



# UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

“Efecto de la inhalación crónica de tolueno  
sobre la reactividad adrenérgica en corazón  
aislado de rata”

T E S I S  
para obtener el título de  
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO  
P R E S E N T A  
pQFB GABRIEL HERRERA LÓPEZ

DIRECTORA DE TESIS  
D. C. MARCIA YVETTE GAUTHEREAU TORRES

CO-DIRECTOR  
D. C. IGNACIO VALENCIA HERNANDEZ



Morelia, Michoacán Agosto 2013

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

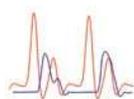
Parte de este trabajo fue presentado durante el 4th International IDARS meeting en Mexico, City llevado a cabo del 15 al 19 de abril del 2013 y durante el XXXV Congreso Nacional de Farmacología en la Escuela Superior de Medicina-IPN del 15 al 18 de mayo del 2013.

## ÍNDICE GENERAL

	<i>Pág.</i>
Índice de figuras.....	III
Índice de tablas.....	IV
Abreviaturas.....	V
Resumen.....	1
1. Introducción.....	2
1.1. Inhalables.....	2
1.2. Abuso de los inhalables en México.....	2
1.3. Clasificación de los inhalables.....	2
1.3.1. Alquil nitritos volátiles.....	3
1.3.2. Óxido nitroso.....	3
1.3.3. Disolventes volátiles, combustibles y anestésicos.....	3
1.4. Efectos farmacológicos de los disolventes de abuso.....	3
1.4.1. Mecanismos de acción de los disolventes: blancos moleculares.....	4
1.4.1.1. Interacciones con el receptor NMDA .....	4
1.4.1.2. Interacciones con los receptores de glicina y GABA <sub>A</sub> .....	4
1.4.1.3. Interacciones con el receptor 5-HT <sub>3</sub> .....	5
1.4.1.4. Interacciones con el receptor nicotínico.....	5
1.4.1.5. Interacciones con canales iónicos dependientes de voltaje.....	5
1.4.1.6. Interacciones con el receptor P2X.....	6
1.4.2. Efectos de los disolventes sobre el sistema dopaminérgico.....	6
1.4.3. Efectos crónicos de los disolventes.....	7
1.5. Tolueno .....	8
1.5.1. Propiedades físico-químicas.....	8
1.5.2. Usos.....	9
1.5.3. Farmacocinética.....	9
1.5.4. Efectos del tolueno sobre la salud.....	10
1.5.5. Efectos cardiovasculares.....	10
1.6. Muerte súbita por inhalación de disolventes.....	10
1.7. Anatomía y fisiología del corazón.....	13
1.7.1. Configuración externa e interna.....	13
1.7.2. Venas y arterias del corazón.....	15
1.7.3. El corazón como una bomba y el centro de la circulación.....	16
1.7.4. Circulación especial: la circulación coronaria.....	18
1.7.5. El origen del latido.....	18
1.7.6. Mecanismos e contracción cardíaca.....	18
1.7.7. Ciclo cardíaco.....	19
1.8. Modelo de corazón aislado y perfundido.....	20
1.8.1. Especies usadas para la perfusión.....	21
1.8.2. Anestesia.....	22
1.8.3. Medición de parámetros cardiovasculares de interés.....	23



1.8.3.1.	Presión de perfusión.....	23
1.8.3.2.	Fuerza de contracción ventricular.....	23
1.8.3.3.	Electrocardiograma.....	24
1.8.4.	Aplicación de la técnica.....	24
1.9.	Receptores adrenérgicos.....	24
1.10.	Mecanismos de acción de la adrenalina.....	26
1.11.	Antagonistas adrenérgicos: propranolol y prazosina .....	29
2.	Justificación.....	30
3.	Hipótesis.....	31
4.	Objetivos.....	32
4.1.	Objetivo general.....	32
4.2.	Objetivos específicos.....	32
5.	Material y métodos.....	33
5.1.	Animales.....	33
5.2.	Sustancias.....	33
5.3.	Estandarización de la técnica de corazón aislado y perfundido según Langendorff..	34
5.4.	Exposición al disolvente.....	34
5.5.	Preparación Langendorff de corazón aislado de rata.....	36
5.6.	Curva concentración-respuesta gradual.....	38
5.7.	Análisis estadístico de resultados.....	38
6.	Resultados.....	39
6.1.	Estandarización de la técnica de corazón aislado y perfundido tipo Langendorff.....	39
6.2.	Efecto de la inhalación crónica de tolueno sobre el peso corporal.....	50
6.3.	Efecto de la inhalación crónica de tolueno sobre la ingesta de agua y alimento.....	51
6.4.	Efecto de la inhalación crónica de tolueno sobre la presión de perfusión.....	52
6.5.	Efecto de la inhalación crónica de tolueno sobre la fuerza de contracción ventricular.....	56
6.6.	Efecto de la inhalación crónica de tolueno sobre las arritmias ventriculares inducidas por adrenalina.....	59
6.7.	Efecto de la inhalación crónica de tolueno sobre la frecuencia cardiaca.....	61
7.	Discusión de resultados.....	64
7.1.	Estandarización de la técnica de corazón aislado y perfundido tipo Langendorff.....	66
7.2.	Efecto de la inhalación crónica de tolueno sobre el desarrollo y consumo de agua y alimento.....	66
7.3.	Muerte súbita por inhalación de disolventes.....	69
7.4.	Efecto de la inhalación crónica de tolueno sobre la presión de perfusión.....	71
7.5.	Efecto de la inhalación crónica de tolueno sobre la fuerza de contracción ventricular.....	74
7.6.	Efecto de la inhalación crónica de tolueno sobre las arritmias ventriculares inducidas por adrenalina.....	77
7.7.	Efecto de la inhalación crónica de tolueno sobre la frecuencia cardiaca.....	80
8.	Conclusiones.....	81
9.	Perspectivas.....	82
10.	Referencias.....	82



<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<i>Pág</i>
<b>Figura 1.</b> Estructura del tolueno.....	9
<b>Figura 2.</b> Mecanismos biológicos de muerte súbita.....	12
<b>Figura 3.</b> Localización interna del corazón.....	13
<b>Figura 4.</b> Configuración externa del corazón.....	14
<b>Figura 5.</b> Configuración interna del corazón.....	15
<b>Figura 6.</b> Vasos coronarios.....	16
<b>Figura 7.</b> Potenciales de acción cardiacos.....	19
<b>Figura 8.</b> Ciclo cardiaco.....	20
<b>Figura 9.</b> Tránsito del líquido perfundido en el corazón aislado.....	23
<b>Figura 10.</b> Receptores adrenérgicos.....	26
<b>Figura 11.</b> Estructura de la adrenalina.....	27
<b>Figura 12.</b> Mecanismo de acción de la adrenalina .....	28
<b>Figura 13.</b> Estructura de la prazosina y el propranolol.....	29
<b>Figura 14.</b> Cámara de exposición estática.....	35
<b>Figura 15.</b> Corazón aislado de rata, montado y perfundido según Langendorff.....	37
<b>Figura 16.</b> Montaje de la preparación Langendorff.....	39
<b>Figura 17.</b> Ensayo de la preparación Langendorff: manipulación excesiva.....	40
<b>Figura 18.</b> Ensayo de la preparación Langendorff: introducción de un globo ventricular.....	41
<b>Figura 19.</b> Comportamiento mecánico del catéter de embolectomía.....	42
<b>Figura 20.</b> Ensayo de la preparación Langendorff: catéter inflado con aire.....	43
<b>Figura 21.</b> Globo intraventricular.....	44
<b>Figura 22.</b> Ensayo de la preparación Langendorff: globo ventricular y necrosis.....	45
<b>Figura 23.</b> Ensayo de la preparación Langendorff: isquemia y reperfusión.....	46
<b>Figura 24.</b> Variación de los volúmenes de adrenalina (10 y 20 $\mu$ l).....	47
<b>Figura 25.</b> Variación de los volúmenes de adrenalina (50 $\mu$ l).....	48
<b>Figura 26.</b> Registro típico.....	49
<b>Figura 27.</b> Curso temporal del aumento de peso de los animales.....	50
<b>Figura 28.</b> Curso temporal del consumo de alimento.....	51
<b>Figura 29.</b> Curso temporal del consumo de agua.....	52
<b>Figura 30.</b> Curva concentración-respuesta a la adrenalina sobre la presión de perfusión.....	53
<b>Figura 31.</b> Efecto del tolueno sobre la presión de perfusión basal.....	54
<b>Figura 32.</b> Efecto de la adrenalina sobre la presión de perfusión (% aumento).....	55
<b>Figura 33.</b> Efecto de la adrenalina sobre la presión de perfusión en presencia de antagonistas.....	56
<b>Figura 34.</b> Efecto de la adrenalina sobre la fuerza de contracción ventricular.....	57
<b>Figura 35.</b> Efecto del tolueno sobre la fuerza de contracción ventricular basal.....	58
<b>Figura 36.</b> Efecto de la adrenalina sobre la fuerza de contracción ventricular en presencia de antagonistas.....	59
<b>Figura 37.</b> Perfil de las arritmias ventriculares inducidas por adrenalina.....	60
<b>Figura 38.</b> Curva concentración-respuesta a la adrenalina sobre la frecuencia cardiaca.....	61
<b>Figura 39.</b> Efecto del tolueno sobre la frecuencia cardiaca basal.....	62
<b>Figura 40.</b> Curvas concentración-respuesta a la adrenalina sobre la frecuencia cardiaca en presencia de antagonistas.....	63



**ÍNDICE DE TABLAS**

<b>Tabla 1.</b> Clasificación de los disolventes.....	4
<b>Tabla 2.</b> Efectos del tolueno sobre el sistema nervioso central.....	11
<b>Tabla 3.</b> Ventajas y desventajas de la preparación tipo Langendorff.....	21
<b>Tabla 4.</b> Características de los receptores adrenérgicos $\alpha_1$ y $\alpha_2$ .....	25
<b>Tabla 5.</b> Características de los receptores adrenérgicos $\beta$ .....	26



**ABREVIATURAS**

AR	Receptor adrenérgico
5-HT	5-Hidroxitriptamina o serotonina
5-HT <sub>3</sub>	Receptor a serotonina subtipo 3
ADR	Adrenalina
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
CCR	Curva concentración respuesta
CTR	Control
DA	Dopamina
e.e.	Error estándar
ENA	Encuesta Nacional de Adicciones
FC	Frecuencia cardiaca
FCV	Fuerza de contracción ventricular
GABA	Ácido-γ-amino butírico
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
h	Horas
i.p.	Intraperitoneal
I <sub>Ca</sub>	Corriente de Ca <sup>+2</sup>
I <sub>f</sub>	Corriente activada por hiperpolarización
I <sub>K,r</sub>	Corriente rectificadora de potasio
IP3	Inositol trifosfato
ISO	Isoprenalina o isoproterenol
I <sub>st</sub>	Corriente entrante sostenida
LPM	Latidos por minuto
M	Molar
MECA	Metilcarboxamida
mM	Milimolar
mmHg	Milímetros de mercurio
ms	Milisegundo
mV	Milivolts
NA	Noradrenalina
NCX	Intercambiador de sodio-calcio
NMDA	N-metil-D-aspartato
Nodo AV	Nodo aurículoventricular
Nodo SA	Nodo sinoauricular
NOM	Norma oficial mexicana
NS	No significativo
NT	Neurotransmisor



PP	Presión de perfusión
PPL	Propranolol
ppm	Partes por millón
PRZ	Prazosina
RS	Retículo sarcoplásmico
SNC	Sistema nervioso central
TCE	1,1,1-tricloroetano
TNT	2,4,6-trinitrotolueno
UI	Unidades internacionales
VOCs	Compuestos orgánicos volátiles



## RESUMEN

Los inhalables son sustancias volátiles a temperatura ambiente cuya autoadministración se realiza con el fin de alterar el estado de conciencia. El abuso de los inhalables constituye un problema de salud pública, situándose sólo bajo la marihuana y por encima de la cocaína, como las drogas más consumidas en México. Los inhalables se pueden clasificar de acuerdo a su perfil farmacológico en alquil nitritos volátiles, óxido nitroso y disolventes volátiles; de estos últimos, el tolueno es la sustancia de la que más abusan jóvenes y adolescentes de un estrato económico bajo en México, lo cual es posible gracias a su amplia distribución, ya que se puede encontrar como constituyente del “thinner”, pegamentos, pinturas, etc. Se ha descrito que la inhalación de tolueno, así como de otros disolventes, puede producir el síndrome de muerte súbita por inhalación, cuyo mecanismo de acción es aún desconocido. Existen reportes epidemiológicos y casos clínicos que indican que la inhalación de altas concentraciones de tolueno, seguida de un periodo de estrés producido por un aumento en las catecolaminas endógenas (por activación simpática), podría llevar a la aparición de arritmias cardíacas y consecuentemente a la muerte. El propósito del presente estudio fue investigar el efecto de la inhalación crónica de tolueno sobre la reactividad del corazón a la adrenalina, para lo cual, se expusieron ratas macho de la cepa Wistar a tolueno (4000 ppm) o a aire, durante 60 días en una cámara de exposición estática. Una vez transcurrido este tiempo, las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (50 mg/kg de peso) para extraer los corazones y montarlos en una preparación tipo Langendorff. Durante el experimento se registró la presión de perfusión (PP), la fuerza de contracción ventricular (FCV) y la frecuencia cardíaca (FC) y se estudió el efecto de la administración de concentraciones crecientes de adrenalina (desde  $1 \times 10^{-9}$  M hasta  $1 \times 10^{-3}$  M) sobre la PP, la FCV y la FC. Se construyeron curvas concentración-respuesta graduales, en ausencia y presencia de los antagonistas adrenérgicos propranolol y prazosina para cada parámetro mencionado. Mediante el uso de estas herramientas farmacológicas, se encontró que el tolueno induce la sensibilización del corazón al efecto inotrópico y cronotrópico positivo de la adrenalina y desensibilización en la respuesta vascular, además de incrementar la aparición de arritmias ventriculares tanto en intensidad como en número de episodios por unidad de tiempo, todo lo cual podría deberse, al menos en parte, a una regulación a la alta para el fenómeno de sensibilización o a la baja para el fenómeno de desensibilización, de los respectivos receptores adrenérgicos; sin embargo, se requieren más estudios al respecto.



