



# UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

---

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

## TESIS

“Efecto de la exposición crónica a tolueno sobre el  
aprendizaje y la memoria en ratas”

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

pQFB JESSICA IVONNE SANDOVAL MEDINA

DIRECTORA DE TESIS:

DOCTORA EN CIENCIAS EN LA ESPECIALIDAD  
EN FARMACOLOGÍA

MARCIA YVETTE GAUTHEREAU TORRES



Morelia, Michoacán Junio 2018

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo del Conacyt (182208)  
Prodep (Fortalecimiento de Cuerpos Académicos, 2016).

## **Agradecimientos**

A mi asesora la Dra. Marcia Yvette Gauthereau Torres por brindarme la oportunidad de acercarme y conocer un poco de lo que es la investigación, por la confianza depositada en mí y en la realización de este proyecto, por sus consejos y apoyo constante en el laboratorio y personalmente.

A mis revisores y sinodales el Dr. Fernando Ortega, el Dr. Daniel Godínez y el Dr. Zurisaddai Hernández por sus observaciones que fueron de gran ayuda, por su tiempo y disposición puestos en este trabajo.

A mis profesores de la facultad, en especial al Q.F.B. Horacio Cerda y Q.F.B. Elvira Ramos por su ayuda en mi formación académica, gracias por permitirme conocerlos de manera un poco más personal, fue un gusto haber sido su alumna.

A mis padres Ma. Angelina Medina y Jesús Sandoval por el apoyo durante todo este tiempo, gracias a ustedes me convertí en la persona que soy ahora.

A mis hermanos Sergio, Erick, Sandra, Christian y Stephanie, por su apoyo a lo largo de estos años, sus consejos, risas y cariño.

A mis amigos Saúl, David, Vince, Andrés, Andrea y Diego por que a pesar de la distancia y el tiempo, cuento con ustedes de manera incondicional.

A mis amigos de la facultad Alberto, Ivonne, Armando y Moisés por el compañerismo, amistad y con los que he compartido grandes momentos.

A mi mejor amigo y compañero Zaid Amaury por todo el apoyo, confianza y cariño que me ha brindado durante todo este tiempo.

## ÍNDICE GENERAL

|                                                               | <i>Pág.</i> |
|---------------------------------------------------------------|-------------|
| Índice de figuras .....                                       | III         |
| Índice de tablas .....                                        | IV          |
| Abreviaturas.....                                             | V           |
| Resumen .....                                                 | VI          |
| Summary .....                                                 | VII         |
| 1. Introducción .....                                         | 1           |
| 1.1. Inhalables .....                                         | 1           |
| 1.2. Clasificación de los inhalables .....                    | 1           |
| 1.2.1. Nitritos de alquilo volátiles .....                    | 1           |
| 1.2.2. Oxido nitroso .....                                    | 2           |
| 1.2.3. Disolventes volátiles, combustibles y anestésicos..... | 2           |
| 1.3. Epidemiología .....                                      | 3           |
| 1.4. Exposición .....                                         | 4           |
| 1.5. Efectos de los inhalables .....                          | 5           |
| 1.6. Tolueno.....                                             | 6           |
| 1.6.1. Propiedades físico-químicas.....                       | 6           |
| 1.6.2. Farmacocinética .....                                  | 7           |
| 1.6.3. Mecanismos de acción .....                             | 7           |
| 1.6.4. Efectos del tolueno sobre la salud.....                | 8           |
| 1.7. Aprendizaje.....                                         | 8           |
| 1.7.1. Procesos de aprendizaje conductual.....                | 9           |
| 1.7.1.1. Aprendizaje asociativo .....                         | 9           |
| 1.7.1.2. Aprendizaje no asociativo .....                      | 10          |
| 1.7.2. Procesos de aprendizaje de habilidades .....           | 10          |
| 1.7.3. Procesos de adquisición de la información.....         | 11          |
| 1.8. Memoria.....                                             | 11          |
| 1.8.1. Sistema de memoria.....                                | 11          |

|                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------|----|
| 1.8.2. Tipos de memoria.....                                      | 12 |
| 1.8.3. Memoria a corto plazo .....                                | 12 |
| 1.8.4. Memoria a largo plazo .....                                | 13 |
| 1.8.4.1. Memoria declarativa o explícita.....                     | 13 |
| 1.8.4.2. Memoria no declarativa o implícita.....                  | 14 |
| 1.8.5. Memoria de reconocimiento .....                            | 15 |
| 1.8.6. Consolidación de la memoria .....                          | 15 |
| 1.8.7. Neuroanatomía de la memoria .....                          | 16 |
| 1.8.8. Bases moleculares de la memoria.....                       | 17 |
| 1.8.8.1. Plasticidad sináptica y potenciación a largo plazo ..... | 17 |
| 1.9. Tolueno y memoria .....                                      | 18 |
| 2. Justificación .....                                            | 22 |
| 3. Hipótesis.....                                                 | 23 |
| 4. Objetivos.....                                                 | 23 |
| 4.1. Objetivo general.....                                        | 23 |
| 4.2. Objetivos específicos .....                                  | 23 |
| 5. Materiales y métodos.....                                      | 24 |
| 5.1. Animales .....                                               | 24 |
| 5.2. Sustancias .....                                             | 24 |
| 5.3. Diseño experimental .....                                    | 24 |
| 5.4. Exposición al disolvente.....                                | 25 |
| 5.5. Prueba de actividad motora espontánea .....                  | 27 |
| 5.6. Prueba de auto aprendizaje (caja de Skinner).....            | 27 |
| 5.7. Prueba de reconocimiento del objeto novedoso .....           | 29 |
| 6. Análisis estadístico de resultados .....                       | 32 |
| 7. Resultados.....                                                | 33 |
| 7.1. Protocolo de memoria.....                                    | 33 |
| 7.2. Protocolo de aprendizaje .....                               | 43 |
| 8. Discusión .....                                                | 51 |
| 9. Conclusiones .....                                             | 62 |
| 10. Referencias.....                                              | 63 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Estructura química del tolueno .....                                                                                                                         | 6  |
| <b>Figura 2.</b> Taxonomía de los sistemas de memoria a largo plazo.....                                                                                                      | 15 |
| <b>Figura 3.</b> Áreas encefálicas asociadas con funciones de aprendizaje y memoria                                                                                           | 16 |
| <b>Figura 4.</b> Cámara de exposición estática .....                                                                                                                          | 26 |
| <b>Figura 5.</b> Caja de Skinner .....                                                                                                                                        | 28 |
| <b>Figura 6.</b> Prueba de reconocimiento del objeto novedoso.....                                                                                                            | 31 |
| <b>Figura 7.</b> Peso corporal de ratas del grupo control y tolueno pre y post tratamiento.<br>.....                                                                          | 33 |
| <b>Figura 8.</b> Prueba de actividad motora pre y post tratamiento en caja del objeto<br>novedoso.....                                                                        | 34 |
| <b>Figura 9.</b> Prueba de actividad motora pre y post tratamiento en campo abierto...                                                                                        | 35 |
| <b>Figura 10.</b> Porcentaje de ratas que aprendieron respuesta condicionante durante<br>los 7 días de prueba (grupo control).....                                            | 36 |
| <b>Figura 11.</b> Porcentaje de ratas que aprendieron respuesta condicionante durante<br>los 7 días de prueba (grupo tolueno).....                                            | 36 |
| <b>Figura 12.</b> Número de respuestas condicionantes pre y post tratamiento .....                                                                                            | 37 |
| <b>Figura 13.</b> A) Exploración del objeto familiar y novedoso pre tratamiento (1h). B)<br>Índice de reconocimiento del grupo control y tolueno pre tratamiento (1h) .....   | 38 |
| <b>Figura 14.</b> A) Exploración del objeto familiar y novedoso pre tratamiento (24h). B)<br>Índice de reconocimiento del grupo control y tolueno pre tratamiento (24h) ..... | 40 |
| <b>Figura 15.</b> A) Exploración del objeto familiar y novedoso post tratamiento (1h). B)<br>Índice de reconocimiento del grupo control y tolueno post tratamiento (1h) ..... | 41 |

|                                                                                                                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 16.</b> A) Exploración del objeto familiar y novedoso post tratamiento (24h). B) Índice de reconocimiento del grupo control y tolueno post tratamiento (24h) ..... | 42 |
| <b>Figura 17.</b> Peso corporal de ratas pre y post tratamiento (grupo control y tolueno) .....                                                                              | 43 |
| <b>Figura 18.</b> Prueba de actividad motora pre y post tratamiento en caja del objeto novedoso.....                                                                         | 44 |
| <b>Figura 19.</b> Porcentaje de ratas que aprendieron respuesta condicionante en los 7 días de prueba (grupo control) .....                                                  | 45 |
| <b>Figura 20.</b> Porcentaje de ratas que aprendieron respuesta condicionante en los 7 días de prueba (grupo tolueno) .....                                                  | 46 |
| <b>Figura 21.</b> Numero de respuestas condicionantes del grupo control y tolueno ....                                                                                       | 47 |
| <b>Figura 22.</b> A) Exploración del objeto familiar y novedoso (1h). B) Índice de reconocimiento del grupo control y tolueno (1h).....                                      | 48 |
| <b>Figura 23.</b> A) Exploración del objeto familiar y novedoso (24h). B) Índice de reconocimiento del grupo control y tolueno (24h).....                                    | 59 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|                                                         |   |
|---------------------------------------------------------|---|
| Compuestos químicos en productos comunes de abuso ..... | 3 |
|---------------------------------------------------------|---|

## ABREVIATURAS

|        |                                                               |
|--------|---------------------------------------------------------------|
| CR     | Respuesta condicionada                                        |
| CS     | Estimulo condicionado                                         |
| e.e.   | Error estándar                                                |
| i.p.   | Intraperitoneal                                               |
| LPO    | Productos de peroxidación lipídica                            |
| LTP    | Potenciación a largo plazo                                    |
| m      | Metro                                                         |
| min    | Minuto                                                        |
| NCAM   | Moléculas de adhesión celular neuronal                        |
| NMDA   | N-metil D-Aspartato                                           |
| NMDAr  | Receptor N-metil D-Aspartato                                  |
| NOM    | Norma Oficial Mexicana                                        |
| PN     | Posnatal                                                      |
| ppm    | Partes por millón                                             |
| RT-PCR | Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa |
| SNC    | Sistema Nervioso Central                                      |



## RESUMEN

Los inhalables de abuso son sustancias volátiles a temperatura ambiente que son auto administrados para producir un estado alterado de conciencia. El abuso de estas sustancias se considera un problema de salud pública. Dentro de los inhalables se encuentran los disolventes volátiles, siendo el tolueno el prototipo de este grupo. El tolueno es el principal constituyente del "thinner" y está presente en otros productos de uso común como pinturas, lacas, esmaltes y productos de limpieza. Se ha documentado que el uso deliberado de tolueno tiene repercusiones en múltiples sistemas en el cuerpo sin embargo, el sistema nervioso central es más susceptible a los efectos tóxicos del tolueno. Entre los efectos sobre el SNC se pueden mencionar la leucoencefalopatía, cambios en las estructuras cerebrales, disfunción neuronal, deterioro cognitivo, deterioro de la memoria y déficit en el aprendizaje. Actualmente no es completamente conocido el mecanismo de acción del tolueno, estudios con receptores recombinantes mostraron que el tolueno inhibe de manera no competitiva al receptor NMDA que se cree que contribuye a muchos de los efectos ocasionados por el tolueno ya que el NMDAr juega un papel importante en los procesos de aprendizaje y memoria. El propósito del presente estudio fue investigar el efecto de la inhalación crónica de tolueno sobre la memoria a largo plazo de tipo no declarativa así como la memoria a corto y largo plazo (declarativa) en ratas. Se realizaron dos protocolos uno para evaluar memoria y otro para evaluar aprendizaje, para ello se emplearon pruebas de actividad motora, pruebas de auto aprendizaje en la cámara condicionante de Skinner y pruebas de reconocimiento de objeto novedoso. Las concentraciones de tolueno empleadas fueron de 4000 y 6000 ppm respectivamente. Se observó que el tolueno no tuvo efecto sobre la memoria de tipo no declarativa en las ratas. Por otro lado, se observó un déficit en el aprendizaje de las ratas en la prueba de auto aprendizaje y pérdida de la memoria a largo plazo (declarativa) en la prueba de reconocimiento del objeto novedoso. El tolueno no tuvo repercusiones en la actividad motora de las ratas en ambos protocolos.

**Palabras clave:** Inhalables / Skinner / Objeto novedoso / Actividad motora /

Tolueno

## SUMMARY

Inhalants of abuse are volatile substances at room temperature that are self-administered to produce an altered state of consciousness. The abuse of these substances is considered a public health problem. Among the inhalants are volatile solvents, being toluene the prototype of this group. Toluene is the main constituent of the "thinner" and is present in other commonly used products such as paints, lacquers, enamels and cleaning products. It has been documented that the deliberate use of toluene has repercussions on multiple systems in the body however, the central nervous system is more susceptible to the toxic effects of toluene. Among the effects on the CNS, leukoencephalopathy, changes in brain structures, neuronal dysfunction, cognitive deterioration, memory impairment and learning deficit can be mentioned. Currently the mechanism of action of toluene is not completely known, studies with recombinant receptors showed that toluene non-competitively inhibits the NMDA receptor that is believed to contribute to many of the effects caused by toluene since NMDAr plays an important role in the processes of learning and memory. The purpose of the present study was to investigate the effect of chronic toluene inhalation on long-term memory of non-declarative type as well as short and long-term memory (declarative) in rats. Two protocols were carried out to assess memory and another to evaluate learning, for which motor activity tests were used, self-learning tests in the Skinner conditioning chamber and novel object recognition tests, the concentrations used were 4000 and 6000 ppm respectively. It was observed that toluene had no effect on memory in the rats in the case of the first protocol. However, in the second protocol there was a deficit in the learning of the rats and loss of long-term memory (declarative) in the test of recognition of the novel object. While in the motor activity tests, toluene produced no effect.

**Key words:** Inhalants / Skinner / Novel object / Motor activity / Toluene

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Inhalables

Los inhalables de abuso se definen como aquellas sustancias volátiles a temperatura ambiente que son auto administradas en forma de gases o vapores para producir un estado alterado de conciencia (Balster *et al.*, 2009).

Dentro de este grupo se encuentran sustancias muy distintas entre sí, que únicamente comparten la vía de administración y el hecho de ser utilizadas como drogas de abuso (Páez-Martínez *et al.*, 2003).

La mayoría de estas sustancias se encuentran en productos comunes del hogar, son de disposición legal, relativamente baratas y se pueden presentar como gases, líquidos, aerosoles o en algunos casos sólidos (Balster *et al.*, 2009).

### 1.2. Clasificación de los inhalables

Existen muchas maneras de clasificar a los inhalables; por su estructura química, por su uso comercial, etc., pero esto no es útil para fines científicos. Sería ideal poder clasificarlos con base a sus perfiles farmacológicos y sus efectos en el comportamiento. Esto no resulta tan fácil ya que no se cuenta con el completo conocimiento de las similitudes y diferencias entre los efectos de los inhalables de abuso. Sin embargo se puede partir de los siguientes tres grupos (Balster, 1998; Balster *et al.*, 2009):

- a) Nitritos de alquilo volátiles
- b) Óxido nitroso
- c) Disolventes volátiles, combustibles y anestésicos

#### 1.2.1. Nitritos de alquilo volátiles

El nitrito de amilo es el prototipo de este grupo. Este compuesto ha sido utilizado como tratamiento médico de la angina de pecho, posteriormente fue remplazado por la nitroglicerina y otros nitritos orgánicos. Su abuso comenzó en los años 60's por usuarios llamados “poppers” (Balster, 1998).

Debido a su abuso, la disponibilidad del nitrito de amilo se redujo en Estados Unidos en 1968, esto dio lugar a que pequeñas compañías desarrollaran alternativas para comercializar productos de manera legal en pequeños establecimientos, estos productos (incienso líquido, fragancias) contenían nitrito de butilo. Estos compuestos fueron utilizados para intensificar las relaciones sexuales entre homosexuales. El uso y abuso de estos compuestos se basa en su capacidad vasodilatadora y relajante del musculo liso (Balster, 1998).

### **1.2.2. Óxido nítrico**

El óxido nítrico también conocido como "gas de la risa", es usado como anestésico en las cirugías dentales. Es un gas estable, químicamente inerte, bacteriostático, que no deja sabor ni olor por lo que también se usa en latas de crema batida de forma presurizada. Otras de las aplicaciones del óxido nítrico puede ser en la industria petrolera para rastrear fugas o en automóviles para acelerar la combustión (vanAmsterdam *et al.*, 2015).

Se ha encontrado que el óxido nítrico produce un perfil único de efectos que son similares a los producidos por los estimulantes, depresores y alucinógenos (Balster, 1998).

### **1.2.3. Disolventes volátiles, combustibles y anestésicos**

Los disolventes volátiles, combustibles y anestésicos son el grupo más grande y químicamente diverso de los inhalables de abuso (Balster, 1998).

Entre los combustibles se encuentra el butano y propano, estos compuestos están presentes en los encendedores de cigarrillos, tanques de gas y gasolina, esta última a su vez contiene una compleja mezcla de compuestos alifáticos e hidrocarburos aromáticos. Por otro lado el abuso de los anestésicos probablemente comenzó con el éter y continúa con algunos anestésicos contemporáneos (Balster, 1998).

Los disolventes volátiles constituyen un grupo de sustancias ampliamente utilizados en la industria (King, 1982), además se pueden encontrar en productos

del hogar o en productos comerciales teniendo como constituyentes el tolueno, n-hexano, clorohidrocarburos o benceno, entre otros (tabla 1) (Brouette y Anton, 2001).

**Tabla 1.** Compuestos químicos en productos comunes de abuso (Modificada de Bowen, 2006).

| Categoría (y ejemplos)                                                                                                                            | Compuestos químicos más abundantes                                                                                                          |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Adhesivos (pegamentos, cemento líquido).                                                                                                          | Acetona, acetato de etilo, hexano, cloruro de metilo, metil etil cetona, tolueno, xileno, tricloroetileno, tolueno.                         |
| Aerosoles (pinturas en spray, desodorantes, aromatizantes, spray para el cabello, etc).                                                           | Butano, nitritos de butilo/isobutilo, fluorocarbonos, hidrocarburos, tolueno, propano.                                                      |
| Agentes limpiadores (desengrasantes, limpiadores para lavado en seco, limpiadores de electrónicos, removedores de manchas).                       | Nitrato de amilo, tolueno, tricloroetileno, tricloroetano, tetracloroetileno.                                                               |
| Solventes (correctores líquidos, extintor de incendios, combustible de gas, removedores de esmalte de uñas, encendedores, diluyentes de pintura). | Acetona, bromoclorodifluorometano, butano, acetato de etilo, isopropano, etano, cloruro de metilo, tricloroetano, tricloroetileno, tolueno. |
| Gasolina y combustibles embotellados.                                                                                                             | Hidrocarburos alifáticos y aromáticos, benceno, butano, etanol, tolueno, freón, metanol, propano.                                           |

### 1.3. Epidemiología

Los inhalables de abuso son utilizados por un gran número de personas en todo el mundo. Se ha demostrado que el uso de inhalables durante la adolescencia puede llegar a ser un factor de riesgo para el uso continuado de drogas ilícitas. Datos recolectados de varios países indican que el abuso de inhalables es un problema que afecta a toda la sociedad (Bowen *et al.*, 2006).

En México, el abuso de inhalables se ha documentado desde la década de 1960, siendo los disolventes los de mayor preferencia entre los usuarios (Villatoro *et al.*, 2011).

Según la Encuesta Nacional de Consumo de Drogas en Estudiantes (2014) se observa que la marihuana ocupa el primer lugar (12.9% en los hombres y 8.4% en las mujeres), seguido por los inhalables (5.9% hombres y 5.8% mujeres) y en tercer lugar los tranquilizantes (3.2% hombres y 4.3% en las mujeres) en prevalencia total de consumo. Además, los inhalables presentan una alta prevalencia hacia los 14 años de edad (7.9%) y su consumo se mantiene en general constante en los diferentes grupos de edad (ENCODE, 2014).

#### **1.4. Exposición**

Los seres humanos pueden entrar en contacto con los inhalables de manera ocupacional, voluntaria o accidental (Cruz *et al.*, 2000).

