *Fundamental Appl. Toxicol.* 5, 971–977.
24. Bushnell, P.J., Kelly, K.L., Crofton, K.M., 1994. Effects of toluene inhalation on detection of auditory signals in rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 16, 149–160.
25. Chan, M.H., Chien, T.H., Lee, P.Y., Chen, H.H., 2004. Involvement of NO/cGMP pathway in toluene-induced locomotor hyperactivity in female rats. *Psychopharmacology* 176, 435–439.
26. Charney S. D., Mihic S.J. y Harris R.A. (2007) Las bases farmacológicas de la terapéutica. Goodman & Gilman. Undécima edición, Cap. 16. Pag. 401-406.

27. Corda M.G. and Biggio G.: Proconflict effect of GABA receptor complex antagonist. Reversal by diazepam. *Neuropharmacology* 25:541-544, 1986.
28. Corda M.G., Giorgi O., Longoni B., Orlandi M. and Biggio G., 1990. Decrease in the function of the gamma-aminobutyric acid-coupled chloride channel produce by the repeated administration of pentylentetrazol to rats. *J Neurochem* 55:1216-1221.
29. Costa, E., Guidotti, A., 1996. Benzodiazepines on trial: a research strategy for their rehabilitation. *Trends Pharmacol. Sci.* 17, 192-199.
30. Curtis, D. R., Duggan, A. W., Felix, D., and Johnston, G. A. (1970) *Nature* 226, 1222–1224.
31. Cutting, G. R., Lu, L., O'Hara, B. F., Kasch, L. M., Montrose-Rafizadeh, C., Donovan, D. M., Shimada, S., Antonarakis, S. E., Guggino, W. B., Uhl, G. R., and Kazanian, H. H. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 2673–2677
32. Cruz, S.L., Balster, R.L., and Woodward, J.J. 2000, *Br. J. Pharmacol.*, 131, 1303.
33. Cruz S.L., Paez-Martinez N., Pellicer F., Salazar L.A., López-Rubalcava C.: Toluene increases acute thermnociception in mice. *Behav Brain Res*, 120:213-20,2001.
34. Cruz S.L., Gauthereau M.Y., Camacho-Muñoz C., López-Rubalcava C., Balster R.L.: 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.
35. Cruz SL, Mirshahi T, Thomas B, Balster RL, Woodward JJ. Effects of the abused solvent toluene on recombinant NMDA and non-NMDA receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 286:334-40.
36. Davies, P. A., Hanna M. C., Hales T. G., and Kirkness, E. F. (1997) *Nature* **385**, 820–823
37. DeLorey, T.M., Olsen, R.W. 1992. *J Biol Chem.* 267, 16747.
38. 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.
39. Echeverria, D., Fine, L., Langolf, G., Schork, T., Sampaio, C., 1991. Acute behavioral comparisons of toluene and ethanol in human subjects. *Br. J. Ind. Med.* 48, 750–761.

40. Einav S., Amitai Y., Reichman J., Geber D., 1997. Bradycardia in toluene poisoning. *J. Toxicol., Clin., Toxicol.* 35, 295-298.
41. Evans E.B. and Balster R.L., (1991) CNS depressant effects of volatile organic solvents. *Neurosci Biobehav Rev* 15:233–241.
42. Evans E.B., Balster R.L., (1993). Inhaled 1,1,1-trichloroethane produce physical dependence in mice: effects of drugs and vapors on withdrawal. *J Pharmacol Exp ther*, 264:726-33.
43. Everett G.M. and Richards R.K.: Comparative anticonvulsive action of 3,5,5-trimethyloxazolidine-2,4-dione (Tridione), Dilantin and Phenobarbital. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 81: 402-407, 1944.
44. Gauthereau-Torres M. Y., 2002. Efecto del Toluene y 1,1,1-Tricloroetano sobre las convulsiones inducidas por Pentilentetrazol y NMDA en ratones. Tesis de Maestria. Departamento de Farmacobiología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional p. 40-43.
45. Geller I., Hartmann R. J., Mendez V., Gaus E.M.: Toluene inhalation and anxiolytic activity: Possible synergism with diazepam. *Pharmacol Biochem Behav*, 19:899-903, 1983.
46. Goudi A.J., Emmett-Oglesby M.W.: *Psychoactive Drugs: Tolerance and sensitization*. Humana Press, Nueva Jersey, 1989.
47. Harvey S. C. Hypnotics and sedatives. In: Gilman A. G.; Goodman L.S.; Rall T. W.; Murad F., eds *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of therapeutics*. New York: Macmillan publish Co.; 1985:339-371.
48. Hevers W., Luddens H. (1998) The diversity of GABAA receptors: pharmacological and electrophysiological properties of GABAA channel subtypes. *Mol Neurobiol* 18:35–86.
49. Hill, D. R., and Bowery, N. G. (1981) *Nature* 290, 149–152
50. Himnan D.J.: Tolerance and reverse tolerance to toluene inhalation: effects on open-field behavior. *Pharmacol Biochem Behav*; 21:625-31, 1984.
51. Hoogerkamp, A., Arends, R.H.G.P., Bomers, A.M., Mandema, J. W., Voskuyl, R.A., Danhof, M., M., 1996. Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship of benzodiazepines in the direct cortical stimulation model of anticonvulsant effect. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 279, 803-812.
52. Indulski, J.A., Sinczuk-Walczak, H., Szymczak, M., Wesolowski, W., 1996. Neurological and neurophysiological examinations of workers occupationally