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Inhalables

Los inhalables son sustancias volátiles a temperatura ambiente que se administran por vía inhalatoria con el fin de alterar el estado de conciencia y el estado de ánimo y alcanzar estados plaxenteros (Dinwiddie, 1994).

Su administración con fines de abuso, involucra métodos como poner sustancias dentro una bolsa de plástico y con ella cubrir nariz y boca para inhalar los vapores o empapar un trapo con la sustancia (Bowen, 2011).

Cabe aclarar que aquellas drogas cuya administración es por vía inhalatoria, pero que no son volátiles a temperatura ambiente, no son consideradas inhalables, como la cocaína, el tabaco y la mariguana (Cruz y Bowen, 2008).

### 1.2. Abuso de los inhalables en México

El abuso de los inhalables se ha documentado en México desde la década de 1960. Su consumo se encontraba en primer lugar entre la población, pasando a segundo lugar de 1986 a 1997 dentro las sustancias de las que más se abusa (Villatoro *et al.*, 2011). Su popularidad descendió aún más de 1997 al 2006 cuando se incrementó el uso de la cocaína; hasta hoy en día, los disolventes continúan siendo una de las drogas más ampliamente usadas y distribuidas, localizándose sólo por debajo de la mariguana y por encima de la cocaína o a niveles similares como las sustancias más consumidas entre adolescentes entre 12 y 17 años (ENA, 2011).

El abuso de los disolventes es más común entre niños que trabajan y habitan las calles, aunque también un alto porcentaje de estudiantes practican del abuso de estas sustancias encontrándose además una prevalencia creciente entre las mujeres (Villatoro *et al.*, 2011).

### 1.3. Clasificación de los inhalables

Es posible clasificar a los inhalables de varias maneras, puede ser observando su estructura química o su uso comercial, también es posible agruparlos tomando en cuenta sus



perfiles farmacológicos, dividiéndose en tres grupos: alquil nitritos volátiles, óxido nitroso y disolventes volátiles, combustibles y anestésicos (Balster, 1998).

### 1.3.1. Alquil nitritos volátiles

El amil nitrito es el prototipo de este grupo de inhalables. Inicialmente, su uso radicaba en el tratamiento de la angina de pecho, pero ha sido reemplazado por la nitroglicerina y otros nitritos orgánicos, su uso y abuso se basa en su capacidad vasodilatadora y relajante del músculo liso (Balster, 1998).

### 1.3.2. Óxido nitroso

Es un anestésico gaseoso comúnmente conocido como “gas hilarante” o gas de la risa y se ha encontrado que produce un perfil farmacológico único entre los inhalables de abuso. (Dohrn *et al.*, 1992) Además, se ha observado que produce efectos conductuales diferentes a los producidos por concentraciones sub-anestésicas de anestésicos generales volátiles (Zacny *et al.*, 1994; Galinkin *et al.*, 1998).

### 1.3.3. Disolventes volátiles, combustibles y anestésicos

Los prototipos de este grupo –conocidos también como compuestos orgánicos volátiles (VOCs)- incluyen al tolueno y al 1,1,1-tricloroetano (TCE), que son ampliamente usados como disolventes industriales (Sharp, 1992). Dentro de esta categoría, los disolventes pueden clasificarse de acuerdo a su estructura química (tabla 1) (Páez-Martínez *et al.*, 2003).

## 1.4. Efectos farmacológicos de los disolventes de abuso

Los disolventes comparten muchas características con los depresores del Sistema Nervioso Central (SNC) como el alcohol (etanol), las benzodiazepinas, los barbitúricos y los anestésicos, por lo que han sido agrupados en la misma categoría (Echeverría *et al.*, 1991; Evans y Balster, 1991).



**Tabla 1.** Clasificación de los disolventes de acuerdo a su estructura química. (Modificada de Ayres y Taylor, 1989).

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

#### 1.4.1. Mecanismos de acción de los disolventes: blancos moleculares.

##### 1.4.1.1. Interacciones con el receptor NMDA

El tolueno, así como el TCE son capaces de inhibir de forma significativa y dependiente de la concentración la función de canales operados por ligando, como lo es el receptor a NMDA (N-metil-D-aspartato). Esta inhibición ocurre a concentraciones de tolueno (<10mM) que no alteran significativamente la conductancia de la membrana en reposo (Cruz *et al.*, 1998 y 2000).

##### 1.4.1.2. Interacciones con los receptores de glicina y GABA<sub>A</sub>

En el año 2000, Beckstead y cols. observaron que los inhalables y, en particular el tolueno, el tricloroetileno y el TCE amplifican las corrientes mediadas por GABA en neuronas del hipocampo, así como de los receptores para glicina y GABA<sub>A</sub> expresados en ovocitos de



*Xenopus laevis* en concentraciones que van de 200 a 900  $\mu\text{M}$ , con lo que se sugiere que algunos de los efectos conductuales producidos por la administración de inhalables podrían deberse a acciones sobre los receptores GABA<sub>A</sub> y a glicina.

#### 1.4.1.3. Interacciones con el receptor 5-HT<sub>3</sub>

El neurotransmisor (NT) serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT) está involucrado en múltiples funciones del cerebro como la regulación de estados afectivos, saciedad y adicción, entre otros. Este neurotransmisor ejerce sus efectos por activar a sus propios receptores. Con excepción del subtipo 5-HT<sub>3</sub>, los otros (5-HT<sub>1</sub> a 5HT<sub>7</sub>) están acoplados a proteína G. Los disolventes son capaces de interactuar únicamente con el subtipo 5-HT<sub>3</sub>, el cual pertenece a la superfamilia de canales operados por ligando (Lopreato *et al.*, 2003). El tolueno, el TCE y el tricloroetileno son capaces de incrementar las corrientes iónicas mediadas por serotonina a través de este subtipo de receptor en concentraciones de 0.3 a 2  $\mu\text{M}$  (Lopreato *et al.*, 2003).

#### 1.4.1.4. Interacciones con el receptor nicotínico

Los receptores nicotínicos, para la ACh, están ampliamente distribuidos en el SNC y sistema nervioso periférico y, aunque son más bien conocidos como el blanco de la nicotina, una variedad de depresores del SNC –como el etanol y compuestos orgánicos volátiles- son capaces de modular la función de estos receptores. Experimentos realizados en receptores nicotínicos nativos de células hipocampales y recombinantes expresados en ovocitos de *Xenopus laevis* confirmaron que, en particular el tolueno, produce una inhibición de estos receptores en forma reversible y dependiente de la concentración (Bale *et al.*, 2002).

#### 1.4.1.5. Interacciones con canales iónicos dependientes de voltaje

El tolueno, el TCE y el percloroetileno pueden perturbar la función de los canales neuronales de calcio sensibles a voltaje (Shafer *et al.*, 2005) y de forma similar, el tolueno afecta las concentraciones intracelulares de Ca<sup>+2</sup> mediadas por canales sensibles e insensibles a dihidropiridinas (Tillard *et al.*, 2002).



Por otro lado, Cruz y colaboradores (2003) encontraron que el tolueno inhibe las corrientes de sodio en canales cardíacos humanos expresados en ovocitos de *Xenopus laevis*, de forma dependiente de la dosis, pero independiente del voltaje. Los efectos anteriores sugieren que podrían ser responsables, al menos en parte, de las arritmias cardíacas y muerte súbita inducidas por la inhalación de tolueno.

Siguiendo los antecedentes observados, la hipótesis de la inhibición de las corrientes iónicas por parte de los VOCs se demostró de igual manera para las corrientes de potasio en canales expresados en ovocitos de *Xenopus laevis*; encontrándose que el tolueno es capaz de inhibir las corrientes mediadas por canales de potasio activados por calcio y canales de potasio rectificadores de entrada acoplados a proteínas G (Del Rea *et al.*, 2006).

#### 1.4.1.6. Interacciones con el receptor P2X

Woodward y colaboradores (2004) estudiaron los efectos del tolueno sobre el receptor P2X expresado en células HEK293. Se trata de un canal iónico activado por ATP y se encuentra ampliamente distribuido en el SNC y el sistema nervioso periférico. De estos receptores, el tolueno potencia la actividad de los receptores P2X2, P2X4, P2X2/3 y P2X4/6, aunque inhibe la corriente mediada por el receptor P2X3.

#### 1.4.2. Efectos de los disolventes sobre el sistema dopaminérgico

El sistema dopaminérgico mesolímbico está implicado en el desarrollo de todas las adicciones a través de una ruta de “recompensa”, observándose aumento de dopamina (DA) sináptica, lo que se traduce en una sensación de bienestar y euforia (Crespo y Rodríguez, 2007). En esta ruta de recompensa se hallan implicados numerosos NT como GABA, glutamato, 5-HT, péptidos opioides y cannabinoides y al igual que otras drogas de abuso, los inhalables tienen la capacidad de modular la actividad dopaminérgica mesolímbica; por ejemplo, el tolueno (300, 750 and 1000 mg kg<sup>-1</sup> i.p.) induce la activación de la c-fos en el área tegmental ventral y en el



*nucleus accumbens* en estudios realizados en cerebro de rata (Lo y Chen, 2005). Aunado a esto, Riegel y cols. (2007) demostraron que el tolueno estimula la neurotransmisión mesoacúmbica en rebanadas de cerebro mediante la activación selectiva de neuronas dopaminérgicas en el área tegmental ventral.

La inhalación de tolueno (>4000 ppm) presenta propiedades estímulo-discriminativas. Estudios realizados por Shelton (2007), mostraron que un grupo de ratones podían ser entrenados para discriminar selectivamente entre tolueno inhalado e isoflurano o etilbenceno de una forma dependiente del tiempo. Otros estudios realizados sobre la misma línea, pusieron de manifiesto que tanto el tolueno como otros inhalables comparten propiedades estímulo-discriminativas con numerosos depresores del SNC, como el etanol, oxazepam y pentobarbital (Evans y Balster, 1991).

#### 1.4.3. Efectos crónicos de los disolventes

La administración repetida de drogas de abuso en animales de laboratorio puede producir tolerancia y dependencia física, además de sensibilización. La tolerancia se define como la disminución del efecto de un fármaco luego de administraciones repetidas, con lo que se requiere una dosis cada vez mayor para producir el efecto inicial (Goudi y Emmett-Oglesby, 1989). En cuanto a la dependencia física, ésta se describe como un estado adaptativo producido luego del cese del consumo de la droga y se ve caracterizado por la presentación de un síndrome de abstinencia específico (Martínez *et al.*, 2003). Por otro lado, la sensibilización es el fenómeno en el que la administración repetida de un fármaco lleva a intensificar el efecto producido por una misma dosis (Goudi y Emmett-Oglesby, 1989).

Son pocos los reportes en los que se comparan los efectos de la exposición aguda de los disolventes con una exposición crónica en animales de laboratorio o donde se estudia el efecto de exposiciones repetidas imitando una administración de abuso. Entre estos estudios, existe un reporte en el que se estudian los efectos de la exposición aguda y crónica a tolueno sobre



parámetros conductuales de ratas en desarrollo y en particular se evalúa el efecto hipnótico, comprobándose que el tolueno aumenta la latencia de aparición de esta conducta en exposiciones crónicas en contraste con la administración aguda (Lorenzana-Jiménez y Salas, 1990). Siguiendo la línea de efectos conductuales del tolueno, Bowen y McDonald (2009) reportaron que la exposición a tolueno de forma repetida y a altas concentraciones en ratones, produce deterioro motor, sugiriendo que existe un daño cerebral, tal vez a nivel del cerebelo o por pérdida de células corticales.

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

Un estudio más reciente hecho por Alfaro-Rodriguez *et al.* (2011), llevó a concluir que exposiciones repetidas a 15000 ppm de tolueno por un periodo de 30 días alteran el ciclo sueño-vigilia, al modificar la respuesta catecolaminérgica en áreas cerebrales relacionadas al sueño, donde hay un aumento de DA y 5-HT.