La exposición ocupacional se refiere a la presencia crónica de bajos niveles de inhalables en el lugar de trabajo durante largos periodos (6 horas o más). Algunos ejemplos incluyen los pintores, cosmetólogos, histólogos y trabajadores de refinería, en donde las concentraciones oscilan entre 100 ppm a varios miles de ppm dependiendo del disolvente (Bowen, *et al.*, 2006).

La exposición accidental se da en el hogar, en la escuela o simplemente cuando se llena el coche con gasolina. Los individuos pueden estar expuestos a bajas concentraciones, pero estas actividades generalmente no conllevan riesgos para la salud cuando se realizan en áreas bien ventiladas (Cruz *et al.*, 2014).

La exposición a inhalables de manera voluntaria puede presentarse de diferentes maneras tales como: "sniffing" o "snorting" (inhalar vapores de contenedores), "huffing" (respiración a través de un paño empapado de disolvente), "bagging" (olfatear o inhalar vapores de sustancias depositadas en una bolsa), rociar aerosoles directamente dentro de la boca o inhalando globos llenos de óxido nítrico (NIDA, 2012).

Durante una "sesión" se estima que las concentraciones de los disolventes van de 3000 hasta 15000 ppm los cuales se producen en un periodo de tiempo corto (10-15 minutos) (Bowen *et al.*, 2007; Duncan y Lawrence, 2013).

### 1.5. Efectos de los inhalables

A excepción de los nitritos, los inhalables actúan como depresores del sistema nervioso central teniendo un efecto bifásico en el comportamiento, con estimulación y desinhibición a bajas concentraciones seguido por depresión a altas concentraciones (Williams, *et al.*, 2007; Dinwindie, 1994).

Un efecto secundario del uso intenso o sostenido del óxido nitroso es la inactivación de la vitamina B12 resultando en una deficiencia funcional de la vitamina y causando inicialmente entumecimiento de los dedos, lo que puede avanzar a una neuropatía periférica y anemia megaloblástica (vanAmsterdam *et al.*, 2015).

La intoxicación por inhalables es similar a la intoxicación por etanol, puede estar acompañado de incoordinación muscular, diplopía, lenguaje mal articulado, ataxia, desorientación, dolor de cabeza, dolor abdominal, náusea o vómito, tinnitus e hipersalivación. También puede desarrollar brevemente delirios o alucinaciones que pueden ser visuales, auditivas o táctiles (Dinwindie, 1994; Brouette y Anton, 2001).

Estudios realizados con "niños de la calle" de México y Brasil, con antecedentes de abuso de inhalables, reportaron haber experimentado un efecto supresor en el apetito posterior a la exposición de estas sustancias, sin embargo algunos otros reportaron haber tenido un efecto contrario (Gigengack, 2014).

Existen reportes epidemiológicos y clínicos que indican que la exposición a altas concentraciones de inhalables puede ocasionar muerte súbita a consecuencia de una arritmia cardíaca aguda (Bale *et al.*, 2005).

El abuso crónico, especialmente durante la adolescencia, es relacionado a la alteración de la función cognitiva, disminución en el coeficiente intelectual, ansiedad, síntomas de depresión, e incremento en la impulsividad. (Duncan y Lawrence, 2013).

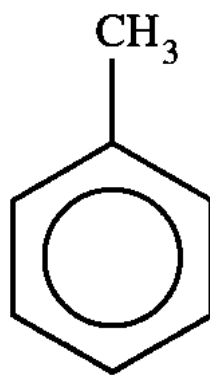
## 1.6. Tolueno

El tolueno (toluol, metilbenceno, fenilmetano) es un hidrocarburo aromático y disolvente orgánico, ubicuo en sociedades de todo el mundo ya que se encuentra en muchos ambientes ocupacionales y en numerosos productos para el hogar. Este disolvente es ampliamente utilizado en muchos procesos industriales incluyendo la producción de plástico, síntesis química, fabricación de gasolina, industrias de limpieza en seco, agente de limpieza y secado en las industrias de caucho y madera y aviación. (Filley *et al.*, 2004; Cruz, *et al.*, 2014).

Es componente de muchas pinturas, lacas, colas, adhesivos, tintas y limpiadores, es además el principal componente del "thinner" (60-70%) (Filley, *et al.*, 2004; Baydas *et al.*, 2005).

### 1.6.1. Propiedades físico-químicas

El tolueno es un líquido transparente e incoloro con un olor distintivo (ATSDR, 2015). La estructura química del tolueno se presenta en la fig. 1. El tolueno es más ligero que el agua en su forma líquida, pero tres veces más pesado que el aire como vapor. Su coeficiente de partición octanol/agua = 2.73, por lo que tiene alta afinidad por los lípidos, es inflamable con un punto de inflamación bajo, la temperatura más baja a la que puede vaporizarse para formar una mezcla inflamable en aire es de 4.4 ° C. (Cruz *et al.*, 2014)



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



### 1.6.2. Farmacocinética

El tolueno se absorbe a través de los pulmones, el tracto gastrointestinal y en menor proporción por la piel y mucosas (Cohr y Stokholm, 1979; ASTDR, 2015), es distribuido a los tejidos ricos en lípidos y altamente irrigados como el cerebro en donde puede atravesar la barrera hematoencefálica (Cruz et al., 2014; ASTDR, 2015).

Los hidrocarburos aromáticos como el tolueno tienden a ser metabolizados por vía hepática mediante la conversión a ácido benzoico por dos enzimas; alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa. El ácido benzoico se conjuga entonces con glicina para formar ácido hipúrico (80%) o ácido glucorónico para formar benzoilglucuronido (20%), ambos son solubles en agua y fácilmente eliminados a través de los riñones a las 12 horas posteriores a la exposición. El ácido hipúrico se utiliza como marcador biológico tanto en la sangre como en la orina. (Dinwinddie, 1994; Filley et al, 2004; Hannigan y Bowen, 2009).

### 1.6.3. Mecanismo de acción

Anteriormente se creía que los efectos de los disolventes orgánicos como el tolueno se debían a cambios inespecíficos en la fluidez membranal, sin embargo ahora es conocido que se debe a un complejo mecanismo de acción que involucra varios sistemas de neurotransmisión (Páez-Martínez et al., 2003).

El tolueno tiene efectos sobre varios canales iónicos activados por ligando. Al igual que el etanol, el tolueno parece ser antagonista no competitivo del receptor NMDA; varios subtipos de receptores NMDA como NR1 y NR2B han sido identificados como los más sensibles a los efectos inhibidores del tolueno (Cruz et al., 2000; Bowen, 2009).

Se ha demostrado que la exposición prolongada al tolueno aumenta los niveles de receptores NMDA, que es similar a los reportes de exposición prolongada al etanol. Además el tolueno aumenta la función de canales iónicos inhibidores (GABA y glicina) y bloquea canales de sodio cardíaco recombinante y nativo. Al igual que

otras drogas de abuso, el tolueno modula la transmisión de dopamina, acción que está relacionada con sus efectos gratificantes (Bowen, 2009).

#### **1.6.4. Efectos del tolueno sobre la salud**

El sistema nervioso central es el sistema más vulnerable en el cuerpo a los efectos tóxicos de los inhalables, especialmente en personas que están expuestas de manera crónica. (Kurtzma *et al.*, 2001).

Los efectos en el sistema nervioso pueden presentarse por periodos temporales, como dolores de cabeza, mareos, somnolencia o inconsciencia. Sin embargo, los efectos como la falta de coordinación, el deterioro cognitivo, pérdida de la visión y de la audición pueden llegar a ser permanentes con la exposición repetida y a altas dosis, asociadas al abuso deliberado del disolvente (ASTDR, 2015).

La exposición a niveles altos de tolueno durante el embarazo puede conducir a una embriopatía también referida como "síndrome fetal por disolventes" cuyas características incluyen microencefalia, malformación cerebral, anomalías craneofaciales particulares, retraso en las capacidades mentales y de crecimiento en los niños (Chien *et al.*, 2005; ASTDR, 2015).

Estudios con animales han demostrado que el tolueno puede producir incoordinación motora, hipotermia, déficit en el aprendizaje y deterioro de la memoria (Hougaard *et al.*, 1999; Chan *et al.*, 2012; Win-Shwe *et al.*, 2010)

### **1.7. Aprendizaje**

Llamamos aprendizaje a los procesos por los cuales la conducta varía y se modifica a lo largo del tiempo, adaptándose a los cambios que se producen en el entorno. Los tipos de aprendizaje pueden variar entre especies desde procesos elementales hasta otros más complejos, por ejemplo, el aprendizaje del lenguaje en nuestra especie (Aguado-Aguilar, 2001).

Se puede distinguir tres grandes variedades de procesos de aprendizaje según el tipo de contenido de información: procesos de aprendizaje conductual, procesos de aprendizaje de habilidades y los procesos de adquisición de información (Aguado-Aguilar, 2001).

### **1.7.1. Proceso de aprendizaje conductual**

En esta categoría se distingue el aprendizaje asociativo y el aprendizaje no asociativo (Aguado-Aguilar, 2001).

#### **1.7.1.1. Aprendizaje asociativo**

La asociación es un mecanismo que permite la modificación de la conducta y la adquisición de conocimiento, en este sentido resulta fundamental para el aprendizaje y la memoria. Por otro lado la asociación también es un importante principio organizador de la memoria. (Aguado-Aguilar, 2001).

Para que el aprendizaje asociativo tenga lugar, dos estímulos o un estímulo y una respuesta deben ser temporalmente asociados (Kandel *et al.*, 1982).

Podemos diferenciar entre condicionamiento clásico o pavloviano y condicionamiento operante o instrumental (Machado *et al.*, 2008).

El condicionamiento pavloviano recibe este nombre porque fue inicialmente descrito por Pavlov, es la forma de aprendizaje asociativo que permite a los animales aprender a anticiparse a sucesos biológicamente relevantes mediante estímulos condicionados e incondicionados (Machado *et al.*, 2008).

El condicionamiento operante también conocido como aprendizaje instrumental o por ensayo y error, implica la relación entre la conducta de un organismo y la consecuencia de dicha conducta. Se caracteriza por que los organismos emiten espontáneamente un número indeterminado de respuestas, a estas respuestas, que forman parte de su repertorio conductual (caminar, emitir sonidos, etc.) se les denomina “operantes”. Si alguna de estas respuestas es seguida de algún evento o estímulo favorable, entonces esa conducta tenderá a repetirse. Al estímulo favorable se le llama reforzador (Solís *et al.*, 2009).

### **1.7.1.2. Aprendizaje no asociativo**

La habituación y la sensibilización forman parte del aprendizaje no asociativo, la primera se entiende como la reducción de la respuesta ante un estímulo que ha sido presentado repetidas veces que, por no ser significativo conduce a ignorarlo (Machado *et al.*, 2008 Solís *et al.*, 2009).

La sensibilización se define como la respuesta aumentada ante un estímulo nocivo que al ser presentado repetidas veces, no solo responde a este estímulo sino también a otros, incluso inocuos (Byrne y Hawkins, 2015).

### **1.7.2. Proceso de aprendizaje de habilidades**

Esta categoría engloba distintas formas de adquisición de diferentes tipos de habilidades o destrezas, es decir, “procedimientos” más o menos complejos que se aplican de manera rutinaria (Aguado-Aguilar, 2001).

Estos procedimientos se refieren a 3 ámbitos: el motor, el perceptivo y el ámbito cognitivo. El primero motor consiste en diferentes procesos de adquisición de destrezas o habilidades motoras, que pueden ser simples hasta más complejas como tocar el piano. El aprendizaje perceptivo, a través de la experiencia repetida de estímulos complejos, posibilita la adquisición de destrezas discriminativas entre estímulos que inicialmente aparecen muy similares por ejemplo los especialistas que pueden diferenciar entre olor, sabor y color de distintos tipos de vino en comparación con una persona que no está entrenada (Aguado-Aguilar, 2001).

Los procedimientos u operaciones mentales que aplicamos constantemente y sin esfuerzo aparente son también resultado del aprendizaje. La adquisición de reglas sintácticas de lenguaje o habilidades aritméticas y lógicas, son ejemplos de destrezas cognitivas que una vez adquiridas forman parte del arsenal de recursos mentales mediante los cuales comprendemos la realidad y razonamos acerca de ella (Aguado-Aguilar, 2001).

### **1.7.3. Procesos de adquisición de la información**

Los procesos de adquisición de información pueden ser múltiples. Nuestro cerebro absorbe constantemente una gran cantidad de información del medio ambiente o entorno y generan un conocimiento objetivo del mundo. Un ejemplo puede ser la información de las experiencias personales, que suelen estar unidos al contexto de tiempo y espacio y que generan un tipo específico de memoria (Aguado-Aguilar, 2001).

## **1.8. Memoria**

### **1.8.1. Sistema de memoria**

“La memoria es la capacidad de retener y de evocar eventos del pasado mediante procesos neurobiológicos de almacenamiento y de recuperación de la información básica en el aprendizaje y en el pensamiento”. El sistema de la memoria está integrado por los siguientes procesos básicos (Etchepareborda y Abad-Mas, 2005)

**Codificación de la información.** La codificación o adquisición, es el proceso en donde se prepara la información para que se pueda guardar. La información puede codificarse como una imagen, sonidos, experiencias, acontecimientos o ideas significativas. Las circunstancias que rodean este momento resultan fundamentales para el éxito o fracaso de la memoria. La atención, concentración y el estado emocional son importantes en este proceso inicial (Weinberger, 2015)

**Almacenamiento de la información.** Esta etapa se caracteriza por el ordenamiento y categorización de la información. Una vez que se codifica la experiencia y se almacenada por cierto tiempo, esta se presenta de manera automática. El almacenamiento es un sistema complejo y dinámico que cambia con las experiencias a las que el sujeto es expuesto (Etchepareborda y Abad-Mas, 2005).

**Evocación o recuperación de la información.** Es el proceso por el cual recuperamos la información. Si ésta ha sido bien almacenada y clasificada será más

fácil localizarla y utilizarla en el momento en que se solicita (Etchepareborda y Abad-Mas, 2005).

### **1.8.2. Tipos de memoria**

En la actualidad los sistemas de clasificación de memoria pueden abarcar una gran diversidad de términos para referirse a distintas variedades, características o niveles de procesos mnésicos, por lo que en la literatura especializada se puede encontrar conceptos que llegan a hacer confusa la conceptualización integral de la memoria y sus distintos componentes (Carrillo-Mora, 2010).

La memoria se clasifica según su contenido en memoria explícita e implícita, sin embargo la clasificación mas común entre los diferentes sistemas de memoria se basa en la distinción de la memoria a corto plazo y largo plazo, es decir, por su duración.(Izquierdo *et al.*, 1999; Aguado-Aguilar, 2001).

### **1.8.3. Memoria a corto plazo**

La memoria a corto plazo es un sistema que mantiene temporalmente la información reciente, abarca las que se conocen como memoria inmediata, primaria, operacional, activa o de trabajo (Aguado-Aguilar, 2001; Solís *et al.*, 2009).

La memoria inmediata está relacionada con lo que se le denomina registro sensorial, está vinculada a la información que no ha sido procesada y que viene de los sentidos. La memoria sensorial puede retener representaciones efímeras de prácticamente todo lo que vemos, oímos, gustamos, olemos o sentimos (Etchepareborda y Abad-Mas, 2005).

La memoria de trabajo consiste en la representación consciente y manipulación temporal de la información necesaria para realizar operaciones cognitivas complejas, como el aprendizaje, la comprensión del lenguaje o el razonamiento. Sin embargo este tipo de memoria es limitada y puede estar susceptible a interferencias (Kent, 2016)

Esta memoria está conformada por un componente ejecutivo central y dos sistemas subsidiarios: el circuito fonológico (encargado entre otras cosas del reforzamiento verbal implicado en el aprendizaje del lenguaje) y el esquema visuo-espacial que estaría encargado del almacenamiento transitorio de la información espacial del ambiente externo (Etchepareborda y Abad-Mas, 2005; Morgado *et al.*, 2005).

#### **1.8.4. Memoria a largo plazo**

Este tipo de memoria retiene información durante un tiempo variable que puede ser desde minutos hasta tiempos ilimitados (White, 2003). Se subdivide en memoria declarativa o explícita y memoria no declarativa o implícita.

##### **1.8.4.1. Memoria declarativa o explícita.**

Se habla de memoria explícita cuando el sujeto recuerda deliberadamente un episodio, no solo emplea información anteriormente adquirida sino que es consciente de estar haciéndolo y es capaz de dar numerosos detalles relativos a la adquisición de esa información, se habla a veces de memoria declarativa porque puede ser "declarada" o expresada conscientemente en propósitos verbales. Además, la memoria declarativa se adquiere con relativamente pocas exposiciones al material que se debe aprender. Este tipo de memoria se subdivide en memoria semántica y episódica (Aguado-Aguilar, 2001; Winters *et al.*, 2008).

La memoria semántica también denominada como genérica o de hechos particulares, es la información sobre las características y atributos que definen los conceptos, así como los procesos que permiten su recuperación de forma eficiente para su utilización en el pensamiento y el lenguaje, no involucra ninguna estructura de eventos o ubicación témporo-espacial, es decir, es independiente del contexto; un ejemplo de este tipo de memoria serían los datos concretos que memorizamos como cifras, nombres de objetos, fechas, etc. (Carrillo-Mora, 2010)

La memoria episódica también referida como memoria autobiográfica es aquella que contiene información de los sucesos experimentados de forma personal, es dependiente del contexto, esto significa que los recuerdos de

experiencias personales van unidos al contexto temporal y espacial en que tales experiencias se han vivido. A diferencia de la memoria semántica que resulta de la repetición y acumulación progresiva de la información, la memoria episódica se adquiere de un único “ensayo”, es decir, este tipo de conocimiento se refiere a episodios únicos (Aguado-Aguilar, 2001).

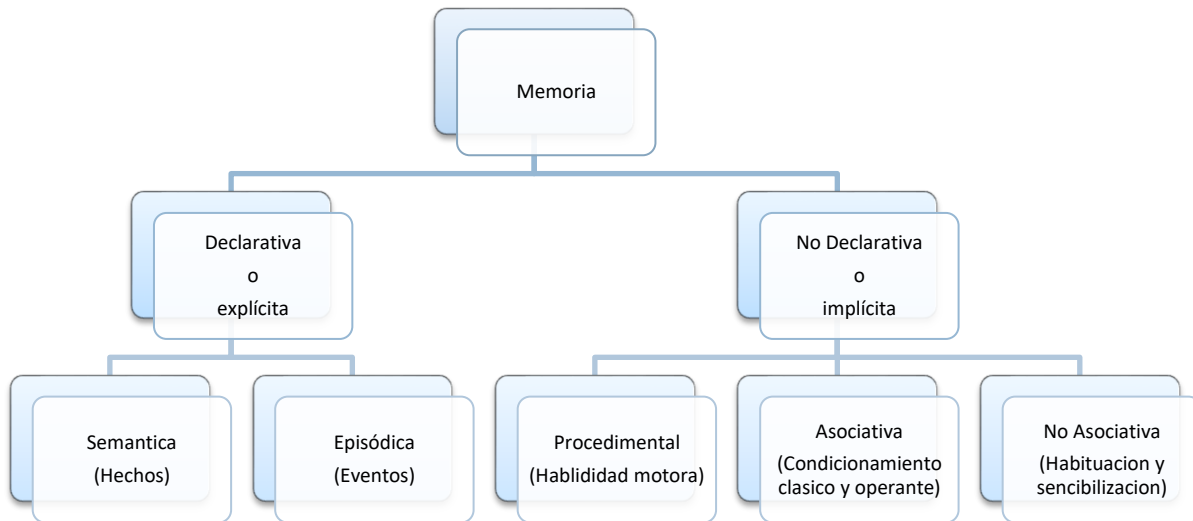
#### **1.8.4.2. Memoria no declarativa o implícita**

La memoria implícita o no declarativa es la que se manifiesta conductualmente sin que el sujeto sea capaz de describir la información que utiliza y sin necesidad que sea consiente ni siquiera del hecho de que anteriormente adquirió esa habilidad (Aguado-Aguilar, 2001).

Se subdivide en memoria procedimental, no asociativa y asociativa; la memoria implícita suele ser rígida y duradera, derivada de tipos de aprendizaje básico y filogenéticamente antiguos como habituación o sensibilización, aprendizaje perceptivo y motor, aprendizaje asociativo y no asociativo. La memoria procedimental se refiere al almacenamiento y recuperación de información de habilidades motoras, es decir, “saber cómo hacer” distintas tareas (Aguado-Aguilar, 2001).

