



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO



DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS "DR.
IGNACIO CHÁVEZ"

**"EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A TOLUENO SOBRE LA
RESPUESTA ADRENÉRGICA CARDIOVASCULAR EN
EL MODELO DE RATA ANESTESIADA"**

QFB. LUIS ÁNGEL QUIROZ GARCÍA

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD

DIRECTORES DE LA TESIS

D.C. DANIEL GODÍNEZ HERNÁNDEZ

D.C. MARCIA YVETTE GAUTHEREAU TORRES

MORELIA, MICH. AGOSTO 2024.

Agradecimientos

A mis padres Ángel Arnoldo y María del Carmen, por siempre darme su apoyo incondicional, por todo su esfuerzo y dedicación.

A mis tíos J. Rubén y María Guadalupe, por brindarme su apoyo y siempre tratar de darme lo que mis padres no podían.

A mis hermanos Benjamín, Diana, Jesús, Casandra, Gisela y Francisco, por darme apoyo emocional y brindarme su amor, el cual fue necesario para seguir esforzándome.

A Marlene, por brindarme su apoyo, por no dejar que me dé por vencido y por mostrarme que a pesar de que siempre hay problemas debo de luchar por lo que quiero.

Al D. en C. Daniel y a la D. en C. Marcia, por brindarme su apoyo, los recursos necesarios para realizar mi trabajo, y lo importante, su tiempo y conocimiento, el cual me fue de gran ayuda para poder realizar este proyecto.

A mis sinodales D. en C. José Miguel Cervantes Alfaro, D. en C. Luis Fernando Ortega Varela y al D. en C. Zurizaddai Hernández Gallegos, por el conocimiento y por sus comentarios, los cuales fueron pieza fundamental en la creación de este proyecto.

Este proyecto contó con apoyo de la CIC, UMSNH, proyectos número:18096 y 18146.

Índice

Lista de abreviaturas

Índice de figuras

Índice de tablas

Resumen

Abstract

Introducción

1. Marco teórico.....	1
1.1. Inhalables.....	1
1.1.1. Definición de inhalables	1
1.1.2. Clasificación.....	1
1.1.3. Epidemiología de los inhalables	2
1.2. Tolueno	4
1.2.1. Efectos del tolueno	4
1.2.2. Usos	4
1.2.3. Farmacocinética del tolueno	5
1.2.4. Exposición a tolueno.....	6
1.2.5. Blancos moleculares del tolueno.....	7
1.3. Tolueno y sistema cardiovascular.....	7
1.4. Muerte súbita por inhalación	8
1.5. Tejido vascular	9
1.6. Sistema nervioso en la regulación cardiovascular.....	9
1.7. Receptores adrenérgicos	10
1.7.1. Tipos de receptores adrenérgicos	10
1.7.2. Mecanismos de acción de los receptores adrenérgicos α_1	12
1.8. Antecedentes del laboratorio.....	12

2. Justificación	17
3. Hipótesis.....	18
4. Objetivos.....	18
4.1. Objetivo general.....	18
4.2. Objetivos particulares	18
5. Estrategia experimental	19
6. Materiales y métodos	20
6.1. Animales de experimentación.....	20
6.2. Fármacos	20
6.3. Aspectos éticos	20
6.4. Grupos experimentales	20
6.5. Exposición a tolueno.....	21
6.6. Modelo de la rata anestesiada	22
6.7. Pruebas de reactividad a los fármacos	23
7. Análisis de resultados	25
8. Resultados.....	26
8.1. Valores iniciales en los diferentes grupos experimentales	26
8.2. Curvas dosis respuesta a fenilefrina.....	27
8.3. Efecto del tiempo de exposición en la presión sanguínea diastólica y sistólica.....	31
8.4. Efecto de la exposición subaguda y crónica a tolueno sobre la frecuencia cardíaca.....	33
8.5. Participación de los receptores adrenérgicos alfa 1D.....	35
8.5.1. Participación de los receptores alfa 1D en la presión de las ratas expuestas de manera subaguda	35
8.5.2. Participación de los receptores alfa 1D en la presión de las ratas expuestas de manera crónica.....	38

8.6. Área bajo la curva de los grupos experimentales	41
8.7. Respuesta máxima y dosis efectiva 50	42
8.8. Duración del efecto generado por las dosis crecientes de fenilefrina 44	
9. Discusión.....	46
10. Conclusiones.....	55
11. Perspectivas	56
12. Referencias.....	57

Lista de abreviaturas

ABC	Área bajo la curva
AR	Receptores adrenérgicos
Ca⁺²	Ion calcio
CaM	Calmodulina
DAG	Diacilglicerol
DE₅₀	Dosis efectiva 50
E_{max}	Respuesta máxima
IP₃	Inositol trifosfato
NSP	Nuevas sustancias psicoactivas
PLC	Fosfolipasa C
SNC	Sistema nervioso central
SNS	Sistema nervioso simpático

Índice de figuras

Figura 1. Prevalencia del consumo de drogas alguna vez en la vida.....	3
Figura 2. Farmacocinética del tolueno.....	5
Figura 3. Mecanismo de contracción del tejido vascular.....	14
Figura 4. Curvas concentración-respuesta a la adrenalina en ausencia y presencia de antagonistas adrenérgicos.....	15
Figura 5. Curvas concentración-respuesta a la adrenalina en corazones de animales expuestos de forma aguda a tolueno.....	15
Figura 6. Curvas concentración-respuesta a adrenalina en anillos de aorta de animales control y de animales expuestos a tolueno	16
Figura 7. Estrategia experimental.....	19
Figura 8. Cámara de exposición estática.....	24
Figura 9. Montaje de la rata anestesiada.....	24
Figura 10. Adquisición de datos de los cambios en la presión sanguínea	25
Figura 11. Curvas dosis-respuesta de la presión diastólica de animales expuestos de manera subaguda a tolueno y a aire	29
Figura 12. Curvas dosis-respuesta de la presión sistólica de animales expuestos de manera subaguda a tolueno y a aire.....	29
Figura 13. Curvas-dosis respuesta de la presión diastólica de ratas con exposición crónica a tolueno o a aire.	30
Figura 14. Curvas-dosis respuesta de la presión sistólica de ratas con exposición crónica a tolueno o a aire.	30
Figura 15. Curvas-dosis respuesta de la comparación de la presión diastólica de ratas con exposición subaguda y crónica a aire..	31
Figura 16. Curvas-dosis respuesta de la comparación de la presión sistólica de ratas con exposición subaguda y crónica a aire.....	32
Figura 17. Curvas-dosis respuesta de la comparación de la presión diastólica de ratas con exposición subaguda y crónica a tolueno.....	32

Figura 18. Curvas-dosis respuesta de la comparación de la presión sistólica de ratas con exposición subaguda y crónica a tolueno.....	33
Figura 19. Curvas-dosis respuesta de la comparación de la frecuencia cardíaca de ratas.	34
Figura 20. Curvas-dosis respuesta de la presión diastólica de ratas con y sin administración de BMY-7378 expuestas a aire de manera subaguda.....	36
Figura 21. Curvas-dosis respuesta de la presión sistólica de ratas con y sin administración de BMY-7378 expuestas a aire de manera subaguda.....	36
Figura 22. Curvas-dosis respuesta de la comparación de la presión sanguínea diastólica de ratas con y sin administración de BMY-7378 expuestas a tolueno de manera subaguda.....	37
Figura 23. Curvas-dosis respuesta de la comparación de la presión sanguínea sistólica de ratas con y sin administración de BMY-7378 expuestas a tolueno de manera subaguda.....	37
Figura 24. Curvas-dosis respuesta de la presión diastólica de ratas con y sin administración de BMY-7378 expuestas a aire de manera crónica.....	39
Figura 25. Curvas-dosis respuesta de la presión sistólica de ratas con y sin administración de BMY-7378 expuestas a aire de manera crónica.....	39
Figura 26. Curvas-dosis respuesta de la presión diastólica de ratas con y sin administración de BMY-7378 expuestas a tolueno de manera crónica.....	40
Figura 27. Curvas-dosis respuesta de la presión sistólica de ratas con y sin administración de BMY-7378 expuestas a tolueno de manera crónica.....	40
Figura 28. Curvas-dosis respuesta de la duración del efecto de la fenilefrina en la presión de ratas expuestas de manera subaguda a aire y a tolueno	45

Índice de tablas

Tabla 1. Características de los receptores adrenérgicos α_1 y α_2	11
Tabla 2. Valores iniciales y finales de pesos de los animales y valores basales de presión sanguínea y frecuencia cardíaca.	27
Tabla 3. Valores del área bajo la curva de las presiones de los grupos expuestos a 6000 ppm de tolueno y a aire.....	42
Tabla 4. Valores del efecto máximo y de la dosis efectiva 50 de los grupos expuestos a aire o a tolueno de manera subaguda o crónica	44

Resumen

Los inhalables son un grupo de sustancias con naturaleza diversa que sólo comparten la vía de administración y el hecho de ser utilizadas como drogas de abuso, dentro de los inhalables se encuentra el tolueno, el cual es un disolvente volátil que forma parte de muchos productos de uso doméstico, que son legales, baratos y fáciles de adquirir, y son utilizados de manera recreativa para provocar un estado de alteración mental. Los efectos causados por el tolueno a nivel cardiovascular son: aumento en la presión sanguínea, arritmias, taquicardias, sensibilización a catecolaminas y finalmente la muerte, pero no se sabe con precisión el mecanismo de acción implicado. Por lo anterior, es necesario conocer más a detalle el mecanismo de acción del tolueno a nivel cardiovascular. El objetivo del proyecto fue evaluar el efecto de la exposición a tolueno sobre la respuesta adrenérgica cardiovascular en la rata anestesiada. Se utilizaron ratas macho Wistar de una edad de 8-9 semanas y un peso de 300 a 400 g, con 4 grupos controles expuestos a aire, 2 de exposición subaguda y 2 de exposición crónica a 6000 ppm de tolueno. Las exposiciones se realizaron en cámaras de exposición estática durante 30 minutos, dos veces al día dejando 6 horas entre cada exposición, por 1 semana para los grupos subagudos y 4 semanas para los grupos crónicos. Una vez expuestos los animales, se utilizó el modelo de la rata anestesiada y se llevaron a cabo curvas dosis-respuesta a fenilefrina (agonista α_1 adrenérgico), en ausencia y presencia de BMY 7378 (antagonista α_{1D} adrenérgico). Para determinar si existieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los diferentes grupos de experimentación, a los datos obtenidos que cumplieron con la normalidad se les realizaron las pruebas paramétricas de T de Student o análisis de varianza de dos vías seguidos de la prueba post hoc de Tukey, de no cumplir el criterio anterior se llevaron a cabo las pruebas no paramétricas de U de Mann-Whitney o la prueba de Friedman. Los resultados mostraron que las ratas que fueron expuestas a tolueno presentaron presión sanguínea diastólica y sistólica basal más elevada en comparación al grupo expuesto a aire ($p < 0.05$), sin observar cambios en la frecuencia cardíaca. Se realizaron curvas dosis-respuesta a la fenilefrina en presencia y ausencia de BMY-7378, donde en las curvas dosis-respuesta a fenilefrina de la presión diastólica y sistólica de las ratas que fueron expuestas de manera subaguda a tolueno, no se observaron diferencias, ni en la frecuencia cardíaca, en comparación con su grupo control. En las curvas dosis-respuesta a fenilefrina de la presión diastólica y sistólica de las ratas que fueron expuestas crónicamente a tolueno, se observó que tuvieron una respuesta menor en comparación con su grupo control ($p < 0.05$). También se analizaron los resultados de la ABC, Emax y DE₅₀ de las presiones, y no se observó diferencia en los parámetros antes mencionados. Después, al analizar la participación de los receptores adrenérgicos alfa 1D, se identificó que la presión sanguínea diastólica y sistólica fue menor en las curvas dosis respuesta de ratas expuestas a aire que recibieron BMY-7378, en comparación a las expuestas a aire sin la administración del antagonista adrenérgico alfa 1D ($p < 0.05$). Las áreas bajo la curva (ABC) de las presiones de los grupos expuestos de manera crónica a aire fueron mayores en comparación a las del grupo expuesto de manera subaguda aire y en las ABC de las presiones de los grupos expuestos a tolueno de manera subaguda y crónica, se identificó que sólo el ABC de la presión diastólica del grupo tolueno crónico fue mayor con respecto a la presión diastólica del grupo de exposición a tolueno subagudo ($p < 0.05$). Se concluyó que el tolueno no generó una sensibilización a las catecolaminas, pero si aumentó la presión sanguínea basal y modificó la respuesta adrenérgica vascular mediada por los receptores alfa 1 adrenérgicos.

Palabras clave: Inhalables, catecolaminas, adrenérgico, muerte súbita, drogas de abuso.

Abstract

Inhalants are a group of substances with diverse nature that only share the route of administration and the fact that they are used as drugs of abuse. The most commonly inhalant is toluene, a volatile solvent that is part of many household products which are legal, cheap, and easy to obtain, and used recreationally to induce a state of mental alteration. The cardiovascular effects caused by toluene include increased blood pressure, arrhythmias, tachycardia, sensitization to catecholamines, and ultimately death. However, the precise mechanism of action involved is not well understood. Therefore, it is necessary to study with more detail the mechanism of action of toluene at the cardiovascular level. This project aimed to evaluate the effect of toluene exposure on the adrenergic cardiovascular response in anesthetized rats. Male Wistar rats, 8–9 weeks old and weighing 300-400 g, were used with 4 control groups exposed to air, 2 subacute exposure groups, and 2 chronic exposure groups at 6000 ppm of toluene. Exposures were carried out in static exposure chambers for 30 minutes, twice a day in a 6-hour interval between exposures; 1 week for the subacute groups and 4 weeks for the chronic groups. Once the animals were exposed, the anesthetized rat model was used to get dose-response curves to phenylephrine (α_1 adrenergic agonist) in the presence and absence of BMY 7378 (α_1 adrenergic antagonist). To determine if there were statistically significant differences ($p < 0.05$) between the different experimental groups, parametric tests such as Student's t-test or two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test were performed on the data that met the normality criteria. If normality was not accomplished, non-parametric tests such as the Mann-Whitney U test or the Friedman test were used. The results showed that rats exposed to toluene had higher basal diastolic and systolic blood pressure than the air-exposed control group ($p < 0.05$), with no changes in heart rate observed. Dose-response curves to phenylephrine were performed in the presence and absence of BMY-7378 in the subacute toluene exposure group, no significant differences in diastolic and systolic pressures or heart rate were observed compared to the control group. In the chronic toluene exposure group, a reduced response in diastolic and systolic pressures compared to the control group was observed ($p < 0.05$). Additionally, analysis of the area under the curve (AUC), E_{max} , and DE_{50} of the pressures showed no significant differences in the mentioned parameters. Furthermore, the role of α_1 adrenergic receptors was analyzed, and identified that diastolic and systolic blood pressure was lower in the dose-response curves of air-exposed rats that received BMY-7378 compared to those exposed to air without the α_1 adrenergic antagonist ($p < 0.05$). The AUC for pressures in the chronically exposed air group was higher compared to the subacute air exposure group, and the AUC of pressures for the subacute and chronic toluene exposure groups, only the AUC for diastolic pressure in the chronic toluene group was greater than the subacute toluene group ($p < 0.05$). It was concluded that toluene did not create a sensitization to catecholamines, but did increase basal blood pressure and modified the adrenergic vascular response mediated by α_1 receptors.

Introducción

La dependencia y el consumo de drogas constituyen un problema de salud pública mundial, debido a que son de los factores principales de riesgo para el

desarrollo de daños en la salud en todo el mundo. Este problema mundial ha ido creciendo, ya que entre los años 2011 y 2021 el número de individuos que consumían drogas aumentó un 23%. El reporte mundial de drogas estima que el 5.8% de la población (296 millones de personas) de entre 15 y 64 años ha consumido drogas al menos una vez durante el año 2021; mientras que el 13.34% (39.5 millones de personas) del total de quienes utilizaron drogas sufrieron algún trastorno relacionado con el consumo de estas sustancias (UNODC, 2023). Dentro de las drogas utilizadas se encuentran el cannabis, los opioides, la cocaína, los estimulantes de tipo anfetamínico, los sedantes y las nuevas sustancias psicoactivas (NSP), dentro de las NSP se incluyen diversas sustancias químicas que son sintéticas (flualprazolam, HU-210 y U-47700) o de origen vegetal (kratom, *Salvia divinorum* y khat). La COVID-19 generó cambios en los hábitos de consumo en personas que ya eran consumidoras de drogas, sin mostrar un aumento en el número de nuevos consumidores, sólo se reportó crecimiento en las cantidades consumidas de algunas drogas como: cannabis, sedantes como las benzodiacepinas, cocaína y en las NSP.

En México, el consumo de cualquier droga alguna vez en la vida en personas de 12 a 65 años aumentó un 2.5% entre los años 2011 y 2016, en donde las principales drogas consumidas son el cannabis, la cocaína y los inhalables. El consumo de inhalables en las edades de 12 a 65 años se encuentra en un tercer lugar entre las drogas de abuso más consumidas (ENCODAT, 2017).

Los inhalables son sustancias volátiles que son inhaladas para producir un estado alterado de la conciencia. Dentro de este grupo se encuentran sustancias de diversa naturaleza, que sólo comparten la vía de administración y el hecho de ser utilizadas como drogas de abuso. Son empleadas como drogas de abuso debido a que los efectos generados por estas sustancias se presentan muy rápido, además están presentes como mezclas complejas (su principal componente es el tolueno) en muchos de los artículos de la vida cotidiana. Son fáciles de adquirir y son más baratos que otras drogas (NIDA, 2021). La inhalación de disolventes, como el tolueno, por periodos largos de tiempo puede producir asfixia, convulsiones, coma y muerte súbita.

La mayoría de los estudios realizados en animales de experimentación para observar los efectos del tolueno, ya sea *in vitro* o *in vivo*, se basan principalmente en identificar su acción a nivel del sistema nervioso central, pero no se conocen muy bien sus efectos en el sistema cardiovascular. Se ha reportado que, en humanos, el tolueno modifica el ritmo cardíaco; y dentro de las modificaciones se incluyen la taquicardia y la bradicardia transitorias (Camara *et al.*, 2015). Existen algunos estudios *in vitro* relacionados con el efecto de este disolvente en el sistema cardiovascular, en los cuales se ha reportado que el tolueno inhibe los canales iónicos de calcio (Tillar *et al.*, 2002), de sodio (Cruz *et al.*, 2003) y de potasio activados por voltaje (Del Re *et al.*, 2006), también hay reportes donde el tolueno aumenta la densidad de los receptores adrenérgicos en el corazón (Carreón-Garcidueñas *et al.*, 2018).

Por lo anterior, y debido a la poca información respecto a los efectos a nivel cardiovascular de los disolventes *in vivo*, en este trabajo se analizará el efecto del tolueno en la respuesta cardiovascular adrenérgica en un modelo animal.

1. Marco teórico

1.1. Inhalables

1.1.1. Definición de inhalables

Los inhalables son sustancias volátiles que a temperatura ambiente se encuentran como vapor y es por eso que se pueden inhalar, como consecuencia se produce un estado de alteración mental que se observa como falta de atención, de concentración, de coordinación, pérdida de equilibrio, entre otros (NIDA, 2021).

1.1.2. Clasificación

No es fácil hacer una clasificación universal de los inhalables, debido a que dentro de este grupo se encuentran sustancias de diversa naturaleza, que sólo comparten la vía de administración y el hecho de ser utilizadas como drogas de abuso. Existen diferentes clasificaciones basadas principalmente en la estructura química, la forma física y en el uso que se les da a los inhalables en la vida cotidiana (Balster *et al.*, 2009), pero la clasificación más aceptada es aquella en la que los inhalables se clasifican de acuerdo a la forma en que se presentan en los productos domésticos, industriales y médicos. Con base en lo anterior se tienen cuatro grupos principales de inhalables: disolventes volátiles, aerosoles, gases y nitritos (NIDA, 2021).

- Disolventes volátiles: son generalmente líquidos que pueden convertirse en vapores a temperatura ambiente, son más pesados que el aire, tienen una alta afinidad por los lípidos y la mayoría son altamente inflamables (Cruz y Bowen, 2021). Se encuentran en una gran variedad de productos de bajo costo que se pueden obtener fácilmente y que se usan comúnmente en el hogar y en la industria. Dentro de este apartado se incluye a los removedores de pinturas, líquidos para lavado en seco, eliminadores de grasa, gasolinas, pegamentos, líquidos correctores y marcadores con punta de fieltro (NIDA, 2021).
- Aerosoles: son partículas diminutas líquidas o sólidas nebulizadas en el aire. Se forman cuando un producto es expulsado a través de una válvula por la fuerza de un gas comprimido. Estos incluyen a las pinturas en aerosol, los

eliminadores de olor, los atomizadores para desodorante y los fijadores de cabello, los rociadores de aceite vegetal para cocinar y los rociadores para proteger telas o tejidos. Estos productos se utilizan indebidamente para experimentar los efectos psicotrópicos inducidos por el gas propulsor (Cruz y Bowen, 2021; NIDA, 2021).