## 1.5. Tolueno

### 1.5.1. Propiedades físico-químicas

El tolueno (figura 1) es un hidrocarburo aromático monosustituido de fórmula condensada  $C_7H_8$ . Consta de un anillo de seis carbonos con tres dobles enlaces y varias formas de resonancia, además de un grupo metilo como sustituyente.



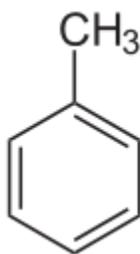


Figura 1. Estructura del tolueno

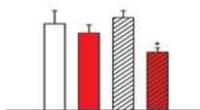
Posee un peso molecular de 22.13 g/mol, y un índice de polaridad bajo (2.4), es soluble en disolventes orgánicos y prácticamente inmisible en agua (6.5 mmol/l de agua a 20°C). Tiene una densidad de 0.866 g/cm<sup>3</sup>, un punto de fusión de -95 °C y una presión de vapor igual a 28.4 mm Hg, con lo que su punto de ebullición asciende a 110.6°C. (Arlie-Søborg, 1992; Agency for toxic substances and disease registry [ATSDR], 2000).

### 1.5.2. Usos

El tolueno, se produce principalmente a partir de la refinación del petróleo y es un constituyente principal del aceite crudo. Se adiciona a los combustibles como antidetonante, llegando a contener de un 5-7% de tolueno, además de usarse como disolvente de pinturas (mejor conocido como “thinner”) (Cruz y Bowen, 2008), revestimientos, caucho, resinas, como diluyente en lacas nitrocelulósicas y en adhesivos; es un constituyente de limpiadores, tintas, pegamentos y barniz de uñas, además de ser el producto de partida en la síntesis del 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) y para la producción de benceno, nylon, plásticos y poliuretanos (Flanagan, 1994; Flowers, 2005).

### 1.5.3. Farmacocinética

Por vía inhalatoria, el tolueno es absorbido rápidamente, observándose concentraciones de este disolvente en sangre de 2-5 µmol/l, alrededor de 10 a 15 minutos luego de la exposición de 80 ppm, siendo identificado además en hígado, en pulmones y en cerebro. Debido a su liposolubilidad, atraviesa fácilmente la barrera hematoencefálica y llega de forma inmediata al SNC (ATSDR, 2000).



El tolueno es catabolizado por una isoenzima del citocromo P450, siendo el ácido hipúrico el principal metabolito identificado en la orina (Thiesen *et al.*, 2007). Otros metabolitos son el ácido benzoico conjugado con glucuronil y el orto y para cresol conjugados con sulfato y glucurónido (Ayres y Taylor, 1989; Benignus, 1981).

#### 1.5.4. Efectos del tolueno sobre la salud

La posibilidad de que el tolueno afecte el cerebro es motivo de seria preocupación. El tolueno puede causar dolores de cabeza y somnolencia y puede afectar la capacidad para pensar claramente. La probabilidad de que esto suceda dependerá de la cantidad de tolueno a la que se está expuesto, de la duración de la exposición, de la susceptibilidad genética y de la edad. Estos síntomas generalmente desaparecen cuando la exposición cesa (ATSDR, 2000). En la tabla 2 se enlistan y correlacionan los efectos del tolueno sobre la salud (en particular sobre el SNC) y las concentraciones de este disolvente requeridas para conseguir dicho efecto

#### 1.5.5. Efectos cardiovasculares

Se ha reportado que este disolvente puede causar necrosis de fibras musculares, bradicardia severa, aumento del peso cardiaco en ratas expuestas a 1,250 mg/kg/día por 13 semanas y degeneración del miocardio en ratas expuestas a 5000 mg/kg/día (ATSDR, 2000).

Las complicaciones cardiovasculares en personas que comúnmente abusan del tolueno, así como otros disolventes, están en discusión, ya que mientras las taquiarritmias son la manifestación clásica de la cardiotoxicidad del tolueno, se ha reportado la presencia de bradiarritmias en modelos animales, así como en humanos (Einav *et al.*, 1997).

### 1.6. Muerte súbita por inhalación de disolventes

La muerte súbita se define como aquel deceso que ocurre antes de una hora a partir de la aparición de los síntomas; ésta ocurre de forma repentina, inesperada y es además originada



por causas que no impliquen episodios violentos (como asesinatos por arma de fuego o contusiones). A partir de esto, podemos atribuir varias causas a la muerte súbita y poner de manifiesto que en la mayoría de las ocasiones se trata de una enfermedad desconocida por el paciente –aunque puede tratarse de la agudización de un padecimiento crónico- y de inicio abrupto (Asencio *et al.*, 2004).

**Tabla 2.** Efectos producidos por diferentes concentraciones de tolueno sobre el SNC. Tomado de Consejería de Sanidad de la Región de Murcia, 2007.

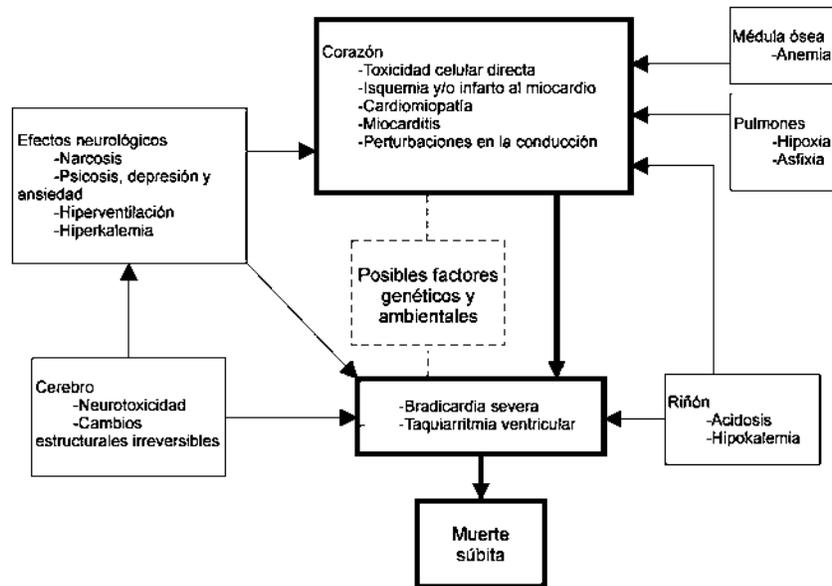
Concentración del tolueno	Efecto
<b>8 mg/m<sup>3</sup> (2-14 ppm)</b>	Detección de olor.
<b>188-377 mg/m<sup>3</sup> (50-100 ppm)</b>	Fatiga o dolor de cabeza. Probablemente no se produzca deterioro observable del tiempo de reacción o de la coordinación.
<b>753 mg/m<sup>3</sup> (200 ppm)</b>	Irritación suave de los ojos y de la garganta.
<b>377-1130 mg/m<sup>3</sup> (100-300 ppm)</b>	Se pueden producir indicios perceptibles de incoordinación en periodos de exposición prolongados.
<b>1507 mg/m<sup>3</sup> (400 ppm)</b>	Lagrimo e irritación de ojos y garganta
<b>1130-3014 mg/m<sup>3</sup> (300-800 ppm)</b>	Se pueden esperar grandes indicios de incoordinación motora en periodos prolongados.
<b>2260-3014 mg/m<sup>3</sup> (600-800 ppm)</b>	Causa fatiga, náuseas, confusión y ataxia en exposiciones de 3 horas.
<b>5650 mg/m<sup>3</sup> (1500 ppm)</b>	No es mortal durante periodos de exposición de hasta 8 horas.
<b>15067 mg/m<sup>3</sup> (4000 ppm)</b>	Perjudica rápidamente el tiempo de reacción y a la coordinación motora. Exposiciones de una hora o más pueden conducir a depresión del SNC y posiblemente a la muerte.
<b>26368 mg/m<sup>3</sup> (7000 ppm)</b>	Se ha observado parestesia, amnesia y estupefacción.
<b>37669 mg/m<sup>3</sup> (10000 ppm)</b>	Causa anestesia general
<b>37669-113006 mg/m<sup>3</sup> (10000-30000 ppm)</b>	En pocos minutos aparece la depresión del SNC, exposiciones más prolongadas pueden ser mortales.

En el caso particular de la muerte súbita por inhalación de disolventes, ésta puede ocurrir durante la exposición o algunas horas después (Shepherd, 1989), y puede ser ocasionada directamente por anoxia, reacciones alérgicas extremas, daño severo a los



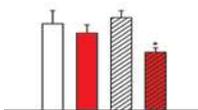
pulmones o depresión del SNC. Con un uso prolongado puede deberse a falla renal, falla hepática y tumores (Bowen, 2011).

No ha sido posible elucidar por completo el mecanismo por el cual los inhalables producen muerte súbita. Sin embargo, se han propuesto cuatro mecanismos directos: inhibición vagal, depresión respiratoria, anoxia y arritmias cardíacas (figura 2). Para el caso de las arritmias cardíacas, se ha establecido como mecanismo probable una sensibilización del miocardio a las catecolaminas endógenas y en particular a la adrenalina (ADR) (Shepherd, 1989).



**Figura 2.** Representación esquemática de los posibles mecanismos biológicos que causan la muerte súbita por inhalación de tolueno. Los cuadros remarcados en la línea en negrita muestran el mecanismo principal por el cual el tolueno induce la muerte súbita. El recuadro con la línea punteada muestra posibles factores que contribuyen a la muerte súbita. El resto de los recuadros indican la relación del daño de otros órganos con los efectos cardiovasculares posterior a la inhalación de tolueno (Modificado de Mutlu y Kültegin, 2007).

Los reportes epidemiológicos existentes indican que durante un proceso llamado sensibilización cardíaca, la exposición a disolventes asociada a periodos de estrés, puede ocasionar arritmias cardíacas, siendo este mecanismo la causa aparente de muerte para muchos inhaladores (Bass, 1970; Shepherd, 1989; Wilcosky y Simonsen, 1991). Frecuentemente, la muerte súbita ocurre después de inhalar y haberse sometido a ejercicio o a

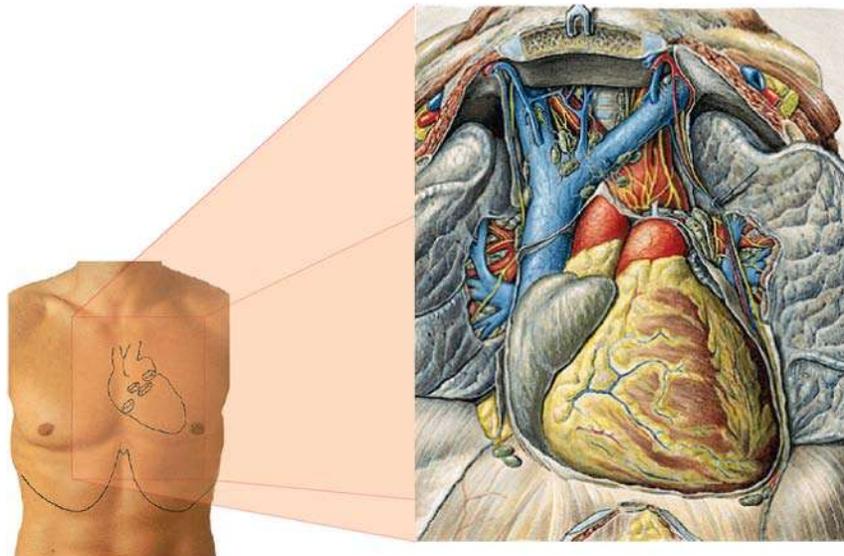


una situación estresante, tal como pelear o al ser sorprendidos inhalando por los padres o por la policía. Debido a que la actividad física vigorosa aumenta los niveles circulantes de ADR, la combinación de ejercicio y la exposición a disolventes como el tolueno y el TCE pueden producir fibrilación ventricular (Wilcosky y Simonsen, 1991).

## 1.7. Anatomía y fisiología del corazón

### 1.7.1. Configuración externa e interna

El corazón es un órgano muscular hueco, localizado en la parte anterior e inferior del mediastino, dentro de la caja torácica entre los pulmones, por encima del diafragma y delante de la columna vertebral (figura 3). Se mantiene en su lugar por los grandes vasos que llegan o parten de él, siendo la unión de la vena cava inferior y el diafragma un elemento de fijación importante (Latarjet y Ruiz, 1995).