Diversos personajes han estudiado diversas formas implícitas de la memoria empleando un tipo particular de aprendizaje (aprendizaje asociativo) que se diferencian a su vez en dos: condicionamiento clásico (asociación repetida entre un estímulo y una respuesta) y condicionamiento operante (asociación entre un estímulo y una conducta) (Carrillo-Mora, 2010).





**Figura 2.** Taxonomía de los sistemas de memoria a largo plazo (Modificado de Squire, 1992).

### 1.8.5. Memoria de reconocimiento

Durante el reconocimiento ocurren dos tipos de experiencias subjetivas, uno es el sentido de familiaridad, que se experimenta rápidamente y varía desde una intuición débil a una creencia convincentemente fuerte. La otra es el recuerdo el cual implica la recuperación de asociaciones cualitativas impulsadas por una clave crítica. La evidencia de estudios neuropsicológicos, de neuroimagen y neurofisiológicos en humanos, monos y ratas indican que las diferentes regiones del lóbulo medial temporal hacen contribuciones distintas al recuerdo y la familiaridad (Eichenbaum *et al.*, 2007)

### 1.8.6. Consolidación de la memoria

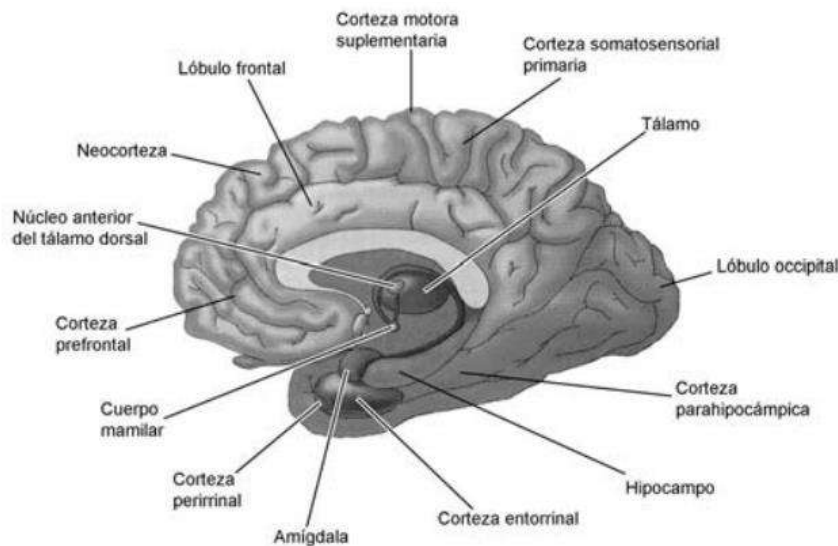
En una situación de aprendizaje, la memoria no está completamente fija o codificada en ese momento, más bien permanece en una forma lábil durante un cierto periodo de tiempo, este periodo puede durar minutos u horas y puede ser susceptible a modificaciones positivas o negativas hasta que se consolida (Brioni, 1993).

El proceso de consolidación de la memoria se puede contemplar como un proceso de consolidación múltiple que tiene lugar en diferentes circuitos cerebrales

y en diferentes momentos después de la experiencia del aprendizaje. Las neuronas gabaérgicas de áreas cerebrales como la corteza, la amígdala, el tabique y el hipocampo pueden modular críticamente la actividad eléctrica de estas áreas durante el proceso de consolidación múltiple del almacenamiento de la memoria (Brioni, 1993).

### 1.8.7. Neuroanatomía de la memoria

Los estudios experimentales y clínicos han permitido la comprensión de la neuroanatomía funcional de la memoria; estructuras cerebrales como el hipocampo, el tálamo, la amígdala del lóbulo temporal, los cuerpos mamilares, el cerebelo, entre otras, están involucradas en la formación, el almacenamiento y la recuperación de diferentes tipos de memoria (White, 2003; Solís *et al.*, 2009).



**Figura 3.** Áreas encefálicas asociadas con funciones de aprendizaje y memoria (Solís *et al.*, 2009)

Se ha demostrado que los sistemas de memoria están distribuidos en circuitos neuronales corticales específicos.

El buen funcionamiento de la memoria de trabajo depende de las áreas sensoriales primarias, del lóbulo prefrontal, núcleo dorso-mediano tálamo y neocórtex (Solís *et al.*, 2009).

La memoria episódica depende de la integridad del hipocampo, giro dentado o circunvolución dentada, de la amígdala y núcleos talámicos. Para la memoria no declarativa o implícita, las áreas cerebrales relacionadas son: el hipocampo, ganglios basales y el cerebelo, entre otras (Solís *et al.*, 2009).

El hipocampo también es importante para la memoria de reconocimiento, siendo más crítico para el recuerdo que para la familiaridad. La corteza parahipocámpica también contribuye al recuerdo, posiblemente a través de la representación y la recuperación de información contextual (especialmente espacial), mientras que la corteza perirrenal contribuye y es necesaria para el reconocimiento basado en la familiaridad (Eichenbaum *et al.*, 2007).

Las lesiones en las cortezas perirrenal, parahipocámpica y entorrinal producen una mayor deficiencia en el almacenamiento de memoria y el reconocimiento de objetos, que las lesiones selectivas al hipocampo (Warrington *et al.*, 1994; Solís *et al.*, 2009).

### **1.8.8. Bases moleculares de la memoria**

#### **1.8.8.1. Plasticidad sináptica y potenciación a largo plazo**

Durante el desarrollo del cerebro, los axones que se encuentran en crecimiento deben reconocer y establecer conexiones con las neuronas postsinápticas apropiadas para establecer los circuitos neuronales funcionales que median el comportamiento animal. Una vez que estos circuitos sinápticos se establecen, pueden sufrir modificaciones incluyendo la adición o supresión de sinapsis, o la alteración de las sinapsis preexistentes. Esta capacidad de cambio, denominada plasticidad sináptica, representa la capacidad del sistema nervioso para codificar y representar los cambios en el entorno, es decir, la capacidad de aprender y recordar. (Murasugi y Schuman, 1999).

Las sinapsis, los puntos de contacto entre las neuronas, experimentan cambios dinámicos en su fuerza, que perduran de minutos a horas a días. La potenciación a largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés) es una mejora duradera de la transmisión sináptica excitatoria que se produce después de breves episodios de actividad sináptica (Murase y Schuman, 1999).

La LTP se descubrió al observar un incremento estable y duradero entre la vía perforante y las células granulares de la circunvolución dentada del hipocampo tras una estimulación de frecuencia moderadamente alta, posteriormente estudios *in vitro* mostraron que no solo se trata de un fenómeno duradero, sino también de inducción rápida y con características asociativas y de especificidad de estímulos (Morgado *et al*, 2005).

Este tipo de plasticidad sináptica ha sido intensamente estudiado como un modelo potencial de cómo se almacena la información durante el aprendizaje con animales (Murase y Schuman, 1999).

Una de las principales señales que induce la LTP es el aumento de las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en las neuronas postsinápticas, este incremento de calcio puede ser generado por tres mecanismos (Ben-Ari *et al.*, 1992)

- Activación del receptor NMDA permeable a  $\text{Ca}^{2+}$ .
- Activación de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje.
- Liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde almacenamientos intracelulares.

### **1.9. Tolueno y memoria**

Durante mucho tiempo se ha documentado en la literatura médica una gran variedad de anormalidades neurológicas causadas por los disolventes orgánicos, la mayoría son de casos de abusadores crónicos y de trabajadores expuestos a estos compuestos.

Algunos de los estudios realizados en países escandinavos informaron de la aparición del "síndrome psico-orgánico" o "síndrome de los pintores" resultado de

una exposición crónica de bajo nivel, que consiste en fatiga, cambios de personalidad, dificultad de concentración y mala memoria (Rosenberg *et al.*, 2002).

Se ha demostrado que el abuso crónico de tolueno causa cambios permanentes en las estructuras cerebrales como el cerebelo, los ventrículos cerebrales y los surcos corticales, correlacionándose con disfunción neuronal. El tolueno puede causar depresión del SNC, pérdida de la memoria y daño progresivo cerebral y nervioso (Fornazzari *et al.*, 1983; Baydas *et al.*, 2005).

Dentro del cerebro, el tolueno se dirige principalmente a la sustancia blanca, que se cree que contribuye a muchas de las consecuencias neurológicas a largo plazo, como es en el caso de la leucoencefalopatía. La gravedad clínica de la leucoencefalopatía por tolueno es paralela al grado de lesión de la sustancia blanca en el cerebro, como se observa en los estudios con neuroimagen, cuya característica más importante de este trastorno es la demencia. (Filley *et al.*, 2004; Duncan y Lawrence, 2013).

Existen evidencias que sugieren la posibilidad de que el abuso del tolueno de manera crónica también tenga como blanco estructuras de materia gris y como consecuencia una disminución en el número de células neuronales, indicando la capacidad del tolueno para conducir directa o indirectamente a la muerte celular. (Duncan y Lawrence, 2013).

Hougaard y col., (1999), expusieron ratas embarazadas a tolueno, en los días 7-20 de gestación a una concentración de 1800 ppm durante 6 h al día. Se estudió el desarrollo y los efectos neuroconductuales de la exposición prenatal a tolueno. Se observó que los pesos corporales de la descendencia fueron más bajos, además de que el rendimiento en el laberinto de Morris durante el aprendizaje inicial dio algunas indicaciones de deterioro de las funciones cognitivas que se confirmó en las pruebas posteriores. Los efectos sobre las funciones cognitivas fueron más marcadas en la descendencia femenina.

Hass y col. (1999), estudiaron el efecto de la exposición a tolueno sobre ratas embarazadas desde el día 7 de embarazo hasta el día 18 posnatal con una

concentración de 1200 ppm durante 6 h por día. Los efectos de desarrollo y neuroconductuales fueron investigados en la descendencia. Realizaron pruebas de función motora, actividad motora y aprendizaje y memoria en el laberinto acuático de Morris. Los principales efectos observados en la crías fue el bajo peso al nacer, retraso en el desarrollo del reflejo, incremento en la actividad motora y deterioro en las funciones cognitivas.

Rosenberg y col. (2002) realizaron un estudio en donde participaron 55 personas, todas ellas con historial de abuso de disolventes orgánicos. Evaluaron la ejecución de funciones cognitivas, memoria de trabajo, velocidad y capacidad del procesamiento de la información, discurso y lenguaje. Los resultados fueron comparados con otro grupo de abusadores de otro tipo de drogas (cocaína y alcohol) que fueron sometidos a las mismas pruebas, ambos tuvieron un desempeño pobre pero el grupo de los abusadores de disolventes tuvo un desempeño aun peor en las pruebas de memoria de trabajo y ejecución de funciones cognitivas.

Baydas y col. (2005) investigaron el efecto de la exposición a tiner (3000 ppm) durante 45 días (1 h/día) sobre las funciones cognitivas, evaluadas en el laberinto acuático de Morris y el test de evitación pasiva, así como el efecto sobre los niveles de moléculas de adhesión celular neuronal (NCAM) y los productos de peroxidación lipídica (LPO) en el hipocampo, corteza y cerebelo en ratas. También estudiaron la acción de la melatonina sobre los efectos producidos por el disolvente. La exposición a tiner causó un aumento significativo de LPO (malondialdehído y 4-hidroxi alcanos) en todas las regiones del cerebro, lo que indica que puede producir daño oxidativo en lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. La administración de melatonina redujo significativamente las LPO y elevó los niveles de glutatión en el cerebro. Las NCAM desempeñan funciones estructurales y de desarrollo en el sistema nervioso, además de estar involucradas en el aprendizaje y la memoria. Las NCAM disminuyeron significativamente en el hipocampo y la corteza. Además las ratas mostraron un déficit cognitivo sobre las pruebas mencionadas anteriormente, se observó que este efecto pudo ser revertido en las ratas que fueron tratadas con melatonina.

Hueng-Sik Seo y col., (2010), estudiaron los cambios temporales de la neurogénesis en el hipocampo de ratones (C57BL) después de la administración aguda de tolueno (500mg/kg, i.p.) utilizando dos marcadores histoquímicos (Ki-67 y DCX). Además evaluaron la posible disfunción conductual en pruebas de aprendizaje y memoria. El número de células de la circunvolución dentada del hipocampo disminuyó después del tratamiento con tolueno, también hubo una disminución significativa de la memoria en comparación con el grupo control al realizar la prueba de reconocimiento del objeto novedoso. Este estudio sugiere que la exposición aguda de tolueno reduce la tasa de neurogénesis del hipocampo y puede causar disfunción del hipocampo, como depresión y deterioro cognitivo.

Huerta-Rivas y col., (2012), estudiaron el efecto de la exposición crónica y aguda de tolueno (1000, 2000, 4000 o 6000 ppm) sobre el aprendizaje, la memoria y la acetilación de histonas en el hipocampo de ratas macho de la cepa Wistar durante dos etapas de la vida: adolescencia (PN 22-35) y la edad adulta joven (PN 43-56). Las pruebas de memoria utilizadas fueron la prueba de reconocimiento del objeto novedoso y prueba de evitación inhibitoria, también se realizaron pruebas de actividad locomotora y nocicepción. La inhalación crónica y aguda del tolueno perjudicó el aprendizaje, la memoria a corto y largo plazo en las pruebas anteriormente mencionadas en ambos grupos de edad, este efecto se produjo a concentraciones bajas de tolueno (1000 y 2000 ppm). La inhalación aguda de tolueno produjo nocicepción. La acetilación de las histonas en el giro dentado del hipocampo se produjeron de diferente manera según la histona, la edad y tratamiento: una sola exposición de tolueno aumentó la acetilación H4 en ambos grupos de edad, mientras que en la exposición crónica disminuyó la acetilación de H3 solo en ratas adultas jóvenes. Este estudio además de mostrar el efecto perjudicial del tolueno sobre la memoria, muestra que incluso una sola exposición de tolueno puede causar cambios epigenéticos en el hipocampo de ratas.

## 2. JUSTIFICACIÓN

El consumo de drogas es una constante en toda la sociedad. Los inhalables se encuentran entre las drogas de abuso más populares, sobre todo en jóvenes, esto se debe a que son de disposición legal, de bajo costo, fáciles de usar y sus efectos son inmediatos.

El abuso de tolueno sobre todo en edades tempranas puede conducir a un deterioro cognitivo y disminución en el coeficiente intelectual, además puede producir cambios en las estructuras cerebrales que se correlacionan con la disfunción neuronal.

Aunque aún no es conocido completamente el mecanismo de acción del tolueno, los estudios han demostrado que interactúa con diversos receptores, entre los más importantes se encuentran los receptores NMDA, los cuales juegan un papel muy importante en el neurodesarrollo, neuroplasticidad, así como en los procesos de aprendizaje y memoria. También se ha documentado que la exposición prolongada a disolventes produce discapacidad mental y déficit en el aprendizaje tanto en humanos como en animales. A pesar de esto, los inhalables se consideran el grupo de drogas de abuso menos estudiadas.

A pesar de las numerosas pruebas en donde se puede evaluar aprendizaje y memoria en animales, aun no son suficientes los estudios realizados sobre el efecto del tolueno de manera crónica en estos procesos cognitivos, como es el caso de la prueba de auto aprendizaje en la caja condicionada de Skinner en la que no existe ningún registro de haber estudiado las repercusiones del tolueno evaluadas en esta prueba. Por eso es importante seguir estudiando e investigando tales efectos sobre dichos procesos cognitivos.



### **3. HIPÓTESIS**

La exposición crónica de tolueno causa una alteración en los procesos de aprendizaje y memoria en ratas.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1. Objetivo general**

Investigar si la exposición crónica de tolueno altera las capacidades cognitivas de aprendizaje y memoria en ratas.

#### **4.2. Objetivos específicos**

Evaluar el efecto de la exposición crónica a tolueno sobre el aprendizaje y la memoria a largo plazo de tipo no declarativa en un modelo de auto aprendizaje en ratas.

Evaluar el efecto de la exposición crónica a tolueno sobre la memoria a corto y largo plazo de tipo declarativa (episódica) en la prueba de reconocimiento del objeto novedoso en ratas.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1. Animales**

Se usaron ratas macho de la cepa Wistar de 3 meses de edad (200 a 300 g. de peso) sometidas a un ciclo invertido de luz/oscuridad 12:12h, (el periodo comprendido de luz fue de 21:00 h a 09:00 h) con acceso libre a agua y alimento, alojadas en grupos de 5 animales. Todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo según lo establecido por el comité local de ética y de acuerdo a las regulaciones establecidas en la norma oficial mexicana para el uso y cuidado de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

### **5.2. Sustancias**

Se usó tolueno (J.T. Baker) grado HPLC como disolvente de abuso prototipo. Los animales fueron expuestos a una concentración de 4000 ppm y 6000 ppm para el protocolo de memoria y aprendizaje respectivamente.

### **5.3. Diseño experimental**

El estudio se llevó a cabo mediante dos protocolos experimentales: uno para evaluar memoria y otro para evaluar aprendizaje.

Los animales utilizados en el protocolo de memoria se dividieron en dos grupos: el grupo expuesto a tolueno (4000 ppm) y el grupo control expuesto a aire con una n=10 cada grupo. El protocolo se realizó en 5 etapas:

Primera etapa: se realizaron dos pruebas de actividad motora espontánea, una en campo abierto y la segunda en la caja de prueba del objeto novedoso.

Segunda etapa: se realizaron las pruebas de auto aprendizaje en la cámara condicionante (caja de Skinner).

Tercera etapa: se realizaron las pruebas de reconocimiento del objeto novedoso.

Cuarta etapa: Se realizó la exposición a tolueno 24 horas después de haber concluido con las pruebas en caja de Skinner y objeto novedoso. Los animales se colocaron en la cámara de exposición estática por 30 min, 2 veces al día con una diferencia de 6 horas entre cada exposición durante 4 semanas.

Quinta etapa: al finalizar la exposición, los animales fueron sometidos nuevamente a las pruebas de memoria (con el propósito de estudiar el efecto del disolvente sobre la consolidación de la memoria) y pruebas de actividad motora.

Para el protocolo de aprendizaje, los animales utilizados fueron separados en dos grupos: el grupo expuesto a tolueno (6000 ppm) y el grupo control expuesto a aire (control) con una  $n=7$  y  $n=6$  respectivamente. El protocolo se realizó de manera similar al protocolo de memoria; primeramente se realizó la prueba de actividad motora (solo en la caja del objeto novedoso), posteriormente la exposición a tolueno (4 semanas, 2 veces al día, 30 min). Posteriormente se aplicaron las pruebas de auto aprendizaje y la prueba de reconocimiento del objeto novedoso, con el propósito de estudiar el efecto del disolvente sobre el aprendizaje en ratas.

#### **5.4. Exposición al disolvente**

La exposición a Tolueno se llevó a cabo en cámaras de exposición estática que consta de una jarra cromatográfica de 29 L, cerrada de forma hermética por una tapa de acrílico, que cuenta con un puerto de inyección por el que se administra el disolvente y es recibido por un papel filtro sujetado a una malla metálica. En el interior tiene un ventilador con las aspas dirigidas hacia adentro, lo que permite la rápida volatilización y distribución del disolvente durante el tiempo de exposición (Figura 4).



**Figura 4.** Cámara de exposición estática.

Los animales son introducidos de manera individual, administrando el disolvente por el puerto de inyección. Las exposiciones se llevaron a cabo por un periodo de 30 minutos, dos veces al día, con una diferencia de 6 horas, durante un mes (30 días). Las concentraciones de vapor deseadas se alcanzan en menos de un minuto y permanecen constantes durante el tiempo de exposición. El volumen necesario para obtener la concentración deseada en partes por millón dentro de la cámara, se calcula empleando la ecuación de Nelson.

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

Donde:

$V$  = volumen del solvente que se necesita inyectar para obtener la concentración deseada (ml).

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

$C_{ppm}$  = concentración deseada (ppm)

$V_s$  = volumen de la cámara de exposición.

$d$  = densidad del disolvente (g/l)

$P$  = presión atmosférica (atm)

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

$T$  = temperatura.

### **5.5. Prueba de actividad motora espontánea**

Para el protocolo de memoria se realizaron dos pruebas de actividad motora espontánea, es decir, antes y después de la exposición a tolueno: la primera en un campo abierto rectangular de 1.3 x 1 m y la segunda en la caja del objeto novedoso con una superficie de 40 x 40 cm.