- Gases: incluyen a los anestésicos de uso médico, como el éter, el cloroformo, el halotano y el óxido nitroso. Entre estos, el óxido nitroso es el más utilizado en situaciones de abuso, éste se puede encontrar en los dispensadores de crema batida y en los productos que aumentan el octanaje en los autos de carrera. Además de los anestésicos, dentro de este grupo se encuentran los gases que se utilizan en productos domésticos o comerciales, como en encendedores de butano, los tanques de gas propano y los refrigerantes (NIDA, 2021).
- Nitritos: son catalogados como una clase especial dentro de los inhalables, ya que estos principalmente dilatan los vasos sanguíneos y relajan los músculos, y por lo anterior difieren de los demás inhalables porque no actúan sobre el sistema nervioso central (SNC). También, mientras que los otros inhalables son usados para alterar el estado de ánimo, los nitritos son usados como potenciadores del placer sexual (NIDA, 2021). Dentro de esta clasificación se encuentran los nitritos de alquilo.

1.1.3. Epidemiología de los inhalables

El consumo de inhalables es frecuente en muchos países de todo el mundo, y afecta a la población en general; aunque el uso de estas sustancias es diferente dentro de cada país y existe una gran diversidad en cuanto a los consumidores que van desde niños, jóvenes, adultos y hasta personas mayores. Dentro de los países en los que se tiene registro del uso de inhalables se encuentran: Kenia, Pakistán, Australia, Alemania, Croacia, Estados Unidos de América, México, República Dominicana, Belice (Cruz y Bowen, 2021).

En México, las investigaciones realizadas han permitido identificar cambios en el comportamiento del uso de los inhalables a través de los años; por ejemplo, en la década de 1970 y 1980 los inhalables y la marihuana eran las principales

drogas consumidas en nuestro país; posteriormente, en los años 90, fueron sustituidas por otras sustancias como la cocaína, que ocupó el primer lugar de preferencia, sin incluir al alcohol y al tabaco. Estos cambios produjeron que la investigación y el número de publicaciones alrededor de los disolventes inhalables disminuyeran considerablemente. Sin embargo, el consumo de estos productos no ha desaparecido, pero no se le ha dado gran importancia por el grupo social que las consume. En el año 2002, los inhalables tuvieron una prevalencia de consumo del 0.5% (314,760 personas) y un descenso hasta el cuarto lugar como droga de preferencia (ENA, 2002), para los años 2008 un 0.7% (533,797 personas), 2011 un 0.9 (727,107 personas) y 2016 un 1.1% (950,101 personas), observándose que no hubo cambios significativos en el uso de inhalables; sin embargo, en estos años su uso llegó al tercer lugar como droga de preferencia (Figura 1) (ENCODAT, 2017). Durante la pandemia causada por la COVID-19, se pudo observar una disminución en el consumo de los inhalables, situándolos en el año 2022 en un cuarto lugar como droga consumida alguna vez en la vida (CIJ, 2023).

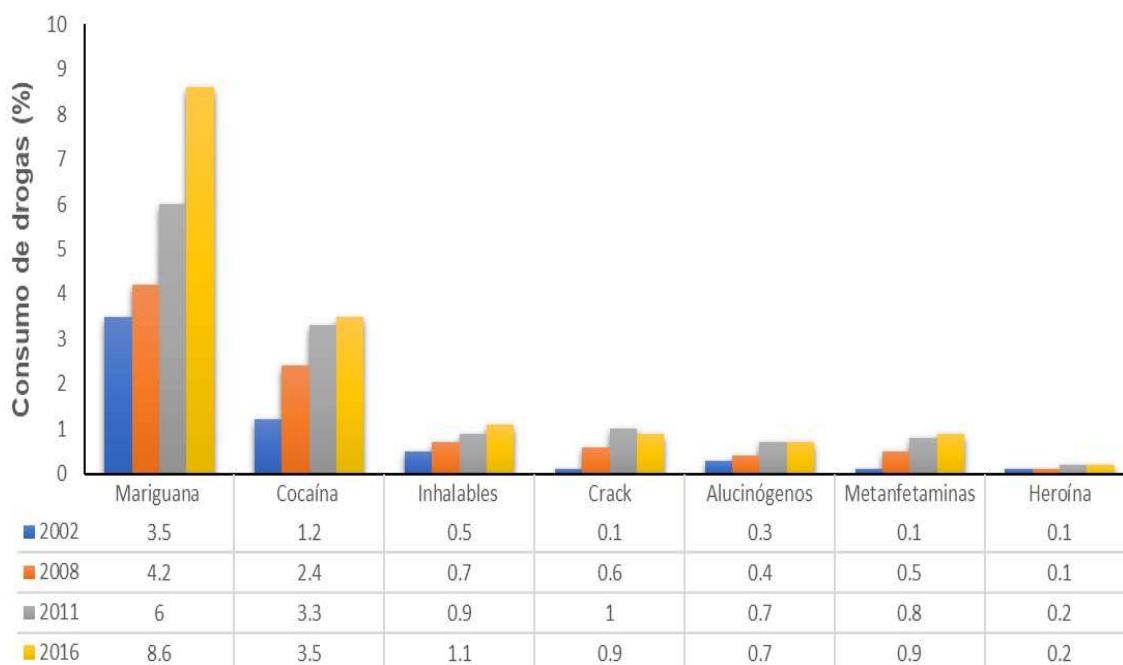


Figura 1. Prevalencia del consumo de drogas alguna vez en la vida en la población mexicana de los 12 a 65 años. Tomada de ENCODAT, 2017.

Como resultado de los trabajos de investigación realizados en nuestro país, respecto al consumo de inhalables, se han podido identificar las características del consumo en poblaciones consideradas de alto riesgo, como son los grupos marginales, los integrantes de bandas juveniles, los niños en situación de calle, los adultos y los menores reclusos en centros de detención, las sexo servidoras, los estudiantes y la población general (Martínez *et al.*, 2016).

1.2. Tolueno

El tolueno o metilbenceno es un disolvente orgánico ampliamente utilizado en varios procedimientos industriales (fabricación de plásticos, síntesis química y producción de combustibles). Es un líquido volátil, incoloro y de un olor característico, tiene una densidad mayor que el aire (lo que lo hace más fácil de inhalar), es más liviano que el agua y tiene un coeficiente de partición de 2.7 log octanol/agua (ATSDR, 2017; Cruz *et al.*, 2014).

1.2.1. Efectos del tolueno

La inhalación de tolueno puede causar múltiples efectos que dependen del tiempo de exposición (aguda y crónica).

Los efectos agudos son: euforia inicial, excitación, cambios de humor repentinos, mareo, habla arrastrada, visión borrosa, falta de coordinación, ilusiones, alucinaciones y espasticidad muscular.

Los efectos crónicos incluyen pérdida de memoria, dificultad para concentrarse, déficit de atención, atrofia cerebelosa difusa, anormalidades de la materia blanca, agrandamiento ventricular, pérdida de fuerza muscular, ataxia cerebelosa que conduce a una alteración de la coordinación motora, pérdida de audición, deterioro de la vista y nistagmo (Cruz *et al.*, 2014). Además, el tolueno es asociado con daño progresivo del sistema nervioso central y periférico y pérdida progresiva de la memoria (Rodríguez, 2020).

1.2.2. Usos

El tolueno es utilizado principalmente como disolvente, para hacer pinturas, como componente de diluyentes de pinturas, de esmalte de uñas, de barnices, de adhesivos y caucho, y en algunos procesos de impresión y curtido de cuero. El

tolueno también se usa en la producción de otras sustancias químicas, nailon y plásticos. También se agrega a la gasolina junto con benceno y xileno para mejorar el índice de octanaje (ATSDR, 2017).

1.2.3. Farmacocinética del tolueno

Al ser una sustancia que está presente en muchos productos de la vida cotidiana, puede ingresar al organismo al tener contacto con la piel, tras ser ingerido o inhalado (ATSDR, 2017). La inhalación es la principal vía de ingreso cuando se trata del abuso de esta sustancia, en ese caso es absorbido a través de los pulmones, pasando a la circulación sanguínea, donde difunde sobre todo en los órganos ricos en lípidos. Atraviesa rápidamente la barrera hematoencefálica y, finalmente, es metabolizado en el hígado por la isoenzima CYP2E1 del citocromo P-450 para formar alcohol bencílico, y otras enzimas para generar ácido benzoico, el cual se combina con glicina para formar ácido hipúrico (Figura 2) (Treviño y Cruz, 2011; Cruz *et al.*, 2014). El ácido hipúrico se puede disociar en aniones y protones, algunos de los aniones se unen al amoníaco, sodio y potasio, siendo excretados a través de la orina, llegando a generar una acidosis metabólica (Cruz *et al.*, 2014). La formación de estos ácidos agrega un ion hidrógeno por cada molécula de tolueno metabolizada, generando una carga ácida. El tolueno y sus metabolitos aparecen en la orina rápidamente después de la exposición, y es excretado mayoritariamente en las primeras 12 horas después de su consumo (Treviño y Cruz, 2011).

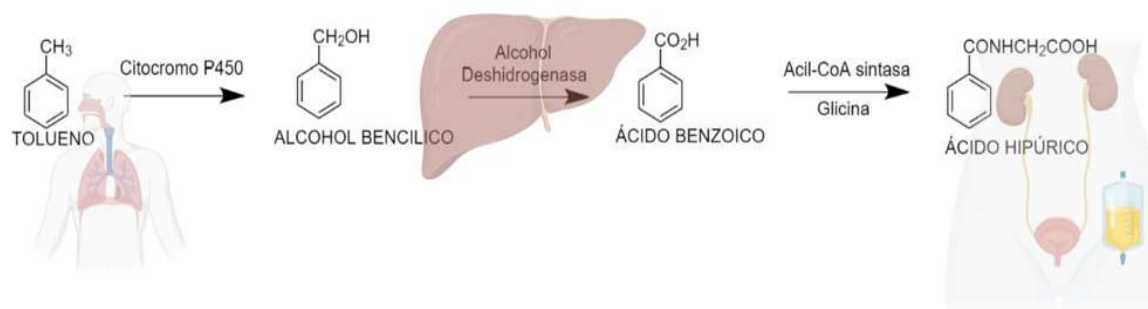


Figura 2. Farmacocinética del tolueno (adaptada de Treviño y Cruz, 2011).

1.2.4. Exposición a tolueno

Existen diferentes formas en las que se puede estar en contacto con el tolueno, ya sea de forma ocasional, ocupacional o laboral y de manera intencional (abuso). La manera ocasional se refiere a exposiciones por periodos cortos de tiempo a tolueno (8 ppb), donde las personas no se dan cuenta que están en contacto con esta sustancia, este tipo de exposición generalmente ocurre en el hogar, por el uso de productos domésticos comunes como: pinturas, disolventes de pintura, adhesivos, esmalte de uñas, entre otros (Bowen *et al.*, 2006; Pruneda *et al.*, 2015).

Las exposiciones ocupacionales o laborales hacen referencia a la presencia crónica de bajos niveles de tolueno (50 ppm), en el área de trabajo y durante 6 o más horas al día, cinco días a la semana. En la exposición de manera intencional las concentraciones de tolueno son mucho más elevadas que las observadas en los otros tipos de exposición. El abuso típico de tolueno implica de 15 a 20 inhalaciones de concentraciones muy altas, en un rango de 5 mil a 15 mil ppm, en un periodo corto de tiempo que va de 10 a 15 minutos (Bowen *et al.*, 2006).

El tolueno puede ser consumido de diferentes maneras, dependiendo del producto que lo contenga:

- Resoplado, es cuando se respira el disolvente impregnado en un trozo de trapo o papel.
- Esnifado o aspirado, inhalación nasal directa del producto.
- Bolseo, se refiere a respirar el vapor de la sustancia colocada en una bolsa.

Al utilizar cualquiera de estos métodos, los efectos causados por la exposición aparecen rápidamente, comúnmente en segundos, y su duración va de 15 a 60 minutos. Debido a que los efectos desaparecen en poco tiempo, los usuarios repiten la exposición para mantenerse en el estado que produce el disolvente (Cruz *et al.*, 2014).

1.2.5. Blancos moleculares del tolueno.

Existen diversos receptores sobre los que actúa el tolueno, dependiendo de la concentración y tiempo de exposición, algunos de ellos son:

- Receptores a glutamato: en los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) se observó que el tolueno fue capaz de inhibir de forma dependiente de la concentración las corrientes mediadas por este tipo de receptor (Cruz *et al.*, 1998; Furlong *et al.*, 2016).
- Receptores GABA_A y glicina: se observó que el tolueno incrementa las corrientes inhibitorias mediadas por estos receptores (Beckstead *et al.*, 2000; MacIver, 2009).
- Receptores colinérgicos: se demostró que el tolueno inhibe reversiblemente las corrientes inducidas por acetilcolina en receptores nicotínicos y muscarínicos, esta inhibición es dependiente de la dosis (Bale *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2002).
- Receptores serotoninérgicos: en los receptores 5-HT₃ se encontró que el tolueno aumenta las corrientes activadas por serotonina de manera reversible y dependiente de la concentración (Lopreato *et al.*, 2003).
- Canales iónicos activados por voltaje: el tolueno bloquea los canales de potasio (Del Re *et al.*, 2006) y los canales de calcio activados por voltaje (Tillar *et al.*, 2002; Shafer *et al.*, 2005); también inhibe los canales de sodio cardíacos y de músculo esquelético (Gauthereau *et al.*, 2005; Cruz *et al.*, 2003).

1.3. Tolueno y sistema cardiovascular

Se ha demostrado que la exposición a altas concentraciones de tolueno modifica el ritmo cardíaco, tanto en humanos como en animales. Dentro de las modificaciones se incluyen la taquicardia y la bradicardia transitorias (Camara *et al.*, 2012; Einav *et al.*, 1997). Se ha reportado que las taquicardias transitorias se observaron después de aplicar tolueno, en donde al comparar el ritmo cardíaco de las ratas control se observó un aumento a más de 400 latidos/min y luego se recuperó rápidamente a 325 latidos/minuto, mientras que el ritmo cardíaco de las

ratas dosificadas con 400, 800 y 1200 mg/kg de tolueno alcanzó un máximo de 400 a 425 latidos/min durante los primeros 30 minutos después de la dosificación. Las respuestas taquicárdicas fueron transitorias, pero la frecuencia cardíaca de las ratas dosificadas con el disolvente se mantuvo elevada por encima de los niveles de los controles. También se observó un aumento de la presión sanguínea asociado con las taquicardias, pero la presión alta se mantuvo durante 12 horas (Gordon *et al.*, 2007).

En otro estudio donde se administró tolueno en una única dosis de 6 mL/kg se observó que el ritmo cardíaco y la presión sanguínea tuvieron una disminución significativa en comparación con el grupo control (Tas *et al.*, 2013). Las taquiarritmias son las manifestaciones clásicas de la cardiotoxicidad del tolueno y el efecto que desencadenan tales manifestaciones consiste presumiblemente en la sensibilización del miocardio al potencial efecto arritmogénico de las catecolaminas endógenas (Faus *et al.*, 1999).

En otros experimentos se ha demostrado que el tolueno bloquea los canales de sodio cardíacos *in vitro* (Gauthereau *et al.*, 2005), y debido a que estos canales son responsables de la fase inicial del potencial de acción, es probable que este efecto esté relacionado con las arritmias cardíacas.

1.4. Muerte súbita por inhalación

Es una de las consecuencias más graves causadas por el abuso de los inhalables, y se define como la muerte resultante directa e inmediatamente del uso indebido de sustancias volátiles (Bowen, 2011). La muerte súbita por inhalación ocurre por una sensibilización del corazón a catecolaminas (adrenalina o la noradrenalina), estas catecolaminas se producen como respuesta a cualquier estímulo, principalmente ante estrés o un susto, y la liberación de estas sustancias puede desencadenar arritmias cardíacas fatales (Bass, 1970). Generalmente, quienes sufren este problema presentan una disfunción cardíaca que ocurre durante la inhalación o en horas posteriores al consumo de los inhalables.

1.5. Tejido vascular

La despolarización de los miocitos de músculo liso vascular depende de la penetración de calcio a la célula, a pesar de que también participan las corrientes de sodio. Se conoce que por lo menos son tres mecanismos los encargados de la contracción de los miocitos. El primer mecanismo se da cuando los canales de calcio sensibles a voltaje se activan en reacción a la despolarización de la membrana; por lo tanto, el calcio (Ca^{+2}) extracelular se desplaza hacia el interior de la célula por efecto de su gradiente electroquímico. El segundo mecanismo se lleva a cabo por la intervención de agonistas que no despolarizan la membrana, pero que activan o estimulan la vía $\text{G}_q\text{-PLC-IP}_3$, en la cual el agonista se une a receptores acoplados a proteínas G_q , lo cual activa a la fosfolipasa C (PLC), ésta a su vez produce inositol trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG), en consecuencia, se libera calcio intracelular proveniente del retículo sarcoplásmico. En el tercer mecanismo se involucran los canales de calcio operados por receptor, los cuales al haber una interacción ligando-receptor se abren y en consecuencia permiten la entrada de calcio extracelular al espacio intracelular (Michel y Hoffman, 2012).

1.6. Sistema nervioso en la regulación cardiovascular

El sistema nervioso autónomo es el principal regulador neural de la circulación y de la tensión arterial a corto plazo, y ejerce su función mediante diversos reflejos que regulan el tono vasomotor, la frecuencia cardíaca y el gasto cardíaco. La regulación nerviosa se encarga de mantener estable la circulación periférica con ayuda de mecanismos propios del sistema cardiovascular. Además, se proporciona una regulación rápida de la circulación y un control de grandes porciones del sistema vascular de manera simultánea (Estañol *et al.*, 2009).

El sistema nervioso simpático (SNS) controla el músculo liso vascular, así como la frecuencia cardíaca y la fuerza de contracción del corazón (Rang *et al.*, 2008). La importancia de la contribución del SNS sobre el tono vascular, normal y anormal, se hace evidente al presentarse una caída considerable de la presión arterial, tanto en humanos como en animales, además de los efectos inmediatos del SNS sobre los vasos sanguíneos, debido a que existen evidencias que sugieren

que los nervios simpáticos perivasculares tienen efectos tróficos a largo plazo sobre el sistema cardiovascular (Mark, 1996).

1.7. Receptores adrenérgicos

Un receptor es una macromolécula celular, a la cual se liga un fármaco para iniciar sus efectos; una parte importante de los receptores está formada por moléculas de origen proteico que normalmente actúan como andamio para ligandos endógenos (hormonas, factores de crecimiento y neurotransmisores).

Los receptores adrenérgicos (AR, por sus siglas en inglés) constituyen una familia de proteínas con una relación estrecha en cuanto a estructura y función con los receptores acoplados a proteínas G, para una amplia variedad de hormonas y neurotransmisores. Todos los AR son receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas. Cada tipo de receptor muestra preferencia para clases específicas de proteínas G, ejemplo: α_1 para G_q , α_2 para G_i y β para G_s (Westfall y Westfall, 2012).

Los AR intervienen en las respuestas celulares a las catecolaminas adrenalina y noradrenalina. Son secretadas como hormonas por la glándula adrenal o liberadas como neurotransmisores en neuronas adrenérgicas dentro del sistema nervioso central y neuronas posganglionares simpáticas periféricas. Además, participan en la regulación cardiovascular; por ejemplo, la activación de AR en el corazón incrementa la frecuencia cardíaca y la fuerza de contracción, mientras que en el músculo liso vascular contraen los vasos, lo que produce un incremento de la presión arterial (Izzo y Black, 2008).

1.7.1. Tipos de receptores adrenérgicos

Existen varios tipos de AR, basándose en los estudios de la capacidad de la adrenalina, la noradrenalina y otros agonistas relacionados en la regulación de varios procesos fisiológicos (Ahlquist, 1948). Ahlquist hizo las designaciones α y β para los receptores en el músculo liso. Tiempo después, los receptores β se subdividieron en β_1 y β_2 y al aislar un gen humano se encontró un tercer subtipo β , denominado β_3 (Emorine *et al.*, 1989). En los últimos años se ha propuesto la existencia de un cuarto tipo de receptor adrenérgico β , el receptor β_4 (Hieble, 2007).

Se pueden identificar diferentes tipos de receptores adrenérgicos α : α_1 y α_2 . Se encuentran tres receptores α_1 definidos farmacológicamente: α_{1A} , α_{1B} y α_{1D} ; por otro lado, se han identificado tres subtipos de receptores α_2 : α_{2A} , α_{2B} y α_{2C} , con diferentes características (tabla 1), además se identificó un cuarto tipo de receptor α_1 denominado α_{1L} (Hieble, 2007).

Los receptores α_1 se han caracterizado en una gran variedad de vasos. En particular, los receptores α_{1D} se han caracterizado en arterias: tales como la aorta, la carótida, la mesentérica, la femoral iliaca y la renal, y se ha observado que median la contracción por agentes adrenérgicos y que contribuyen al control de la presión arterial (Bracho *et al.*, 2009).