exposed to organic solvent mixtures used in the paint and varnish production. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* 9, 235–244.

53. Iversen S.D., Iversen L: Behavioral Pharmacology. 2^a. Ed. Oxford University Press, Nueva York, 1981.
54. James A.F., Ann C.B. and Robert A.G., 1980. Relationship between seizures activity and cyclic nucleotide levels in brain.
55. Johnston, G. A. (1994). *Prog. Brain Res.* 100, 61–65
56. Johnston L.D., O'Malley P.M., Bachman J.G., 2003. Monitoring the Future National Survey Results on Adolescent Drug Use: Overview of Key Findings. Bethesda, MD7 National Institute on Drug Abuse; 2003.
57. Knisely J.S., rees D., Balster R.L., (1990). Discriminative stimulus properties of toluene in the rat. *Neurotoxicol. Teratol.* 12:129-133.
58. Lopreato, G.F., Phelan, R., Borghese, C.M., Beckstead, M.J., Mihic, S.J., 2003. Inhaled drugs of abuse enhance serotonin-3 receptor function. *Drug Alcohol Depend.* 70, 11–15.
59. Lovinger D. M. (1997). Acohols and neurotransmitter gated ion channels: past, present and future. *Naunyn-Schmiedeberg;s Arch Pharmacol* 356:267-282.
60. Löf, A; Wallen, M; Hjelm, EW. (1990) Influence of paracetamol and acetylsalicylic acid on the toxicokinetics of toluene. *Pharmacol Toxicol* 66:138-141.
61. Löf, A; Hjelm, EW; Colmsjo, A; et al. (1993) Toxicokinetics of toluene and urinary excretion of hippuric acid after human exposure to ²H₈-toluene. *Br J Ind Med* 50:55-59.
62. Löscher W. and Fiedler M. The role of thecnical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluations of anticonvulsant drugs. VI. Seasonal influences on maximal electroshocks and pentylenetetrazol sizure thresholds. *Epilepsi Research.* 25:3-10, 1996.
63. Löscher W. and Schwark W.S. (1985). Evidence for impairment GABAergic activity of the substantia nigra of amygdaloid kindled rats. *Brain Res* 339:146-150.
64. Macdonald R. L. and J.L Barker. (1977). Pentylenetetrazol and penicillin are selective antagonist of GABA-mediated postsynaptic inhibition in cultured mammalsians neurons, *Nature* 267, 720.