Por otro lado, para el protocolo de aprendizaje solo se realizó una prueba de actividad motora en la caja del objeto novedoso antes y después del tratamiento con tolueno.

En ambas pruebas, los animales iniciaron con una fase de habituación de 3 minutos, seguido de la fase de prueba que consistió en colocar el animal en el centro del campo y grabarlas durante un periodo de 5 minutos con la finalidad de que quedara registrado en video para su posterior análisis. Se registró el número de veces en que la rata se levantó en dos patas (actividad vertical).

### **5.6. Prueba de auto aprendizaje (caja de Skinner)**

La cámara de condicionamiento operante o caja de Skinner es un instrumento de laboratorio que esta especialmente adaptado para el preciso control ambiental que es fundamental en el estudio de condicionamiento operante (Reynolds, 1973).

Las dimensiones de la cámara (caja condicionante de Skinner Med Associates, St Albans, VT), son de 30 x 25 x 25 cm, la pared anterior y posterior son de aluminio y las paredes laterales son de acrílico. Dentro se encuentra una bandeja

de comida (5 x 4 cm) empotrada en la parte central de la pared anterior a 2 cm encima del piso, se encuentra una palanca que esta a 5 cm de lado izquierdo de la bandeja y 4 cm por encima del piso, una luz blanca de 28 V situada a 6 cm por encima de la palanca (Figura 5).

Existe una caja adicional que se coloca de manera externa a la cámara, está diseñada para impedir la entrada de luz y sonido, está ventilada en su interior y el experimentador no entra en contacto directo con el sujeto durante la sesión de experimento.



**Figura 5.** Caja de Skinner.

El protocolo fue tomado y modificado de Picazo y col., (2016) la cual inicia con una fase de habituación (5 min), en donde los animales son introducidos a la cámara de manera individual con ayuno de 24 horas y acceso a 10 pellets de alimento (0.45 g).

La fase de prueba o sesión de auto aprendizaje consta de 30 ensayos de 1 min; cada ensayo consiste en la presentación del estímulo condicionado de luz-palanca (CS) por 30 s, en donde la rata puede tener acceso a los pellets de comida (estímulo no condicionado [US]) por medio de la respuesta condicionada (CR), es decir, al presionar la palanca y 30 s de oscuridad.

Durante los primeros 10 ensayos de cada sesión y para propósitos de enseñanza, se proporcionaba de manera manual el US en presencia del CS, para que el animal lograra producir CR.

Se dieron un máximo de 7 sesiones con 24 horas de diferencia cada una. Posterior al día de aprendizaje, se dio una última sesión de 10 ensayos en donde las CR fueron el resultado final.

Solo para el protocolo de memoria, después de la exposición al disolvente, se realizaron 10 ensayos de prueba por dos días. El incremento o decremento de CR se considera como una mejoría o deterioro de la memoria (Manuel-Apolinar y Meneses, 2004).

Todas las respuestas (CR) fueron registradas a través de una interface de computadora, usando el software Med-IV

La limpieza de la caja entre sesión implicó la eliminación de materia fecal y orina, el uso de una solución alcohol-agua al 5% para controlar las señales de olor, secada y ventilada durante unos minutos.

### **5.7. Prueba de reconocimiento del objeto novedoso**

Esta prueba es usada para estudiar la memoria a corto plazo, memoria declarativa (episódica) y atención (Winters *et al.*, 2008; Huerta-Rivas *et al.*, 2012). La prueba fue introducida por Ennaceur y Delacour (1988), con el fin de evaluar la capacidad de las ratas para reconocer un objeto nuevo en un entorno familiar, está basada en la tendencia natural de los roedores por explorar nuevos objetos por lo que se espera que el animal tome más tiempo en explorar un objeto nuevo que uno familiar.

El equipo consta de una caja cuadrada de acrílico de 40 cm<sup>3</sup> con dos áreas marcadas que indican la posición de los objetos a discriminar y un equipo de grabación para el análisis posterior de cada prueba.

Los objetos que se utilizaron en la prueba tienen una dimensión aproximada de 5 cm<sup>3</sup> y están hechos de madera.

La prueba inicia con una fase de habituación de 3 minutos, seguido de una fase de adquisición que consta de la presentación de dos objetos iguales, también denominados familiares (A, A'), durante 5 minutos.

Después de la fase de adquisición el animal es retirado, una hora después es colocado nuevamente en la caja para evaluar la memoria a corto plazo con la presentación de un objeto familiar y un objeto novedoso (A, B). 24 horas después se evaluó memoria a largo plazo con la presentación del objeto familiar y otro objeto novedoso (A, C).

La exploración del roedor hacia los objetos se registra cuando coloca su nariz a una distancia  $\leq 2$  cm del objeto (Han y Kim, 2015), cuando los toca completamente con la nariz o cuando los toca con las patas delanteras (Morales-Montor et al., 2013). No es registrado si se acuesta sobre el objeto o es tocado por el cuerpo o cola (Orlate-Sánchez et al., 2014).

La limpieza entre ensayos implicó la eliminación de pellets fecales y orina; para controlar las señales de olor, la caja y los objetos fueron completamente limpiados con una solución alcohol-agua al 5%, secados y ventilados durante unos minutos.

El resultado se calcula como índice de reconocimiento ( $IR_{RO}$ ) con la siguiente fórmula:

$$IR_{RO} = \frac{\text{Tiempo de exploración en el ON}}{\text{Tiempo de exploración en el OF} + \text{Tiempo de exploración en el ON}}$$

Donde:

$IR_{RO}$  = Índice de reconocimiento (> 0.5 indica preferencia por el objeto novedoso)

ON= Objeto Novedoso

OF= Objeto Familiar





**Figura 6.** Prueba de reconocimiento del objeto novedoso.

## **6. ANÁLISIS DE RESULTADOS**

Los resultados se expresaron en graficas como la media  $\pm$  error estándar (e.e) de cada grupo experimental.

Las diferencias entre cada grupo se analizaron por medio de la prueba t-Student para muestras independientes o t-Student para muestras emparejadas según corresponda. Los datos que no se ajustaron a las curvas de normalidad se realizaron pruebas no paramétricas (U de Mann-Whitney o prueba de Wilcoxon).

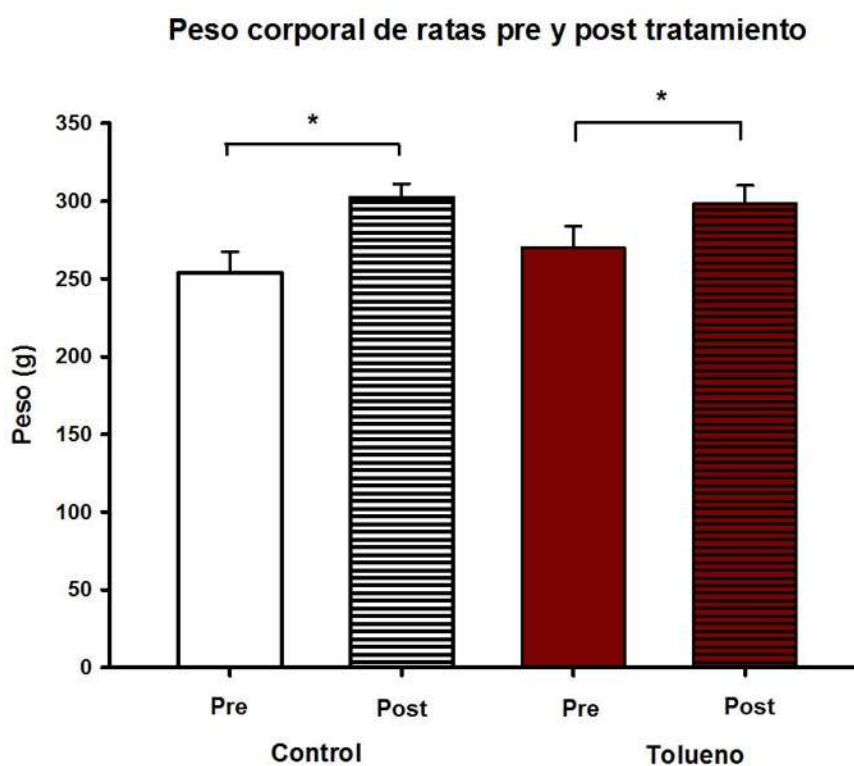
El análisis estadístico y material gráfico se realizó con el programa Sigma Plot versión 11.0. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con un valor de  $p < 0.05$ .

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Protocolo de memoria

Los animales utilizados en el protocolo de memoria se dividieron en dos grupos: grupo control (ratas a las que solo fueron expuestas a aire) y el grupo tolueno (ratas expuestas al disolvente) con una  $n=10$  cada grupo.

Se registraron los pesos corporales de las ratas del grupo control y tolueno antes y después del tratamiento con tolueno (1 mes). Hubo diferencia significativa entre el pre y post tratamiento en ambos grupos con una  $p=0.001$  en el grupo control y una  $p=0.002$  en el grupo tolueno (Fig. 7).

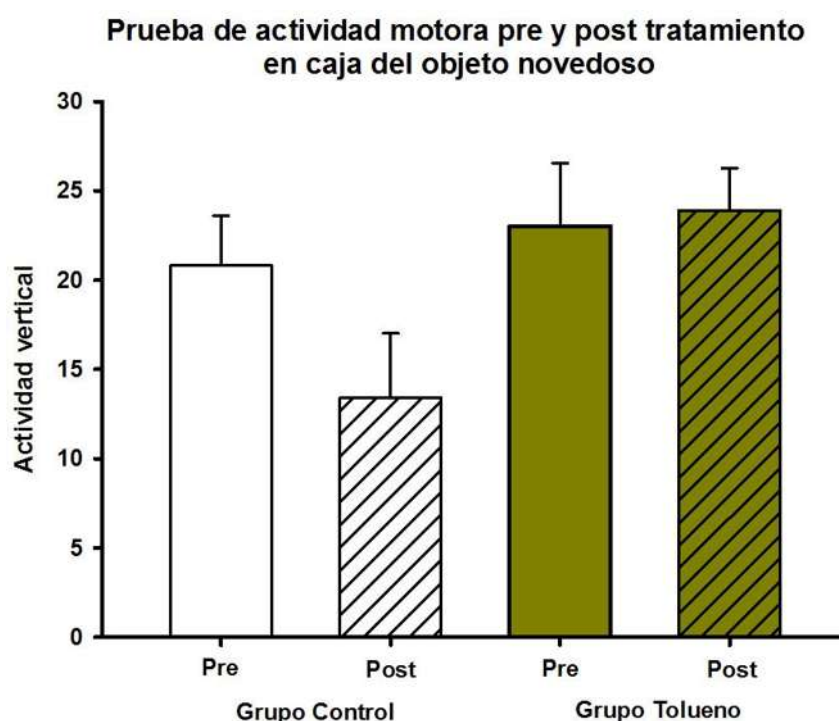


**Figura 7:** Peso corporal de ratas antes y después de la exposición a tolueno (4000 ppm) o aire (control) con una  $n=10$  en ambos grupos. Los resultados se muestran en media  $\pm$  error estándar. Se observó diferencia significativa en ambos grupos  $*p < 0.05$ , (prueba t-Student para muestras relacionadas).

# • **Prueba de actividad motora espontánea**

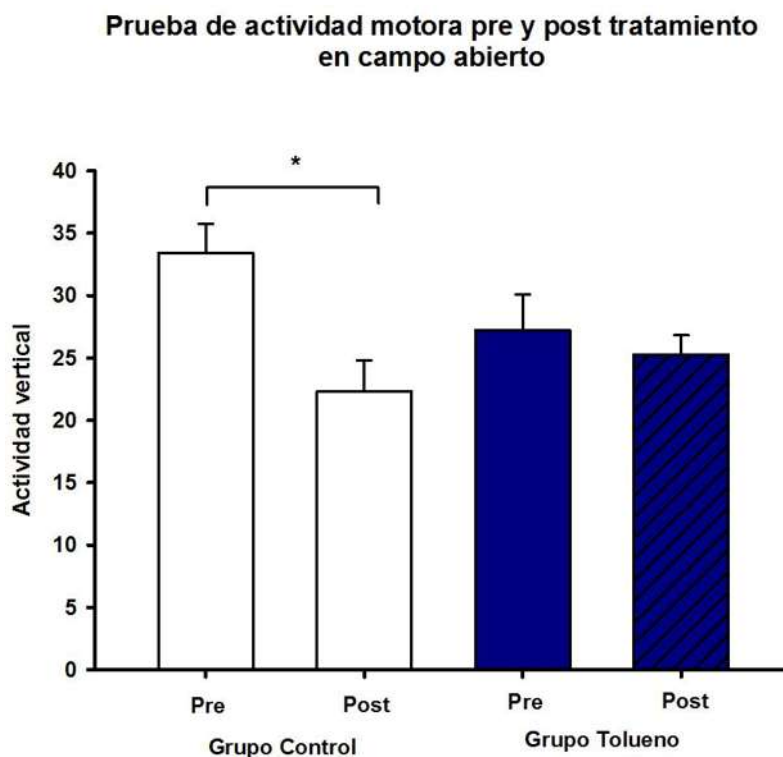
La prueba de actividad motora se realizó a ambos grupos (control y tolueno) en dos pruebas: una en campo abierto y la otra en la caja del objeto novedoso, en ambas pruebas se valoró la actividad vertical, es decir, el número de veces en que la rata se paraba en dos patas. Ambas pruebas se realizaron antes y después de la exposición a tolueno o aire (pre y post tratamiento).

En la prueba de actividad motora dentro de la caja del objeto novedoso, se observó que no hubo diferencia significativa entre el pre y post tratamiento en el grupo control ( $p=0.070$ ) ni en el grupo tolueno ( $p=0.826$ ) (Fig. 8).



**Figura 8.** Prueba de actividad motora pre y post tratamiento a tolueno (4000 ppm) o aire (control) en caja del objeto novedoso, con una  $n=10$  en ambos grupos. Los resultados se muestran en media  $\pm$  error estándar. No se observó diferencia estadística.

En la prueba de actividad motora realizada en campo abierto hubo una diferencia significativa en el grupo control entre el pre y post tratamiento con una  $p=0.001$ , mientras que en grupo tolueno no se observó diferencia estadística ( $p=0.557$ ) (Fig. 9).

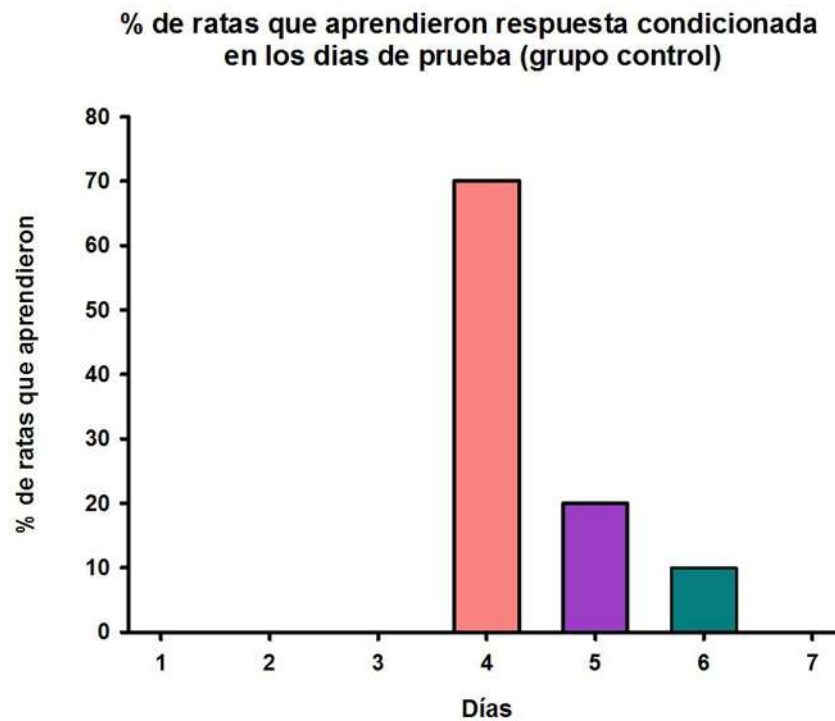


**Figura 9.** Prueba de actividad motora pre y post tratamiento a tolueno (4000 ppm) o aire (control) en campo abierto con una  $n=10$  en ambos grupos. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar,  $*p < 0.05$ . Se observó diferencia estadística en el grupo control pre tratamiento vs post tratamiento (prueba t-Student para muestras relacionadas).

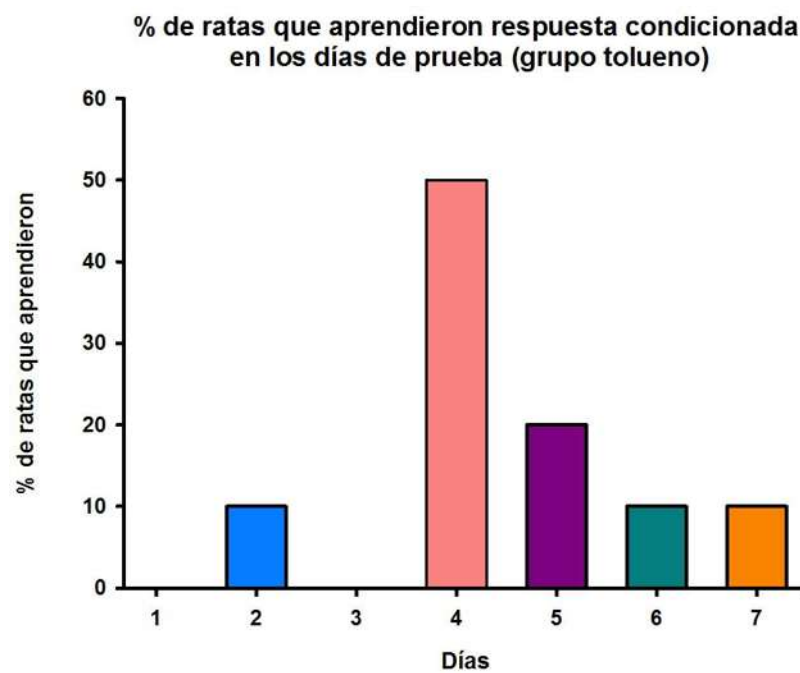
- **Prueba de auto aprendizaje (Caja de Skinner)**

Los grupos control y tolueno se sometieron a las pruebas de auto aprendizaje en la caja de Skinner antes y después de la exposición al disolvente.

Previo a la exposición al disolvente se registró el número de días en que las ratas aprendían respuesta condicionada. En ambos grupos, esta relación está representada como porcentaje de ratas que aprendieron en los 7 días de prueba (Fig. 10 y 11).



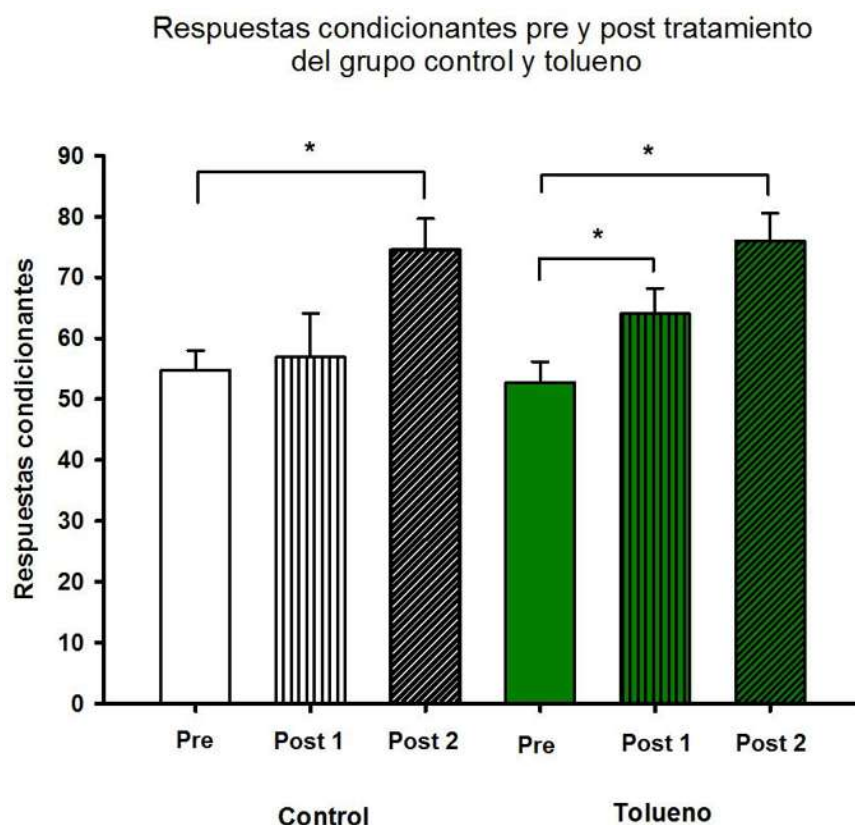
**Figura 10.** Porcentaje de ratas del grupo control que aprendieron respuesta condicionada durante los 7 días de prueba en la caja de Skinner (n=10). Los resultados se muestran en porcentaje por cada día de entrenamiento.