Tabla 1. Características de los receptores adrenérgicos α_1 y α_2 (Westfall y Westfall, 2012).

Subtipo del receptor	Familia de proteínas G	Principales efectores	Localización	Efectos generados
α_{1A}	$G\alpha_q$ ($\alpha_{11}/\alpha_{14}/\alpha_{16}$)	$\uparrow$ PLC, $\uparrow$ PLA ₂ $\uparrow$ Canales de Ca ²⁺ $\uparrow$ Señalización de MAPK	Corazón, hígado, músculo liso, vasos sanguíneos, pulmón y cerebelo.	Receptor predominante que causa contracción del músculo liso vascular. Favorece la estructura y crecimiento cardíacos. Vasoconstricción de arteriolas grandes de resistencia en el músculo estriado.
α_{1B}			Riñón, bazo, pulmón, vasos sanguíneos, corteza cerebral y tronco del encéfalo.	Subtipo más abundante en el corazón. Favorece el crecimiento y estructura cardíacos.
α_{1D}			Plaquetas, próstata, aorta y arterias coronarias, corteza cerebral e hipocampo.	Receptor predominante que causa vasoconstricción en la aorta y en arterias coronarias.
α_{2A}	Familia $G\alpha_i$ Familia $G\alpha_o$ (α_{o1}/α_{o2})		Plaquetas, neuronas simpáticas, ganglios autónomos, páncreas, vasos coronarios, SNC.	Receptor inhibidor predominante en las neuronas simpáticas. Vasoconstricción de los vasos precapilares pequeños en el músculo estriado.

α_{2B}	Familia $G\alpha_i$ Familia $G\alpha_o$ (α_{o1}/α_{o2})	Inhibición de AC $\downarrow$ AMP _c $\downarrow$ Actividad PKA	Hígado, riñón, vasos sanguíneos, vasos coronarios, SNC y páncreas.	Receptor predominante que media la vasoconstricción α_2 .
α_{2C}	Familia $G\alpha_i$ ($\alpha_{i1}/\alpha_{i2}/\alpha_{i3}$) Familia $G\alpha_o$ (α_{o1}/α_{o2})		Núcleos basales, corteza cerebral, cerebelo e hipocampo.	Receptor que modula predominantemente la liberación de dopamina. Receptor predominante que inhibe la liberación de hormona de la médula suprarrenal.

PLC, fosfolipasa C; PLA₂, fosfolipasa A₂; AMP_c, AMP cíclico; PKA, proteína cinasa A; MAPK, proteína cinasa activada por mitógenos; AC, adenilato ciclasa.

1.7.2. Mecanismos de acción de los receptores adrenérgicos α_1

Los receptores adrenérgicos α_1 están asociados a proteínas G, la cuales se unen a la fosfolipasa C β a través de la proteína G_{q/11}. De la unión del ligando al receptor resulta la activación de PLC β , esta enzima hidroliza el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) contenido en la membrana para generar inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y 1,2-diacilglicerol (DAG). El IP₃ se difunde a la membrana del retículo sarcoplásmico (SR), donde se une al receptor de IP₃, dando como resultado la apertura de canales de Ca⁺² y esto permite que el Ca⁺² se vierta al espacio intracelular (Graham *et al.*, 1996; Walsh, 2011). El aumento resultante en la concentración de Ca⁺² intracelular da como resultado la unión de Ca⁺² a la calmodulina (CaM), a continuación, la CaM activa a la cinasa de cadena ligera de miosina, esta activación da como resultado la unión de miosina con actina provocando la contracción del músculo (Figura 3) (Walsh, 2011).

1.8. Antecedentes del laboratorio

Dentro del grupo de trabajo se han realizado una serie de experimentos con tolueno y fármacos adrenérgicos (adrenalina, isoproterenol, fenilefrina y BMY-7378), con la finalidad de identificar el efecto de este disolvente a nivel cardiovascular. Para cumplir con lo anterior, se llevaron a cabo exposiciones a tolueno y posterior a esto se utilizaron modelos *in vitro* de órgano aislado, en los cuales se aisló el tejido (aortas) u órgano (corazón) de interés para poder realizar curvas concentración-respuesta a los agonistas o antagonistas adrenérgicos. Como resultados se han obtenidos los siguientes hallazgos:

En los experimentos realizados por Alvarado (2013) se encontró que al realizar curvas concentración-respuesta a la adrenalina en los corazones de ratas expuestas a 6000 ppm de tolueno de manera subaguda y crónica, se incrementó la presión de perfusión de manera dependiente de la concentración utilizada de adrenalina (Figura 4). También se tuvo un incremento en la frecuencia cardíaca dependiente de la concentración utilizada de adrenalina.

En los experimentos realizados por Carreón-Garcidueñas et al. (2018) se observó que al efectuar curvas concentración-respuesta a la adrenalina en los corazones de ratas expuestas a 6000 ppm de tolueno de manera aguda, se aumentó la presión de perfusión de manera dependiente de la concentración utilizada de adrenalina. Además, se tuvo un incremento en la frecuencia cardíaca en los corazones de ratas expuestas a tolueno de manera dependiente de la concentración utilizada de adrenalina (Figura 5).

En el trabajo realizado por Ceja en el 2022 se observó que al realizar curvas concentración-respuesta a adrenalina en anillos de aorta con endotelio de ratas expuestas a 6000 ppm de tolueno de manera subaguda, se pudo apreciar que la fuerza de contracción es dependiente de la concentración utilizada de adrenalina; en este sentido también se encontró que la respuesta fue mayor en los anillos de aorta del grupo expuesto al disolvente, en comparación con el grupo control (Figura 6).

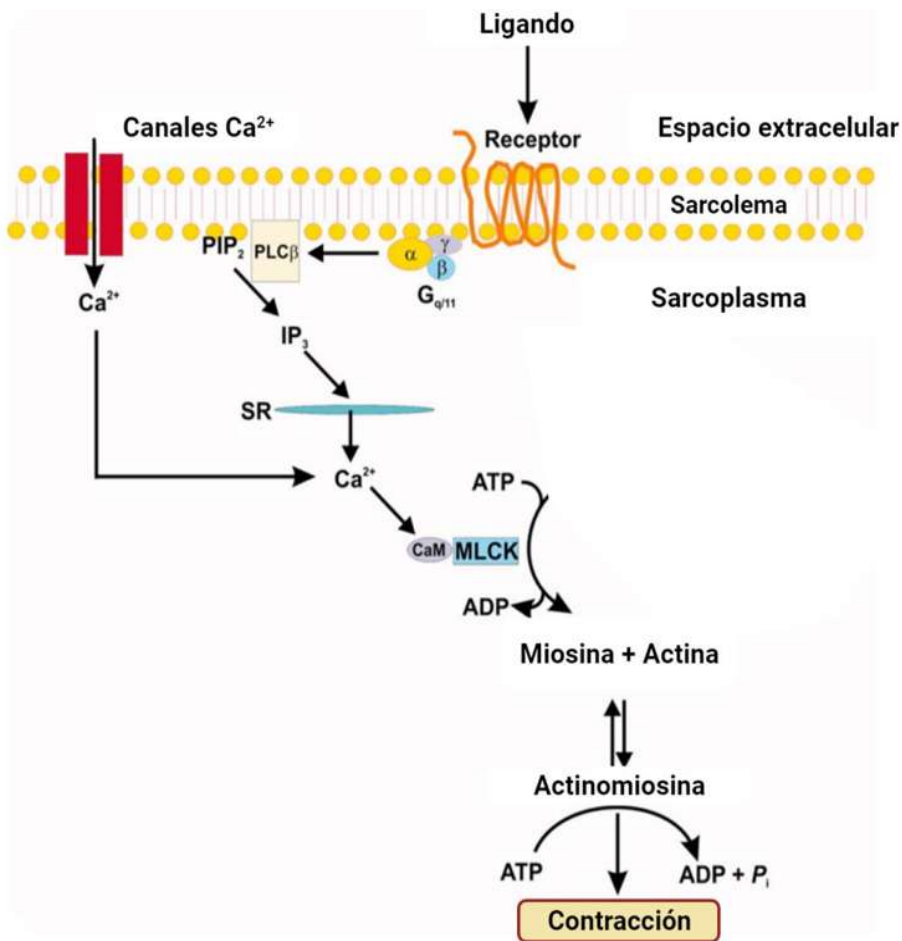


Figura 3. Mecanismo de contracción del tejido vascular. Los receptores adrenérgicos desencadenan una vía de transducción de señales que conducen a la contracción del músculo liso inducida por Ca^{+2} y proteínas $\text{G}_{q/11}$. La proteína $\text{G}_{q/11}$ activa a la PLC_β y ésta hidroliza al PIP_2 en IP_3 y DAG , el IP_3 actúa en los receptores del retículo sarcoplásmico, en consecuencia, se libera Ca^{+2} al sarcoplasma, donde se une a la calmodulina, este complejo CaM activa a la cinasa de cadena ligera de miosina, resultando finalmente en la contracción. Abreviaturas: PLC_β , isoforma β de la fosfolipasa C; PIP_2 , fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato; IP_3 , inositol 1,4,5-trifosfato; RS, retículo sarcoplasmático; CaM , calcio-calmodulina; MLCK, cinasa de cadena ligera de miosina. Modificado de Walsh (2011).

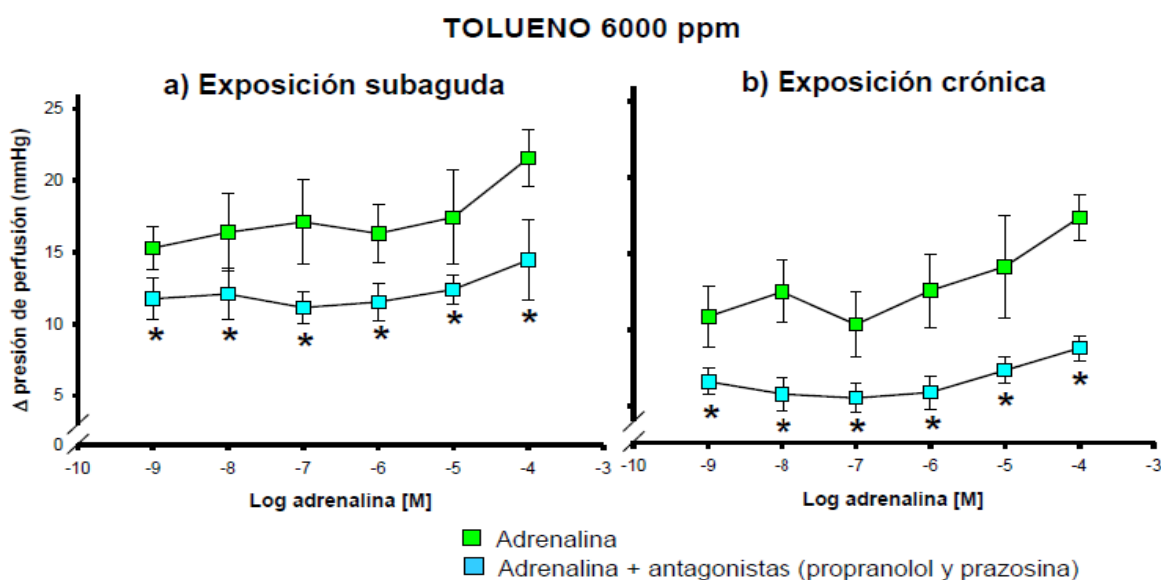


Figura 4. Curvas concentración-respuesta a la adrenalina en ausencia y presencia de antagonistas adrenérgicos (propranolol y prazosina) en corazones expuestos a tolueno 6000 ppm de manera subaguda a) y crónica b). Los símbolos representan la media $\pm$ error estándar de 5 experimentos. * $p < 0.05$ adrenalina vs adrenalina + antagonistas. Tomada de Alvarado (2013).

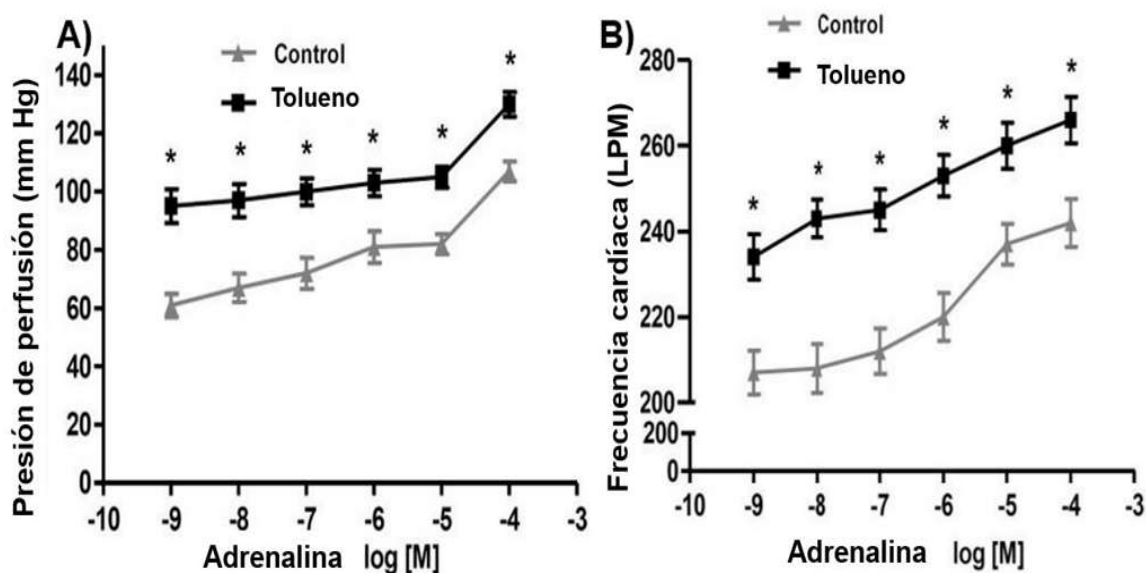


Figura 5. Curvas concentración-respuesta a la adrenalina en corazones de animales expuestos de forma aguda a tolueno 6000 ppm o a aire (grupo de control), en una sola exposición. A) Efecto en la presión de perfusión y B) efecto en la frecuencia cardíaca. Los símbolos representan la media $\pm$ error estándar de 5 experimentos. * $P < 0.05$ tolueno vs control. Modificado de Carreón-Garcidueñas et al., 2018.

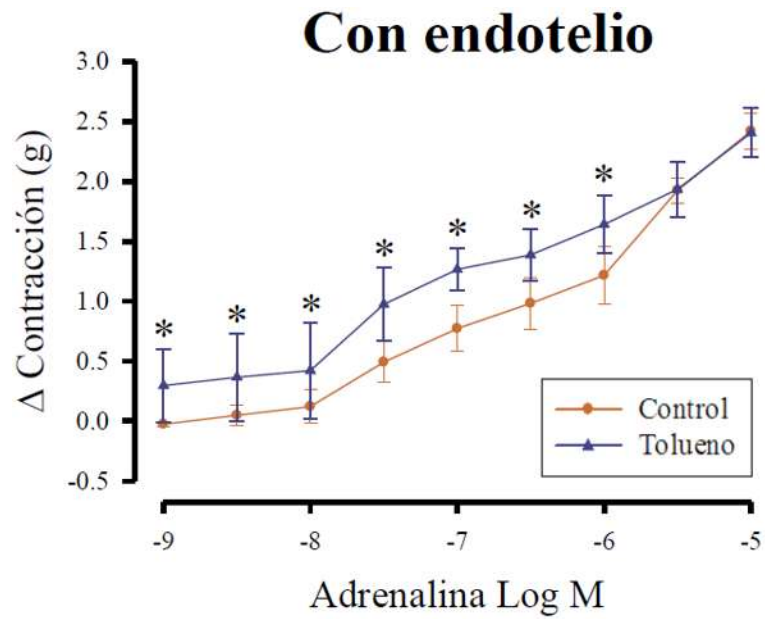


Figura 6. Curvas concentración-respuesta a adrenalina en anillos de aorta de animales control y de animales expuestos a tolueno 6000 ppm de manera subaguda, en presencia del endotelio. Los símbolos representan la media $\pm$ error estándar de 6 experimentos, * $p < 0.05$ control vs tolueno. Tomado de Ceja, 2022.

2. Justificación

El uso de inhalables en México se mantiene presente, llegando a ser un problema de salud pública debido a que se encuentra en el tercer lugar como droga de preferencia en personas de 12 a 65 años; además, se sabe que los inhalables son de las drogas de abuso menos estudiadas, por lo que no se conocen del todo los mecanismos de acción que participan en los efectos que producen. Por su parte, dentro de los inhalables se encuentran los disolventes volátiles, donde el tolueno es la sustancia más representativa de este grupo, debido a que se encuentra en una gran cantidad de productos de uso doméstico que son fáciles de adquirir, baratos y legales, haciendo que sea muy utilizado de manera recreativa.

La gran mayoría de los estudios referentes a esta sustancia se basan principalmente en los efectos que produce a nivel del sistema nervioso central, sin embargo, en cuanto sus efectos a nivel cardiovascular, se sabe que puede generar arritmias, taquicardia, sensibilización a catecolaminas, aumento de la presión sanguínea, entre otros, pero no se sabe con precisión su mecanismo de acción. Además de que la mayor parte de los estudios cardiovasculares se han realizado en experimentos *in vitro* y muy pocos *in vivo*.

Con el modelo *in vivo* utilizado en el presente trabajo se tiene la ventaja de poder observar la integración de las respuestas a estímulos externos, más los mecanismos de acción compensatorios.

Por las razones anteriores y la investigación limitada que se tiene acerca de los inhalables, el presente estudio planea proporcionar un panorama más claro del mecanismo de acción del tolueno a nivel cardiovascular, observando los efectos que causa su inhalación repetida en animales de experimentación.

3. Hipótesis

La exposición a tolueno aumenta la respuesta adrenérgica cardiovascular en la rata anestesiada.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la exposición a tolueno sobre la respuesta adrenérgica cardiovascular en la rata anestesiada.

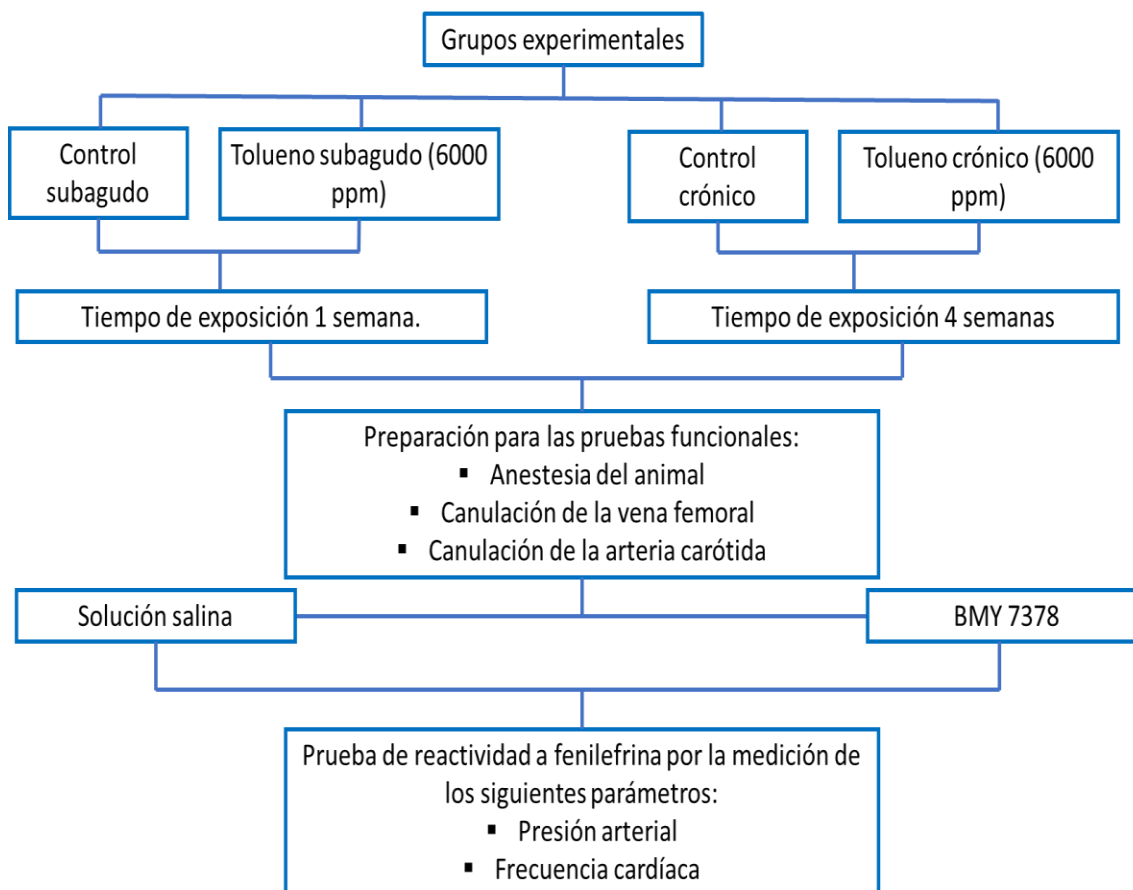
4.2. Objetivos particulares

- Estudiar el efecto de la exposición subaguda a tolueno sobre la respuesta adrenérgica cardiovascular en la rata anestesiada.
- Estudiar el efecto de la exposición crónica a tolueno sobre la respuesta adrenérgica cardiovascular en la rata anestesiada.
- Determinar la participación de los receptores adrenérgicos alfa 1D sobre la respuesta adrenérgica cardiovascular en la rata anestesiada.