65. Macdonald R. L. and J.L Barker (1978). Specific antagonism of GABA-mediated postsynaptic inhibition in cultured mammalian spinal cord neurons: a common mode of convulsant action. *Neurology* **28**:325–330.
66. Macdonald R. L., Olsen R. W., 1994. GABA_A receptors channels. *Annu. Rev Neurosci.* 17, 569-602.
67. Marangos P.J., Paul S.M., Parma A.M., Goodwin F.K., Syapin P. and Skolnick P., 1979. Purinergic inhibition of diazepam binding to rat brain in vitro. *Life Sci.* 24, 851.
68. Marjot R, Mcleod AA: Chronic non-neurological toxicity from volatile substance abuse. *Hum toxicol*, 8:301-6, 1989.
69. McKernan, R.M., Whiting, P.J. 1996. *Trends Neurosci.* 19, 139.
70. Michael J. Beckstead, Jeff L. Weiner, Edmond I. Eger II, Diane H. Gong, and S. John Mihic. Glycine and γ -Aminobutyric Acid_A Receptor Function Is Enhanced by Inhaled Drugs of Abuse, 2000.
71. Mihic S. J. (1999): Acute effects of ethanol on GABA_A and glycine receptor function. *Neurochem Int* 35:115-123.
72. Mohler H. and Okada T. *Science*, 198 849-851 (1977).
73. Monster, AC; Kezic, S; van de Gevel, I; et al. (1993) Evaluation of biological monitoring parameters for occupational exposure to toluene. *Int Arch Occup Environ Health* 65(Suppl):159-162.
74. Morton, H.G., 1987. Occurrence and treatment of solvent abuse in children and adolescents. *Pharmacol. Ther.* 33, 449–469.
75. Moser, V.C., Balster, R.L., 1986. The effects of inhaled toluene, halothane, 1,1,1-trichloroethane, and ethanol on fixed-interval responding in mice. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 8, 525–531.
76. Muller W.E., Schlafer U. and Wollert U. 1978. Benzodiazepine receptor binding: Interaction of some nonbenzodiazepine drugs with specific Diazepam binding to rat brain synaptosomal membranes, *Naunyn-Schmiedeb. Arch. Pharmacol.* 305.23.
77. Páez-Martínez N., López-Ruvalcaba C. y Cruz S. L., 2003. Avances en la investigación básica de los efectos *in vivo* de los disolventes de abuso. Departamento de Farmacología, Cinvestav, IPN. *Salud Mental*, Vol.26, No. 6.

78. Nelson GA. Controlled test atmospheres. Principles and techniques. University of California Press. Pág. 1-7, 1971.
79. Nestler E.J., Hyman S.E., Malenka R.C.: Molecular Neuropharmacology. A Foundation for Clinical Neuroscience. McGraw-Hill, USA, 2001.
80. NTP. (2001) Chemical Health and Safety Data. Online. Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Research Triangle Park, NC; http://ntp-server.niehs.nih.gov/Main_Pages/Chem-HS.html
81. McLeod, A., Marjot, R., Monaghan, M.J., Hugh-Jones, P., and Jackson, G. 1987, Br. Med. J., 294, 727.
82. Murray, M.J., Murray, W.J., 1980. Nitrous oxide availability. J. Clin. Pharmacol. 20, 202-205.
83. Olsen R.W., Wamsley J.K., McCabe R.T., Lee R.J. and Lomax P., 1985. Benzodiazepine/ γ -aminobutyric acid receptor deficit in the seizure-susceptible gerbil. Proc Natl Acad Sci USA 82:6701-6705.
84. Orloff M.J., Williams H.L. and Pfeiffer C.C.: Timed intravenous infusion of metrazol and strychnine for testing anticonvulsant drugs. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 70:254-257, 1949.
85. Ortells, M.O., Lunt, G.G. 1995. *Trends Neurosci.* 18, 121.
86. Pellizzari, ED; Wallace, LA; Gordon, SM. (1992) Elimination kinetics of volatile organics in humans using breath measurements. J Expo Anal Environ Epidemiol 2:341-355.
87. Pellmar T.C. and Wilson W.A., 1977. Synaptic mechanism of pentylenetetrazol sensitivity for chloride conductance, Science 197, 912.
88. Phillis, J.W., O'Regan, M.H. 1988. Benzodiazepine interaction with adenosine system explains some anomalies in GABA hypothesis. Trends Pharmacol. Sci. 9, 153-154.
89. Raines, D.E., Gioia, F., Claycomb, R.J., and Stevens, R.J. 2004, J. Pharmacol. Exp. Ther., 11, 14.
90. 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.