**Figura 11.** Porcentaje de ratas del grupo tolueno que aprendieron respuesta condicionada durante los 7 días de prueba en la caja de Skinner (n=10). Los resultados se muestran en porcentaje por cada día de entrenamiento.

Se observó que el cuarto día fue en el que la mayoría de ratas aprendieron respuesta condicionada, 70% de ratas del grupo control y un 50% de ratas del grupo tolueno. 20% de las ratas aprendieron en el 5to día en ambos grupos. Únicamente un 10% de ratas aprendió el 6to día en ambos grupos y un 10% de ratas del grupo tolueno aprendió el segundo día y séptimo día.

También fue registrado número de respuestas condicionantes de cada rata de ambos grupos en una prueba de 10 ensayos posterior al día de aprendizaje (pre tratamiento). Después de la exposición a tolueno o aire respectivamente, se realizó dos pruebas de 10 ensayos con 24 horas de diferencia cada una, es decir, en dos días de prueba (Post 1, Post 2). Los resultados se muestran en la fig. 12.



**Figura 12.** Número de respuestas condicionantes pre y post tratamiento en animales expuestos a aire (control) y tolueno (4000 ppm) con una  $n=10$  en ambos grupos. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar,  $*p < 0.05$ . Se observó diferencia significativa entre el pre vs post 2 tratamiento en el grupo control y en el grupo de tolueno entre el pre vs post 1 y el pre vs post 2 tratamiento (prueba t-Student para muestras relacionadas).

Hubo diferencia significativa en el grupo control Post 2 vs el pre tratamiento con una  $p=0.001$ , también se observó significancia en el grupo tolueno entre el pre tratamiento vs el primer día post tratamiento (Post 1) con una  $p=0.017$  y el pre tratamiento vs el segundo día de prueba post tratamiento (Post 2) con una  $p=0.001$ .

- **Prueba de reconocimiento del objeto novedoso**

Se realizó la prueba de reconocimiento de objeto novedoso pre y post tratamiento a ambos grupos. Se registraron los tiempos de exploración del objeto novedoso y el objeto familiar a la hora y a las 24 horas después de la fase de "adquisición". Posteriormente se calculó el índice de reconocimiento de ambos grupos.

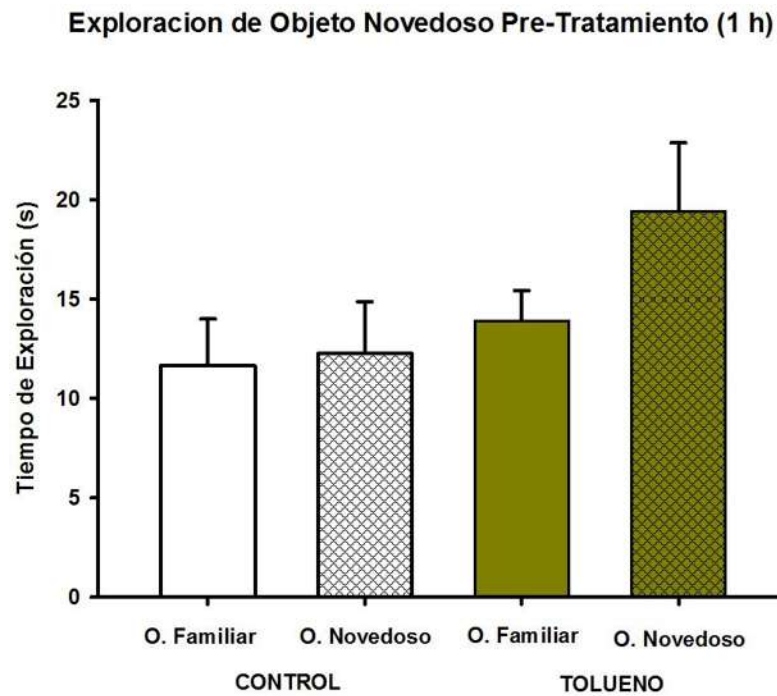
En general no se observó diferencia estadísticamente significativa en los tiempos de exploración del objeto familiar y novedoso en ambos grupos antes y después del tratamiento con tolueno o aire respectivamente. Lo mismo sucedió con los índices de reconocimiento del grupo control y tolueno, pre y post tratamiento, además se observó que ambos grupos estuvieron por encima del 0.5 que indica una preferencia hacia el objeto novedoso.

Se realizaron en su mayoría pruebas no paramétricas (U Mann-Whitney).

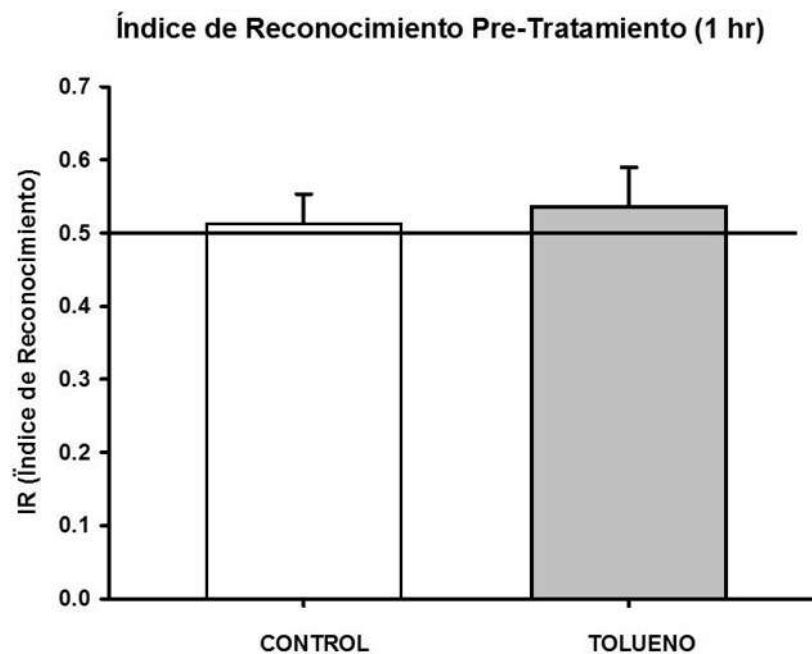
No se observó significancia estadística en los tiempos de exploración de objetos a la hora en el grupo control ( $p=0.865$ ) ni en el grupo tolueno ( $p=0.158$ ). En cuanto al índice de preferencia o reconocimiento (1h) tampoco hubo diferencia significativa ( $p=0.741$ ) (Fig. 13).



A)

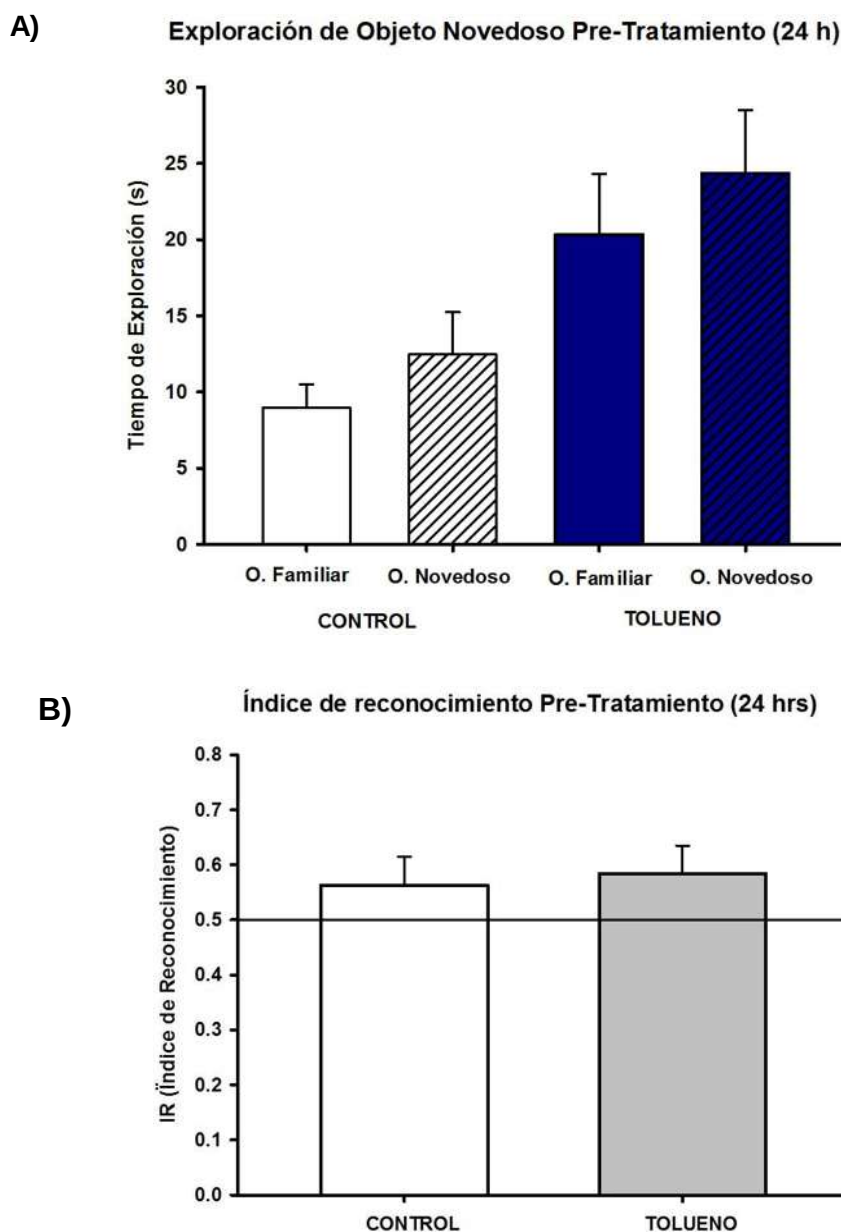


B)



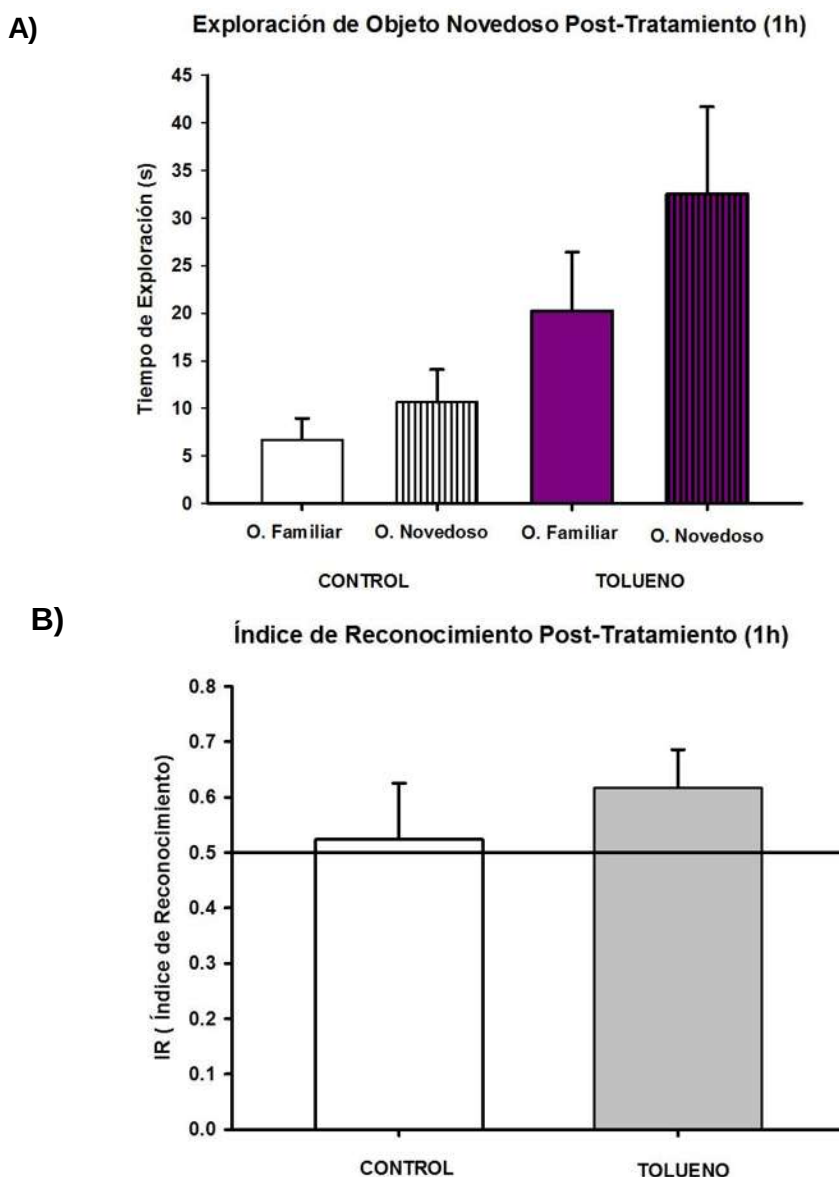
**Figura 13.** A) Exploración del objeto familiar y novedoso pre tratamiento (1h) del grupo control y tolueno con una n=10 en ambos grupos. B) Índice de reconocimiento del grupo control y tolueno pre tratamiento (1h). Los resultados se muestran como la media  $\pm$  error estándar. No se observó diferencia significativa en los tiempos de exploración de los objetos ni en el índice de reconocimiento.

A las 24 horas después de la fase de "adquisición", no se observó diferencia significativa entre la exploración del objeto familiar y el objeto novedoso del grupo control ( $p=0.486$ ) y del grupo tolueno ( $p=0.486$ ). En cuanto al índice de preferencia entre el grupo control y tolueno a las 24 horas, no hubo diferencia estadística con una  $p=0.850$  (Fig. 14).



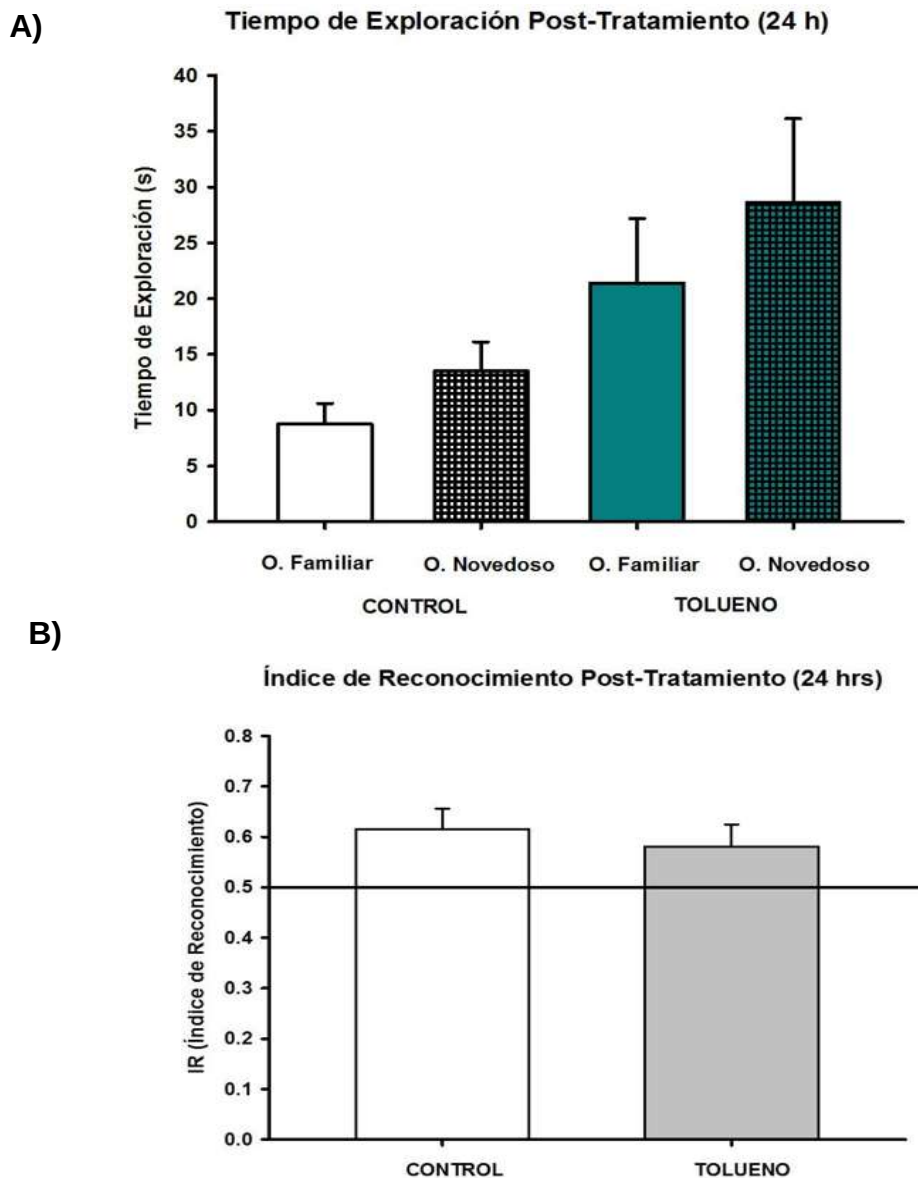
**Figura 14.** A) Exploración del objeto familiar y novedoso pre tratamiento (24h) del grupo control y tolueno con una  $n=10$  en ambos grupos. B) Índice de reconocimiento del grupo control y tolueno pre tratamiento (24h). Los resultados se muestran como la media  $\pm$  error estándar. No se observó diferencia significativa en los tiempos de exploración de los objetos ni en el índice de reconocimiento.

Después de la exposición al tolueno (4000 ppm) o aire (grupo control) se observó que no hubo diferencia significativa en el tiempo de exploración post tratamiento (1 h) en el grupo control ( $p=0.424$ ) ni en el grupo tolueno ( $p=0.186$ ). Tampoco hubo significancia estadística en el índice de reconocimiento a la hora post tratamiento entre el grupo control y tolueno ( $p=0.458$ ) (Fig. 15).



**Figura 15.** A) Exploración del objeto familiar y novedoso post tratamiento (1h) del grupo control y tolueno con una  $n=10$  en ambos grupos. B) Índice de reconocimiento del grupo control y tolueno post tratamiento (1h). Los resultados se muestran como la media  $\pm$  error estándar. No se observó diferencia significativa en los tiempos de exploración de los objetos ni en el índice de reconocimiento.

No hubo significancia estadística en el tiempo de exploración del objeto novedoso y familiar del grupo control post tratamiento a las 24 horas ( $p=0.158$ ), tampoco se observó diferencia significativa en el grupo expuesto a tolueno ( $p=0.385$ ). En cuanto al índice de preferencia, no hubo diferencia significativa entre el grupo control y tolueno ( $p=0.564$ ) (Fig.16).