5. Estrategia experimental

Iniciamos con la obtención de los grupos experimentales, conformados por ocho grupos con seis animales cada uno. Los grupos se dividieron en: cuatro grupos controles expuestos a aire, dos de exposición subaguda y dos de exposición crónica a 6000 ppm de tolueno. Los animales del grupo de exposición subaguda a tolueno y su respectivo control fueron expuestos durante 30 minutos, dos veces por día a disolvente o a aire, respectivamente, dejando un lapso de 6 horas entre cada exposición, durante una semana. Para los grupos restantes, de exposición crónica y su respectivo control, se repitió la metodología empleada con la exposición subaguda y su control, a excepción del tiempo, el cual fue de 4 semanas. Concluido el tiempo de tratamiento, cada animal fue anestesiado para después ser preparado para las pruebas de reactividad a fármacos adrenérgicos (Figura 7).

Figura 7. Estrategia experimental.



6. Materiales y métodos

6.1. Animales de experimentación

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, con una edad de 8-9 semanas y con un peso de 300 a 400 g, que fueron compradas a Círculo ADN S.A. de C.V. Los animales tuvieron periodos de 12 horas de luz /12 horas de oscuridad. Además, se mantuvieron en jaulas con acceso libre a agua y a alimento. Al finalizar toda la metodología, los animales fueron sacrificados de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 Especificaciones técnicas para producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

6.2. Fármacos

- El BMY-7378 fue comprado a Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), grado analítico.
- El clorhidrato de fenilefrina fue comprado a Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).
- El tolueno ACS reagent, $\geq 99.5\%$ fue comprado a Merck (Darmstadt, Alemania).

Solución salina al 0.9% fue comprada a PISA (Guadalajara, Jalisco, México).

6.3. Aspectos éticos

Todos los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 Especificaciones técnicas para producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Se contó con la aprobación de “Comité de bioseguridad y Bioética del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas”.

6.4. Grupos experimentales

Se utilizaron 8 grupos de ratas de la cepa Wistar, donde:

- El primer y quinto grupo fueron controles expuesto a aire de manera subaguda.
- El segundo y sexto grupo fueron expuesto a tolueno de manera subaguda.

- El tercer y séptimo grupo fueron controles expuestos a aire de manera crónica.
- El cuarto y octavo grupo fueron expuesto de manera crónica a tolueno.

Las exposiciones se realizaron dos veces al día, con un intervalo de 6 horas entre cada exposición; durante una semana si es exposición subaguda y durante cuatro semanas si es exposición crónica.

6.5. Exposición a tolueno

Los animales se expusieron durante 30 minutos de manera individual a tolueno (exposición subaguda o crónica) o a aire. Para llevar a cabo la exposición, las ratas fueron introducidas en cámaras de exposición estáticas, que consisten en jarras cromatográficas con un volumen de 29 litros (Figura 8).

La cámara consta de un frasco cilíndrico cromatográfico, de una tapa acrílica con cierre hermético, puertos de inyección, un ventilador y una malla de acero inoxidable que se encuentran en el interior de la cámara, se coloca un trozo de papel filtro en la malla para posteriormente introducir una rata, se cierra la cámara con su tapa y se inyecta un volumen determinado de tolueno sobre el papel filtro a través de un puerto de inyección. El tolueno se volatiliza con ayuda del ventilador, el cual distribuye el tolueno de manera homogénea por toda la cámara. Al finalizar las exposiciones, los animales se sometieron a las pruebas de reactividad adrenérgica con el empleo de un agonista alfa 1 y un antagonista alfa-1D adrenérgico selectivo.

El volumen de tolueno (disolvente) que se utilizó fue calculado con la ecuación de Nelson (1972):

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

V= volumen de disolvente que se necesita inyectar para obtener la concentración deseada

PM= peso molecular del disolvente (g mol⁻¹) = 92.1381 g mol⁻¹

C_{ppm}= concentración deseada (ppm) = 6000 ppm

V_s= volumen de la cámara de exposición (L) = 29 L

P = presión atmosférica = 1 atm

d = densidad del disolvente = 0.8669 g mL⁻¹

R = constante general de los gases (L atm mol⁻¹ K⁻¹) = 0.082 L atm mol⁻¹ K⁻¹

$T = \text{temperatura ambiente} = 298.15 \text{ K } (25^\circ \text{C})$

6.6. Modelo de la rata anestesiada

Este modelo está basado en lo reportado por Shipley y Tilden (Shipley y Tilden, 1947), pero se adecuó para esta metodología. La rata se mantuvo bajo anestesia, aplicando una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (dosis: 65 mg/kg). Enseguida, se disecó la tráquea, procediendo de la siguiente manera: La rata se fijó firmemente, en posición supina, a la mesa, se hizo una incisión en la línea media sagital del cuello, se localizó la tráquea separando los músculos del tejido conectivo con ayuda de unas pinzas curvas, se pasó un hilo por debajo de la tráquea, a ésta se le hizo un corte en cruz y se introdujo la cánula traqueal, se ató firmemente y se conectó a la bomba de respiración (Kleinman y Radford, 1964). La temperatura de los animales se mantuvo por medio de una lámpara. A continuación, se colocó una cánula en la vena femoral derecha para la inyección de fármacos (fenilefrina y BMY-7378) y solución salina, para la colocación se realizó un corte con tijeras en la zona inguinal siguiendo el ángulo natural de la pata trasera del animal, se disecó el tejido conjuntivo hasta exponer la vena femoral que se encuentra junto a la arteria y al nervio femoral, al ser expuesta se procedió a separar la vena de la arteria, para este proceso se hizo una incisión entre la vena y la arteria femoral utilizando pinzas de punta curva, una vez que se tuvo la vena aislada, se le colocó un hilo por debajo, después de esto se le realizó un corte y se insertó una cánula de polietileno llena con solución salina y para finalizar se ató firmemente. Además, se colocó una cánula en la arteria carótida izquierda para el registro de la presión arterial diastólica, sistólica y frecuencia cardíaca; en este procedimiento se utilizaron pinzas curvas para separar el músculo y la grasa con la finalidad de exponer la arteria carótida, que se encuentra situada de manera paralela a la tráquea y a un lado del nervio vago, una vez localizada la arteria se utilizaron pinzas curvas para separar la fascia que recubre la arteria, enseguida se realizó una abertura entre el nervio vago y la carótida para separarlos; ya que fue aislada la carótida, se colocó un hilo por debajo de ella, se le realizó un corte y se insertó una cánula de polietileno llena de solución salina heparinizada para evitar la coagulación, finalmente se ató la cánula.

La cánula colocada en la arteria carótida se conectó a un transductor de presión TSD104A (BIOPAC Systems Inc. Santa Barbara, CA, EUA) acoplado a una llave de tres vías que está conectada a una jeringa con solución salina heparinizada, mientras que la cánula colocada en la vena femoral está acoplada a una llave de tres vías que tiene una jeringa con solución salina. La presión sanguínea diastólica, sistólica y frecuencia cardíaca se registraron con un sistema adquisición de datos (BIOPAC Systems Inc. Santa Barbara, CA, EUA), mientras que los animales se mantuvieron a 37°C.

6.7. Pruebas de reactividad a los fármacos

Al terminar el procedimiento del modelo de la rata anestesiada (Figura 9), los animales se estabilizaron durante 10 minutos y una vez transcurrido este tiempo se realizó la toma de la presión diastólica y sistólica y de la frecuencia cardíaca iniciales. Después de la recolección de estos parámetros, se llevó a cabo la administración de solución salina (1 ml/kg) a cuatro de los ocho grupos experimentales; a los grupos control (exposición subaguda y crónica) y a sus respectivos grupos de exposición a tolueno, y los otros cuatro grupos restantes expuestos de manera subaguda y crónica, a aire o a tolueno, recibieron BMY-7378 (1 mg/kg), el cual es un antagonista de receptores adrenérgicos α_{1D} . Una vez administrada la solución salina o el BMY-7378 se dejó un tiempo de incubación de 15 minutos, enseguida se procedió a administrar fenilefrina (agonista α_1 adrenérgico) en dosis crecientes (1 a 1000 $\mu\text{g/kg}$, con un factor de $10^{1/2}$) para la construcción de las curvas dosis respuesta.

En la construcción de la curva dosis-respuesta a fenilefrina, se administró la dosis más baja (el volumen necesario para administrar la dosis correspondiente), se observó el efecto máximo (en este momento se llevó a cabo la medición de los parámetros de interés) y en cuanto regresó a su respuesta basal, se administró la siguiente dosis de fenilefrina (en orden ascendente) y se repitió el proceso hasta completar la curva dosis respuesta (Figura 10).

Para la administración de fármacos, después de haber aplicado la dosis correspondiente, ya sea de solución salina, BMY-7378 o fenilefrina, se inyectaron

0.2 mL de solución salina para arrastrar lo que pueda quedar de fármaco en la cánula.



Figura 8. Cámara de exposición estática de 29 L; es un sistema cerrado que cuenta con un puerto de inyección y un ventilador para homogenizar la concentración de tolueno.



Figura 9. Montaje de la rata anestesiada para realizar pruebas funcionales cardiovasculares.

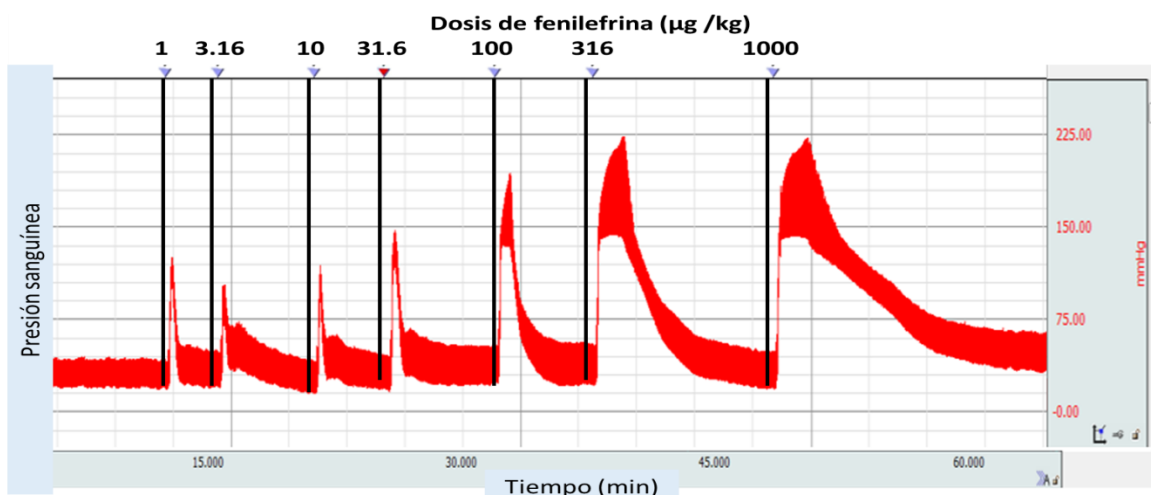


Figura 10. Adquisición de datos de los cambios en la presión sanguínea generados por dosis crecientes de fenilefrina (1 µg/Kg a 1000 µg/Kg), en cada línea se representa la aplicación de cada dosis de fenilefrina en el punto basal de la respuesta anterior.

7. Análisis de resultados

Para realizar el análisis y las gráficas de los valores obtenidos de presión sanguínea diastólica y sistólica y de frecuencia cardíaca, los datos resultantes fueron procesados en Microsoft office Excel (2021), y analizados y graficados en el programa SigmaPlot (v.11).

Para determinar si existieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los diferentes grupos de experimentación, a los datos obtenidos que cumplieron con la normalidad se les realizaron las pruebas paramétricas de T de Student o análisis de varianza de dos vías seguidos de la prueba post hoc de Tukey, de no cumplir el criterio anterior se llevaron a cabo las pruebas no paramétricas de U de Mann-Whitney o la prueba de Friedman.

8. Resultados

8.1. Valores iniciales en los diferentes grupos experimentales

Los animales fueron pesados antes de iniciar las exposiciones y al final de estas. En la tabla 2 se muestra el resultado del análisis de los datos obtenidos de los pesos y se reveló que no hubo diferencia al comparar el peso inicial contra el peso final de los grupos expuestos de manera subaguda a aire y a tolueno, para los grupos expuestos de manera crónica a aire hubo un aumento estadísticamente significativo en el peso final, comparado con el peso inicial del mismo grupo. Por su parte, en el grupo expuesto crónicamente a tolueno se realizó la comparación de peso final contra el peso inicial y se logró observar una ganancia en el peso, sin llegar a ser significativa. También, se llevó a cabo la comparación del peso final de cada uno de los grupos expuestos a tolueno en comparación con su respectivo grupo control, observando que en la comparación del grupo expuesto de manera subaguda a tolueno el peso fue menor, en comparación a su respectivo grupo control, sin llegar a ser diferente estadísticamente, en lo que respecta al peso final del grupo expuesto crónicamente a tolueno este fue menor con una diferencia estadísticamente significativa, en comparación al peso final del respectivo grupo control.

Una vez realizada la metodología del modelo de la rata anestesiada, durante el periodo de estabilización de 10 minutos se obtuvieron los datos mostrados en la tabla 2 que representan los valores basales de presión diastólica y sistólica y de frecuencia cardíaca en ratas que estuvieron bajo anestesia con pentobarbital sódico. Previamente a llevar a cabo estas mediciones los animales fueron expuestos de manera subaguda y crónica a aire o a tolueno 6000 ppm. Al analizar los resultados obtenidos se pudo observar que la presión diastólica y sistólica siguen un comportamiento normal, en donde la presión sistólica es mayor que la diastólica, lo cual se conservó en todos los grupos experimentales.

Tabla 2. Valores iniciales y finales de pesos de los animales y valores basales de presión sanguínea y frecuencia cardíaca durante la anestesia con pentobarbital.

Grupo	Peso (g)		Presión sanguínea (mm Hg)		Frecuencia cardíaca (LPM)
	Inicial	Final	Diastólica	Sistólica	
Control subagudo	326.1 ± 6.9	339.8 ± 4.3	54.2 ± 11	98.2 ± 11	404 ± 22.8
Tolueno subagudo	328.8 ± 10.1	327.7 ± 10.4	84.4 ± 6.7*	130 ± 8.9*	426.5 ± 16.9
Control crónico	384.8 ± 8.4	421.7 ± 7.9 [□]	56.3 ± 7.9	90.3 ± 4.6	411.8 ± 9.2
Tolueno crónico	355.2 ± 11.9	364 ± 7.3 ^σ	91.3 ± 8.1**	124.3 ± 7.2**	419.8 ± 15.3

Los valores representan la media ± EE de 6 animales de experimentación. * p<0.05 vs control subagudo; ** p<0.05 vs control crónico, [□] p<0.05 vs peso inicial control crónico, ^σ p<0.05 vs peso final control crónico; t de Student o U de Mann-Whitney.

Se llevo a cabo la comparación de la presión diastólica y sistólica iniciales del grupo expuesto a 6000 ppm de tolueno de forma subaguda con su respectivo grupo control expuesto a aire, se encontró que las presiones diastólica y sistólica del grupo expuesto a tolueno fueron mayores que las del grupo control, observándose que la diferencia entre las presiones fue estadísticamente significativa. También se observó un comportamiento similar en la comparación de las presiones de los grupos expuestos de manera crónica a aire y a 6000 ppm de tolueno, donde al realizar el análisis se mostró que las presiones sistólica y diastólica del grupo tolueno fueron significativamente mayores en comparación con las de su respectivo grupo control (p<0.05). Además, se observó que al comparar la frecuencia cardíaca de todos los grupos no se logró encontrar diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (tabla 2).

8.2. Curvas dosis respuesta a fenilefrina

Para realizar las curvas dosis-respuesta se administró una serie de dosis de fenilefrina (1 µg/kg a 1000 µg/kg, con un factor de 10^{1/2}) a las ratas anestesiadas y se graficó el cambio de presión generado por cada una de las dosis; previamente, las ratas se sometieron a un periodo de estabilización para obtener lecturas más estables. Los datos obtenidos fueron analizados para cada uno de los grupos experimentales.

En los resultados de las curvas dosis-respuesta a fenilefrina, se muestra la comparación de los valores por separado de la presión diastólica (Figura 11) y sistólica (Figura 12) de la exposición subaguda a 6000 ppm de tolueno y a aire, y se observó que al añadir cada una de las diferentes dosis de agonista a las ratas, se obtenía una presión sanguínea diastólica y sistólica mayor al aumentar progresivamente las dosis, por consiguiente, puede inferirse que la presión sanguínea es dependiente de la dosis de fenilefrina. Además, se observó que la presión sistólica es mayor en el grupo control y en el grupo tolueno subagudo, en comparación a la presión diastólica del grupo control y del grupo tolueno. Sin embargo, no se lograron observar diferencias significativas.

En la curva dosis-respuesta de la comparación de los valores de la presión sanguínea diastólica del grupo expuesto crónicamente a tolueno y del grupo control expuesto crónicamente a aire (Figura 13), obtenidos de las respuestas a fenilefrina, se observó que, al añadir cada una de las diferentes dosis, se obtenía una presión sanguínea diastólica mayor al aumentar progresivamente la dosis del agonista, con lo anterior, se puede deducir que la presión sanguínea diastólica es dependiente de la dosis de fenilefrina. Además, el tolueno disminuyó la presión sanguínea diastólica, en comparación con el grupo control ($p < 0.05$). Por otro lado, en las curvas dosis-respuesta a fenilefrina de la presión sanguínea sistólica del grupo tolueno y del grupo control crónico (Figura 14), las respuestas mostraron un aumento dependiente a la dosis utilizada del agonista. Además, se observó que el tolueno disminuyó la presión sanguínea sistólica, en comparación con la del grupo control ($p < 0.05$).

Presión diastólica exposición subaguda

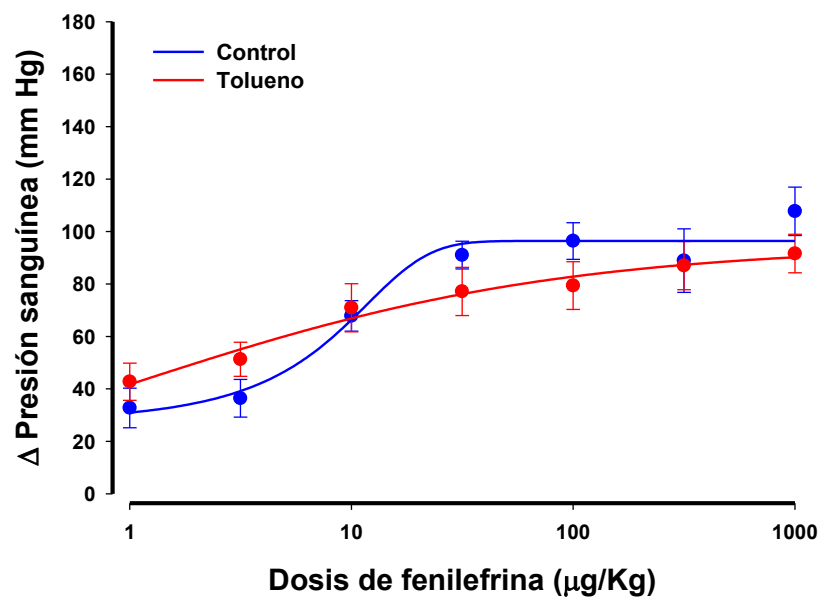


Figura 11. Curvas dosis-respuesta de la presión diastólica de animales expuestos de manera subaguda a tolueno (6000 ppm) y a aire (control). Los símbolos representan la media $\pm$ el error estándar de 6 animales.