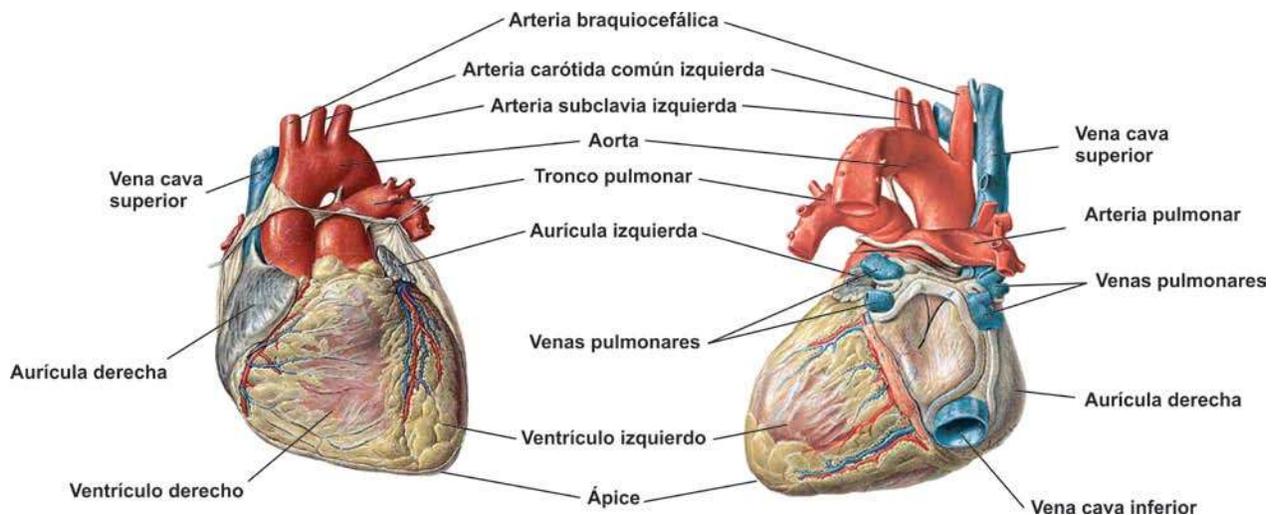
**Figura 3.** Localización interna del corazón. El corazón se encuentra en la caja torácica entre los pulmones, encima del diafragma y delante de la columna vertebral. El vértice del corazón se aloja sobre el diafragma, a la izquierda de la línea media (Modificado de Sobotta *et al.*, 2006).



Tiene forma de pirámide triangular con una base, un vértice y tres caras (figura 4). La base está vuelta hacia atrás y hacia la derecha y el vértice se dirige hacia adelante y a la izquierda y descansa sobre el diafragma. El corazón se relaciona directamente con el pericardio y de forma indirecta con los órganos del mediastino y el tórax (Quiroz *et al.*, 2010).

Interiormente, el corazón está dividido en dos mitades, derecha e izquierda. De cada lado, el corazón derecho e izquierdo poseen dos de cuatro cavidades en que se divide todo el órgano: dos aurículas y dos ventrículos (figura 5) (Latarjet y Ruiz, 1995).

Los ventrículos presentan forma más o menos cónica y poseen dos orificios en su base: uno que comunica el ventrículo con la aurícula del mismo lado, mientras que el otro orificio, comunica el ventrículo izquierdo con la aorta y el ventrículo derecho con la arteria pulmonar, es el orificio arterial (Quiroz *et al.*, 2010).

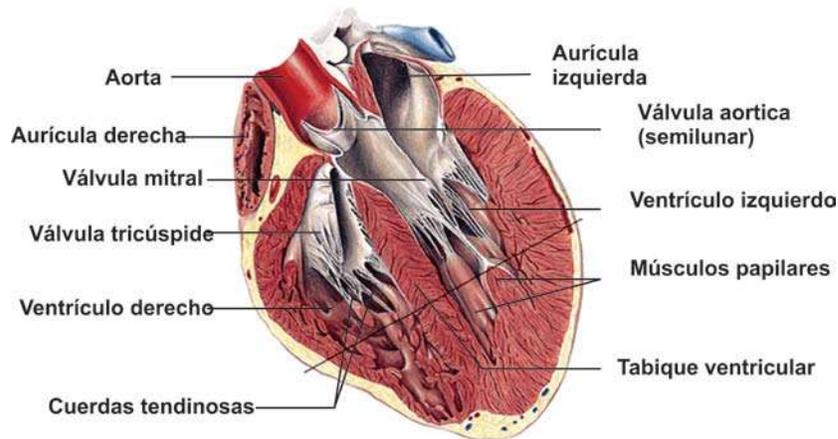


**Figura 4.** Configuración externa del corazón. Se observan la cubierta más externa llamada pericardio y la cara externa de los ventrículos y aurículas. Sobre los ventrículos se distinguen las venas y arterias coronarias. En la parte superior del corazón, se extienden las arterias aorta y pulmonar, y en su cara posterior se aprecian las venas pulmonares y la vena cava superior e inferior (Modificado de Sobotta *et al.*, 2006).

El ventrículo derecho posee forma de pirámide triangular, consta de tres paredes, un vértice y una base. La base se halla en la parte superior, encontrándose en ella el orificio auriculoventricular derecho y su válvula tricúspide y el orificio de la arteria pulmonar. (Quiroz *et al.*, 2010).



El ventrículo izquierdo tiene forma de cono. Su orificio auriculoventricular posee una válvula mitral compuesta de dos valvas cuadrangulares, mientras que el orificio aórtico tiene una válvula formada de tres valvas sigmoideas (Quiroz *et al.*, 2010).



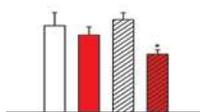
**Figura 5.** Configuración interna del corazón. El corazón está conformado de un ventrículo derecho y un ventrículo izquierdo, más pequeño que el derecho y de pared más gruesa. Se distinguen además las aurículas derecha e izquierda así como las válvulas aórtica y tricúspide que funcionan como compuertas para el paso de sangre del ventrículo izquierdo a la aorta y de las aurículas a los ventrículos, respectivamente (Modificado de Sobotta *et al.*, 2006).

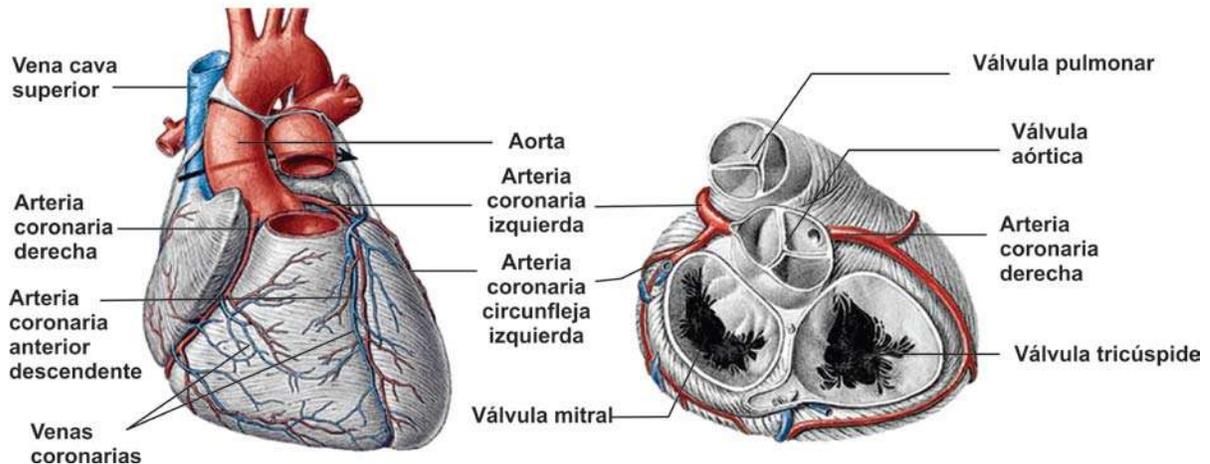
Las aurículas son de menor tamaño que los ventrículos y se hallan detrás de éstos; poseen cada una el orificio auriculoventricular y orificios venosos que corresponden a la entrada de las venas cavas y seno coronario en la derecha y las venas pulmonares a la izquierda (Quiroz *et al.*, 2010).

El corazón está formado por una masa gruesa de músculo hueca llamada miocardio, el cual constituye una parte primordial de la estructura del corazón; está recubierto por dentro por el endocardio, y por fuera por el pericardio (Quiroz *et al.*, 2010).

### 1.7.2. Venas y arterias del corazón

Las venas y arterias del corazón –denominadas vasos coronarios– (figura 6) están dispuestas alrededor del órgano en forma de círculo (Latarjet y Ruiz, 1995).





**Figura 6.** Vasos coronarios. En la imagen se resaltan de color rojo las arterias aorta, pulmonar y coronarias y de color azul las venas cava superior y coronarias y su localización y relaciones con otros aspectos anatómicos del corazón (Modificado de Sobotta *et al.*, 2006).

Las arterias coronarias derecha e izquierda no son iguales. La arteria coronaria izquierda se origina de la aorta a la altura de la válvula sigmoidea y del seno de la aorta; pasa detrás del tronco de la arteria pulmonar, luego a su izquierda y por último, abajo y adelante. Por otro lado, la arteria coronaria derecha se origina de la aorta a la altura de la válvula sigmoidea anterior derecha y del seno de la aorta correspondiente y se conduce hacia abajo, hacia adelante y a la derecha y comprende el segmento preatrial (que va desde el origen de la arteria hasta el borde anteroinferior del corazón), el segmento infroatrial y el segmento interventricular inferior (Latarjet y Ruiz, 1995).

Las venas del corazón no coinciden con la disposición de las arterias y comprenden la vena cardiaca magna –o coronaria mayor- y seno coronario; y un grupo de venas independientes: pequeñas venas del corazón y venas cardiacas mínimas (Latarjet y Ruiz, 1995).

### 1.7.3. El corazón como una bomba y el centro de la circulación

El corazón como tal es un sistema de dos bombas separadas. Por un lado, el corazón derecho bombea sangre hacia los pulmones y el corazón izquierdo bombea sangre a los órganos periféricos (Guyton y Hall, 2011).



El músculo cardiaco está formado por tres tipos principales de tejido: músculo auricular, músculo ventricular y fibras especializadas en conducción. Los músculos auricular y ventricular son similares al músculo esquelético en cuanto a contracciones, pero las mantienen por más tiempo. Respecto a las fibras especializadas en conducción, éstas se contraen débilmente, pero en cambio exhiben descargas eléctricas en forma de potenciales de acción a lo largo del corazón con lo que se logra un sistema excitatorio que controla el latido rítmico del corazón (Guyton y Hall, 2011).

El corazón alterna entre una fase de llenado y una de vaciado. Bajo circunstancias normales, el marcapasos en el nodo sinoauricular (nodo SA) determina la duración del ciclo cardiaco y las propiedades eléctricas del sistema cardiaco de conducción y los miocitos determinan la duración relativa de la contracción y la relajación. Mientras que el ritmo cardiaco permanezca inalterado, este patrón permanece estable (Boron y Boulpaep, 2005).

Las partes del corazón normalmente se contraen en secuencia ordenada, comenzando por la contracción de las aurículas (sístole auricular), seguida de la contracción ventricular (sístole ventricular) y por último la relajación de las cuatro cámaras (diástole) (Ganong, 2002).

La aurícula derecha recibe la sangre venosa pobre en oxígeno proveniente de la circulación sistémica que entra desde la vena cava superior e inferior, de ahí entra al ventrículo derecho atravesando la válvula tricúspide. La sangre pasa entonces a su proceso de oxigenación a los pulmones a través de una válvula semilunar por la arteria pulmonar (Boron y Boulpaep, 2005).

La sangre oxigenada ingresa a la aurícula izquierda, que la manda hacia el ventrículo izquierdo de donde es expulsada hacia la circulación sistémica a través de la válvula aórtica por la arteria aorta (Boron y Boulpaep, 2005).



#### 1.7.4. Circulación especial: la circulación coronaria

El corazón recibe alrededor del 5 % del gasto cardiaco en reposo, aunque representa menos del 0.5% del peso corporal total. Todo el suministro de sangre al miocardio deriva de las arterias coronarias derecha e izquierda, que se originan en la raíz de la aorta (figura 6). Estas arterias se ramifican en segmentos que penetran el tejido y se dividen en canales capilares (Boron y Boulpaep, 2005).

Una vez que la sangre pasa a través de los capilares, se colecta en vénulas que drenan la sangre pobre en oxígeno hacia las venas epicardiales (Boron y Boulpaep, 2005).

#### 1.7.5. El origen del latido

El corazón posee un sistema de conducción conformado por el nodo SA, las vías auriculares internodales, el nodo aurículoventricular (nodo AV), el haz de His y sus ramas y el sistema de Purkinje (Ganong, 2002).

Este sistema de conducción es sensible a daño por enfermedades como isquemia, resultando normalmente en una secuencia anormal de la contracción de las cavidades cardiacas y en una disminución de la efectividad del bombeo (Guyton y Hall, 2011).

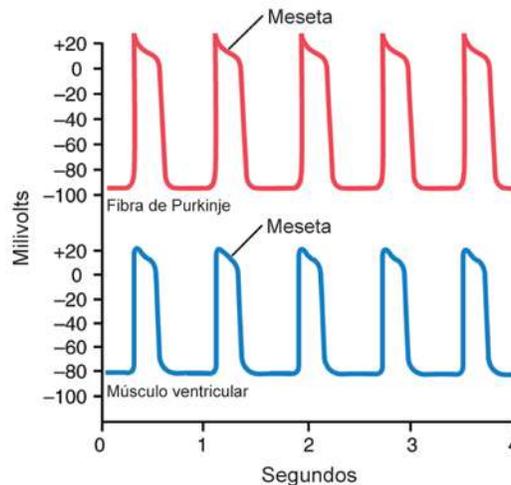
El nodo SA es el marcapasos natural del corazón gracias a su capacidad de descargar en forma espontánea con mayor rapidez que el resto de las partes del sistema de conducción, lo que determina la velocidad de latido del corazón. Los impulsos generados en el nodo SA pasan a través de las vías auriculares al nodo AV y de ahí al haz de His y través de las ramas del haz al sistema de Purkinje hasta el músculo auricular (Ganong, 2002).