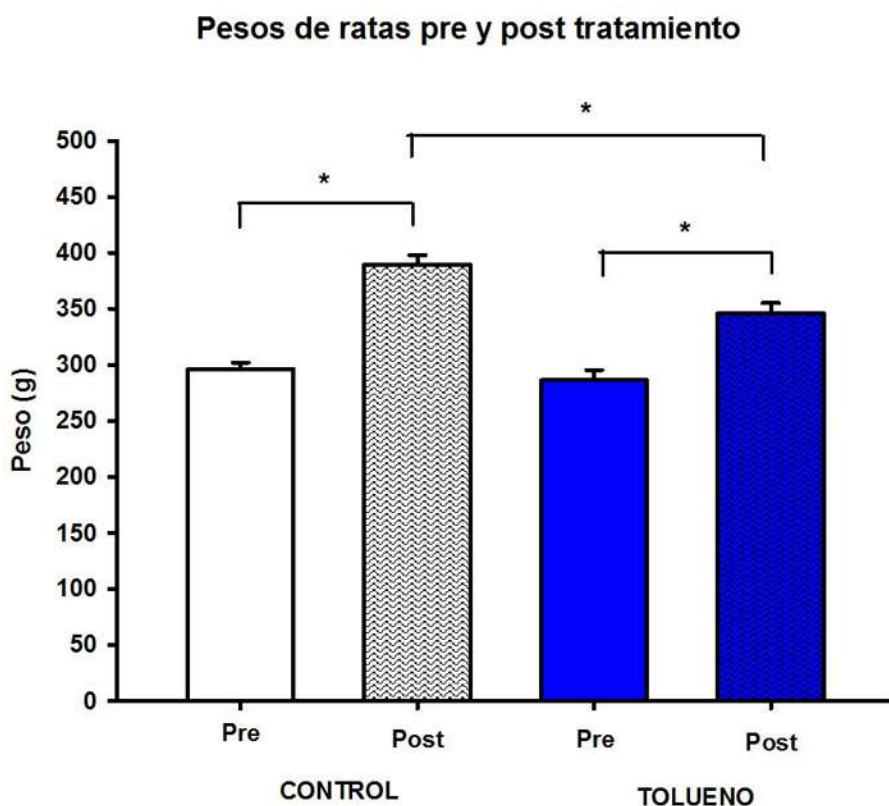


**Figura 16.** A) Exploración del objeto familiar y novedoso post tratamiento (24h) del grupo control y tolueno con una  $n=10$  en ambos grupos. B) Índice de reconocimiento del grupo control y tolueno post tratamiento (24h). Los resultados se muestran como la media  $\pm$  error estándar. No se observó diferencia significativa en los tiempos de exploración de los objetos ni en el índice de reconocimiento.

## 7.2. Protocolo de aprendizaje

Los animales utilizados en el protocolo de aprendizaje se dividieron en dos grupos: grupo control (ratas expuestas a aire) y el grupo tolueno (6000 ppm) con una  $n=6$  y  $n=7$  respectivamente.

Se registraron los pesos corporales de las ratas del grupo control y grupo tolueno antes y después de la exposición al tolueno o aire (pre y post tratamiento). Hubo significancia entre los pesos del grupo control pre y post tratamiento con una  $p=0.001$  y en el grupo tolueno con una  $p=0.001$ , también se observó una diferencia significativa entre los pesos post tratamiento del grupo control vs el grupo tolueno post tratamiento con una  $p=0.005$ . (Fig. 17).

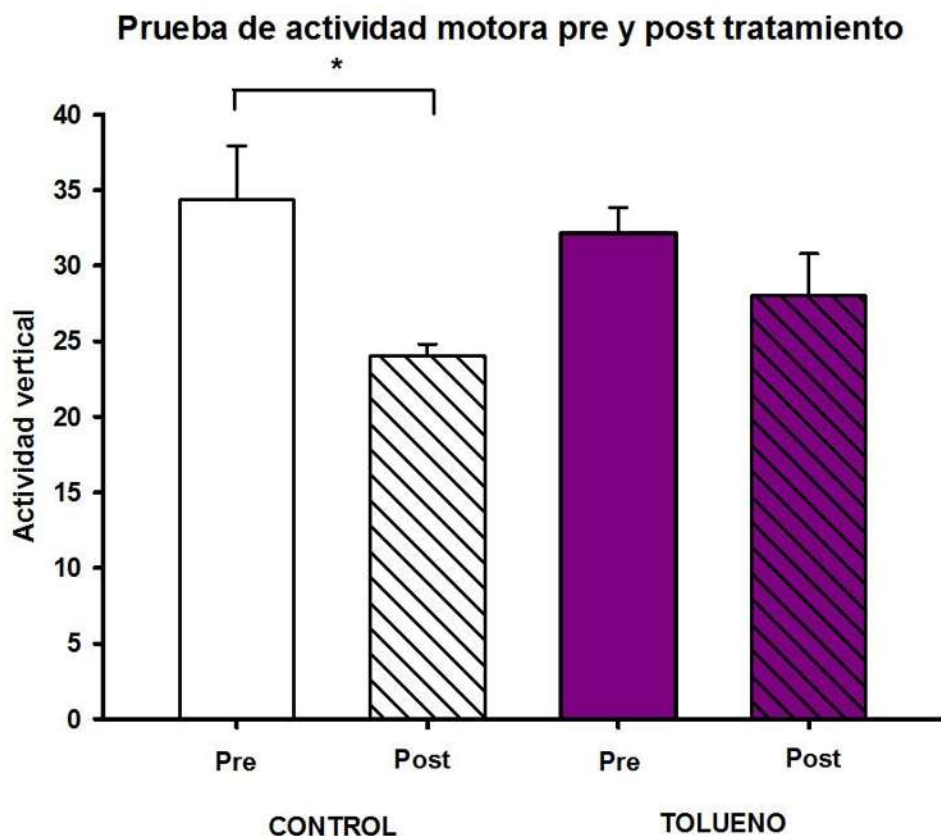


**Figura 17.** Peso corporal de ratas antes y después de la exposición a tolueno (6000 ppm) o aire (control) con una  $n=7$  y  $n=6$  respectivamente. Los resultados se muestran en media  $\pm$  error estándar. Se observó diferencia significativa en ambos grupos entre el pre vs post tratamiento,  $*p < 0.05$ , (prueba t-Student para muestras relacionadas) y entre el peso del grupo control vs el grupo tolueno post tratamiento (t-Student para muestras independientes).

- **Prueba de actividad motora espontanea**

La prueba de actividad motora se realizo únicamente en la caja del objeto novedoso antes y después de la exposición a tolueno o aire respectivamente. Se valoró la actividad vertical, es decir, el número de veces en que la rata se paraba en dos patas

Hubo diferencia significativa en el grupo control entre la actividad motora pre y post tratamiento con una  $p=0.024$  (prueba t-Student para muestras relacionadas). No hubo diferencia significativa en el grupo tolueno entre el pre y post tratamiento ( $p=0.146$ ).

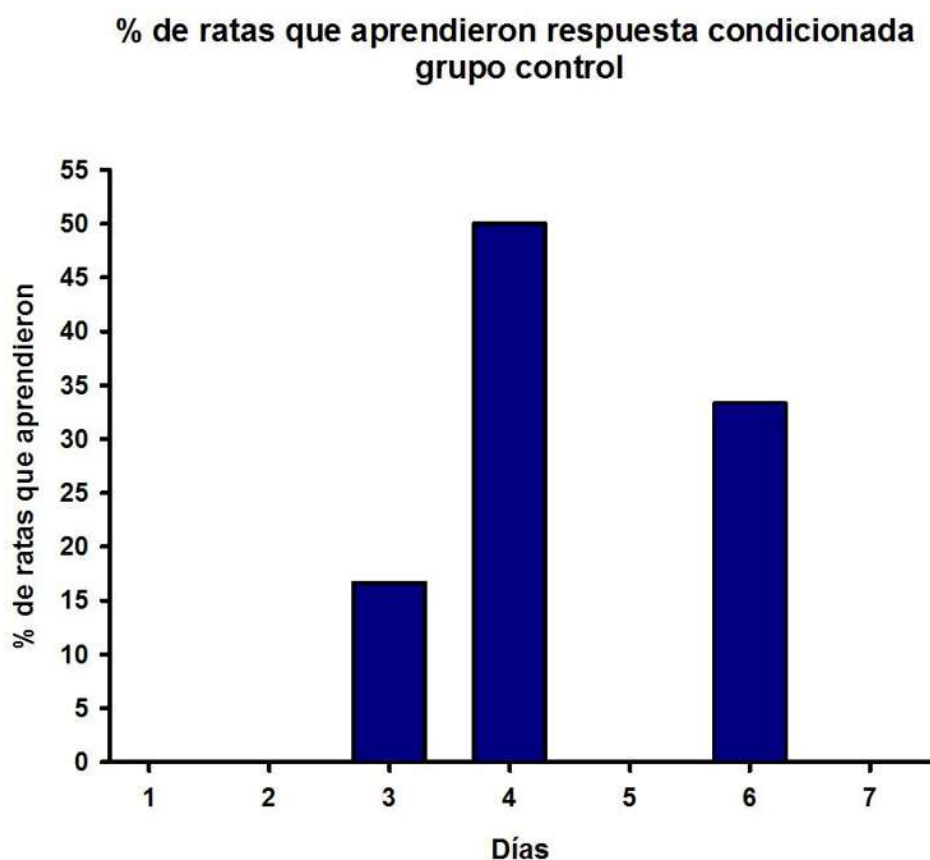


**Figura 18.** Prueba de actividad motora pre y post tratamiento en caja del objeto novedoso del grupo control y tolueno (6000 ppm) con una  $n=6$  y  $n=7$  respectivamente. Los resultados se muestran en media  $\pm$  error estándar, se observó diferencia estadística entre la actividad motora del grupo control entre el pre vs post tratamiento,  $*p < 0.05$  (prueba t-Student).

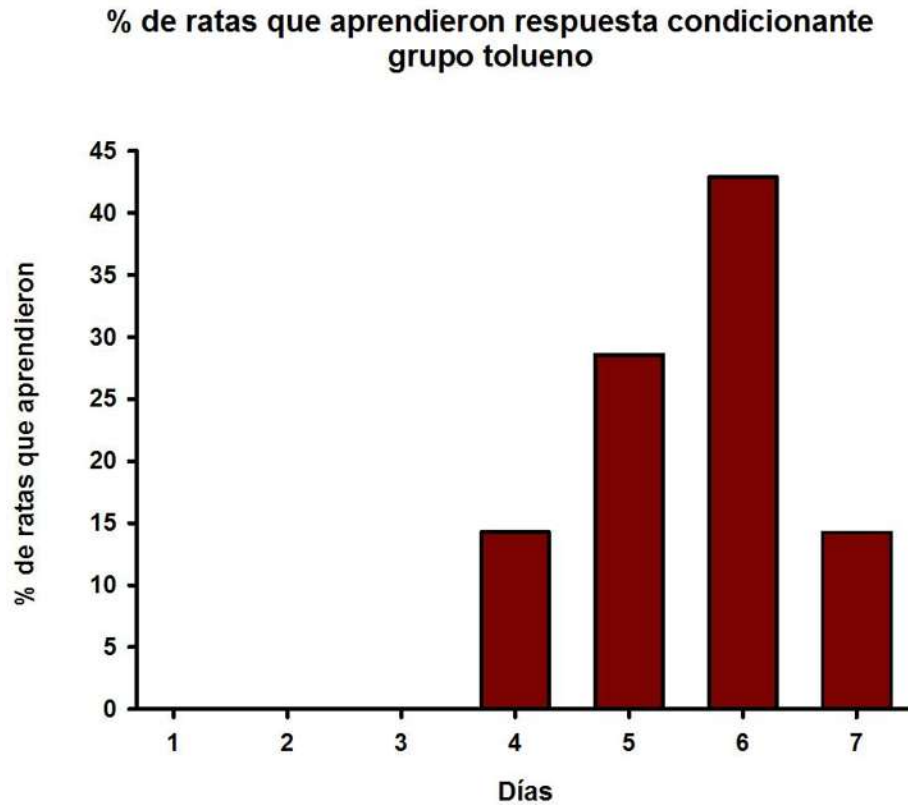
- **Prueba de auto aprendizaje (caja de Skinner)**

Se realizó la prueba de auto aprendizaje a ambos grupos, después de la exposición a tolueno (6000 ppm) o aire. Se registraron los días en los que los animales aprendían respuesta condicionada. Se observó que en el grupo control, el 4to día fue en el que la mayoría de ratas aprendió (50%), mientras que en el 6to día solo aprendieron el 33.33% y el 3er día el 16.66% (Fig. 19)

En cambio, en el grupo tolueno el día en el que la mayoría de ratas aprendió fue el 6to (42.85%), seguido del 5to día con 28.57% y solo un 14.28% para el 4to y 7mo día (Fig. 20).



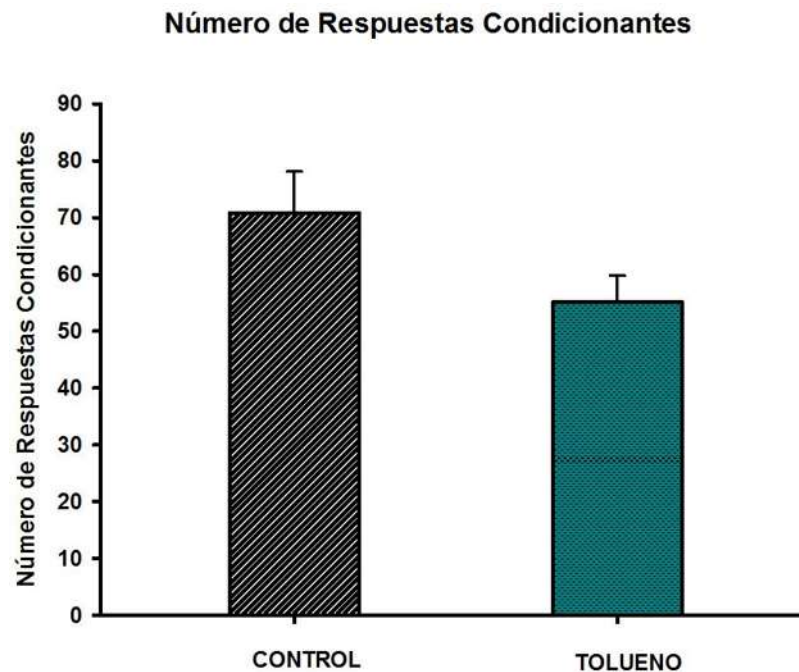
**Figura 19.** Porcentaje de ratas que aprendieron respuesta condicionada en los 7 días de prueba en la caja de Skinner después de un mes de exposición a aire (grupo control) con una n=6. Los resultados se expresan como porcentajes por cada día de entrenamiento.



**Figura 20.** Porcentaje de ratas que aprendieron respuesta condicionada en los 7 días de prueba en la caja de Skinner después de un mes de exposición a tolueno (6000 ppm) con una  $n=7$ . Los resultados se expresan como porcentajes por cada día de entrenamiento.

Con respecto al número de respuestas condicionantes, en la prueba final de 10 ensayos posterior al día de aprendizaje, no se observó diferencia significativa entre el grupo control y tolueno ( $p=0.051$ ) (Fig. 21).





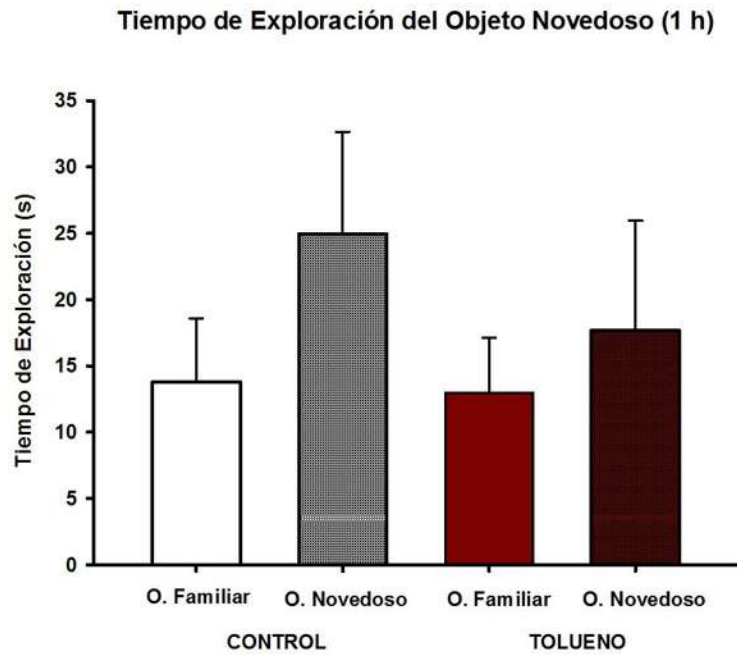
**Figura 21.** Número de respuestas condicionantes post tratamiento en animales expuestos a aire (control) y tolueno (6000 ppm) con una  $n=6$  y  $n=7$  respectivamente. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar. No se observó diferencia significativa en grupo control y el grupo tolueno.

- **Prueba de reconocimiento del objeto novedoso.**

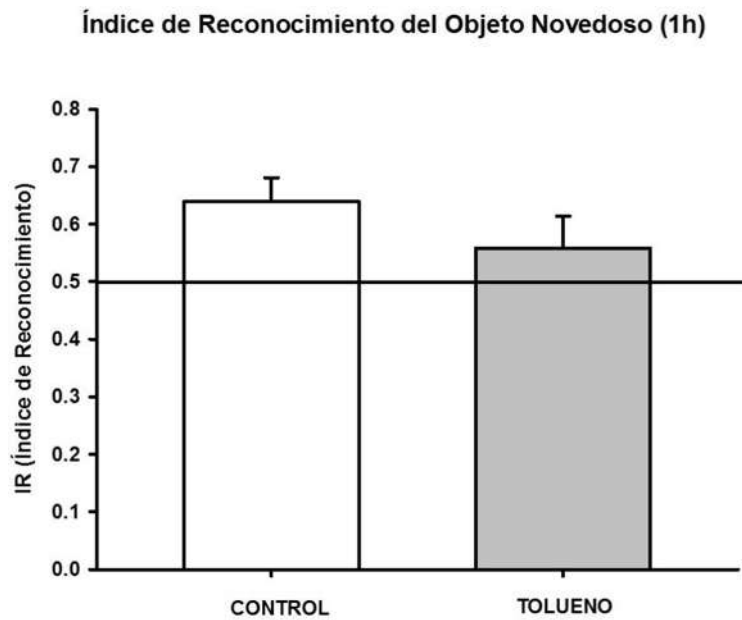
Se realizó la prueba de reconocimiento de objeto novedoso a ambos grupos. Se registraron los tiempos de exploración del objeto novedoso y el objeto familiar a la hora y a las 24 horas después de la fase de "adquisición". Posteriormente se calculó el índice de reconocimiento de ambos grupos.

No hubo diferencia significativa entre el tiempo de exploración del objeto familiar y el objeto novedoso a la hora en el grupo control ( $p=0.244$ ) ni en el grupo tolueno ( $p=0.805$ ). Respecto al índice de reconocimiento tampoco se observó diferencia estadística entre el grupo control y tolueno ( $p=0.534$ ) (Fig.22).

A)



B)

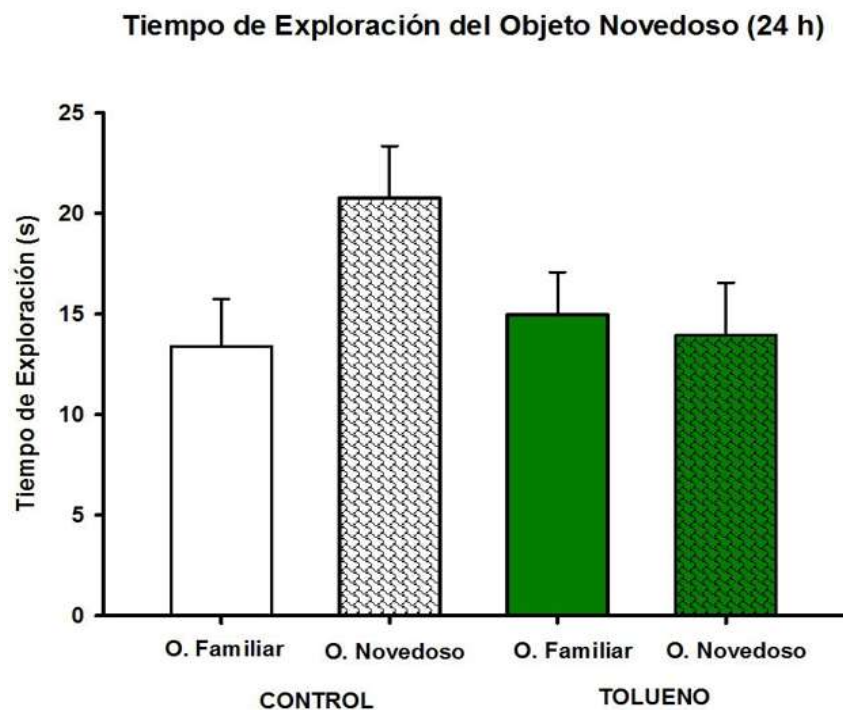


**Figura 22.** . A) Exploración del objeto familiar y novedoso del grupo control y tolueno (1h) con una n=6 y n=7 respectivamente. B) Índice de reconocimiento del grupo control y tolueno (1h). Los resultados se muestran como la media  $\pm$  error estándar. No se observó diferencia significativa en los tiempos de exploración de los objetos ni en el índice de reconocimiento.