Presión sistólica exposición subaguda

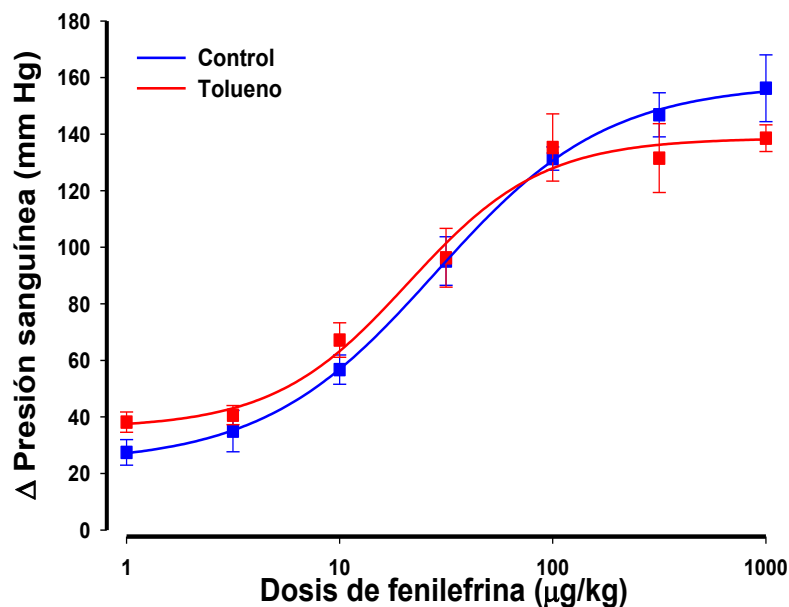


Figura 12. Curvas dosis-respuesta de la presión sistólica de animales expuestos de manera subaguda a tolueno (6000 ppm) y a aire (control). Los símbolos representan la media $\pm$ el error estándar de 6 animales.

Presión diastólica exposición crónica

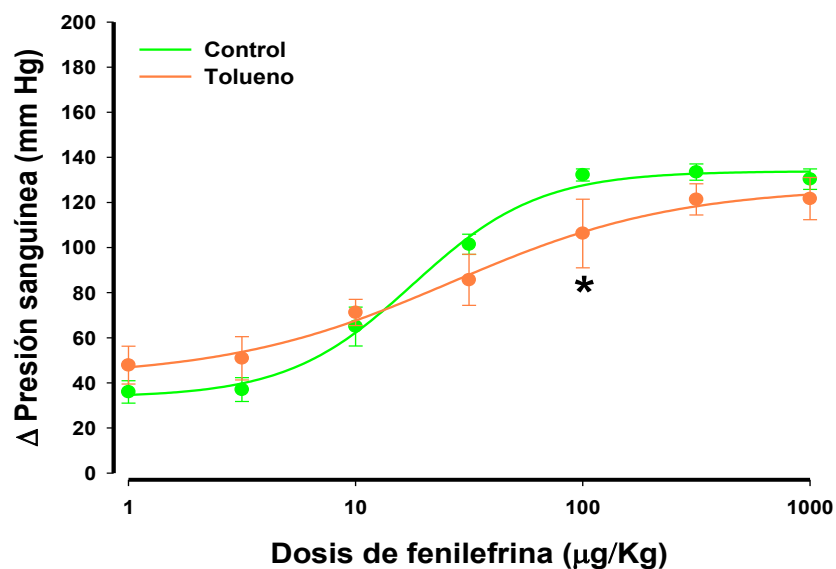


Figura 13. Curvas-dosis respuesta de la presión diastólica de ratas con exposición crónica a tolueno (6000 ppm) o a aire (control). Los símbolos representan la media $\pm$ el error estándar de 6 animales. * $p < 0.05$ vs control; ANOVA dos vías seguido de una prueba de Tukey.

Presión sistólica exposición crónica

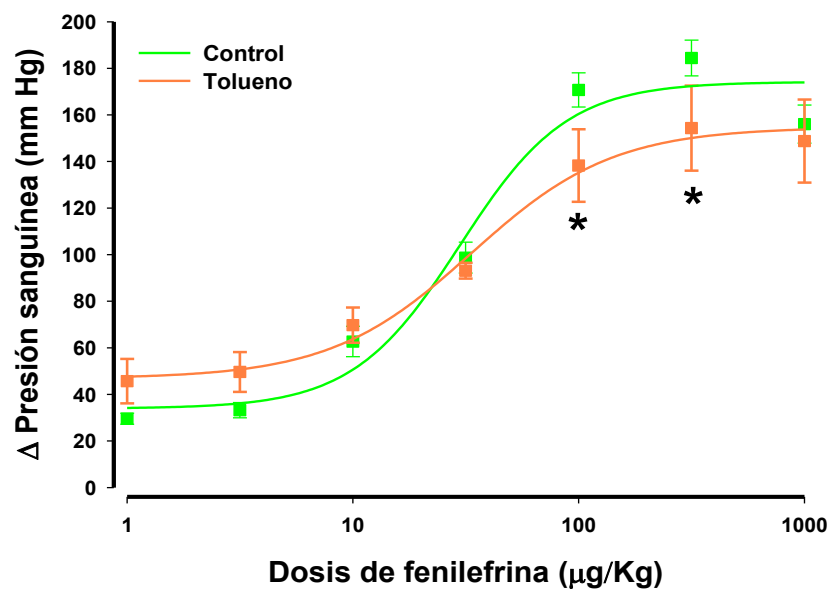


Figura 14. Curvas-dosis respuesta de la presión sistólica de ratas con exposición crónica a tolueno (6000 ppm) o a aire (control). Los símbolos representan la media $\pm$ el error estándar de 6 animales. * $p < 0.05$ vs control; ANOVA dos vías seguido de una prueba de Tukey.

8.3. Efecto del tiempo de exposición en la presión sanguínea diastólica y sistólica

En la comparación de las curvas dosis-respuesta con respecto al tiempo de exposición: subagudo (una semana) y crónico (cuatro semanas), se observó que la presión diastólica (Figura 15) y sistólica (Figura 16) del grupo control crónico fue mayor en comparación con el grupo control subagudo ($p < 0.05$).

De manera similar, en la comparación de las curvas dosis-respuesta de la presión diastólica (Figura 17) del grupo expuesto a tolueno (6000 ppm), la presión fue mayor en los animales expuestos crónicamente al disolvente con respecto al grupo tolueno subagudo ($p < 0.05$). Sin embargo, en la comparación de la presión sistólica (Figura 18) entre ambos grupos, no se observó una diferencia estadísticamente significativa en las curvas dosis-respuesta.

Presión diastólica de la exposición subaguda y crónica a aire

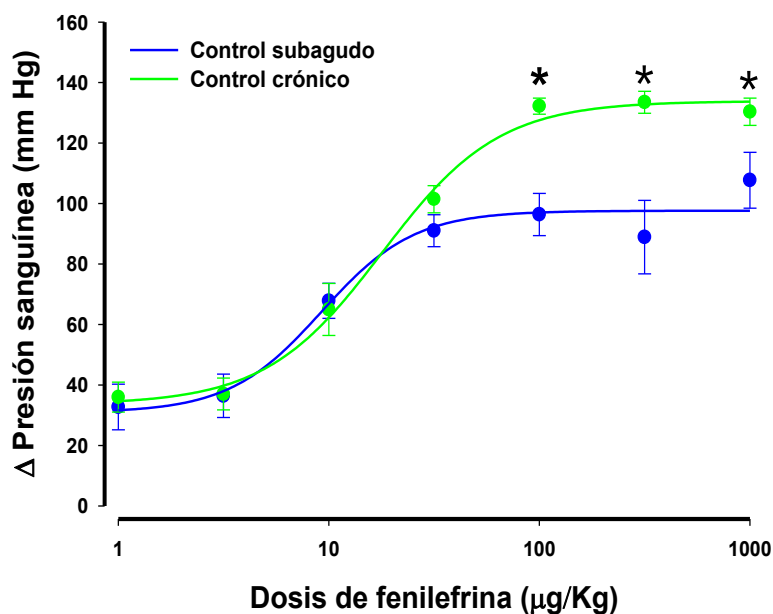


Figura 15. Curvas-dosis respuesta de la comparación de la presión diastólica de ratas con exposición subaguda y crónica a aire. Los símbolos representan la media $\pm$ el error estándar de 6 animales. * $p < 0.05$ vs control subagudo; ANOVA dos vías seguido de una prueba de Tukey.

Presión sistólica de la exposición subaguda y crónica a aire

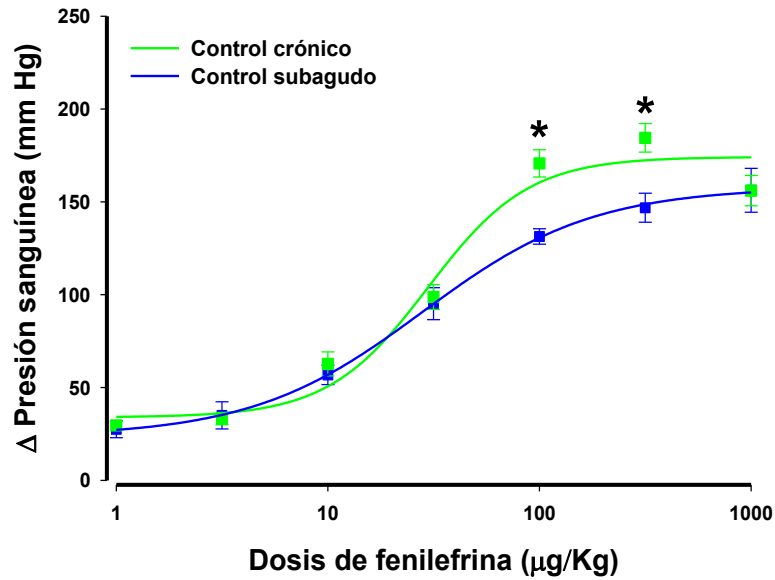


Figura 16. Curvas-dosis respuesta de la comparación de la presión sistólica de ratas con exposición subaguda y crónica a aire. Los símbolos representan la media $\pm$ el error estándar de 6 animales. * $p < 0.05$ vs control subagudo; ANOVA dos vías seguido de una prueba de Tukey.

Presión diastólica de la exposición subaguda y crónica a tolueno

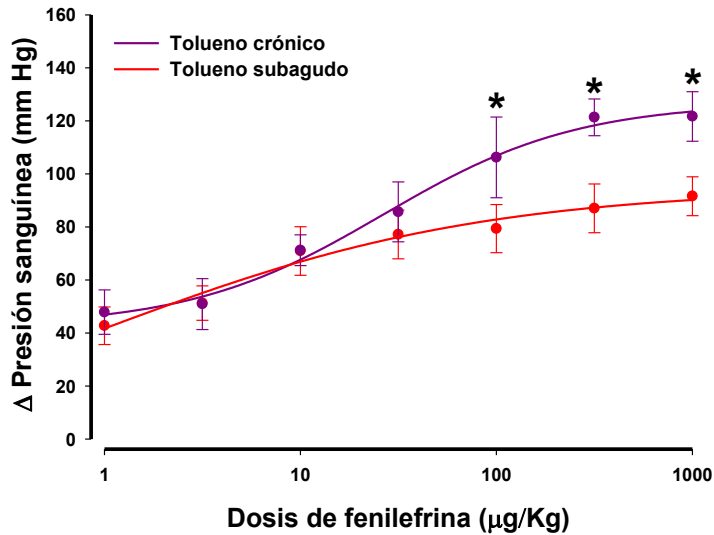


Figura 17. Curvas-dosis respuesta de la comparación de la presión diastólica de ratas con exposición subaguda y crónica a tolueno (6000 ppm). Los símbolos representan la media $\pm$ el error estándar de 6 animales. * $p < 0.05$ vs tolueno subagudo; ANOVA dos vías seguido de una prueba de Tukey.

Presión sistólica de la exposición subaguda y crónica a tolueno

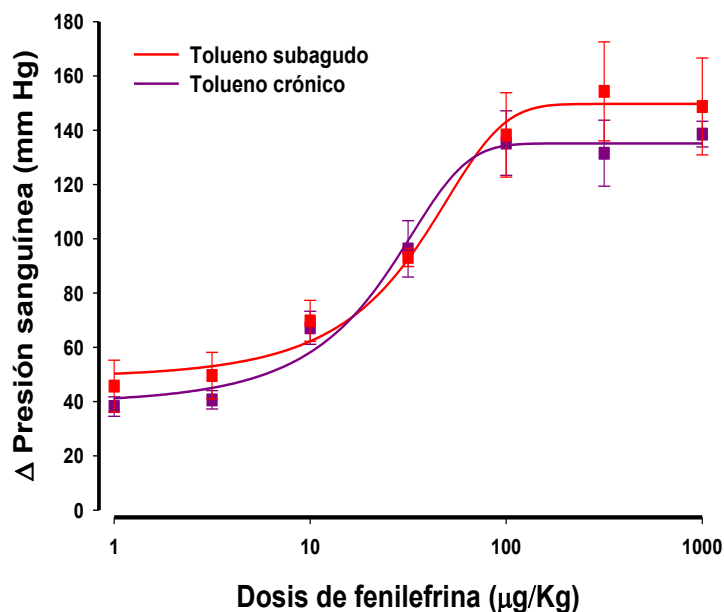
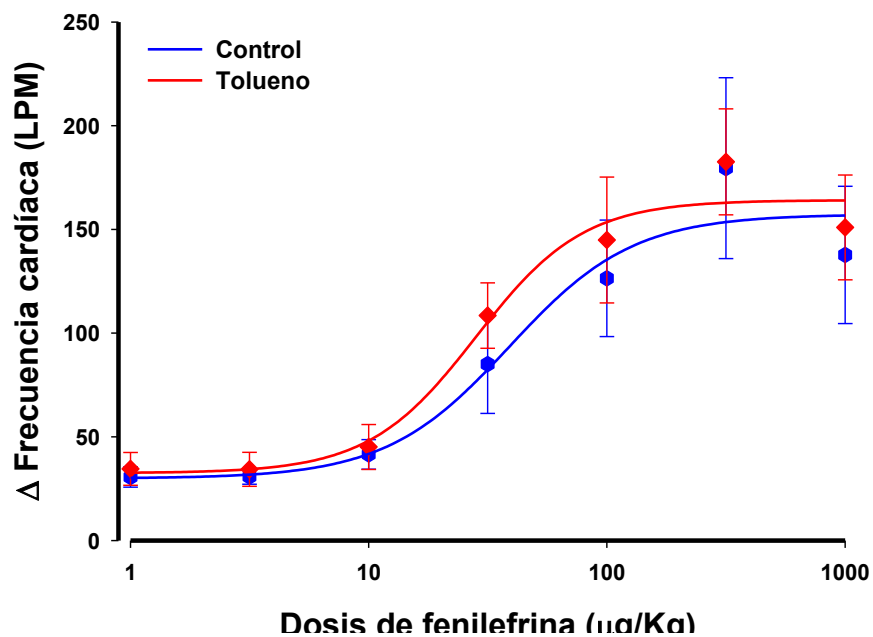


Figura 18. Curvas-dosis respuesta de la comparación de la presión sistólica de ratas con exposición subaguda y crónica a tolueno (6000 ppm). Los símbolos representan la media $\pm$ el error estándar de 6 animales

8.4. Efecto de la exposición subaguda y crónica a tolueno sobre la frecuencia cardíaca.

Para realizar las curvas dosis respuesta, se graficó el cambio en la frecuencia cardíaca generado por dosis crecientes de fenilefrina (1– 1000 µg/Kg). Se observó que la frecuencia cardíaca aumenta de manera dependiente de la dosis utilizada de fenilefrina en cada uno de los grupos. Además, se identificó que, al realizar la comparación de la frecuencia cardíaca de los grupos expuestos de manera subaguda y la de los grupos expuestos de manera crónica, los cambios en la frecuencia cardíaca tuvieron una tendencia a presentar valores más elevados en los grupos expuestos a tolueno, pero ninguna de estas comparaciones resultó con diferencias significativas (figura 19).

A) Frecuencia cardíaca exposición subaguda



B) Frecuencia cardíaca exposición crónica

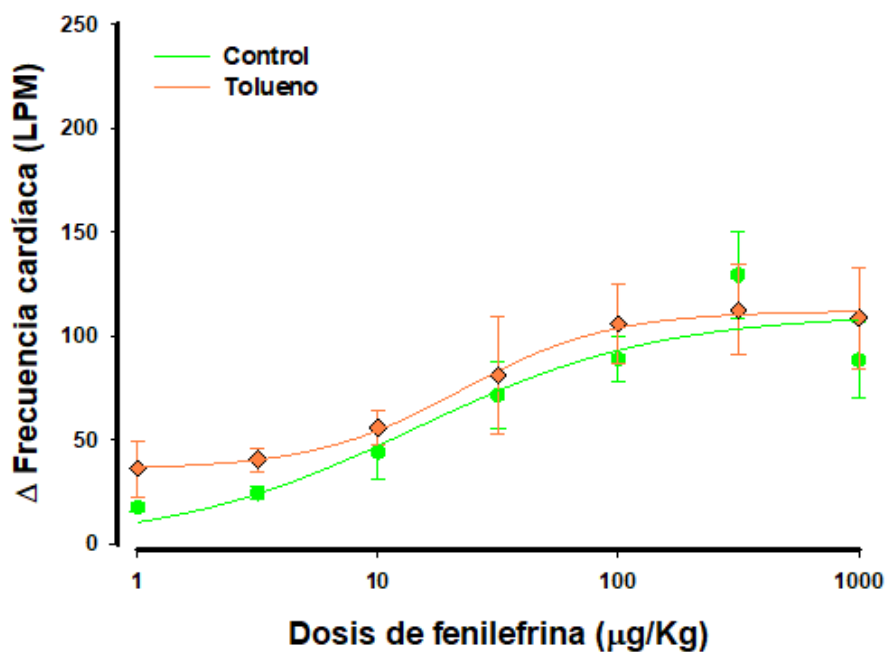


Figura 19. Curvas-dosis respuesta de la comparación de la frecuencia cardíaca de ratas con: A) exposición subaguda a tolueno (6000 ppm) y a aire (control), y B) exposición crónica a tolueno (6000 ppm) y a aire. Los símbolos representan la media $\pm$ el error estándar de 6 animales.

8.5. Participación de los receptores adrenérgicos alfa 1D

Para determinar la participación de los receptores adrenérgicos alfa 1D en las respuestas cardiovasculares de los animales se realizaron curvas dosis-respuesta a un agonista de los receptores adrenérgicos alfa 1 (fenilefrina) en presencia de un antagonista selectivo de los receptores alfa 1D adrenérgicos (BMY-7378). Para la creación de las curvas dosis-respuesta se administró una dosis única de BMY-7378 (1 mg/Kg), se dejaron 15 minutos de incubación, enseguida se realizó la administración de dosis crecientes de fenilefrina (1 µg/kg a 1000 µg/kg, con un factor de $10^{1/2}$) a las ratas anestesiadas y se graficó el cambio de presión generado por cada una de las dosis.

8.5.1. Participación de los receptores alfa 1D en la presión de las ratas expuestas de manera subaguda

En el análisis de las curvas dosis-respuesta de la presión diastólica de las ratas control expuestas de manera subaguda a aire, con y sin la administración de BMY-7378 (Figura 20), se observó una disminución en la presión diastólica de las ratas en presencia del antagonista, en comparación con las ratas que no recibieron el antagonista. Las curvas dosis-respuesta de la presión sistólica de las ratas control expuestas de manera subaguda a aire, con y sin la administración de BMY-7378 (Figura 21), nos permitieron identificar una disminución en la presión sistólica de las ratas que recibieron el antagonista, en comparación con las ratas que no se les administró el antagonista.

En el análisis de las curvas dosis-respuesta de la presión diastólica las ratas expuestas de manera subaguda a tolueno, con y sin la administración de BMY-7378 (Figura 22, la presión de las ratas a las que se les administró el antagonista fue menor en comparación al grupo al que no se le administró, obteniendo una diferencia estadísticamente significativa en la dosis de fenilefrina de 10 µg/kg.

En la comparación de las curvas dosis-respuesta de la presión sistólica de las ratas expuestas de manera subaguda a tolueno, con y sin la administración de BMY-7378 (Figura 23, la presión de las ratas a las que se les administró el antagonista fue menor en comparación al grupo al que no se le administró, obteniendo diferencia estadísticamente significativa en la dosis de fenilefrina de 10 µg/kg.

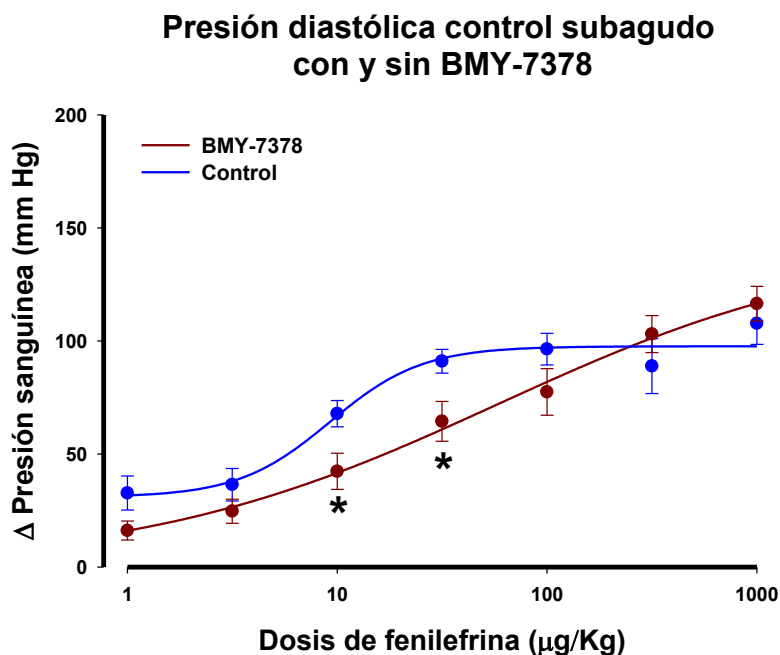


Figura 20. Curvas-dosis respuesta de la presión diastólica de ratas con y sin administración de BMY-7378 expuestas a aire de manera subaguda. Los símbolos representan la media $\pm$ el error estándar de 6 animales. * $p < 0.05$ vs control; ANOVA dos vías seguido de una prueba de Tukey.