#### 1.7.6. Mecanismos de contracción cardíaca

El potencial de acción registrado en una fibra de músculo ventricular (figura 7) produce una despolarización de aproximadamente 105 mV, lo que significa que el potencial intracelular aumenta de alrededor de -85 mV hasta +20 mV durante cada latido. Después del pico inicial, la



membrana permanece despolarizada por 0.2 segundos, mostrando una meseta seguida por una abrupta repolarización (Guyton y Hall, 2011).



**Figura 7.** Potenciales de acción (en milivoltios) de una fibra de Purkinje y de una fibra de músculo ventricular. En ambos casos se resalta la fase de meseta, la cual se produce gracias a la liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  de los cardiomiocitos y permite una mayor duración del potencial de acción antes de la fase de repolarización (Modificado de Guyton y Hall, 2011).

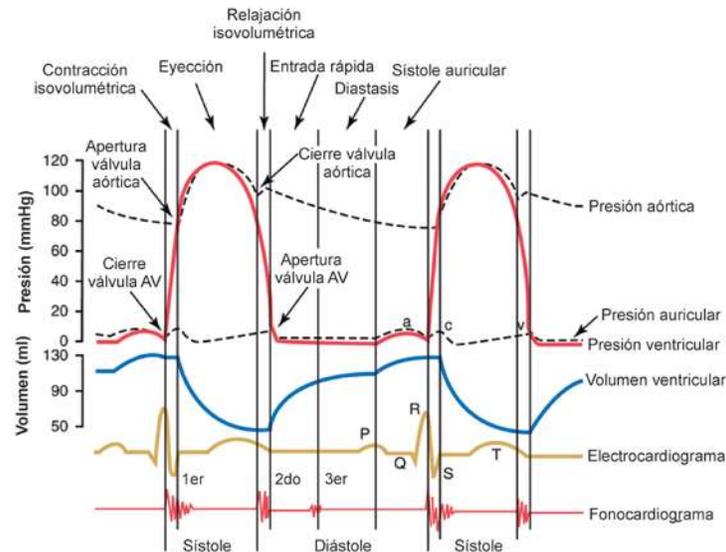
En el músculo cardíaco, el potencial de acción es provocado por la apertura de dos tipos de canales: canales de sodio y de calcio dependientes de voltaje. Mientras los canales de sodio permanecen abiertos por poco tiempo, al cabo del cual ocurre la despolarización, los canales de calcio permanecen abiertos por más tiempo, permitiendo la entrada de iones de calcio y causando el estado de meseta en el potencial de acción. Más allá de esto, los iones de calcio entrantes durante este estado con los causantes del proceso contráctil, a diferencia del músculo esquelético en el que este proceso ocurre derivado del calcio del retículo sarcoplásmico intracelular (Guyton y Hall, 2011).

### 1.7.7. Ciclo cardíaco

Se llama ciclo cardíaco al evento que ocurre desde el inicio de un latido hasta el inicio del siguiente. Cada ciclo inicia con la generación de un potencial de acción en el nodo SA y se desplaza hasta el nodo AV en los ventrículos.



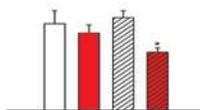
El ciclo cardiaco consta de un periodo de relajación conocido como diástole, durante el cual el corazón se llena de sangre, seguido de un periodo de contracción llamado sístole. La duración del ciclo cardiaco es recíproca con la frecuencia cardiaca y tiene relación con el electrocardiograma, relación ilustrada en la figura 8.



**Figura 8.** Relación entre el ciclo cardiaco y el registro electrocardiográfico y fonocardiográfico. Las diferentes etapas del ciclo cardiaco producen signos cuantificables que son comparables y correlacionables entre sí (Modificado de Guyton y Hall, 2011).

### 1.8. Modelo de corazón aislado y perfundido

Fue Oscar Langendorff, quien en 1897, describió la técnica para extraer y aislar el corazón de un mamífero y mantenerlo vivo, alimentándolo con una solución nutritiva a través de una cánula insertada en la aorta ascendente. La perfusión retrógrada cierra la válvula aórtica y el perfusado pasa al seno coronario, con lo que el corazón late en “vacío”. El método fue basado en la preparación de corazón perfundido de rana, desarrollada por Elias Cyon en 1866. La técnica sentó las bases para comprender la fisiología del corazón.



**Tabla 3.** Ventajas y desventajas observadas en la preparación tipo Langendorff de corazón aislado y perfundido de mamífero

Ventajas	Desventajas
Preparación estable y fácil de usar (Ytreus, 2000)	No se considera del todo fisiológica (Ytreus, 2000)
Permite varias rondas de experimentos con una sola preparación (Ytreus, 2000)	La homeostasis celular se mantiene por un tiempo limitado y es propenso a deterioro (Ytreus, 2000; Southerland y Hearse, 2000)
Alta reproducibilidad (Ytreus, 2000)	Ausencia de influencia humoral y de regulación neuronal normal (Southerland y Hearse, 2000) *
Los experimentos pueden realizarse en ausencia de "ruido" proveniente de otros órganos (Southerland y Hearse, 2000)	Con el globo intraventricular no es siempre bien perfundido el músculo papilar y puede haber necrosis inducida por isquemia (Ytreus, 2000)
Condiciones estandarizadas durante la reperfusión (Ytreus, 2000)	
Bajo costo (Ytreus, 2000; Southerland y Hearse, 2000)	

\*Puede considerarse como ventaja o desventaja.

La utilidad de esta técnica radica en su manejo sencillo y versátil, así como en su bajo costo, aunque no sea del todo fisiológica debido al gran volumen de flujo coronario y a la carga y precarga ilusorios (Tabla 3) (Riascos *et al.*, 2004).

### 1.8.1. Especies usadas para la perfusión

La preparación de corazón aislado tipo Langendorff es apropiada para cualquier mamífero y se han reportado preparaciones de humano y corazones de grandes especies como mono, cerdo, oveja y perro, pero no son comunes. La preparación más usada y mejor descrita es la de corazón de rata, aunque posee una limitante, que es la duración corta de su potencial de acción; sin embargo, prevalece su uso en modelos experimentales de isquemia (Sutherland y Hearse, 2000; Skrzyplc-Spring *et al.*, 2007).

En lo que se refiere a la preparación de corazón de ratón, su tamaño pequeño y ritmo cardiaco alto hacen difícil la medición de la presión intraventricular y la duración más corta de su potencial de acción, hace esta preparación muy inadecuada para el análisis de sustancias arritmogénicas y drogas antiarrítmicas (Skrzyplc-Spring *et al.*, 2007).



Otras especies, como el conejo, tienen problemas con la anestesia (Sutherland y Hearse, 2000).

### 1.8.2. Anestesia

Para poder realizar el procedimiento quirúrgico es necesario someter al animal a anestesia general. Para tal efecto, son aconsejables los barbitúricos y los anestésicos volátiles (éter, halotano y metoxiflurano). No se aconseja decapitar al animal para evitar la liberación de catecolaminas endógenas y otros factores de la circulación (Doring y Dehnert, 1988; Sutherland y Hearse, 2000).

Es importante conocer las ventajas y desventajas de cada anestésico. El éter no es aconsejable ya que es altamente inflamable, produce irritaciones en el animal y es capaz de estimular el sistema nervioso simpático (Skrzyplc-Spring *et al.*, 2007). El método de anestesia más ampliamente utilizado es una inyección intraperitoneal de barbitúricos, especialmente tiopental o nembutal. El pentobarbital es, por ejemplo, un depresor cardiorespiratorio que puede conducir a la reducción celular de fosfatos de alta energía, no obstante, el efecto cardiodepresor es eliminado 10 minutos después de interrumpida la anestesia (Doring y Dehnert, 1988; Sutherland y Hearse, 2000).

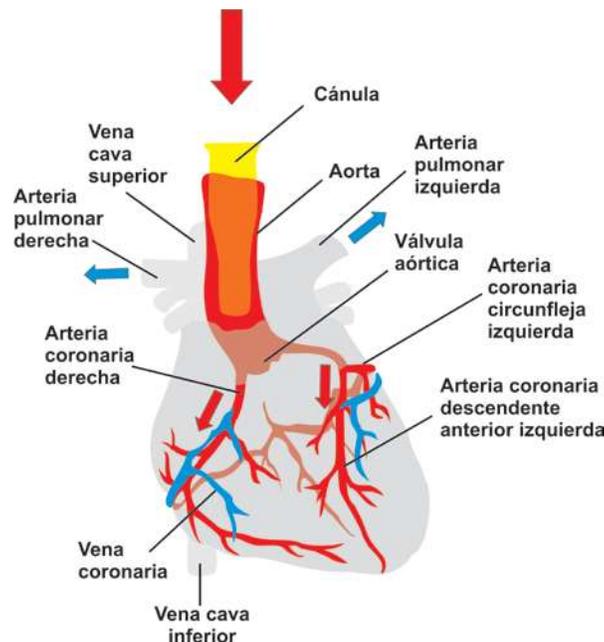
Para prevenir la aparición de trombos, es aconsejable la administración de heparina o algún otro anticoagulante, a menos que se realicen estudios sobre el metabolismo de ácidos grasos, ya que la heparina tiene acción lipolítica, por ende, puede desplazar proteínas asociadas a la membrana celular como la superóxido dismutasa (Sambandam *et al.*, 1999). La administración de heparina puede realizarse vía endovenosa (Sutherland y Hearse, 2000; Riascos *et al.*, 2004) o vía intraperitoneal (Doring y Dehnert, 1988); sin embargo, no es esencial, autores como Skrzyplc-Spring y col. (2007) no administran ningún tipo de fármaco anticoagulante.



### 1.8.3. Medición de parámetros cardiovasculares

#### 1.8.3.1. Presión de perfusión

La presión de perfusión es una medida de la oposición del tejido a llenarse con líquido. Para el caso particular de la preparación Langendorff de corazón aislado, la presión de perfusión corresponde a la oposición de la vasculatura coronaria del órgano al paso del perfusado, la cual se produce a partir de la perfusión retrógrada, entrando por la cánula hacia la aorta, lo que lleva a que se cierre la válvula aórtica y que el perfusado pase hacia las arterias coronarias derecha e izquierda, de ahí hacia las venas coronarias y sea expulsado a través de las arterias pulmonares (figura 9).



**Figura 9.** Diagrama que muestra el tránsito del líquido perfundido en el corazón aislado. El perfusado entra a través de la cánula hacia la arteria aorta, con lo que mantiene cerrada la válvula aórtica y el perfusado pasa a las arterias coronarias, nutre el miocardio, donde se filtra hacia las venas coronarias y es expulsado por las arterias pulmonares derecha e izquierda.

#### 1.8.3.2. Fuerza de contracción ventricular

El procedimiento más sencillo y más ampliamente usado para medir la fuerza de contracción ventricular es el método del globo, introducido por Gottlieb y Magnus en 1904. Para medir este parámetro, se introduce un globo lleno de líquido, como puede ser agua



destilada y desionizada, o una solución de etanol al 96% y agua destilada y desionizada en una proporción 1:1, la cual permite sólo una baja solubilidad de oxígeno y por lo tanto la fácil eliminación de burbujas de aire (Doring y Dehnert, 1989).

El globo se introduce en el ventrículo izquierdo vía una de las venas pulmonares a través de la válvula mitral. El globo debe ser tan delgado como sea posible, flexible y compatible con tejidos biológicos (Skrzypiec-Spring *et al.*, 2007). El tamaño será determinado por la especie del animal de estudio, siendo necesario para ratas un diámetro de entre 3 y 4 mm, para cuyos de 5 a 6 mm y para conejos de 8 a 10 mm (Doring y Dehnert, 1989). Los globos pueden ser fabricados con un trozo película de látex o plástico para envoltura de alimentos, el cual es atado al extremo de una cánula por la que se llenará el globo de líquido (Sutherland *et al.*, 2003).

### 1.8.3.3. Electrocardiograma

Para medir la excitación cardiaca normal, puede usarse una cánula aórtica metálica como electrodo de referencia y, a partir de eso, elegir algún método para colocar los electrodos. Un electrodo puede posicionarse fácilmente sobre la aurícula izquierda (con una sierra fina o un clip) sin temor a dañar el sistema capilar, ya que la aurícula no contiene vasos coronarios (Doring y Dehnert, 1989).

### 1.8.4. Aplicación de la técnica de Langendorff

La preparación original de Langendorff ha tenido varias modificaciones, gracias a las cuales es posible estudiar varias condiciones patológicas, que van desde isquemia global hasta isquemia regional, arritmias y posibles drogas proarrítmicas e incluso evaluar las condiciones de almacenamiento más adecuadas de corazones para trasplante (Skrzypiec-Spring *et al.*, 2007).