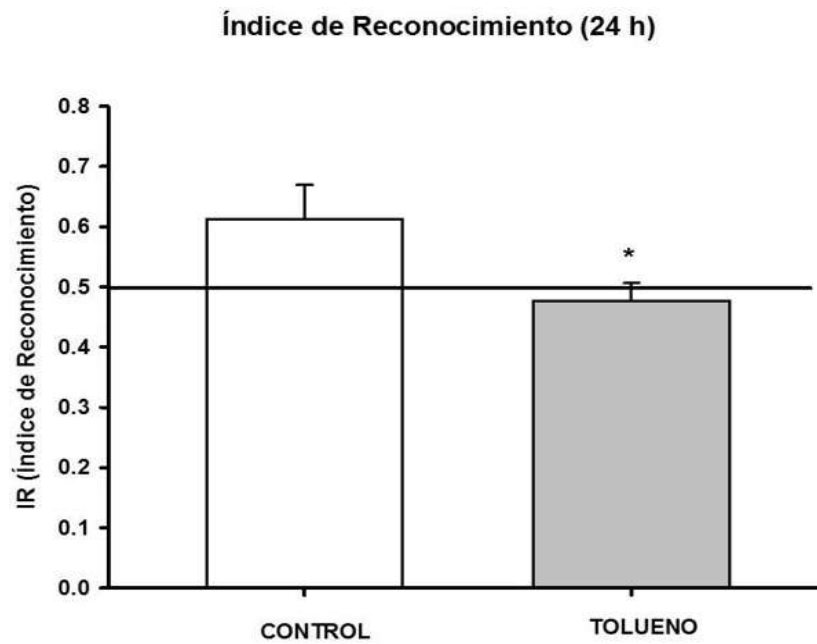
No hubo diferencia estadística entre el tiempo de exploración del objeto familiar y el objeto novedoso a las 24 horas en el grupo control ( $p= 0.063$ ) ni en el grupo tolueno ( $p= 0.772$ ). En cuanto a los índices de reconocimiento a las 24 horas, sí hubo una diferencia significativa entre el grupo control y tolueno con una  $p=0.049$  (prueba t- Student para muestras independientes) (Fig. 23).

Se observó que el grupo tolueno está por debajo del índice de reconocimiento de 0.5, es decir, este grupo no tuvo preferencia por el objeto novedoso.

A)



B)



**Figura 23.** A) Exploración del objeto familiar y novedoso del grupo control y tolueno (24h) con una  $n=6$  y  $n=7$  respetivamente. B) Índice de reconocimiento del grupo control y tolueno (24h). Los resultados se muestran como la media  $\pm$  error estándar. No se observó diferencia significativa en los tiempos de exploración de los objetos en ambos grupos. Se observó diferencia estadística entre los índices de reconocimiento del grupo control vs grupo tolueno,  $*p < 0.005$ , prueba t-Student para muestras independientes.

## 8. DISCUSIÓN

El abuso de inhalables en México es común entre los jóvenes marginados (Gigengack, 2013).

La exposición prolongada a tolueno se asocia con anomalías neurológicas que incluyen deterioro cognitivo, atrofia cerebral e hipocampal, pérdida del volumen cerebral, leucoencefalopatía, disminución de la actividad neuronal y alteraciones epigenéticas (Deleu y Hanssens, 2000; Bale *et al.*, 2005; Huerta-Rivas *et al.*, 2012).

En el presente trabajo se estudió principalmente el efecto del tolueno sobre el aprendizaje y la memoria en ratas, de manera adicional se decidió investigar el efecto del tolueno sobre los pesos corporales de los animales antes y después de un mes de exposición a tolueno (4000 y 6000 ppm) ya que como se ha mencionado anteriormente, uno de los múltiples efectos que provoca el abuso de disolventes es la pérdida del apetito.

En el caso de las ratas expuestas a 4000 ppm durante un mes, se observó una significancia estadística entre los pesos pre y post tratamiento ( $p=0.002$ ), por otro lado, en el grupo control (expuestas a aire) también hubo significancia estadística ( $p=0.001$ ). Ambos grupos subieron de peso de manera similar ya que al comparar los pesos entre el grupo control y tolueno post tratamiento estos no presentaron significancia.

Estos datos son similares a los reportados por Lin y col., (2010), que tampoco observaron diferencias significativas en la ganancia de peso durante la administración del tolueno en comparación con el grupo control. En ese estudio utilizaron ratones macho NMRI a las cuales se les administro tolueno i.p. en concentraciones ascendentes desde el día pos natal 35 al 46 de la siguiente manera: 600mg/kg a partir del día 35 al 37 PN, 750mg/kg del 38-39 PN, seguido de dos días sin administración y por último la misma dosis (750mg/kg) del día 42 al 46 PN.

Gauthereau y col. (2009), expusieron ratas macho de la cepa Wistar ( $350 \pm 50$  g de peso) a tolueno, xileno y benceno (6000 ppm) por un periodo de dos meses

(30 min, 2 veces al día, con diferencia de 6 hrs) con el fin de estudiar el efecto de los disolventes sobre la ingesta de glutamato monosódico (umami), ingesta de alimento y peso corporal de las ratas. Los resultados mostraron un aumento en la ingesta de la solución de glutamato en las ratas expuestas a los disolventes, además de un menor aumento de peso en comparación con el grupo control solo en el grupo expuesto a benceno. El grupo tolueno y xileno no presentaron diferencias significativas en cuanto al peso corporal.

Lee y col., (2005) utilizaron ratas Sprague-Dawley a las que se les administro tolueno i.p. (500mg/kg) diariamente durante el día PN 4 al 9. No observaron diferencia significativa en los pesos corporales de las ratas del grupo tolueno respecto al control.

Por otro lado, también existen estudios en los que la exposición a tolueno sí afectó la ingesta de alimento y por lo tanto el peso corporal de las ratas, por ejemplo, Herrera-López (2013) expuso ratas macho de la cepa Wistar de dos meses de edad a 4000 ppm de tolueno por un periodo de 60 días (30 min, 2 veces al día), en donde se observó que a partir de la quinta semana de exposición, el grupo tolueno tuvo un menor consumo de alimento presentando una significancia estadística al compararlo con el control. Además hubo significancia estadística entre los pesos del grupo tolueno y control a partir de la sexta semana de exposición al disolvente.

Duncan y col. (2012), expusieron ratas macho Wistar adolescentes (PN=27) a tolueno (3000 ppm) en periodos de 1 h por día, 3 veces por semana, durante 2 meses. Se observó un retraso significativo en el aumento de peso durante el periodo de exposición.

Es posible que la edad de las ratas, el periodo de exposición al disolvente y las variaciones de concentración influyan en la menor ganancia de peso ya que en los estudios mencionados se utilizaron ratas más jóvenes y periodos más prolongados de exposición en comparación con las de nuestro estudio.

En el caso de las ratas expuestas a 6000 ppm durante un mes, se observó una significancia estadística entre los pesos pre y post tratamiento ( $p=0.001$ ) y de igual

manera en el grupo control ( $p=0.001$ ). Además, hubo significancia estadística al comparar los pesos del grupo control vs el grupo tolueno post tratamiento con una  $p=0.005$ , es decir, los animales del grupo control aumentaron aún más de peso en comparación con los del grupo tolueno, al parecer una concentración más alta de tolueno sí tuvo efecto sobre los pesos corporales de las ratas en solo un mes de exposición.

En general, los datos sugieren que la exposición prolongada y a concentraciones elevadas de tolueno tenga como efecto una alteración en la ingesta de alimento. Es probable que los mecanismos subyacentes sean complejos y multifactoriales.

Se ha demostrado que la exposición al tolueno en roedores aumenta los niveles de serotonina en el cerebro, el cual es el principal neurotransmisor modulador del apetito y un potente agente anoréxico. Las posibles interacciones funcionales entre los receptores de la serotonina y los diferentes sistemas neuromoduladores podrían estar involucradas en la regulación fisiológica del apetito. Por lo tanto, se ha descrito que los agonistas del receptor hipotalámico 5-HT inhiben la acción del Neuropeptido Y (NPY), un potente estimulador de la ingesta de alimentos. Además, se ha documentado del incremento de galanina en la región hipotalámica, otro estimulador de la ingesta de alimento, el cual podría representar un mecanismo compensatorio contra la anorexia inducida por tolueno (Shen *et al.*, 1992; Moron *et al.*, 2004; Dick *et al.*, 2015).

Para el protocolo de memoria se realizaron dos pruebas de actividad motora espontánea, una en campo abierto y otra en la caja del objeto novedoso, estas pruebas se realizaron previo y posterior al tratamiento con tolueno o aire, registrándose el número de veces en que la rata se paraba en dos patas (actividad vertical).

No se observó diferencia significativa en ambos grupos, antes y después de la exposición al disolvente o aire en la caja del objeto novedoso. Sin embargo, en la prueba realizada en el campo abierto sí se presentó significancia estadística

( $p=0.001$ ) entre el pre y post tratamiento en el grupo control, sin mostrar diferencia en el grupo tolueno.

Diversos estudios realizados con roedores expuestos a tolueno han reportado un aumento en la actividad locomotora (Batis et al., 2010). Tal es el caso de Batis y col., (2010) en donde utilizaron ratas macho de la cepa Sprague-Dawley adolescentes (24 PN) y adultas (86 PN), las cuales fueron asignadas a 1 de 3 patrones de exposición a tolueno (0, 8000 ó 16000 ppm). Evaluaron la actividad locomotora, durante y después de 30 min de la exposición. En general las ratas adolescentes mostraron una actividad locomotora mayor durante la exposición en los 3 patrones, en contraste con las ratas adultas que mostraron una mayor actividad en el periodo de recuperación (30 min después).

Bowen y col., (2007) expusieron ratas macho y hembras de la cepa Long-Evans por 20 min a 0, 2000, 4000 y 8000 ppm de tolueno por 10 días, de dos edades distintas, 28-39 PN (adolescentes) y 44-55 ó 70 PN (adultas) y evaluaron actividad locomotora durante las exposiciones. El tolueno aumento significativamente la actividad en comparación con el control.

En efecto, el tolueno si altera las habilidades motoras durante o poco tiempo después de la exposición al disolvente, teniendo un efecto bifásico en el comportamiento con aumento en la actividad motora a bajas concentraciones seguido de depresión a altas concentraciones (Williams, *et al.*, 2007; Dinwindie, 1994).

Con base a los resultados en nuestro estudio, el tratamiento con tolueno no tuvo efecto sobre la actividad motora en los animales posterior a un mes de exposición. Las pruebas se realizaron por lo menos 24 horas después de la última exposición a tolueno, por lo que no se encontraban bajo los efectos del disolvente.

Gmaz y col., (2012), observaron que la inhalación aguda de tolueno (~5000 ppm) producía deterioros en las habilidades de natación y capacidad de navegar en las ratas en el laberinto acuático de Morris, pero estas habilidades eran recuperadas rápidamente en un periodo aproximado de 20 min.



Como ya se mencionó anteriormente, en nuestro estudio, el grupo control presentó una disminución en la actividad motora después del mes de tratamiento con aire sin embargo, no olvidemos que se trata de una prueba conductual por lo que es difícil predecir cómo será el comportamiento de los animales.

Estos datos son similares a los reportados por Jacobo-Jacobo (2017), donde evaluó la actividad motora en ratas macho de la cepa Wistar separadas en 3 grupos de distintas edades después de un mes de exposición a tolueno (4000 ppm). Se observó una disminución en la actividad de las ratas del grupo control tanto en un campo abierto como en la caja del objeto novedoso. Sin observar diferencia en el grupo tolueno.

Para evaluar memoria a largo plazo de tipo no declarativa, se utilizó la prueba de auto aprendizaje en la caja condicionante de Skinner. Previamente la prueba fue estandarizada en el laboratorio por lo que el 100% de los animales utilizados en el estudio aprendieron "respuesta condicionante". Se consideró que la rata aprendía cuando el número de respuestas fuera igual o mayor a 40.

Se observó que la mayoría de las ratas aprendían al cuarto día de entrenamiento de los 7 días contemplados en la prueba. El 70% de los animales del grupo control aprendió el cuarto día y el 50% del grupo tolueno, seguido del quinto día de prueba, en donde se observó un 20% en ambos grupos.

Previo al tratamiento con tolueno (4000 ppm) o aire (control), ambos grupos tuvieron un número de respuestas condicionantes similar, es decir, por encima de 50. Posterior al tratamiento, se observó un incremento de respuestas condicionantes por parte del grupo control en el primer día de prueba (post 1), sin embargo, no presentó significancia estadística con respecto al pre tratamiento. Al segundo día de prueba (post 2) sí hubo significancia estadística en comparación con el pre tratamiento con una  $p=0.001$ .

En el caso del grupo tolueno, hubo un incremento en el número de respuestas condicionantes en el primer día de prueba post tratamiento (post 1) observándose una significancia estadística en comparación con el número de respuestas pre

tratamiento con una  $p=0.017$ . Se observó la misma tendencia que presentó el grupo control en el segundo día de prueba, es decir, un incremento aún mayor en el "post 2" presentando significancia estadística en comparación con el pre tratamiento con una  $p=0.001$ .

Al parecer el tratamiento con tolueno no afectó la memoria en las ratas, ya que recordaron como ejecutar la tarea y en un número de respuestas considerables. Estos datos son similares a los reportados en el estudio realizado en nuestro laboratorio por Jacobo-Jacobo (2017), en donde utilizó 65 ratas macho de la cepa Wistar, divididas en 3 grupos de diferentes edades (7-8 meses, 5-6 meses y 4 meses) y a su vez subdivididas en dos grupos: uno expuesto a tolueno (4000 ppm) y otro expuesto a aire (control). Los animales fueron sometidos al mismo protocolo de memoria usado en nuestro estudio. Únicamente el grupo de 7-8 meses de edad presentaron una disminución en el número de respuestas condicionantes en el post tratamiento tanto en el subgrupo tolueno como en el subgrupo control, debido a esto se consideró que la disminución en el número de respuestas no se debió al tratamiento con tolueno y que pudo haber sido por la edad de las ratas y el tiempo tan prolongado que les tomó evaluar la memoria (4 meses). Los grupos restantes no presentaron alteración en la memoria ante la exposición a tolueno.

Recordemos que la memoria implícita suele ser rígida y duradera, además la interacción funcional repetitiva de diversas estructuras neuroanatómicas, ensambladas en circuitos neuronales específicos provocan el reforzamiento de las conexiones sinápticas involucradas y, los cambios de plasticidad sináptica que se requieren para establecer los procesos de aprendizaje y memoria. Los recuerdos, una vez convertidos en su forma duradera son relativamente estables (Solís *et al.*, 2009).

Se puede pensar que una vez que la memoria se haya consolidado, resulte difícil que el tratamiento con tolueno a 4000 ppm durante un mes haya tenido efecto alguno sobre la memoria no declarativa en ratas.

De igual manera diversos factores pudieran ser tomados en cuenta para futuros estudios como la edad de las ratas, las concentraciones del tolueno, los

periodos de exposición al disolvente, asociación de diversos disolventes y cepa de las ratas.

No existe algún otro estudio en donde se haya evaluado el efecto de la exposición a tolueno sobre un modelo de auto aprendizaje en la caja condicionante de Skinner, sin embargo, se pueden mencionan algunos otros estudios en donde el tolueno no afecto la memoria.

Miyagawa y col., (1995) estudiaron el efecto de la exposición a tolueno (600 ppm, 24 h por día, por 50 días) en el proceso de aprendizaje y memoria de trabajo en ratas utilizando el laberinto de brazos radiales. No obtuvieron diferencias significativas sobre la memoria después de la exposición. Gmaz y col., (2012) expusieron a tolueno de manera aguda (~5000 ppm) ratas macho y hembras de la cepa Long-Evans de 6-7 meses de edad, las cuales recibieron previo entrenamiento en el laberinto de Morris en donde no se observó efectos sobre la memoria espacial respecto al control.

Dick y col., (2013), expusieron ratas macho de la cepa Wistar (27 PN) a 10000 ppm, una hora por día, 3 veces por semana, durante 4 semanas. No se observó alteraciones en la memoria espacial en las ratas en la prueba de laberinto acuático de Morris.

Ladefoged y col., (1991) expusieron ratas macho de la cepa Wistar a 0, 500 y 1500 ppm de tolueno, 6 hr/día, 5 días/semana, durante 6 meses. No se observó cambios neuroconductuales en las pruebas realizadas en el laberinto de brazo radial y en la prueba de evitación pasiva.

Beasley y col., (2012), expusieron ratas adultas de la cepa Long-Evans a 0, 10, 100 y 1000 ppm de tolueno de manera sub-aguda durante 4 semanas. No observaron ningún efecto en la actividad motora, la ansiedad (prueba del laberinto elevado en cruz), adquisición-discriminación visual y aprendizaje instrumental.

También se estudió la memoria a corto plazo y largo plazo (declarativa) en la prueba del objeto novedoso. En general no se observó diferencias significativas

tanto en el grupo tolueno como en el grupo control en los tiempos de exploración de los objetos ni en los índices de reconocimiento.

Estos datos son similares a los realizados en nuestro laboratorio por Jacobo-Jacobo (2017), que también evaluó memoria declarativa de tipo episódica, en la prueba de reconocimiento del objeto novedoso en ratas expuestas a tolueno un mes (4000 ppm) utilizando el mismo protocolo que en el presente estudio, como anteriormente se mencionó, no se observó diferencia significativa en las ratas expuestas a tolueno en comparación con las del grupo control.

Estos datos no concuerdan con otros estudios en donde también se utilizó la prueba de reconocimiento de objetos en los que la exposición a tolueno si afecto la memoria en ratas y ratones. Chan y col., (2012) estudiaron el efecto del tolueno sobre la memoria de reconocimiento en la prueba de "reconocimiento del objeto novedoso". Usaron ratones a los cuales se les administro i.p. 0, 250, 500 y 750 mg/kg de tolueno diluido en aceite de maíz. La administración se realizó 30 min antes de la fase de adquisición, a las 24 horas fue evaluada la retención de la memoria y obtuvieron como resultado que el tolueno reducía el índice de reconocimiento en todas las dosis empleadas.

En el estudio de Lin y col., (2010) anteriormente mencionado, también investigaron el efecto del tolueno sobre la memoria en la prueba de reconocimiento del objeto novedoso. Realizaron la prueba durante el día PN 61 y nuevamente en el día PN 79, a la hora y a las 24 horas después de la sesión de adquisición. El tiempo de exploración del objeto novedoso se redujo significativamente en el grupo tratado con tolueno durante ambos periodos de prueba.

Win-Shwe y Fujimaki (2011), investigaron el efecto agudo del tolueno sobre la retención de la memoria en la prueba de reconocimiento del objeto novedoso además de la expresión de las subunidades del receptor NMDA en el hipocampo de ratones hembra utilizando RT-PCR. Los animales se habituaron y se entrenaron con la presentación de dos objetos iguales por 10 minutos, 24 horas después les administraron una dosis de tolueno (300mg/kg i.p.). 60 minutos después de la

administración realizaron la fase de prueba. Como resultado los ratones tratados con tolueno no prefirieron el objeto nuevo y mostraron una pobre discriminación entre objetos nuevos y familiares. Además, se observó una disminución en la expresión de la subunidad NR2B del receptor NMDA en el hipocampo.

Se observa que tanto las concentraciones empleadas como los periodos previos de exposición al tolueno no son similares, por lo que podrían ser algunos de los factores que hayan influido en la diferencia de resultados.

Para el protocolo de aprendizaje se realizó la prueba de actividad motora en la caja del objeto novedoso previo y posterior al periodo de exposición al tolueno. Se observó una disminución en la actividad motora en las ratas del grupo control post tratamiento, la cual presento diferencia significativa ( $p=0.024$ ) con respecto al pre tratamiento. El grupo tolueno no presentó diferencia significativa.

Los datos son similares a los obtenidos en el protocolo de memoria en la prueba de actividad motora en campo abierto anteriormente descritos.