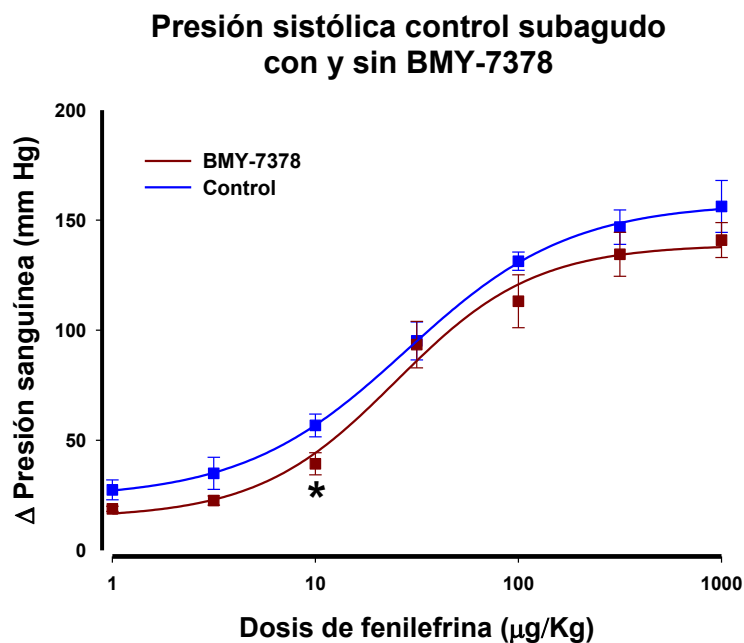


Figura 21. Curvas-dosis respuesta de la presión sistólica de ratas con y sin administración de BMY-7378 expuestas a aire de manera subaguda. Los símbolos representan la media $\pm$ el error estándar de 6 animales. * $p < 0.05$ vs control; ANOVA dos vías seguido de una prueba de Tukey.

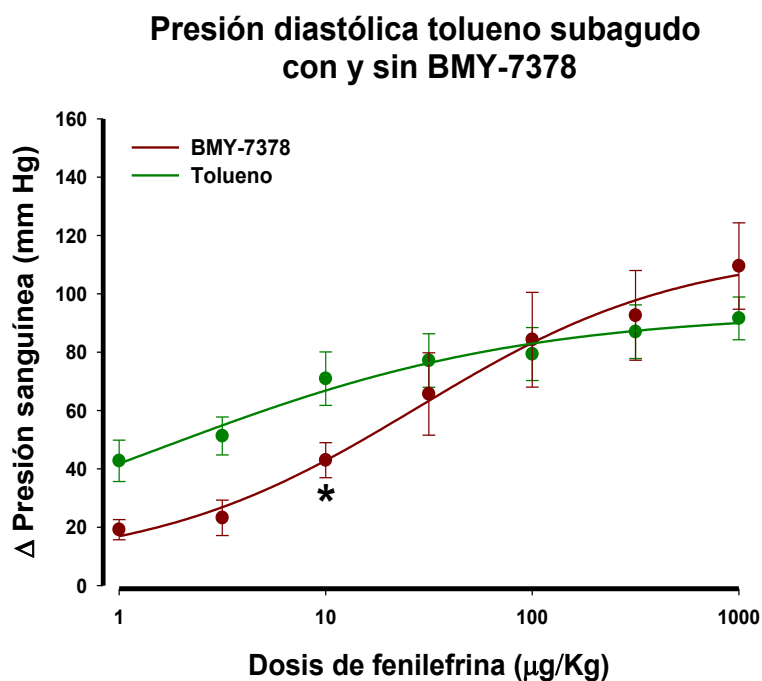


Figura 22. Curvas-dosis respuesta de la comparación de la presión sanguínea diastólica de ratas con y sin administración de BMY-7378, expuestas de manera subaguda a 6000 ppm de tolueno. Los símbolos representan la media $\pm$ el error estándar de 6 animales. * $p < 0.05$ vs control; ANOVA dos vías seguido de una prueba de Tukey.

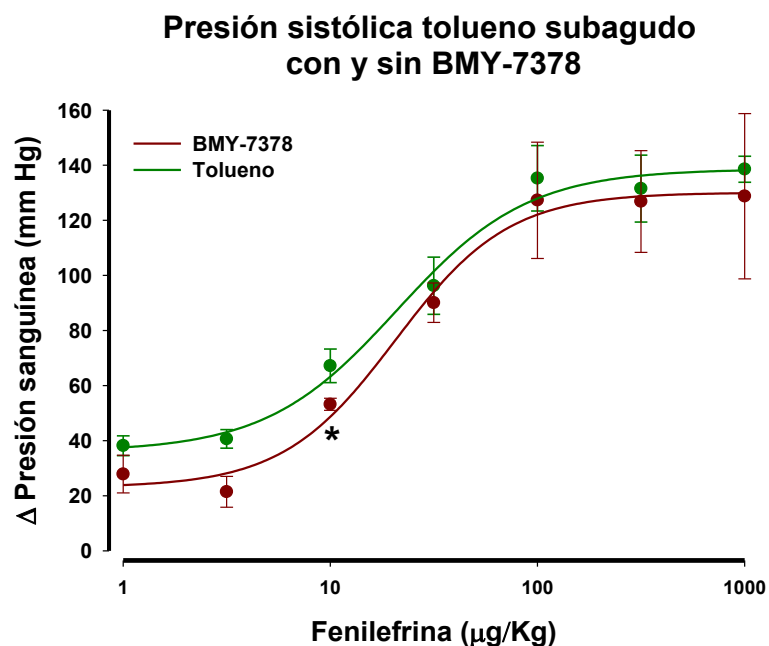


Figura 23. Curvas-dosis respuesta de la comparación de la presión sanguínea sistólica de ratas con y sin administración de BMY-7378, expuestas de manera subaguda a 6000 ppm de tolueno. Los símbolos representan la media $\pm$ el error estándar de 6 animales. * $p < 0.05$ vs control; ANOVA dos vías seguido de una prueba de Tukey.

8.5.2. Participación de los receptores alfa 1D en la presión de las ratas expuestas de manera crónica

En el análisis de las curvas dosis-respuesta de la presión diastólica de las ratas control expuestas de manera crónica a aire, con y sin la administración de BMY-7378 (Figura 24), se observó una disminución estadísticamente significativa en la presión de las ratas en presencia del antagonista, en comparación con las ratas que no recibieron el antagonista, indicando la posible participación de los receptores alfa 1D al mediar la presión sanguínea diastólica.

Las curvas dosis-respuesta de la presión sistólica de las ratas control expuestas de manera crónica a aire, con y sin la administración de BMY-7378 (Figura 25), nos permitieron identificar una disminución estadísticamente significativa en la presión de las ratas que recibieron el antagonista, en comparación con las ratas que no se les administró el antagonista, indicando la posible participación de los receptores alfa 1D para mediar la presión sanguínea sistólica.

En el análisis de las curvas dosis-respuesta de los cambios de presión diastólica generados por las dosis crecientes de fenilefrina (1 a 1000 $\mu\text{g/Kg}$) en las ratas control expuestas de manera crónica a tolueno, con y sin la administración de BMY-7378 (Figura 26), se observó una disminución estadísticamente significativa en la presión de las ratas en presencia del antagonista, en comparación con las ratas que no recibieron el antagonista. Esta disminución sólo se observó al aplicar dosis bajas de fenilefrina (1 a 10 $\mu\text{g/Kg}$), lo anterior demuestra la participación de los receptores alfa 1D al mediar la presión sanguínea diastólica.

Las curvas dosis-respuesta de los cambios de presión sistólica generados por las dosis crecientes de fenilefrina (1 a 1000 $\mu\text{g/Kg}$) en las ratas expuestas de manera crónica a tolueno, con y sin la administración de BMY-7378 (Figura 27), nos permitieron identificar una disminución estadísticamente significativa en la presión de las ratas que recibieron el antagonista, en comparación con las ratas que no se les administró el antagonista. Esta disminución se observó solamente al utilizar dosis bajas de fenilefrina (1 a 10 $\mu\text{g/Kg}$), indicando la participación de los receptores alfa 1D al mediar la presión sanguínea sistólica.

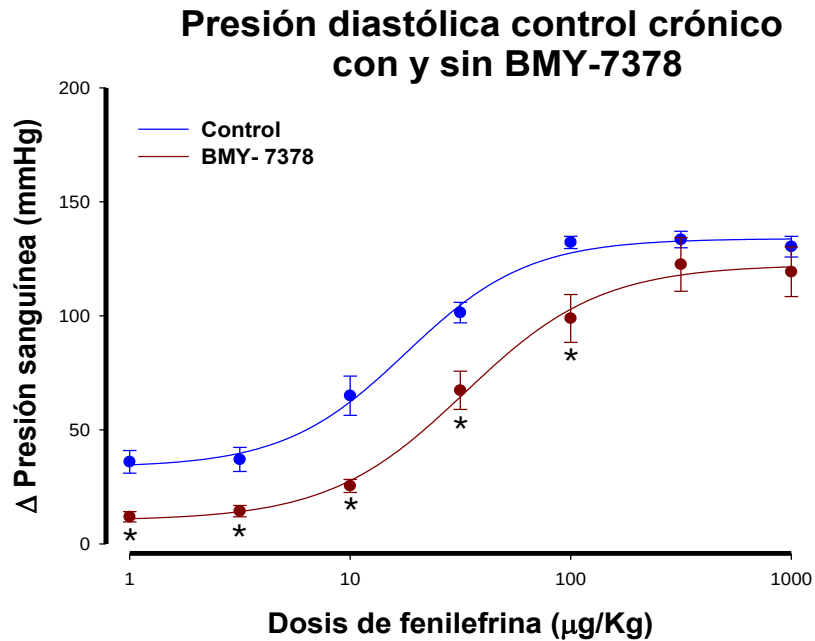


Figura 24. Curvas-dosis respuesta de la presión diastólica de ratas con y sin administración de BMY-7378 expuestas a aire de manera crónica. Los símbolos representan la media $\pm$ el error estándar de 6 animales. * $p < 0.05$ vs sin BMY-7378; ANOVA dos vías seguido de una prueba de Tukey.

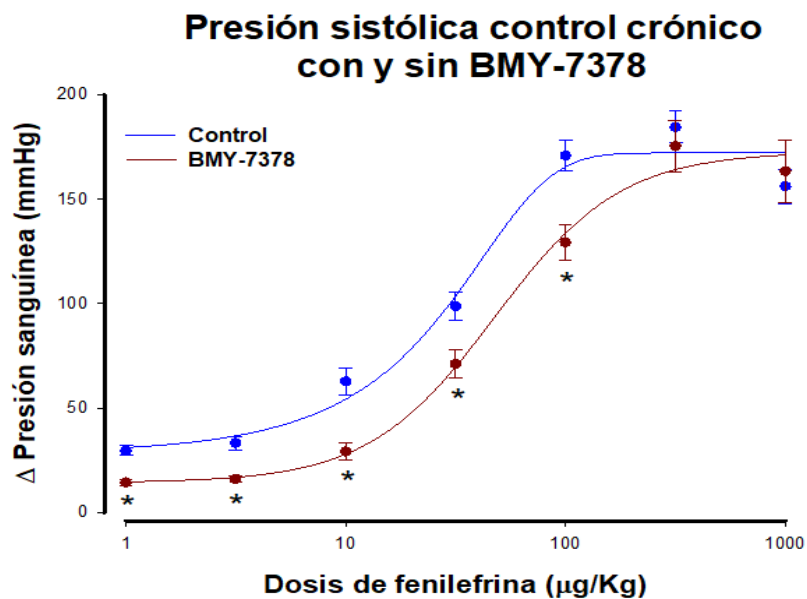


Figura 25. Curvas-dosis respuesta de la presión sistólica de ratas con y sin administración de BMY-7378 expuestas a aire de manera crónica. Los símbolos representan la media $\pm$ el error estándar de 6 animales. * $p < 0.05$ vs sin BMY-7378; ANOVA dos vías seguido de una prueba de Tukey.

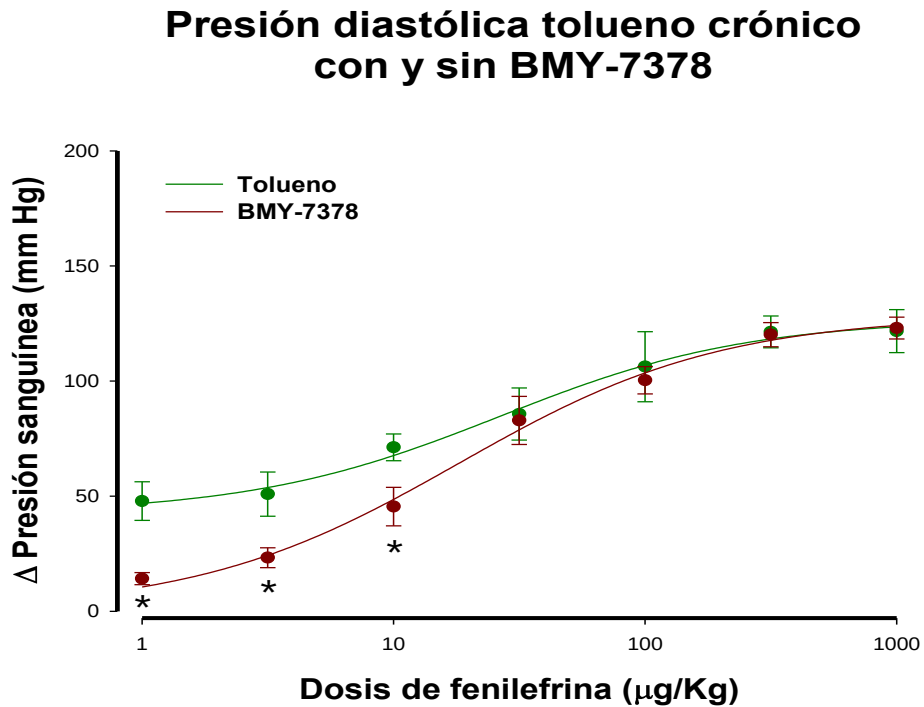


Figura 26. Curvas-dosis respuesta de la presión diastólica de ratas con y sin administración de BMY-7378 expuestas a tolueno de manera crónica. Los símbolos representan la media $\pm$ el error estándar de 6 animales. * $p < 0.05$ vs sin BMY-7378; ANOVA dos vías seguido de una prueba de Tukey.

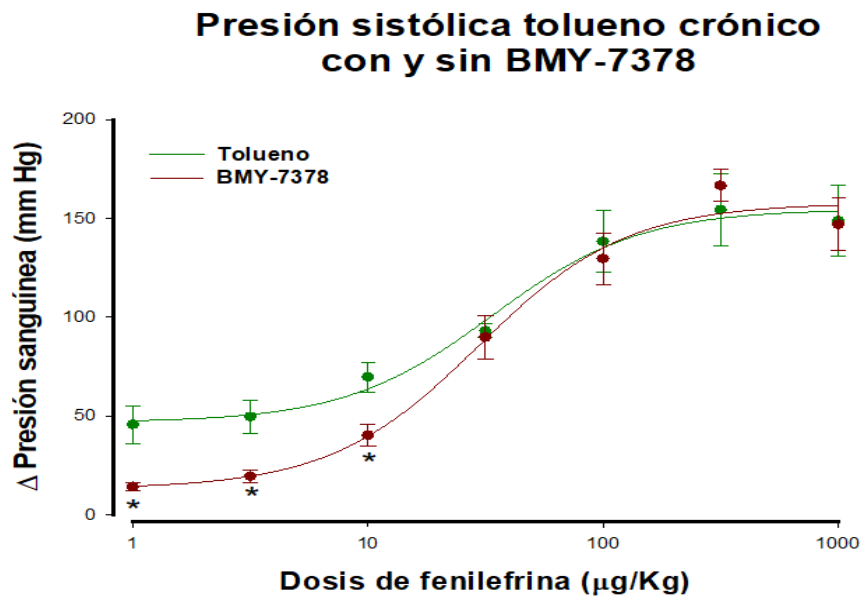


Figura 27. Curvas-dosis respuesta de la presión sistólica de ratas con y sin administración de BMY-7378 expuestas a tolueno de manera crónica. Los símbolos representan la media $\pm$ el error estándar de 6 animales. * $p < 0.05$ vs sin BMY-7378; ANOVA dos vías seguido de una prueba de Tukey.

8.6. Área bajo la curva de los grupos experimentales

Al analizar de manera individual los resultados obtenidos del área bajo la curva (ABC) de las curvas dosis-respuesta de los grupos control subagudo y crónico (Tabla 3A), se observó que el ABC de la presión sistólica es mayor en ambos grupos, comparada con el ABC de la presión diastólica de cada uno de los grupos anteriores. Sin embargo, no se logró tener una diferencia estadística entre las diferentes ABC de las presiones diastólica y sistólica de los grupos control subagudo y crónico.

Se hizo el análisis de las ABC comparando el tiempo de exposición de una semana (subagudo) contra un mes (crónico), en este caso al comparar las presiones diastólica y sistólica del grupo expuesto de manera crónica a aire éstas fueron mayores con respecto a las del grupo control subagudo ($p < 0.05$). En las ABC de las presiones de los grupos expuestos a tolueno de manera subaguda y crónica, se identificó que sólo el ABC de la presión diastólica del grupo tolueno crónico fue mayor respecto a la presión diastólica del grupo de exposición a tolueno subagudo ($p < 0.05$).

Al analizar los resultados obtenidos de las ABC de las curvas dosis-respuesta de los grupos expuestos a aire y a tolueno de manera subaguda y crónica (Tabla 3B) con la administración de BMY-7378, se observó que el ABC de la presión sistólica es mayor en ambos grupos, comparada con el ABC de la presión diastólica de cada uno de los grupos anteriores. Sin embargo, no se logró tener una diferencia estadísticamente significativa entre las diferentes ABC de las presiones de los grupos tolueno expuestos de manera subaguda y crónica, en comparación a las ABC de los grupos que recibieron la administración del antagonista.

Finalmente se hizo la comparación de las ABC de las presiones diastólica y sistólica de las ratas sin la administración de antagonista, en comparación con las que sí se les administro BMY-7378, observando que no existe diferencia estadísticamente significativa.

Tabla 3. Valores del área bajo la curva de las presiones de los grupos expuestos a 6000 ppm de tolueno y a aire (control), con y sin la administración de BMY-7378.

A) Sin BMY-7378				
	Área bajo la curva (ABC)			
	Control subagudo	Tolueno subagudo	Control crónico	Tolueno crónico
Presión diastólica	95820.6 ±9364.3	86543.2 ±5454.5	129163.4 ±2925*	116506.5 ±7006.6**
Presión sistólica	143472.3 ±7110.2	131342.3 ±7613.2	166189.7 ±3395.5*	145464.7 ±15468.6
B) Con BMY-7378				
	Área bajo la curva (ABC)			
	Control subagudo	Tolueno subagudo	Control crónico	Tolueno crónico
Presión diastólica	100864.9 ±7297.6	96034.7 ±10620.0	113479.2 ±10553.1	114917.6 ±2327.6
Presión sistólica	129718.2 ±7209.8	126430.3 ±15993.0	156877.9 ±10683.0	148431.4 ±7655.9

*p<0.05 vs presión sanguínea diastólica control subagudo, **<0.05 vs presión sanguínea diastólica tolueno subagudo, + <0.05 vs presión sanguínea sistólica control subagudo; t de Student o U de Mann-Whitney.

8.7. Respuesta máxima y dosis efectiva 50

Una vez obtenidas las respuestas máximas (Emax) de la presión sistólica y diastólica de las ratas sin la administración de BMY-7378 (tabla 4), pertenecientes a los diferentes grupos experimentales expuestos a aire o a tolueno (6000 ppm) de manera subaguda y crónica, se observó que las Emax de la presión diastólica y sistólica de los grupos expuestos a tolueno fueron menores en comparación con las de los grupos expuestos a aire. Sin embargo, la diferencia en los valores no logró tener una diferencia estadísticamente significativa. De manera adicional a lo anterior, al analizar las Emax de la presión diastólica y sistólica de las ratas a las que se les administró BMY-7378, logramos observar que las Emax de los grupos expuestos a tolueno fueron menores en comparación a los grupos expuestos a aire. También, se llevó a cabo la comparación de las Emax de la presión diastólica y sistólica de las ratas a las que se les administró BMY-7378 contra las que no se les administró el antagonista y no se logró observar alguna diferencia estadísticamente significativa.