91. Rees, D.C., Knisely, J.S., Breen, T.J., Balster, R.L., 1987. Toluene, halothane, 1,1,1 trichloroethane and oxazepam produce ethanol-like discriminative stimulus effects in mice. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 243, 931–937.
92. Rehavi M., Skolnick P. and Paul S.M. (1982). Effects of tetrazole derivatives on []diazepam binding in vitro: correlation with convulsant potency. *Eur J Pharmacol* **78**:353–356.
93. Riegel A.C., Ali S.F., Torinese S., French E.D. Repeated exposure to the abused inhalant toluene alters levels of neurotransmitters and generates peroxynitrite in nigrostriatal and mesolimbic nuclei in rat. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2004; 1025:543–551. [PubMed: 15542760]
94. Riegel AC, French ED. An electrophysiological analysis of rat ventral tegmental dopamine neuronal activity during acute toluene exposure. *Pharmacology & Toxicology* 1999;85(1):37–43. [PubMed:10426162]
95. Riegel AC, Zapata A, Shippenberg TS, French ED. The abused inhalant toluene increases dopamine release in the nucleus accumbens by directly stimulating ventral tegmental area neurons. *Neuropsychopharmacology* 2007;32(7):1558–1569. [PubMed: 17213847]
96. Ritchie G.D, Rossi J., Nordholm A.F., Still K.R., Carpenter R.L., Wenger G.R., Wright D.W., Effects of repeated exposure to JP-8 jet fuel vapor on learning of simple and difficult operant tasks by rats, *J. Toxicol. Environ. Health* 64 (2001) 385–415.
97. Saldeen T., Johansson O.: The significance of chronic heart disease, fatty liver, and consumption of barbiturate and Librium on the tolerance to ethyl alcohol, as judged in a postmortem series. *J. Forensic Sci.* 12:273-249; 1967.
98. Sepinwall J.; Cook, L.: Behavioral pharmacology of antianxiety drugs. In: Iversen, S. D.; Synder, S. H., eds. *Handbook of psychopharmacology*. Vol.13. New York: plenum Press; 1978:345-393.
99. Scholdfield C.N., 1980. Convulsant antagonize inhibition in the olfactory cortex slice, *Naunyn-Schmiedeb. Arch. Pharmacol* 314, 29.
100. Sharp, C. W., 1992. Introduction of inhalant abuse. In: Sharp, C. W., Beauvais, F., Spence, R. (Eds). *Inhalant abuse. A volatile research agenda*. NIDA Research Monograph 192. NIH Publication No. 93-3480, Institute of drug abuse, Rockville, MD, pp. 1-10.
101. Shepherd R. T., 1989. Mechanism of sudden death associated with volatile substance abuse. *Human Toxicol.* 8, 287-292.

102. Shin C., Pedersen H.B. and McNamara J.O., 1985. γ -Aminobutyric acid and benzodiazepine receptor in the kindling model of epilepsy: A quantitative radiohistochemical study. *J Neurosci* 5:2696-2701.
103. Siegel G. J., Agranoff B. W., Albers R. W., et al. Basic Neurochemistry. Molecular, cellular and medical aspects. Sixth edition. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1999. Imagen disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=bnchm&part=A1181>
104. Silva-Filho A. R., Nogueira M. L., Shiotsuki N.: Anticonvulsant and convulsant effects of organic solvents. *Pharmacol biochem behave*; 41:79-82, 1991.
105. Silvia L. Cruz and Scott E. Bowen, 2008. Neural Mechanism of Action of Drugs of Abuse and Natural Reinforces.
106. Simmonds M.A., 1978. Presynaptic action of γ -aminobutyric acid and some antagonist in a slice preparation of cuneate nucleus, *Br. J. Pharmacol.* 63, 945.
107. Simmonds M.A., 1982. Clasification of some GABA antagonist with regard to site of action and potency in slices of rat cuneate nucleus, *European J. Pharmacol* 80, 347.
108. Sepinwall J.; Cook L. Behavioral pharmacology of antianxiety drugs. In: Iversen S.D.; Snyder S.H., eds. *Handbook of psychopharmacology*. Vol 13. New York: Plenum Press; 1978:345-393.
109. Speth R.C., Wastek G.J., Johnson P.C., and Yamamura H.I. *Life sci*, 23 859-866 (1978).
110. Spreafico R., Mennini T., Danover L., Cagnnato A., Regodini M.C., Miari A., De Blas A., Vergnes M. and Avanzini G., 1993. GABA_A receptor impairment in the genetic absence epilepsy rats from Strasbourg (GAERS): An immunocytochemical and receptor binding autoradiography study. *Epilepsy Res* 15:229_238.
111. Steven M. Paul, GABA and Glycine. Chapter 8, *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*, edited by Floyd E. Bloom and David J. Kupfer. Raven Press, Ltd., New York, 1995.
112. Stoleman I.: Drug of abuse: behavioural principles, methods and terms. *Trends pharmacol Sci*, 13:170-176,1992.