Se utilizó la prueba de auto aprendizaje en la caja de Skinner para evaluar el aprendizaje de las ratas expuestas previamente a tolueno durante un mes a 6000 ppm. Se observó nuevamente que el cuarto día era en el que la mayoría de las ratas del grupo control aprendían (50%) mientras que en el grupo tolueno solo un 14.28% aprendían "respuesta condicionante" este día. Estos datos se pueden comparar con los resultados obtenidos en el protocolo de memoria donde se ve claramente que el cuarto día presentó un porcentaje mayor en comparación con los otros días de prueba.

En las gráficas se puede apreciar mejor la diferencia que hubo por parte del grupo tolueno de acuerdo a los días en los que aprendían. Se puede decir entonces que el tolueno produjo un déficit en el aprendizaje de tipo asociativo en las ratas.

Estos datos concuerdan con el estudio de Dick y col., (2013) en donde expusieron ratas macho de la cepa Wistar a 10000 ppm durante 4 semanas.

Observando un retraso en la adquisición del aprendizaje instrumental en caja de Skinner utilizando sacarosa al 5%.

Las implicaciones de la exposición crónica al tolueno en el aprendizaje instrumental sobre animales siguen siendo relativamente desconocidas (Bowen, 2006).

Bowen y Mc Donald, (2008), estudiaron el efecto de la exposición a tolueno (1000, 3600 y 6000 ppm) sobre la función cognitiva en ratones después de haber aprendido una tarea operante (Fixed-ratio) utilizando leche endulzada como recompensa. La exposición a tolueno disminuyó las tasas de respuesta además los ratones expuestos a 6000 ppm mostraron una disminución dramática en el número de recompensas recibidas en comparación a los expuestos a las demás dosis.

Por último, se evaluó memoria a corto plazo y memoria declarativa (episódica) en la prueba del objeto novedoso. Como ya se ha mencionado, esta prueba se realizó posterior al tratamiento con tolueno (6000 ppm) o aire.

El grupo control y tolueno tuvieron preferencia por el objeto novedoso a la hora posterior de la fase de adquisición (memoria a corto plazo).

Al evaluar memoria a largo plazo (declarativa) se observó que el grupo tolueno no reconoció el objeto novedoso presentando un índice de reconocimiento por debajo de 0.5 y mostrando una diferencia significativa ( $p=0.049$ ) en comparación con el grupo tolueno.

En comparación con los resultados obtenidos en el protocolo de memoria se puede decir que una concentración mayor si causo un deterioro en la memoria a largo plazo.

Estos datos son similares a los reportados por Huerta-Rivas y col., (2012), en donde estudiaron el efecto de la exposición crónica y aguda de tolueno (1000, 2000, 4000 o 6000 ppm) en ratas macho de la cepa Wistar durante dos etapas de la vida: adolescencia (PN 22-35) y la edad adulta joven (PN 43-56) sobre el aprendizaje y la memoria. Las pruebas de memoria utilizadas fueron la prueba de reconocimiento

del objeto novedoso y prueba de evitación inhibitoria. La inhalación crónica y aguda del tolueno perjudico el aprendizaje, la memoria a corto y largo plazo en las pruebas anteriormente mencionadas en ambos grupos de edad, este efecto se produjo a concentraciones bajas de tolueno (1000 y 2000 ppm).

## 9. CONCLUSIONES

- La exposición crónica al tolueno a 4000 ppm no afectó el aumento de peso corporal en las ratas.
- La actividad motora de los animales no se vio afectada tras la exposición crónica al tolueno a 4000 ppm.
- La exposición crónica al tolueno a 4000 ppm no tuvo efectos significativos sobre la memoria a largo plazo de tipo no declarativa, evaluada en la prueba de auto aprendizaje en la caja condicionante de Skinner.
- La exposición crónica al tolueno a 4000 ppm no afectó la memoria a corto plazo ni la memoria a largo plazo de tipo declarativa (episódica) evaluada en la prueba de reconocimiento del objeto novedoso.
- La exposición crónica a 6000 ppm de tolueno induce una menor ganancia de peso en las ratas.
- La actividad motora de los animales no se vio afectada tras la exposición crónica al tolueno a 6000 ppm.
- La exposición crónica a 6000 ppm de tolueno produjo un déficit en el aprendizaje en las ratas utilizando un modelo de auto aprendizaje en la caja condicionante de Skinner.
- La exposición crónica al tolueno a 6000 ppm no afectó la memoria a corto plazo, utilizando la prueba de reconocimiento del objeto novedoso.
- La exposición crónica al tolueno a 6000 ppm afectó de manera significativa la memoria a largo plazo de tipo declarativa (episódica) evaluada en la prueba de reconocimiento del objeto novedoso.



## 10. REFERENCIAS

- Aguado-Aguilar, L. (2001). Aprendizaje y memoria. *Revista de neurología*, 32(4), 373-381.
- ATSDR. Toxicological Profile for Toluene – Draft. *US Dep Heal Hum Serv.* 2015; (September). <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp41.pdf>
- Bale, A. S., Tu, Y., Carpenter-Hyland, E. P., Chandler, L. J., & Woodward, J. J. (2005). Alterations in glutamatergic and gabaergic ion channel activity in hippocampal neurons following exposure to the abused inhalant toluene. *Neuroscience*, 130(1), 197-206.
- Balster, R. L. (1998). Neural basis of inhalant abuse. *Drug and alcohol dependence*, 51(1), 207-214.
- Balster, R. L., Cruz, S. L., Howard, M. O., Dell, C. A., & Cottler, L. B. (2009). Classification of abused inhalants. *Addiction*, 104(6), 878-882.
- Batis, J. C., Hannigan, J. H., & Bowen, S. E. (2010). Differential effects of inhaled toluene on locomotor activity in adolescent and adult rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 96(4), 438-448.
- Baydas, G., Ozveren, F., Akdemir, I., Tuzcu, M., & Yasar, A. (2005). Learning and memory deficits in rats induced by chronic thinner exposure are reversed by melatonin. *Journal of pineal research*, 39(1), 50-56.
- Beasley, T. E., Evansky, P. A., & Bushnell, P. J. (2012). Behavioral effects of sub-acute inhalation of toluene in adult rats. *Neurotoxicology and teratology*, 34(1), 83-89.
- Ben-Ari, Y., Aniksztejn, L., & Bregestovski, P. (1992). Protein kinase C modulation of NMDA currents: an important link for LTP induction. *Trends in neurosciences*, 15(9), 333-339.
- Bowen, S. E. (2006). Increases in amphetamine-like discriminative stimulus effects of the abused inhalant toluene in mice. *Psychopharmacology*, 186(4), 517-524.

- Bowen, S. E. (2009). Time course of the ethanol-like discriminative stimulus effects of abused inhalants in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 91(3), 345-350.
- Bowen, S. E., Batis, J. C., Paez-Martinez, N., & Cruz, S. L. (2006). The last decade of solvent research in animal models of abuse: mechanistic and behavioral studies. *Neurotoxicology and teratology*, 28(6), 636-647.
- Bowen, S. E., Charlesworth, J. D., Tokarz, M. E., Wright, M. J., & Wiley, J. L. (2007). Decreased sensitivity in adolescent vs. adult rats to the locomotor activating effects of toluene. *Neurotoxicology and teratology*, 29(6), 599-606.
- Brioni, J. D. (1993). Role of GABA during the multiple consolidation of memory. *Drug development research*, 28(1), 3-27.
- Broadbent, N. J., Squire, L. R., & Clark, R. E. (2004). Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(40), 14515-14520.
- Brouette, T., & Anton, R. (2001). Clinical review of inhalants. *The American Journal on Addictions*, 10(1), 79-94.
- Byrne, J. H., & Hawkins, R. D. (2015). Nonassociative learning in invertebrates. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(5), a021675.
- Carrillo-Mora, P. (2010). Sistemas de memoria: reseña histórica, clasificación y conceptos actuales. Primera parte: Historia, taxonomía de la memoria, sistemas de memoria de largo plazo: la memoria semántica. *Salud mental*, 33(1), 85-93.
- Carrillo-Mora, P. (2010). Sistemas de memoria: reseña histórica, clasificación y conceptos actuales. Segunda parte: Sistemas de memoria de largo plazo: Memoria episódica, sistemas de memoria no declarativa y memoria de trabajo. *Salud mental*, 33(2), 197-205.
- Castellano, C., Cestari, V., & Ciamei, A. (2001). NMDA receptors and learning and memory processes. *Current drug targets*, 2(3), 273-283.
- Chan, M. H., Chung, S. S., Stoker, A. K., Markou, A., & Chen, H. H. (2012). Sarcosine attenuates toluene-induced motor incoordination, memory

impairment, and hypothermia but not brain stimulation reward enhancement in mice. *Toxicology and applied pharmacology*, 265(2), 158-165.

- Chien, T. H., Chan, M. H., Tang, Y. C., & Chen, H. H. (2005). Toluene exposure during the brain growth spurt reduces behavioral responses to noncompetitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonists in adult rats. *Psychopharmacology*, 182(4), 468-474.
- Cohr, K. H., & Stockholm, J. (1979). Toluene: a toxicologic review. *Scandinavian journal of work, environment & health*, 71-90.
- Cruz, S. L., Balster, R. L., & Woodward, J. J. (2000). Effects of volatile solvents on recombinant N-methyl-D-aspartate receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *British journal of pharmacology*, 131(7), 1303-1308.
- Cruz, S. L., Rivera-García, M. T., & Woodward, J. J. (2014). Review of toluene action: clinical evidence, animal studies and molecular targets. *Journal of drug and alcohol research*, 3.
- Deleu, D., & Hanssens, Y. (2000). Cerebellar dysfunction in chronic toluene abuse: beneficial response to amantadine hydrochloride. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 38(1), 37-41.
- DINWIDDIE, S. H. (1994). Abuse of inhalants: a review. *Addiction*, 89(8), 925-939.
- Duncan, J. R., & Lawrence, A. J. (2013). Conventional concepts and new perspectives for understanding the addictive properties of inhalants. *Journal of pharmacological sciences*, 122(4), 237-243.
- Duncan, J. R., Dick, A. L. W., Egan, G., Kolbe, S., Gavrilescu, M., Wright, D., ... & Lawrence, A. J. (2012). Adolescent toluene inhalation in rats affects white matter maturation with the potential for recovery following abstinence. *PloS one*, 7(9), e44790.
- Eichenbaum, H., Yonelinas, A. P., & Ranganath, C. (2007). The medial temporal lobe and recognition memory. *Annu. Rev. Neurosci.*, 30, 123-152.
- Ennaceur, A., & Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioural brain research*, 31(1), 47-59.

- Etchepareborda, M. C., & Abad-Mas, L. (2005). Memoria de trabajo en los procesos básicos del aprendizaje. *Rev Neurol*, 40(Supl 1), S79-S83.
- Evans, E. B., & Balster, R. L. (1991). CNS depressant effects of volatile organic solvents. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 15(2), 233-241.
- Filley, C. M., Halliday, W., & Kleinschmidt-DeMasters, B. K. (2004). The effects of toluene on the central nervous system. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 63(1), 1-12.
- Fornazzari, L., Wilkinson, D. A., Kapur, B. M., & Carlen, P. L. (1983). Cerebellar, cortical and functional impairment in toluene abusers. *Acta Neurologica Scandinavica*, 67(6), 319-329.
- Gauthereau-Torres, M. Y., Martínez-Revollar, G., Plancarte-Miranda, M., Girón-Abarca, L., Campos-Campos, B., & Mercado-Camargo, R. (2009). Effects of chronic solvent abuse exposure on umami taste perception. In *Proceedings of the Western Pharmacology Society*(Vol. 52, pp. 99-103).
- Gigengack, R. (2014). The chemo and the mona: Inhalants, devotion and street youth in Mexico City. *International Journal of Drug Policy*, 25(1), 61-70.
- Gmaz, J. M., Yang, L., Ahrari, A., & McKay, B. E. (2012). Binge inhalation of toluene vapor produces dissociable motor and cognitive dysfunction in water maze tasks. *Behavioural pharmacology*, 23(7), 669-677.
- Han, M., & Kim, J. (2015). Effect of dietary iron loading on recognition memory in growing rats. *PloS one*, 10(3), e0120609.
- Hannigan, J. H., & Bowen, S. E. (2010). Reproductive toxicology and teratology of abused toluene. *Systems biology in reproductive medicine*, 56(2), 184-200.
- Hass, U., Lund, S. P., Hougaard, K. S., & Simonsen, L. (1999). Developmental neurotoxicity after toluene inhalation exposure in rats. *Neurotoxicology and teratology*, 21(4), 349-357.
- Herrera-López, G. (2013). *"Efecto de la inhalación crónica de tolueno sobre la reactividad adrenérgica en corazón aislado de rata"* (tesis de licenciatura). Facultad de Químico Farmacobiología, Michoacán, México.

- Hougaard, K. S., Hass, U., Lund, S. P., & Simonsen, L. (1999). Effects of prenatal exposure to toluene on postnatal development and behavior in rats. *Neurotoxicology and teratology*, 21(3), 241-250.
- Huerta-Rivas, A., López-Rubalcava, C., Sánchez-Serrano, S. L., Valdez-Tapia, M., Lamas, M., & Cruz, S. L. (2012). Toluene impairs learning and memory, has antinociceptive effects, and modifies histone acetylation in the dentate gyrus of adolescent and adult rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 102(1), 48-57.
- Izquierdo, I., Medina, J. H., Vianna, M. R., Izquierdo, L. A., & Barros, D. M. (1999). Separate mechanisms for short-and long-term memory. *Behavioural brain research*, 103(1), 1-11.
- Jacobo-Jacobo, A. (2017). "Efecto de la exposición a tolueno sobre la memoria a largo plazo en ratas" (tesis de maestría). Facultad de Ciencias Medicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez", Michoacán, México.
- Kandel, E. R., & Schwartz, J. H. (1982). Molecular biology of learning: modulation of transmitter release. *Science*, 218(4571), 433-443.
- Kent, P. L. (2016). Working memory: A selective review. *Applied Neuropsychology: Child*, 5(3), 163-172.
- King, M. D. (1982). Neurological sequelae of toluene abuse. *Human toxicology*, 1(3), 281-287.
- Kurtzman, T. L., Otsuka, K. N., & Wahl, R. A. (2001). Inhalant abuse by adolescents. *Journal of Adolescent Health*, 28(3), 170-180.
- Ladefoged, O., Strange, P., Møller, A., Lam, H. R., Østergaard, G., Larsen, J. J., & Arlien-Søborg, P. (1991). Irreversible effects in rats of toluene (inhalation) exposure for six months. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 68(5), 384-390.
- Lee, Y. F., Lo, P. S., Wang, Y. J., Hu, A., & Chen, H. H. (2005). Neonatal toluene exposure alters N-methyl-D-aspartate receptor subunit expression in the hippocampus and cerebellum in juvenile rats. *Neuropharmacology*, 48(2), 195-203.

- Lin, B. F., Ou, M. C., Chung, S. S., Pang, C. Y., & Chen, H. H. (2010). Adolescent toluene exposure produces enduring social and cognitive deficits in mice: an animal model of solvent-induced psychosis. *The World Journal of Biological Psychiatry*, 11(6), 792-802.
- Lo, P. S., Wu, C. Y., Sue, H. Z., & Chen, H. H. (2009). Acute neurobehavioral effects of toluene: involvement of dopamine and NMDA receptors. *Toxicology*, 265(1), 34-40.
- Machado, S., Portella, C. E., Silva, J. G., Velasques, B., Bastos, V. H., Cunha, M., ... & Ribeiro, P. (2008). Aprendizaje y memoria implícita: mecanismos y neuroplasticidad. *Rev Neurol*, 46(9), 543-549.
- Manuel-Apolinar, L., & Meneses, A. (2004). 8-OH-DPAT facilitated memory consolidation and increased hippocampal and cortical cAMP production. *Behavioural brain research*, 148(1), 179-184.
- McDonald, R. J., & White, N. M. (1993). A triple dissociation of memory systems: hippocampus, amygdala, and dorsal striatum. *Behavioral neuroscience*, 107(1), 3.
- Miyagawa, M., Honma, T., & Sato, M. (1995). Effects of subchronic exposure to toluene on working and reference memory in rats. *Neurotoxicology and teratology*, 17(6), 657-664.
- Morales-Montor, J., Picazo, O., Besedovsky, H., Hernández-Bello, R., López-Griego, L., Becerril-Villanueva, E., ... & Camacho-Arroyo, I. (2014). Helminth infection alters mood and short-term memory as well as levels of neurotransmitters and cytokines in the mouse hippocampus. *Neuroimmunomodulation*, 21(4), 195-205.
- Morgado, I. (2005). Psicobiología del aprendizaje y la memoria: fundamentos y avances recientes. *Rev Neurol*, 40(5), 289-297.
- Murase, S., & Schuman, E. M. (1999). The role of cell adhesion molecules in synaptic plasticity and memory. *Current opinion in cell biology*, 11(5), 549-553.

- NIDA. (2017, February 16). Inhalants. Retrieved from <https://www.drugabuse.gov/publications/drugfacts/inhalants> on 2017, November 5
- Olarte-Sánchez, C. M., Kinnavane, L., Amin, E., & Aggleton, J. P. (2014). Contrasting networks for recognition memory and recency memory revealed by immediate-early gene imaging in the rat. *Behavioral neuroscience*, 128(4), 504.
- Páez Martínez, N., López Rubalcava, C., & Cruz, S. L. (2003). Avances recientes en la investigación de los mecanismos celulares de acción de los disolventes de abuso. *Salud mental*, 26(5).
- Reynolds, G. S. (1973). *Compendio de condicionamiento operante*. Editorial Ciencia de la Conducta.
- Rosenberg, N. L., Grigsby, J., Dreisbach, J., Busenbark, D., & Grigsby, P. (2002). Neuropsychologic impairment and MRI abnormalities associated with chronic solvent abuse. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 40(1), 21-34.
- Seo, H. S., Yang, M., Song, M. S., Kim, J. S., Kim, S. H., Kim, J. C., ... & Moon, C. (2010). Toluene inhibits hippocampal neurogenesis in adult mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 94(4), 588-594.
- Solís, H., & López-Hernández, E. (2009). Neuroanatomía funcional de la memoria. *Arch Neurocién (Mex)*, 14(3), 176-187.
- Squire, L. R. (1992). Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychological review*, 99(2), 195.
- van Amsterdam, J., Nabben, T., & van den Brink, W. (2015). Recreational nitrous oxide use: Prevalence and risks. *Regulatory toxicology and pharmacology*, 73(3), 790-796.
- Villatoro, J. A., Cruz, S. L., Ortiz, A., & Medina-Mora, M. E. (2011). Volatile substance misuse in Mexico: correlates and trends. *Substance use & misuse*, 46(sup1), 40-45.
- Villatoro, J. A., Fregoso, D., Bustos, M., Oliva, N., Mujica, A., Martin del Campo, R., Nanni, R., & Medina-Mora, M. (2014). *Encuesta Nacional de*



*Consumo de Drogas en Estudiantes*, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz; Comisión Nacional Contra las Adicciones, Secretaría de Salud. [http://www.conadic.salud.gob.mx/pdfs/investigación/ENCODE\\_ALCOHOL\\_2014.pdf](http://www.conadic.salud.gob.mx/pdfs/investigación/ENCODE_ALCOHOL_2014.pdf)

- Warrington, E. K., & McCarthy, R. A. (1994). Multiple meaning systems in the brain: A case for visual semantics. *Neuropsychologia*, 32(12), 1465-1473.
- Weinberger NM. *New perspectives on the auditory cortex: learning and memory*. Vol 129. 1<sup>st</sup> ed. Elsevier B.V.; 2015.
- White, A. M. (2003). What happened? Alcohol, memory blackouts, and the brain. *Alcohol Research and Health*, 27(2), 186-196.
- Williams, J. F., Storck, M., Committee on Substance Abuse, & Committee on Native American Child Health. (2007). Inhalant abuse. *Pediatrics*, 119(5), 1009-1017.
- Win-Shwe, T. T., & Fujimaki, H. (2012). Acute administration of toluene affects memory retention in novel object recognition test and memory function-related gene expression in mice. *Journal of Applied Toxicology*, 32(4), 300-304.
- Win-Shwe, T. T., Yoshida, Y., Kunugita, N., Tsukahara, S., & Fujimaki, H. (2010). Does early life toluene exposure alter the expression of NMDA receptor subunits and signal transduction pathway in infant mouse hippocampus?. *Neurotoxicology*, 31(6), 647-653.
- Winters, B. D., Saksida, L. M., & Bussey, T. J. (2008). Object recognition memory: neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 32(5), 1055-1070.