Al analizar los valores de la dosis efectiva 50 (DE_{50}) de la presión sanguínea diastólica y sistólica de los grupos sin la administración de BMY-7378 (tabla 4), pertenecientes a los diferentes grupos experimentales expuestos a aire y a tolueno (6000 ppm) de manera subaguda y crónica, se observó que las DE_{50} de la presión diastólica y sistólica de los grupos expuestos a tolueno fueron mayores en comparación con las de los grupos expuestos a aire. Sin embargo, la diferencia en los valores no logró tener una diferencia estadísticamente significativa. En los grupos que recibieron el antagonista, no se logra observar una diferencia significativa al comparar la DE_{50} de la presión diastólica y sistólica de la exposición crónica a aire y a tolueno, en comparación a las presiones de los grupos expuestos de manera subaguda.

Se llevó a cabo la comparación de la DE_{50} de las presiones de los grupos expuestos a aire y a tolueno de manera subaguda y crónica, administrados con BMY-7378, con los grupos expuestos a aire y a tolueno de manera subaguda y crónica, que no recibieron el antagonista. Como resultado de la comparación, se observó que la DE_{50} de la presión diastólica del grupo expuesto a aire de manera subaguda que recibió BMY-7378 fue mayor, en comparación al grupo expuesto a aire de manera subaguda sin la administración del antagonista, esta diferencia fue estadísticamente significativa. Además, al comparar la DE_{50} de la presión diastólica del grupo control crónico administrado con el antagonista fue mayor, comparada con la presión diastólica del grupo control crónico sin la administración de BMY-7378. En la comparación de la DE_{50} de la presión sistólica del grupo control subagudo y crónico administrado con el antagonista, comparada con la presión sistólica del grupo control subagudo y crónico sin la administración de BMY-7378, no se logró obtener una diferencia estadísticamente significativa. Finalmente, la comparación de la DE_{50} de la presión diastólica y sistólica de los grupos expuestos de manera subaguda y crónica a tolueno administrados con BMY-7378, contra la DE_{50} de la presión diastólica y sistólica de los grupos expuestos de manera subaguda y crónica sin la aplicación del antagonista, mostró que no hubo una diferencia estadísticamente significativa.

Tabla 4. Valores del efecto máximo y de la dosis efectiva 50 de los grupos expuestos a aire o a tolueno de manera subaguda o crónica, con y sin la administración de BMY-7378.

Sin BMY-7378					
		Control subagudo	Tolueno subagudo	Control crónico	Tolueno crónico
Presión diastólica	E _{max}	103.4 ±9.0	94.1 ±18.6	133.9 ±3.6	133.7 ±10.3
	DE ₅₀	8.7 ±1.9	59.3 ±47.4	18.5 ± 4.2	67.8 ±42.4
Presión sistólica	E _{max}	168.8 ±15.3	142.0 ±26.8	175.5 ±4.2	160.3 ±18.6
	DE ₅₀	40.4 ±8.7	24.1 ±6.7	32.0 ±4.4	62.8 ±31.1
Con BMY-7378					
Presión diastólica	E _{max}	120.7 ±8.5	108.6 ±22.3	121.7 ±11.1	124.4 ±4.5
	DE ₅₀	74.7 ±45.1*	33.2 ±15.6	32.3 ±4.0**	26.9 ±12.4
Presión sistólica	E _{max}	145.2 ± 4.2	138.3 ±31.5	173.1 ±14.5	158.0 ±10.1
	DE ₅₀	36.3 ±12.7	22.6 ±5.4	50.1 ±10.1	37.7 ±14.8

*p<0.05 vs presión sanguínea diastólica control subagudo, **<0.05 vs presión sanguínea diastólica control crónico; t de Student o U de Mann-Whitney.

8.8. Duración del efecto generado por las dosis crecientes de fenilefrina

Para determinar el tiempo del efecto de cada una de las dosis de fenilefrina, se llevó a cabo la medición del cambio en el tiempo desde que se aplicó la dosis de agonista hasta que la presión se estabilizó y se realizó una curva dosis-respuesta (figura 28). Se observó que, al añadir cada una de las diferentes dosis, se obtenía mayor tiempo de efecto al aumentar progresivamente la dosis del agonista, con lo anterior, se puede deducir que el tiempo del efecto es dependiente de la dosis de fenilefrina. Además, la exposición a tolueno de manera subaguda disminuyó de manera significativa la duración del efecto generado por la fenilefrina, en comparación al tiempo obtenido en el grupo control. En lo que respecta a los demás grupos experimentales no se logró observar diferencia alguna en la duración del efecto generado por las dosis crecientes de fenilefrina.

Duración del efecto generado por la fenilefrina

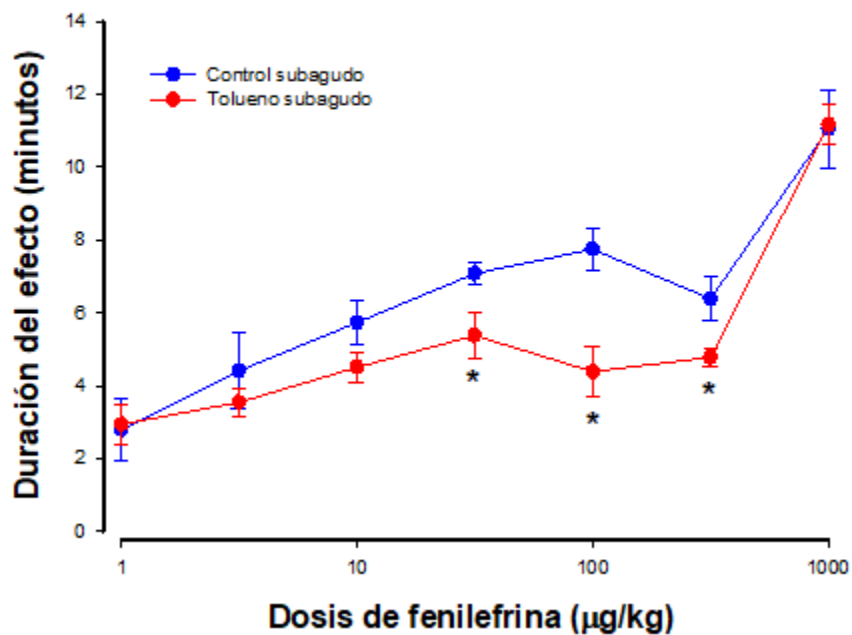


Figura 28. Curvas-dosis respuesta de la duración del efecto de la fenilefrina en la presión de ratas expuestas de manera subaguda a aire y a tolueno 6000 ppm. Los símbolos representan la media $\pm$ el error estándar de 6 animales. * $p < 0.05$ vs control; ANOVA dos vías seguido de una prueba de Tukey.

9. Discusión

El tolueno genera múltiples efectos en el organismo que van desde mareos, náuseas, vómitos, dolor de cabeza, pérdida de la visión y todo lo anterior se debe a que afecta al SNC, pero se ha documentado que también puede actuar sobre el sistema cardiovascular, generando arritmias (taquicardia y bradicardia), cambios de presión sanguínea, entre otros, y uno de los efectos letales que genera la inhalación de productos que contengan tolueno es la denominada muerte súbita por inhalación, la cual consiste en el deceso del consumidor de inhalables de manera repentina y rápida, ésta puede ser causada por diversas situaciones en las que el consumidor se exponga a cambios drásticos en su entorno, como un susto o que lo atrape la policía. Este síndrome no tiene una explicación del porqué se puede generar la muerte del individuo, para explicarlo existen diversas teorías, una de ellas es que existe una sensibilización del corazón a las catecolaminas, lo cual causa cambios en el sistema cardiovascular, generando taquicardias o bradicardias, lo que llevaría a un descontrol en la autonomía del miocardio generando un paro cardíaco y finalmente la muerte. Con base en lo anterior se planteó el presente trabajo, para lo cual se simuló el consumo de inhalables en animales de experimentación, a los cuales se les administró fenilefrina (agonista adrenérgico alfa 1) para observar la reactividad de los animales que fueron expuestos a tolueno, ya que con la aplicación de este agonista se pudo observar si es que realmente se sufre una sensibilización a catecolaminas.

Para cumplir con los objetivos del presente trabajo se identificó el efecto de la exposición subaguda y crónica a tolueno, para lo cual se realizó el registro de los cambios en el peso de los animales, y posteriormente la medición de los cambios de la presión sanguínea diastólica y sistólica y los cambios en la frecuencia cardíaca, generados por dosis crecientes de fenilefrina. Además, se realizó la administración de BMY 7378, el cual es un antagonista selectivo de los receptores alfa 1D, esto con la finalidad de identificar si los receptores antes mencionados están implicados en los cambios de presión de las ratas expuestas a aire y a tolueno.

- **Peso de los animales**

Los animales se dejaron con alimento y agua *ad libitum* durante toda la fase experimental, el peso del animal se tomó antes de comenzar con el tiempo de exposición y al finalizar la exposición, los animales fueron expuestos de manera subaguda (una semana) y crónica (cuatro semanas).

Los resultados indicaron que las ratas expuestas a tolueno de manera subaguda tuvieron una disminución en el peso corporal, en comparación a su grupo control, sin llegar a ser estadísticamente significativo, este resultado concuerda con lo reportado por diferentes autores que observaron que ratas expuestas a tolueno en diferentes concentraciones que van desde las 200 a 10000 ppm, no mostraron cambios significativos en el peso corporal durante la primera semana de exposición a tolueno (Takeuchi *et al.*, 1969; Duncan *et al.*, 2014). Lo anterior indica que el tolueno afecta el peso corporal pero debido al tiempo de exposición no fue un efecto estadísticamente significativo. Por otra parte, las ratas que fueron expuestas de manera crónica a tolueno tuvieron una disminución en el peso corporal, comparado con el peso de las ratas control. Nuestros hallazgos coincidieron con lo reportado en la literatura, donde las ratas fueron expuestas de manera crónica (4 a 11 semanas) a diferentes concentraciones de tolueno (2000 a 10000 ppm), identificando que el peso de los animales disminuye a partir de la segunda semana de exposición, manteniendo la disminución del peso hasta terminar el tiempo de exposición (Takeuchi *et al.*, 1969; Pryor, 1991; Duncan *et al.*, 2012; Dick *et al.*, 2015). Cabe resaltar que en este estudio no se contempló estudiar qué mecanismos están implicados en la pérdida de peso, aunque una de las causas es debido a que el tolueno disminuye la ingesta de alimentos en los animales que están bajo la inhalación del disolvente (Dick *et al.*, 2015); en otro estudio donde se administró tolueno (1.3 ml/kg) se observó que la pérdida de peso se puede deber a la disminución de neuropéptido Y, debido a que éste es un potente estimulante para el consumo de alimentos (Halford y Bundell, 2000). Lo anterior nos lleva a pensar a que la disminución del peso corporal en las ratas expuestas a 6000 ppm de tolueno,

se puede deber a la disminución en la cantidad de alimentos consumidos y al tiempo de exposición.

- **Efecto de la exposición subaguda y crónica a tolueno en el sistema cardiovascular**

El aumento de la presión sanguínea a causa del consumo de tolueno ha sido reportado en diversos estudios en humanos y en animales, en humanos se ha reportado que trabajadores de fábricas expuestos de manera ocupacional (crónica) a tolueno en diferentes concentraciones que van de 0.4 hasta 1200 ppm tuvieron un aumento de la presión sanguínea (Morck *et al.*, 1988; Gericke *et al.*, 2001; Chang *et al.*, 2020). Los reportes en animales mostraron que la administración aguda de tolueno por vía oral en dosis de 800 mg/kg y 1200 mg/kg causó un aumento en la presión sanguínea y la frecuencia cardíaca en ratas monitoreadas con radiotelemetría (Gordon *et al.*, 2007). Nuestros resultados concuerdan con lo anterior, mostrando que la exposición subaguda y crónica a tolueno (6000 ppm) generó un aumento en la presión sanguínea diastólica y sistólica basal en comparación a su respectivo grupo control, sin afectar la frecuencia cardíaca. Y difieren de otros estudios, donde la inhalación aguda y subaguda de tolueno disminuyó la presión sanguínea y generó bradicardia o una disminución del ritmo cardíaco (Morvai *et al.*, 1976). En otro estudio la administración aguda por vía oral de tolueno (5201.4 mg/kg) en ratas, disminuyó la presión sanguínea y la frecuencia cardíaca (Tas *et al.*, 2012).

El aumento observado en la presión sanguínea de las ratas expuestas al disolvente puede deberse a la generación de especies reactivas de oxígeno causada por la inhalación de tolueno, ya que se ha reportado que la inhalación de tolueno genera especies reactivas de oxígeno (Omur *et al.*, 2016; Verma *et al.*, 2017). Además, se ha visto que la administración aguda por vía oral de diferentes dosis de tolueno (500-1500 mg/kg) genera especies reactivas de oxígeno en diferentes órganos (Mattia *et al.*, 1993). Ligado a lo anterior, las especies reactivas de oxígeno generan daño endotelial y este último desempeña un papel importante en la modulación de la presión sanguínea mediante la liberación de sustancias,

como el óxido nítrico (vasodilatador) y la endotelina-1 (vasoconstrictor) (Drozd et al., 2023). Por lo tanto, un desbalance en la producción de estas sustancias puede explicar el incremento en la presión sanguínea en las ratas expuestas de manera subaguda y crónica a tolueno.

En lo que respecta a la frecuencia cardíaca, no se observaron diferencias en los valores de las ratas expuestas a tolueno en comparación a su control. Nuestros resultados difieren de lo reportado, debido a que en animales a los que se les administró tolueno, se encontró que el disolvente les generó un aumento en la frecuencia cardíaca (Gordon et al., 2007); en nuestro caso se observó una tendencia al aumento de la frecuencia cardíaca, sin llegar a ser estadísticamente significativo y esto puede deberse a que el organismo generó tolerancia a los efectos del tolueno sobre el corazón o a que se pudieron generar efectos compensatorios en el animal.

- **Efecto de la exposición a tolueno sobre la respuesta adrenérgica cardiovascular**

Uno de los efectos menos deseados de la inhalación de disolventes es la denominada muerte súbita por inhalación, la cual se creía que era causada por la bolsa plástica que la persona utilizaba para inhalar disolventes, pero después se observó que más personas morían de manera inesperada y repentina sin haber usado una bolsa plástica (Bass, 1970); en un estudio se observó que la muerte súbita se producía tras la inhalación, después de que el individuo sufriera algún tipo de situación estresante o después de realizar ejercicio, en relación a esto se sabe que la actividad física o el estrés favorecen la liberación de catecolaminas, y que la adrenalina y la noradrenalina tienen efectos en el sistema cardiovascular. También se ha reportado que los inhalables generan una sensibilización del corazón a las catecolaminas endógenas, al punto de que cualquier excitación repentina o esfuerzo físico puede generar la muerte (Adgey et al., 1995). Por lo tanto, la muerte puede producirse de manera directa e inmediatamente por anoxia (asfixia) o por problemas cardíacos, debido a la sensibilización a catecolaminas.

Para evaluar si el tolueno generaba una sensibilización a las catecolaminas realizamos curvas dosis-respuesta a fenilefrina en dosis crecientes, que van de 1-1000 $\mu\text{g/kg}$ en ratas anestesiadas, que fueron expuestas de manera subaguda o crónica a aire o a tolueno (6000 ppm). Cabe resaltar que hasta el momento no existe algún reporte de la evaluación *in vivo* de la respuesta a agentes adrenérgicos en ratas expuestas a tolueno.

- **Efecto de la exposición subaguda**

En cuanto el efecto de la exposición subaguda a tolueno sobre la respuesta adrenérgica cardiovascular en la rata anestesiada no se logró observar alguna diferencia en las curvas dosis-respuesta de la presión sanguínea diastólica y sistólica de las ratas que fueron expuestas al disolvente. Además, se hicieron comparaciones con las diferentes ABC, Emax y DE₅₀ de las presiones, y no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Lo anterior nos puede indicar que la exposición subaguda a tolueno no generó una sensibilización a las catecolaminas. Estos resultados concuerdan con lo reportado en trabajos realizados en el laboratorio, donde se observó que en anillos de aorta con endotelio la exposición subaguda a tolueno no tuvo efecto en la reactividad vascular generada por fenilefrina, en comparación con su respectivo control (Ceja, 2022), esto se puede atribuir al correcto funcionamiento del endotelio, el cual al liberar sustancias vaso modificadoras regula el flujo sanguíneo y por lo tanto la presión sanguínea (Drozd et al., 2023).

En las curvas dosis respuesta a fenilefrina de la frecuencia cardíaca, no se apreciaron diferencias en el grupo expuesto a tolueno, en comparación a su grupo control; nuestros resultados difieren de lo reportado, ya que se ha demostrado que la administración de concentraciones crecientes de adrenalina (agonista alfa y beta adrenérgico) en corazones de ratas expuestas de forma aguda a tolueno (6000 ppm) incrementó la frecuencia cardíaca de manera dependiente de la concentración utilizada del agonista (Carreón-Garcidueñas et al., 2018). La diferencia en cuanto a la frecuencia cardíaca puede deberse a la utilización de la fenilefrina, ya que al ser

agonista adrenérgico alfa 1 no tiene un efecto significativo en el corazón, porque en éste hay una mayor cantidad de receptores beta 1 adrenérgicos (Sanz, 2011).

Finalmente, de manera interesante encontramos que el tiempo del efecto generado por las dosis crecientes de fenilefrina en los animales expuestos a tolueno de manera subaguda se ve disminuido de manera significativa, en comparación a subgrupo control, indicando que la exposición subaguda genera tolerancia observada como un menor tiempo de unión del fármaco al receptor.

- **Efecto de la exposición crónica**

Al evaluar el efecto de la exposición crónica a tolueno sobre la respuesta adrenérgica cardiovascular en la rata anestesiada, se vio que la exposición al disolvente provocó una disminución de las respuestas ante el estímulo generado por la fenilefrina, observándose como una disminución en la presión sanguínea diastólica y sistólica, en comparación a su respectivo grupo control. También se analizaron los resultados del ABC, Emax y DE₅₀ de las presiones y, a pesar de la disminución de la presión sanguínea, no logramos observar diferencia en los parámetros antes mencionados. Los resultados anteriores difieren de lo encontrado en estudios previos, donde se llevaron a cabo curvas dosis-respuesta a fenilefrina en anillos de aorta de ratas expuestas de manera crónica a tolueno, donde se observó un aumento en la respuesta vascular generada por fenilefrina (Tapia, 2023). La disminución en la respuesta a fenilefrina, observada como una menor presión sanguínea, puede deberse al decremento de calcio intracelular causada por la inhalación de tolueno, ya que se ha reportado que el tolueno inhibe la función de los canales de calcio sensibles a voltaje (Tillar et al., 2002; Carreón-Garcidueñas et al., 2018), dando como resultado la disminución de la entrada de calcio del espacio extracelular al intracelular y como resultado una menor contracción del tejido vascular.

En las curvas dosis respuesta a fenilefrina de la frecuencia cardíaca, no se logró observar diferencia en el grupo expuesto crónicamente a tolueno, en

comparación a su grupo control, esto puede explicarse por lo antes mencionado en el apartado de la exposición subaguda.

- **Comparación de la respuesta cardiovascular de la exposición subaguda y crónica.**

Al comparar las curvas dosis respuesta de la exposición subaguda y crónica, se mostró que, en la exposición crónica a aire y a tolueno, la presión sanguínea fue más elevada en comparación a la presión obtenida en la exposición subaguda. El aumento en la presión causada por la exposición crónica a tolueno, en comparación a la presión subaguda, puede deberse a que la exposición crónica generó alteraciones en la regulación cardiovascular y endotelial, y un posible aumento en la expresión de receptores adrenérgicos alfa 1, debido a la exposición prolongada al tolueno.

Determinación de la participación de los receptores adrenérgicos alfa 1D sobre la respuesta adrenérgica cardiovascular en la rata anestesiada.

La utilización de un antagonista adrenérgico selectivo de uno de los subtipos de los receptores adrenérgicos involucrados en los cambios de presión generados por fenilefrina, nos ayuda a descartar su posible participación, en nuestro caso utilizamos el BMY-7378, el cual es un antagonista selectivo de los receptores adrenérgicos alfa 1D (Goetz *et al.*, 1995), con la finalidad de evaluar su participación al mediar los cambios de presión sanguínea en las ratas expuestas a aire y a tolueno (6000 ppm) de manera subaguda y crónica. Se utilizó ese antagonista debido a que los receptores alfa 1D se encuentran en el músculo liso en diferentes arterias, como la aorta, carótida, femoral, ilíaca, mesentérica y renal, ayudando a mediar la contracción ante las catecolaminas endógenas y los fármacos adrenérgicos, por lo anterior cumplen un papel relevante en el control de la presión arterial (Zhou y Vargas, 1996; Ibarra *et al.*, 1997).