## 1.9. Receptores adrenérgicos

Los receptores adrenérgicos pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs, por sus siglas en inglés), cuyo prototipo es la rodopsina. Los GPCRs



transmiten la mayoría (~80%) de las señales transduccionales a través de las membranas celulares (Costanzi *et al.*, 2009; Millar y Newton, 2010).

Es posible distinguir tres clases de receptores adrenérgicos:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\beta$ , encontrándose subtipos de cada uno, siendo estos  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$ ;  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$  y  $\alpha_{2C}$  y  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$  siendo el más ampliamente estudiado el AR- $\beta_2$ . Los subtipos de los receptores  $\beta$  se acoplan a la proteína  $G_s$  y activan a la adenilato ciclasa y los subtipos de los receptores  $\alpha_2$  están acoplados a  $G_i$ , produciendo una inhibición de la actividad de la adenilato ciclasa, activando canales de potasio operados por ligando e inhibiendo canales de calcio (Tabla 4 y 5). Por otro lado, los subtipos  $\alpha_1$  actúan mediante su acoplamiento a otros sistemas efectores, siendo la vía  $G_q$ -fosfolipasa C- $IP_3$  el efector de mayor importancia (Tabla 4) (Westfall y Westfall, 2006).

**Tabla 4.** Características de los receptores adrenérgicos  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ . Tomado de IUPHAR-DB, 2013

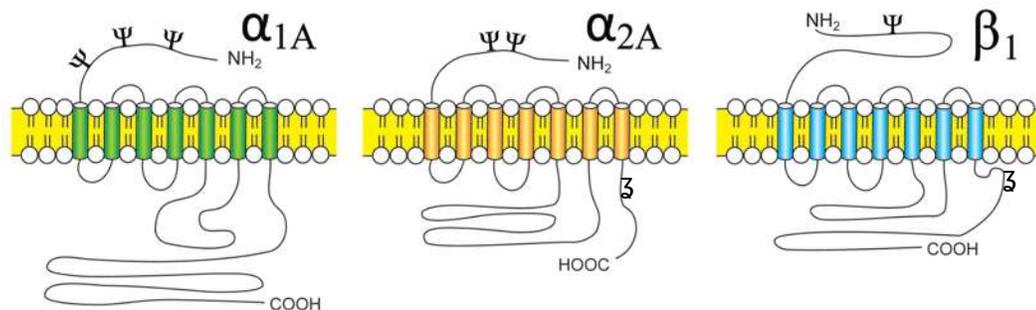
Receptor	Antagonistas	Distribución	Mecanismo efector	Número de aminoácidos
$\alpha_{1A}$	Tamsulosina KMD-3213	Sistema olfatorio, núcleo hipotalámico, corazón, próstata	Fosfolipasa C	466
$\alpha_{1B}$	Tamsulosina NAN 190	Bazo, riñón	Fosfolipasa C	519
$\alpha_{1D}$	Tamsulosina, A-123189, WB 4101	Aorta, vejiga	Fosfolipasa C	572
$\alpha_{2A}$	Lisurida, tergurida, yohimbina	Cerebro, bazo, riñón, aorta, pulmón, músculo esquelético, corazón, hígado	↓ Adenilato ciclasa	450
$\alpha_{2B}$	Rawolsina, espiroxatrina, RX821002	Bazo, riñón, aorta, pulmón, músculo esquelético, corazón, hígado	↓ Adenilato ciclasa	450
$\alpha_{2C}$	Fentolamina, lisurida	Cerebro, riñón, aorta, pulmón, músculo esquelético, corazón, bazo	↓ Adenilato ciclasa	462



**Tabla 5.** Características de los receptores adrenérgicos  $\beta$ . Tomado de IUPHAR-DB, 2013

Receptor	Antagonistas	Distribución	Mecanismo efector	Número de aminoácidos
$\beta_1$	Carvedilol, CGP 12177	Corazón, pulmones	$\uparrow$ Adenilato ciclasa	477
$\beta_2$	Timolol, ICI 118551	Pulmones, corazón	$\uparrow$ Adenilato ciclasa	413
$\beta_3$	Tertatolol, SR59230A	Tejido adiposo	$\uparrow$ Adenilato ciclasa	408

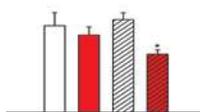
El receptor adrenérgico  $\beta_1$  (AR- $\beta_1$ ) –mostrado en la figura 10- es el subtipo predominante de receptores adrenérgicos del tipo  $\beta$  (AR- $\beta$ ) en el corazón, mediando el incremento del ritmo cardiaco y de la fuerza de contracción, haciéndolo el blanco terapéutico más importante para los antagonistas de los receptores  $\beta$  usados para tratar enfermedades como falla cardiaca crónica, hipertensión y arritmias (Hakalahti *et al.*, 2010).



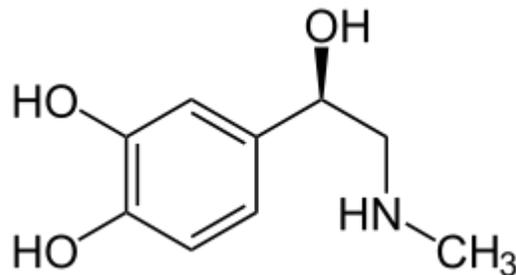
**Figura 10.** Estructura bidimensional de los receptores adrenérgicos  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{2A}$  y  $\beta_1$ . Receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas Gq (para el caso de los AR- $\alpha_1$ ), Gi (para el caso de los AR- $\alpha_2$ ) o Gs (AR- $\beta$ ). (Tomado de Westfall y Westfall, 2006)

### 1.10. Mecanismos de acción de la adrenalina

La epinefrina o adrenalina (figura 11) es un agonista de los receptores adrenérgicos  $\alpha$  y  $\beta$ . Es una catecolamina endógena con efecto vasopresor potente mediado por tres mecanismos, por un lado estimula el miocardio produciéndose un aumento en la fuerza de contracción ventricular (efecto inotrópico positivo) y un aumento de la frecuencia cardiaca



(efecto cronotrópico positivo), además de contraer muchos vasos sanguíneos, efecto que es más notable en las arteriolas más pequeñas y en esfínteres precapilares (Bloom, 2006).



**Figura 11.** Estructura de la adrenalina. La adrenalina es una amina endógena caracterizada por tener la presencia de un grupo catecol, que es un 3, 4-*dihidroxibenceno*. Su precursor biosintético inmediato es la noradrenalina.

Los efectos cardiacos de la ADR son mediados principalmente por estimulación de AR- $\beta_1$  distribuidos en el miocardio, células del marcapasos y tejidos de conducción. Se hallan en proporción 4:1 en comparación con el subtipo  $\beta_2$  (Bloom, 2006).

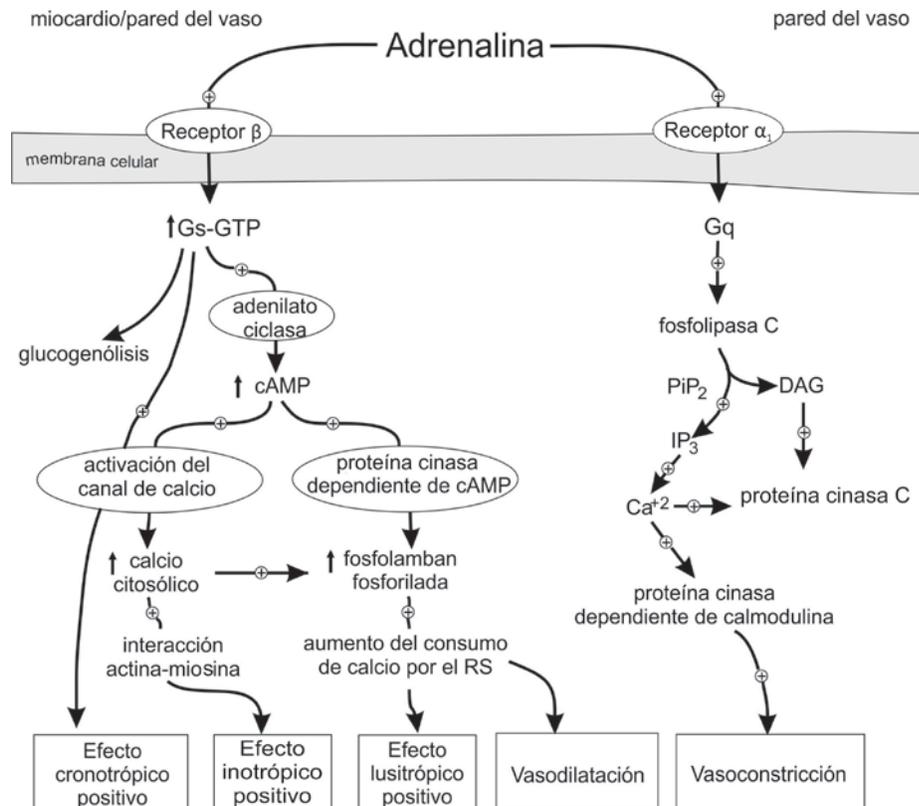
Los AR- $\beta_1$  en el corazón median su efecto a partir de la unión de agonistas produciendo la activación de cascadas de trasducción de señales. Los agonistas adrenérgicos estimulan al AR- $\beta_1$ , el cual, a través de la proteína G ( $G_s$ ) promueve un aumento en la producción de adenosin monofosfato cíclico (cAMP) y éste a su vez activa a la proteína cinasa A (PKA) para fosforilar múltiples efectores moleculares tanto en células del marcapasos como en miocitos cardiaco (Westfall y Westfall, 2006) (figura 12).

En cuanto a los AR- $\alpha_1$ , su estimulación culmina en la regulación de múltiples sistemas efectores. Un mecanismo primario de transducción de señales comprende la activación de la vía  $G_q$ -PLC-IP<sub>3</sub>-Ca<sup>+2</sup> (figura 12) y la activación de otras vías sensibles al calcio y la calmodulina como las de las CaM-cinasas (Westfall y Westfall, 2006).

En células del marcapasos, los agonistas  $\beta_1$  y los activadores de los canales de calcio tipo-L, por ejemplo Bay K 8644 (Rampe y Kane, 1994), promueven las corrientes de calcio ( $I_{Ca}$ ), así como una corriente a través de los canales de calcio tipo-T y corrientes de Na<sup>+</sup> a través de canales catiónicos no selectivos. El efecto neto de estas dos cargas es un incremento en la



frecuencia de despolarización diastólica y una disminución en el umbral para el potencial de acción. Debido a que la diástole se acorta, el ritmo cardiaco se incrementa (Boron y Boulpaep, 2005).



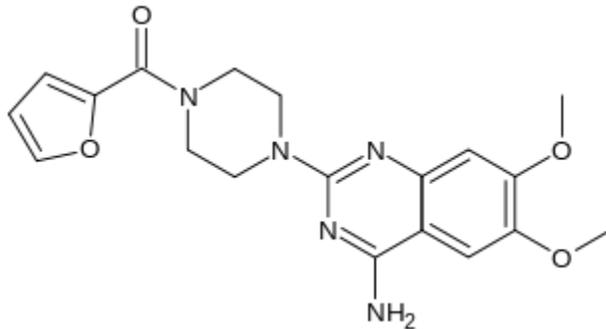
**Figura 12.** Mecanismo de acción de la adrenalina sobre los AR- $\alpha_1$  y AR- $\beta$  en corazón y músculo liso vascular. Los AR- $\beta$  son receptores metabotrópicos acoplados a una proteína Gs, a través de la cual promueven el aumento de cAMP por activación de la enzima adenilato ciclasa. El aumento de cAMP inducirá en músculo ventricular un efecto inotrópico, cronotrópico y lusitrópico positivo, mientras que en músculo liso vascular induce vasodilatación. En cuanto a los AR- $\alpha_1$ , éstos son receptores acoplados a proteína Gq, la cual activa la fosfolipasa C que hidroliza fosfoinosítidos de la membrana ( $PIP_2$ ) para producir  $IP_3$  y DAG. El  $IP_3$  promueve la salida de  $Ca^{+2}$  del retículo sarcoplásmico y subsecuentemente activa la proteína cinasa dependiente de calmodulina en músculo liso vascular para dar la vasoconstricción (Modificado de Gillies *et al.*, 2005).

En las células del miocardio, los agonistas  $\beta_1$  ejercen muchos efectos paralelos vía PKA. Además, la subunidad  $\alpha_s$  de la proteína G puede activar directamente los canales de calcio tipo-L. El efecto neto de estas rutas es la generación de contracciones fuertes y breves (Boron y Boulpaep, 2005).

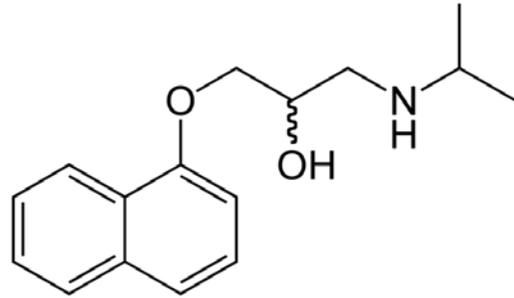


### 1.11. Antagonistas adrenérgicos: propranolol y prazosina

A.