113. Swinyard E.A.: Laboratory assay of clinically effective antiepileptic drugs. J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed. 38:201-204, 1949.
114. Swinyard E.A., Brown W.C. and Goodman L.S.: Comparative assay of epileptic drugs in mice and rats. J.Pharmacol. Exp. Ther. 106:319-330, 1952.
115. Tallman, J. F., Paul S.M., Skolnick P. and Gallager D.W., 1980. Receptors for the age of anxiety: Pharmacology of the benzodiazepines, Science 207, 274.
116. Tardif, R; Plaa, GL; Brodeur, J. (1992) Influence of various mixtures of inhaled toluene and xylene on the biological monitoring of exposure to these solvents in rats. Can J Physio Pharmacol 70:385-395.
117. Tardif, R; Truchon, G; Brodeur, J. (1998) Comparison of hippuric acid and o-cresol in urine and unchanged toluene in alveolar air for the biological monitoring of exposure to toluene in human volunteers. Appl Occup Environ Hyg 13:127-132.
118. Taylor G. J., Harris W. S., 1970. Glue sniffing causes heart block in mice. Science 170, 866-868.
119. Tegeris, J.S., Balster, R.L., 1994. A comparison of the acute behavioral effects of alkylbenzenes using a functional observational battery in mice. Fundamental Appl. Toxicol. 22, 240–250.
120. Tillar, R., Shafer, T.J., Woodward, J.J., 2002. Toluene inhibits voltage-sensitive calcium channels expressed in pheochromocytoma cells. Neurochem. Int. 41, 391–397.
121. Titulaer M.N., Kamphuis W., Pool C.W., Van Heerikhuize J.J and Lopes Da Silva F.H., 1994. Kindling induces time-dependent and regional specific changes in the muscimol binding in the rat hippocampus: A quantitative autoradiographic study. Neuroscience 59:817-826.
122. Turkall, RM; Skowronski, GA; Abdel-Rahman, MS. (1991) Differences in kinetics of pure and soil-adsorbed toluene in orally exposed male rats. Arch Environ Contam Toxicol 20:155-160.
123. United States Environmental Protection Agency (1994) Chemicals in the environment: toluene (CAS NO. 108-88-3). Retrieved August 2001 from Environmental Protection Agency Office of pollution Prevention and Toxics websites. http://www.epa.gov/opptintr/chemfact/f_toluen.txt
124. Verschueren, K. Handbook of environmental data on organic chemicals. Van Nostrand Reinhold Company, New York 1977.

125. Warren, D.A., Bowen, S.E., Jennings, W.B., Dallas, C.E., Balster, R.L., 2000. Biphasic effects of 1,1,1-trichloroethane on the locomotor activity of mice: relationship to blood and brain solvent concentrations. *Toxicol. Sci.* 56, 365–373.
126. Wayne D.Y., Harvey J.K. and Dixon M.W., 1980. Relationship between pentylenetetrazol-induced seizures and brain pentylenetetrazol levels in mice.
127. Wiley J.L., Bale A.S., Balster R.L.: Evaluation of toluene dependence and cross-sensitization to diazepam. *Life Sci*, 72:3023-33, 2003.
128. Wilcosky T. C., Simonsen N. R., 1991. Solvent exposure and cardiovascular disease. *Am. J. Ind. Med.* 19, 569-586.
129. Woodbury D., 1980. Convulsant drugs: Mechanisms of action in: *Antiepileptic drugs: Mechanisms of action*, eds. G.H. Glaser J.K. Penny and D.M Woodbury (Raven Press, New York) p. 249.
130. Wood, R.W., Coleman, J.B., Schuler, R., Cox, C., 1984. Anticonvulsant and antipunishment effects of toluene. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 230, 407–412, 1984).
131. Yanagita T., Takanashi S., Ishida K., Funamoto H.: Voluntary Inhalation of volatile anesthetics and organic solvent by monkey. *Jpn j Clin Pharmacol*, 1:13-16, 1979.
132. Yonekawa W.D., Kupferberg H.J. and Woodbury D.M.: Relationship between pentylenetetrazol-induce seizures and brain pentylenetetrazol levels in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 214:589-593, 1980.
133. Yu O., Ito M., Chiu T.H. and Rosenberg H.C., 1986. GABA-gated chloride ion influx and receptor binding studies in C57BL6J and DBA2J mice. *Brain Res* 399:374-378.