Nuestros resultados mostraron que la administración de BMY-7378 disminuyó los cambios de presión sanguínea diastólica y sistólica en las curvas dosis respuesta generadas por la administración de dosis crecientes de fenilefrina

(1 a 1000 $\mu\text{g/kg}$), en las ratas expuestas de manera subaguda a aire y a tolueno, dicha disminución sólo se observó a dosis bajas de fenilefrina (10-31.6 $\mu\text{g/kg}$), en comparación a las ratas que no recibieron el antagonista. Además, no se logró observar una diferencia en la comparación del ABC de las presiones diastólica y sistólica de los grupos expuestos de manera subaguda a aire y a tolueno, ni una diferencia en la E_{max} de las presiones de los grupos anteriores, pero sí una diferencia en la DE_{50} de la presión diastólica del grupo expuesto a aire con la administración de BMY-7378, en comparación al grupo expuesto aire sin la aplicación del antagonista. En las ratas expuestas de manera crónica a aire y a tolueno, se mostró que la administración de BMY-7378 en ambos grupos disminuyó de manera significativa, los cambios de presión sanguínea generados por la administración de fenilefrina, observándose que la disminución en la presión sanguínea diastólica y sistólica de los animales expuestos a aire comenzó desde la dosis de 1 $\mu\text{g/kg}$ hasta la de 100 $\mu\text{g/kg}$, en comparación al grupo expuesto a aire que no recibió antagonista. En el grupo expuesto a tolueno la disminución se observó en las dosis de 1 a 10 $\mu\text{g/kg}$, en comparación con el grupo tolueno sin administración de BMY-7378. Nuestros resultados concuerdan con lo reportado en la literatura, donde en ratas anestesiadas y desmeduladas se llevaron a cabo curvas dosis respuesta a fenilefrina en presencia de diferentes dosis de BMY-7378 (0.1-1 mg/kg), observando una disminución en los cambios de presión sanguínea generados por la fenilefrina al ir aumentando la dosis del antagonista, con lo anterior se demostró la participación de los receptores alfa 1D a la hora de mediar la presión sanguínea *in vivo* (Zhou y Vargas, 1996). Otra de las observaciones fue que los receptores adrenérgicos alfa 1D tuvieron una mayor participación en las respuestas de los animales que fueron expuestos de manera crónica a aire y a tolueno, en comparación a los expuestos de manera subaguda, esto puede deberse a la edad de los animales, ya que este fenómeno se observó en un estudio previo en el cual se utilizaron ratas de 1 y 5 meses de edad para evaluar si el tiempo de vida del animal tenía algún efecto en la respuesta vascular mediada por los receptores alfa adrenérgicos, encontrando que la respuesta vascular es dependiente de la edad. Además, con la administración de BMY-7378 se identificó que las respuestas

mediadas por los receptores alfa 1D cambia con la edad, apreciando una mayor participación de estos receptores en las ratas de 5 meses de edad (Ibarra *et al.*, 1997).

Con base en lo anterior, podemos inferir que la participación de los receptores adrenérgicos alfa 1D en la modulación de la presión sanguínea, se da tanto en las ratas expuestas a aire como en las ratas expuestas a tolueno.

Por todo lo anterior, es de suma importancia saber qué efecto tiene el tolueno en el organismo, específicamente en la reactividad del sistema cardiovascular ante las catecolaminas, porque con esto se puede ayudar a dilucidar el mecanismo de acción por el cual ocurre la muerte súbita por inhalación, debido a que de manera inicial se creía que la exposición subaguda y crónica a tolueno iba a generar una sensibilización a las catecolaminas y como resultado de esto obtendríamos presiones elevadas y frecuencias cardíacas elevadas, en comparación a su grupo control. Sí se logró observar un aumento en la presión sanguínea basal sin modificación del ritmo cardíaco; no obstante, una vez que realizamos las curvas dosis respuesta a la fenilefrina, nuestros resultados mostraron todo lo contrario, ya que la exposición subaguda a tolueno no generó diferencia en los parámetros de presión sanguínea y frecuencia cardíaca, y en la exposición crónica a tolueno se identificó una posible desensibilización a las catecolaminas, porque al administrar la fenilefrina (catecolamina) la respuesta vascular fue menor en comparación a las ratas expuestas a aire. Se sugiere que el aumento de la presión sanguínea basal se debe a la generación de especies reactivas de oxígeno y que la desensibilización puede deberse al bloqueo de canales de calcio dependientes de voltaje. Por lo tanto, se requieren hacer más experimentos *in vivo* para poder determinar los niveles de especies reactivas de oxígeno y la participación de los canales de calcio en las ratas expuestas a tolueno, mediante la utilización de técnicas moleculares y el modelo de la rata anestesiada.

10. Conclusiones

La exposición a tolueno de manera subaguda y crónica, no generó una sensibilización a las catecolaminas.

El tolueno aumenta la presión sanguínea diastólica y sistólica, sin modificar la frecuencia cardíaca, en las ratas expuestas de manera subaguda y crónica.

La exposición crónica a tolueno modifica la respuesta adrenérgica vascular mediada por los receptores alfa 1.

Los receptores alfa 1D están implicados en la regulación de la presión sanguínea en las ratas expuestas a tolueno.

11. Perspectivas

Los resultados obtenidos en la investigación nos dan pauta para encontrar el mecanismo de acción implicado en las respuestas vasculares ante la exposición a disolventes, proponiendo los siguientes puntos:

- Realizar la exposición aguda a tolueno y medir los efectos a nivel cardiovascular con ayuda del modelo de la rata anestesiada.
- Llevar a cabo la medición de moléculas (receptores adrenérgicos, calcio, óxido nítrico, endotelinas, renina-angiotensina, etc.) que están involucradas en la regulación de la presión sanguínea y frecuencia cardíaca.
- Medir moléculas involucradas en el estrés oxidativo, en ratas expuestas a tolueno de manera aguda, subaguda y crónica.

12. Referencias

- Adgey J, Johnston, PW y McMechan, S. (1995). Sudden cardiac death and substance abuse. *Resuscitation*. 29(3): 219–221.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2017). Toluene ToxFAQ. APA style: Electronic references. Recuperado 13 de junio, 2022, de Cdc.gov.<https://wwwn.cdc.gov/TSP/ToxFAQs/ToxFAQsDetails.aspx?faqid=160&toxid=29>.
- Alvarado, N. (2013). Estudio de los efectos de tolueno, xileno o benceno sobre la reactividad a adrenalina en la preparación de corazones aislado de rata [Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias de la Salud]. Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo.
- Bale AS, Smothers CT y Woodward JJ. (2002). Inhibition of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by the abused solvent, toluene. *British Journal of Pharmacology*. 137(3): 375–383.
- Balster RL, Cruz SL, Howard MO, Dell CA y Cottler, LB. (2009). Classification of abused inhalants. *Addiction*. 104(6): 878-882.
- Bass, M. (1970). Sudden Sniffing Death. *JAMA*. 212(12): 2075–2079.
- Bowen SE, Batis JC, Paez M y Cruz SL. (2006). The last decade of solvent research in animal models of abuse: Mechanistic and behavioral studies. *Neurotoxicology and Teratology*. 28: 636-647.
- Bowen, S. (2011). Two Serious and Challenging Medical Complications Associated with Volatile Substance Misuse: Sudden Sniffing Death and Fetal Solvent Syndrome. *Substance Use & Misuse*. 46(sup1): 68-72.
- Bracho I, Godínez D, Arroyo B, Bobadila RA y López P. (2009). Increased alpha-1 adrenoreceptor expression in pregnant rats with subrenal aortic coarctation. *Hypertens Pregnancy*. 28(4): 402-416.
- Broussard, L. (2020). Inhalants. En BS Levine y S Kerrigan editores. *Principles of Forensic Toxicology*. Springer. 5ª ed. Switzerland. 561-568.

- Camara CR, Rodríguez R, Monreal R y Gerardo J. (2015). Acute toluene intoxication—clinical presentation, management and prognosis: a prospective observational study. *BioMed Central Emergency Medicine*. 15: 1-7.
- Carreón, MG. (2018). Participación de los canales de sodio y de calcio dependientes de voltaje en los efectos cardíacos de los disolventes de abuso [Tesis para obtener el grado de Doctora en Ciencias]. Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo.
- Carreón-Garcidueñas M, Godínez-Hernández D, Alvarado-Gómez N, Ortega-Varela LF, Cervantes-Durán C, y Gauthereau-Torres MY. (2018). Participation of voltage-gated sodium and calcium channels in the acute cardiac effects of toluene. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 28(9): 670–677.
- Ceja, A. (2022). Efecto de la exposición a tolueno sobre la reactividad vascular adrenérgica en ratas [Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias de la Salud]. Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo.
- Centros de Integración juvenil (CIJ), A.C. (2023). Reporte del Sistema de Información Epidemiológica del Consumo de Drogas. Consumo de drogas en solicitantes de tratamiento en Centros de Integración Juvenil. Consumidores de Drogas Ilícitas. Segundo semestre del 2022. Ciudad de México, México: CIJ. APA style: Electronic references. Recuperado el 15 de mayo, 2023, de: <http://www.cij.gob.mx/programas/Investigacion/Epidemiologica.asp>
- Chang TY, Huang KH, Liu CS y Bao, BY. (2020). Exposure to Indoor Volatile Organic Compounds and Hypertension among Thin Film Transistor Liquid Crystal Display Workers. *Atmosphere*. 11(7): 718–718.
- Cruz SL y Bowen SE. (2021). The last two decades on preclinical and clinical research on inhalant effects. *Neurotoxicology and Teratology*. 87: 1-19.
- Cruz SL, Mirshahi T, Thomas B, Balster RL, Woodward JJ. (1998). Effects of the abused solvent toluene on recombinant N-methyl-D-aspartate and non-N-methyl-D-aspartate receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 286 (1): 334–340.

- Cruz SL, Orta G, Gauthereau MY, Millan L y Salinas EM (2003). Inhibition of cardiac sodium currents by toluene exposure: Toluene inhibits Na⁺ cardiac channels. *British Journal of Pharmacology*. 140(4): 653-660.
- Cruz SL, Rivera MT y Woodward JJ. (2014). Review of Toluene Actions: Clinical Evidence, Animal Studies, and Molecular Targets. *Journal of Drug and Alcohol Research*. 3: 1-8.
- Del Re AM y Woodward JJ. (2005). Inhibition of gap junction currents by the abused solvent toluene. *Drug and Alcohol Dependence*. 78(2): 221-224.
- Del Re AM, Dopico AM y Woodward JJ. (2006). Effects of the abused inhalant toluene on ethanol-sensitive potassium channels expressed in oocytes. *Brain Research*. 1087 (1): 75–82
- Dick AL, Simpson A, Qama A, Andrews Z, Lawrence AJ y Duncan JR. (2015). Chronic intermittent toluene inhalation in adolescent rats results in metabolic dysfunction with altered glucose homeostasis. *British Journal of Pharmacology*. 172(21): 5174–5187.
- Drożdż D, Drożdż M y Wójcik M. (2023) Endothelial dysfunction as a factor leading to arterial hypertension. *Pediatric Nephrology*. 38(9):2973-2985.
- Duncan JR, Dick AL, Egan G, Kolbe S, Gavrilesco M, Wright D, Lubman DI y Lawrence AJ. (2012). Adolescent toluene inhalation in rats affects white matter maturation with the potential for recovery following abstinence. *PLOS ONE*. 7(9): e44790.
- Duncan JR, Gibbs SJ y Lawrence AJ. (2014). Chronic intermittent toluene inhalation in adolescent rats alters behavioural responses to amphetamine and MK801. *European Neuropsychopharmacology*. 24(3):480-486.
- Einav S, Amitai Y, Reichman J y Geber D. (1997). Bradycardia in Toluene Poisoning. *Clinical Toxicology*. 35(3): 295–298.

- Emorine LJ, Marullo S, Briend MM, Patey G, Tate K, Delavier C, Strosberg AD. (1989). Molecular characterization of the human beta 3-adrenergic receptor. *Science*. 5(4922):1118-21.
- Encuesta Nacional de Adicciones (ENA). (2002). Encuesta nacional de adicciones 2002. APA style: Electronic references. Recuperado 12 de junio, 2022, de <https://www.gob.mx/salud/conadic/documentos/encuesta-nacional-de-adicciones-2002-ena-2002>.
- Encuesta Nacional de Consumo de Drogas, Alcohol y Tabaco (ENCODAT). (2017). Reporte de drogas. APA style: Electronic references. Recuperado el 12 de junio, 2022, de: <https://www.gob.mx/salud%7Cconadic/acciones-y-programas/encuesta-nacional-de-consumo-de-drogas-alcohol-y-tabaco-encodat-2016-2017-136758>.
- Estañol B, Porras M, Sánchez G, Martínez R, Infante O y Senties H (2009). Control neural de la circulación periférica y de la presión arterial. *Archivos de Cardiología de México*. 79(2): 109-116.
- Faus MT, Soler E, Pérez I, Orosa P y Cuenca A. (1999). Taquicardia ventricular por inhalación accidental de tolueno utilizado como solvente en una laca insecticida. *Farmacia Hospitalaria*. 23(1): 73–76.
- Finch AM y Graham RM. (2005). The α 1D-adrenergic receptor: Cinderella or ugly stepsister). *Molecular Pharmacology*. 69: 1-4.
- Furlong TM, Duncan JR, Corbit LH, Rae CD, Rowlands BD, Maher AD, Nasrallah FA, Milligan CJ, Petrou S, Lawrence AJ y Balleine BW. (2016). Toluene inhalation in adolescent rats reduces flexible behaviour in adulthood and alters glutamatergic and GABAergic signalling. *Journal of Neurochemistry*. 139(5): 806–822.
- Gauthereau MY, Salinas EM y Cruz SL (2005). A mutation in the local anaesthetic binding site abolishes toluene effects in sodium channels. *European Journal of Pharmacology*. 528(1-3): 17-26.

- Gericke C, Hanke B, Beckmann G, Baltes MM, Kühl KP y Neubert D. (2001). Multicenter field trial on possible health effects of toluene III. Evaluation of effects after long-term exposure. *Toxicology*. 168(2): 185–209.
- Goetz AS, King HK, Ward SD, True TA, Rimele TJ y Saussy DL. (1995). BMY 7378 is a selective antagonist of the D subtype of α 1-adrenoceptors. *European Journal of Pharmacology*. 272(2-3): R5-R6.
- Gordon CJ, Samsam TE, Oshiro WM y Bushnell PJ. (2007). Cardiovascular effects of oral toluene exposure in the rat monitored by radiotelemetry. *Neurotoxicology and Teratology*. 29(2): 228–235.
- Graham R, Perez D, Hwa J y Piascik M. (1996). α 1-Adrenergic receptor subtypes: molecular structure, function, and signaling. *Circulation Research*. 78(5): 737-749.
- Halford JC y Blundell JE. (2000). Separate systems for serotonin and leptin in appetite control. *Annals of Medicine*. 32(3): 222–232.
- Hieble, J. (2007). Subclassification and nomenclature of α -and β -adrenoceptors. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 7(2): 129-134.
- Ibarra M, Terrón JA, López JJ y Villalobos, R. (1997). Evidence for an age-dependent functional expression of α 1D-adrenoceptors in the rat vasculature. *European Journal of Pharmacology*. 322(2-3): 221–224.
- Kleinman L y Radford E. (1964). Ventilation standards for small mammals. *Journal of Applied Physiology*. 19(2): 360–362.
- Lopreato G, Phelan R, Borghese C, Beckstead M y Mihic S. (2003). Inhaled drugs of abuse enhance serotonin-3 receptor function. *Drug and alcohol dependence*. 70(1): 11-15.
- Ma W, Shaffer KM, Pancrazio JJ, O'Shaughnessy TJ, Stenger DA, Zhang L, Barker, JL y Maric D. (2002). Toluene inhibits muscarinic receptor-mediated cytosolic Ca^{2+} responses in neural precursor cells. *NeuroToxicology*. 23(1): 61–68.

- MacIver MB. (2009). Abused Inhalants Enhance GABA-Mediated Synaptic Inhibition. *Neuropsychopharmacology*. 34(10): 2296–2304.
- Martínez NA, Sánchez GY, Vázquez L y Tiburcio MA. (2016). Las aportaciones de 40 años de investigación epidemiológica en México sobre consumo de solventes inhalables. *Salud Mental*. 39(2): 85-97.
- Mattia CJ, Ali SF y Bondy SC. (1993). Toluene-induced oxidative stress in several brain regions and other organs. *Molecular and Chemical Neuropathology*. 18(3):313-28.
- Michel, T y Hoffman, B. (2012). Antagonistas del calcio. En L. Brunton (Ed.). Goodman & Gilman Las bases farmacológicas de la terapéutica: Tratamiento de la isquemia del miocardio y de la hipertensión. McGraw Hill. 12ª ed. California. 745-788.
- Morck HI, Winkel P y Gyntelberg F. (1988). Health effects of toluene exposure. *Danish Medical Journal*. 35:196–200.
- Morvai V, Hudák A, Ungváry G y Varga B. (1976). ECG changes in benzene, toluene and xylene poisoned rats. *Acta Medica Academiae Scientiarum Hungaricae*. 33(3): 275-286.
- National Cancer Institute (NCI). (2022). circulatory system. APA style: Electronic references. Recuperado 5 de Julio, 2022, de Cancer.gov. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/circulatory-system>.
- National Institute on Drug Abuse (NIDA). 2021. ¿Qué son los inhalantes? Recuperado el 12 de junio, 2022, de: <https://nida.nih.gov/publications/research-reports/inhalants/what-are-inhalants>
- Nelson, GO. (1972). Controlled Test Atmospheres. *American Institute of Chemical Engineers*. 18(1): 256.

- Ömür N, Kütükcü A, Demir C, Ömer B, Yilmaz H, y Meriç F. (2016). Evaluation of Oxidative Stress Status in Workers with Toluene Exposure. The Turkish Journal of Occupational / Environmental Medicine and Safety: 1(4): 79-83.
- Pruneda LG, Ruiz T y Pérez IN. (2015). Exposición no ocupacional a tolueno en diferentes escenarios de México. Revista Iberoamericana de Ciencias. 2(3): 1-8.
- Pryor, GT. (1991). A toluene-induced motor syndrome in rats resembling that seen in some human solvent abusers. Neurotoxicology y Teratology. 13(4):387-400.
- Rodríguez, C. (2020). Intoxicación por tolueno. Medicina Legal de Costa Rica. 37(2): 53-62.
- Sanz D. (2011). Los receptores β adrenérgicos en la enfermedad cardiovascular. Hipertensión Y Riesgo Vascular. 28(2): 55–62.
- Shafer TJ, Bushnell PJ, Benignus VA, Woodward JJ. (2005). Perturbation of voltage-sensitive Ca^{2+} channel function by volatile organic solvents. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 315(3): 1109–1118.
- Shipley RH y Tilden J. (1947). Pithed Rat Preparation Suitable for Assaying Pressor Substances. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. 64(4): 453-455.
- Takeuchi, Y. (1969). EXPERIMENTAL STUDIES ON THE TOLUENE POISONING. Industrial Health. 7(1-2): 31–45.
- Tapia, L. (2023). Efecto de la exposición subaguda y crónica a tolueno en la respuesta vascular adrenérgica en ratas diabéticas [Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias de la Salud]. Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo.
- Tas U, Ekici F, Koç F, Söğüt E, Ayan M, Kuloğlu T, Arici A y Özyurt B. (2013). Acute cardiotoxic effects of high dose toluene: an experimental study. Anadolu kardiyoloji dergisi. 13(1): 3–8.

- Tillar R, Shafer TJ y Woodward JJ. (2002). Toluene inhibits voltage-sensitive calcium channels expressed in pheochromocytoma cells. *Neurochemistry international*. 41(6): 391-397.
- Treviño RA y Cruz J. (2011). Alteraciones metabólicas en la inhalación de solventes. Informe de ocho casos. *Medicina Universitaria*. 13(50): 17–24.
- United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). (2022). Informe Mundial sobre las Drogas 2022 de UNODC. APA style: Electronic references. Recuperado el 12 de mayo, 2023, de: <https://www.unodc.org/unodc/en/data-and-analysis/world-drug-report-2022.html>.
- Verma A, Jain R, Dhawan A y Lakshmy R. (2017). Evaluation of oxidative stress and toluene exposure among adolescent inhalant users at a tertiary care centre of North India. *Free Radical Biology and Medicine*. 112: 37-37
- Walsh, MP. (2011). Vascular smooth muscle myosin light chain dephosphorylation: Mechanism, function, and pathological implications. *IUBMB Life*. 63(11): 987-1000.
- Westfall, T y Westfall, D. (2012). Transmisión adrenérgica. En L. Brunton (Ed.). Goodman & Gilman Las bases farmacológicas de la terapéutica: Neurotransmisión: sistema nervioso autónomo y motor sináptico. McGraw Hill. 12^a ed. California. 171-218.
- Zhou L y Vargas HM. (1996). Vascular α 1D-adrenoceptors have a role in the pressor response to phenylephrine in the pithed rat. *European Journal of Pharmacology*. 305(1-3): 173–176.