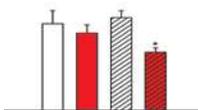
B.



**Figura 13.** Estructura de los antagonistas  $\alpha_1$  y  $\beta$  adrenérgicos prazosina (A) y propranolol (B), respectivamente. (Tomado de IUPHAR-DB)

La prazosina (PRZ) es el prototipo de un grupo de compuestos que contienen un núcleo de piperazinilquinazolina, que antagoniza los receptores adrenérgicos  $\alpha_1$  (figura 13-A). Su afinidad por los receptores adrenérgicos  $\alpha_1$  es unas 100 veces mayor que la que posee por los  $\alpha_2$ , y tiene afinidad similar por los subtipos  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  y  $\alpha_{1D}$  (Westfall y Westfall, 2006).

El propranolol (PPL) (figura 13-B) es un antagonista adrenérgico con igual afinidad por los receptores  $\beta_1$  y  $\beta_2$ , pero no interactúa con receptores adrenérgicos  $\alpha$ . Es altamente lipofílico y de absorción casi completa al administrarse por vía oral (Westfall y Westfall, 2006).



## 2. JUSTIFICACIÓN

Los inhalables son compuestos que pueden hallarse fácilmente en diversos productos comerciales como pegamentos, esmaltes, aerosoles y pinturas; su amplia distribución y numerosos efectos sobre órganos y sistemas -que van desde el SNC hasta el sistema cardiovascular- hacen que se despierte un interés especial en el estudio de estas sustancias.

Son muchos los reportes que existen sobre la exposición ocupacional a los inhalables, no así de su abuso. A pesar de que este grupo de drogas es de las más empleadas entre la población (principalmente entre personas jóvenes y de un nivel socioeconómico bajo), con lo que constituyen un serio problema de salud pública, los inhalables son las drogas menos estudiadas.

El principal conocimiento que se ha forjado alrededor de los inhalables radica a nivel de los efectos sobre el SNC, de ahí que aún queda mucho por conocer sobre el mecanismo de acción de los inhalables a nivel cardiovascular. Los datos que existen sobre los efectos del tolueno sobre el corazón son escasos y derivan principalmente de observaciones clínicas hechas en pacientes que abusan de este disolvente.

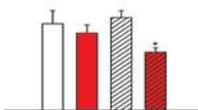
Un ejemplo puntual de un fenómeno relacionado con los inhalables y su efecto directo sobre el sistema cardiovascular se refiere con el síndrome de muerte súbita por inhalación, del cual existen sólo unos pocos casos clínicos registrados que dan una idea y posibles hipótesis acerca del mecanismo por el cual la inhalación de disolventes en una situación de abuso puede producir este efecto; aunado a esto, los estudios *in vitro* son escasos y aun más aquellos reportes en los que se estudia una exposición crónica.

Por lo tanto, resulta de gran interés estudiar los efectos de la exposición crónica de tolueno en un modelo estandarizado *in vitro* y poder correlacionarlos con el fenómeno de muerte súbita por inhalación.



### 3. HIPÓTESIS

La exposición crónica a tolueno produce una sensibilización del corazón de rata al efecto de la adrenalina.



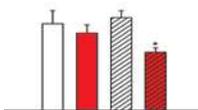
## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo general

Estudiar el efecto de la exposición crónica a tolueno sobre la reactividad a la adrenalina sobre el corazón de rata en la preparación tipo Langendorff.

### 4.2. Objetivos específicos

- 4.2.1. Estandarizar la técnica para montar y perfundir el corazón aislado de rata en una preparación tipo Langendorff.
- 4.2.2. Evaluar el efecto de la exposición crónica (2 meses) a 4000 ppm de tolueno sobre la presión de perfusión del corazón en presencia de adrenalina.
- 4.2.3. Evaluar el efecto de la exposición crónica (2 meses) a 4000 ppm de tolueno sobre la fuerza de contracción ventricular en presencia de adrenalina.
- 4.2.4. Evaluar el efecto de la exposición crónica (2 meses) a 4000 ppm de tolueno sobre la frecuencia cardiaca en presencia de adrenalina.



## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1. Animales

Se usaron ratas macho de la cepa Wistar de 2 meses de edad (200 a 250 g de peso), sometidas a un ciclo normal luz/obscuridad (12h/12h) y con acceso libre a agua y alimento, alojadas en grupos de cinco animales. Todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo según lo establecido por el comité local de ética y de acuerdo a las regulaciones establecidas en la norma oficial mexicana para el uso y cuidado de animales de laboratorio 'NOM-062-ZOO-1999'.

### 5.2. Sustancias

Se usó tolueno como disolvente de abuso prototipo, anhidro, 99.8% de pureza (Sigma-Aldrich®). Los animales fueron expuestos a una concentración de 4000 ppm, imitando lo que sucede en una situación de abuso (Marjot y McLeod, 1989)

Como anestésico general, se usó pentobarbital sódico (Sedalpharma®) administrado vía i.p. a una dosis de 50 mg/Kg de peso del animal antes de la intervención quirúrgica para posteriormente extraer el corazón.

Se empleó heparina a una dosis de 100 UI por cada 100 g de peso del animal administrada vía i.p.

Para el líquido de perfusión, se utilizó una solución de Krebs-Henseleit modificada, con la siguiente composición (mM): NaCl 118.07, glucosa 23.32, NaHCO<sub>3</sub> 25, KCl 4.7, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.18, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.75, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 2.52 y Na-EDTA-Na 0.0267.

Se empleó clorhidrato de adrenalina como agonista adrenérgico, (Sigma Aldrich®). Se prepararon soluciones con concentraciones de  $1 \times 10^{-9}$  M,  $1 \times 10^{-8}$  M,  $1 \times 10^{-7}$  M,  $1 \times 10^{-6}$  M,  $1 \times 10^{-5}$



M,  $1 \times 10^{-4}$  M y  $1 \times 10^{-3}$  M, disolviendo la adrenalina en solución salina. Las soluciones fueron preparadas en el momento que serían usadas.

Como antagonista  $\beta$ -adrenérgico, se usó clorhidrato de propranolol (Sigma-Aldrich®) disuelto con solución de Krebs-Henseleit a una concentración de  $1 \times 10^{-6}$  M; por su parte, como antagonista  $\alpha_1$ -adrenérgico, se empleó prazosina (Sigma-Aldrich®) disuelta en etanol al 96% diluida en la solución de Krebs-Henseleit, quedando a una concentración de  $6.35 \times 10^{-7}$  M de prazosina y una concentración final de etanol de 0.0015%. La solución es usada en el momento de su preparación.

### 5.3. Estandarización de la técnica de corazón aislado y perfundido según Langendorff

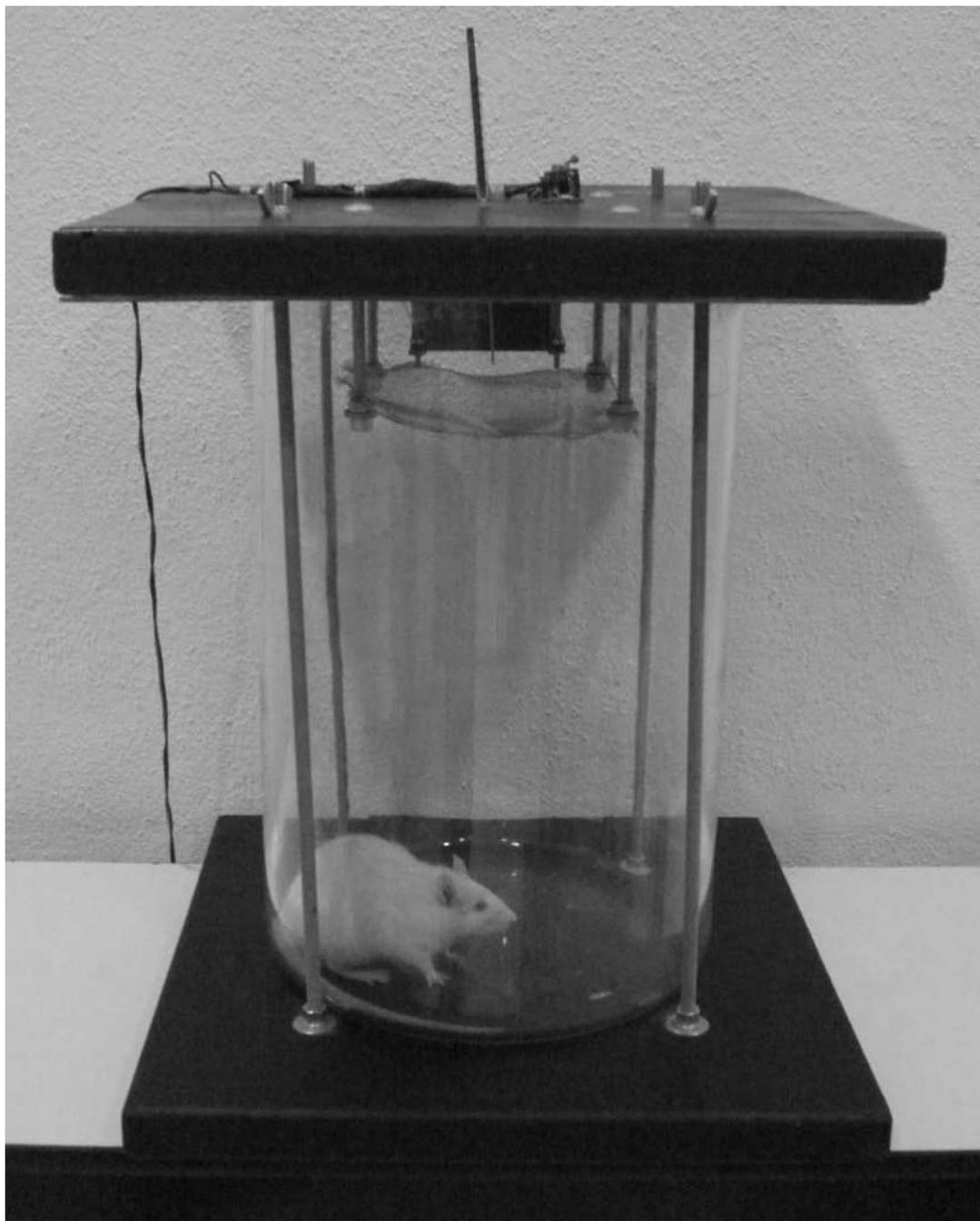
Para llegar a estandarizar la técnica descrita se recurrió a hacer ensayos bajo diversas condiciones hasta obtener un registro que evidenciara una preparación estable según lo descrito en la literatura, haciendo uso de la infraestructura existente en el laboratorio de Farmacología del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas.

Uno de los elementos importantes dentro de la estandarización de la técnica fue encontrar las condiciones óptimas del globo intraventricular usado para medir la FCV y la FC, teniendo que modificar su forma, tamaño y fluido con que se llenó, para este caso decidimos utilizar agua.

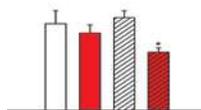
### 5.4. Exposición al disolvente

La exposición al tolueno se llevó a cabo en cámaras de exposición estáticas, que constan de una jarra cromatográfica de 29.0 L, cerrada de forma hermética por una tapa de acrílico, que cuenta con un puerto de inyección por el que se administra el disolvente y es recibido por un papel filtro sujetado a una malla metálica. En el interior tiene un ventilador con las aspas dirigidas hacia dentro de la cámara, lo que permite la rápida volatilización y distribución del disolvente durante el tiempo de exposición (figura 14).





**Figura 14.** Cámara de exposición estática. Consta de una jarra cromatográfica de 29 litros cubierta con una tapa de acrílico que cierra de forma hermética. Por dentro de la tapa se encuentra un ventilador con las aspas dirigidas al interior que volatilizarán el disolvente administrado por un puerto de inyección y recibido en un papel filtro sujeto a una malla metálica. Los animales son introducidos uno a la vez por periodos de 30 min.



Los animales son introducidos en la cámara de manera individual, administrando el disolvente por el puerto de inyección. Las exposiciones se llevaron a cabo por un periodo de 30 minutos, 2 veces al día. Las concentraciones de vapor deseadas se alcanzan en menos de un minuto (1 min) y permanecen constantes durante el tiempo de exposición (30 min). El volumen necesario para obtener la concentración deseada en partes por millón dentro de la cámara, se calcula empleando la ecuación de Nelson (1971):

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

Donde:

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

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

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

$V_s$  = volumen de la cámara de exposición (l)

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

$P$  = presión atmosférica (atm)

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

$T$  = temperatura (K)

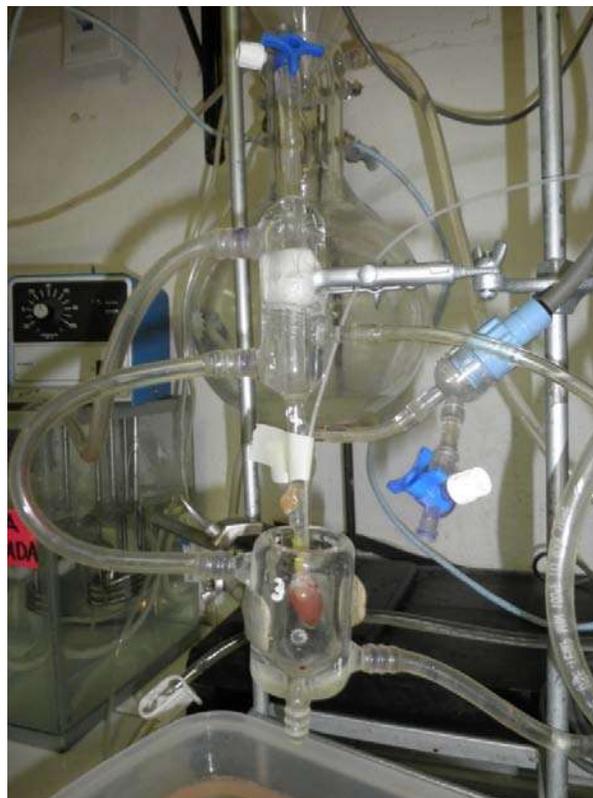
### 5.5. Preparación Langendorff de corazón aislado de rata

Las ratas fueron sometidas a anestesia profunda con pentobarbital sódico y se les administró heparina a una concentración de 100 UI por cada 100 g de peso del animal. Previo a la extracción del corazón, se realizó una traqueotomía para permitir la respiración asistida con

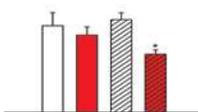


un respirador mecánico (Rodent ventilator 7025®) ajustado a  $1 \text{ mm}^3$  de aire por cada 100 g de peso del animal.

En cada caso, el corazón fue extraído realizando una laparatomía tóraco-abdominal que permite la exposición del paquete cardiopulmonar. Se pinzan las venas cavas inferior y superior y se cortan para impedir el flujo sanguíneo al corazón y con ello minimizar la aparición de coágulos. Se localiza la arteria aorta a nivel del tórax y se corta para, a partir de ella, extraer el corazón y los pulmones, los cuales se sumergen en un vaso de precipitado conteniendo solución de Krebs-Henseleit a  $4^\circ\text{C}$ . Posteriormente, la aorta se corta a la altura del cayado, para montar el paquete cardiopulmonar en el equipo de perfusión con ayuda de una cánula de calibre 24, perfundido en el órgano de forma retrógrada con un flujo constante de  $10 \pm 0.5 \text{ ml}$  de solución de Krebs-Henseleit a  $37^\circ\text{C}$  y  $\text{pH}=7.4$  y gasificada con un 95% de  $\text{O}_2$  y 5% de  $\text{CO}_2$ . Ya que el paquete cardiopulmonar se perfunde por la solución de Krebs-Henseleit, los pulmones son eliminados de la preparación dejando el corazón aislado (figura 15).



**Figura 15.** Corazón aislado de rata, montado y perfundido en una preparación tipo Langendorff.



Para monitorizar la FCV y la FC, se insertó un globo de látex lleno de agua destilada a través de la vena pulmonar hasta el ventrículo izquierdo.

### 5.6. Curva concentración-respuesta gradual

Una vez montado el corazón en el equipo de perfusión, se procedió a correr curvas concentración-respuesta (CCR) graduales; para este propósito se administraron 20 $\mu$ l en orden creciente de concentración, de las soluciones de ADR en ausencia y presencia de PPL y PRZ, adicionados en el perfusado 20 min antes de la realización de la curva. El registro de presión de perfusión, fuerza de contracción ventricular y frecuencia cardíaca fue monitorizado usando un sistema de transducción de señales Byopac Systems. Los datos fueron almacenados en formato electrónico con ayuda del programa AcqKnowledge 3.8.2 para su posterior análisis.

### 5.7. Análisis estadístico de resultados

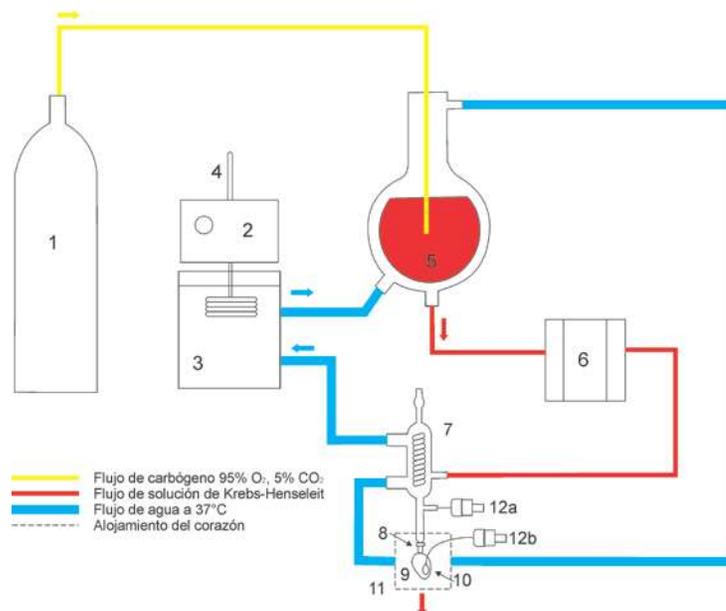
Los resultados obtenidos fueron representados en gráficas como la media  $\pm$  e.e. (n=5) e interpretados mediante un análisis de varianza de dos vías, seguido de una prueba de Tukey, o en su defecto, una prueba *t* de Student usando el programa SigmaPlot 11.0. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con un valor de significancia de  $p < 0.05$ .



## 6. RESULTADOS

### 6.1. Estandarización de la técnica de corazón aislado y perfundido tipo Langendorff

Para lograr que el corazón de una rata permanezca viable mediante una técnica *in vitro* y, en este caso, siguiendo la técnica descrita por Langendorff (1897), fue necesario comenzar por establecer un montaje y acomodo de cada uno de los elementos descritos a fin de que el órgano realice las funciones básicas necesarias en los experimentos realizados. La preparación de Langendorff se esquematiza en la figura 16:



**Figura 16.** Esquema de montaje de la preparación Langendorff en el Laboratorio de Farmacología: 1) fuente de carbógeno (95% O<sub>2</sub>, 5%CO<sub>2</sub>), 2) bomba de recirculación y sistema de regulación de temperatura, 3) baño de agua a temperatura constante (37°C), 4) termómetro, 5) matraz balón conteniendo la solución de Krebs-Henseleit, 6) bomba peristáltica, 7) tubo serpentín, 8) cánula de perfusión sujeta a la aorta, 9) corazón aislado y perfundido, 10) globo ventricular alojado en el ventrículo izquierdo, 11) alojamiento del corazón a temperatura constante, 12a) transductor electrónico que registra la presión de perfusión, 12b) transductor electrónico que registra la fuerza de contracción ventricular y la frecuencia cardíaca.

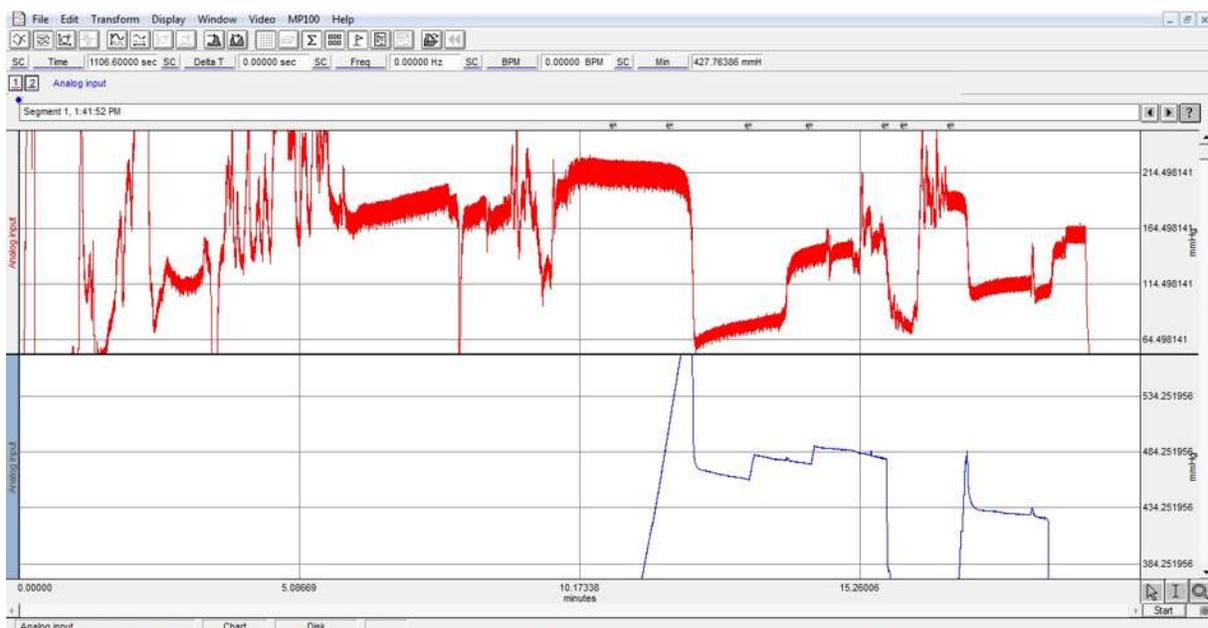


### ***Manipulación excesiva al montar el corazón.***

Si bien el momento en el que se cambia la perfusión sanguínea por la perfusión artificial es un punto crucial para lograr el éxito de la técnica, la inserción del catéter hacia el ventrículo izquierdo fue igualmente un punto importante (figura 17), observándose que esto debe hacerse evitando la manipulación excesiva del órgano y en particular de sus aurículas, ya que de no ser así se llega a un estado arrítmico, seguido del cese del latido cardiaco y el registro único de la presión de perfusión propia del paso del perfusado a través de la cánula.

### ***Introducción de un catéter de embolectomía como globo ventricular.***

El proceso de estandarización se enfocó primeramente en la introducción de un globo intraventricular para medir la FCV e indirectamente la FC. Para este propósito, se empleó un catéter de embolectomía calibre 5F, el cual, sin embargo, no dio los resultados esperados, como se verá más adelante.

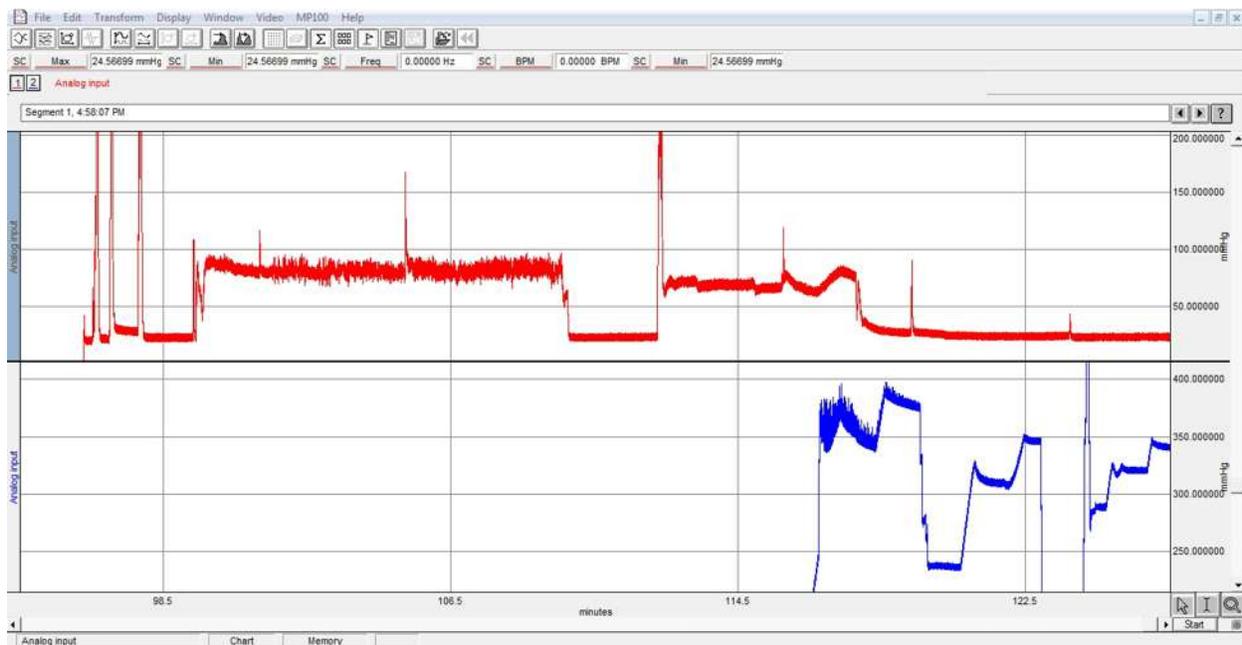


**Figura 17.** Registro de un ensayo de la preparación Langendorff. El canal 1 (rojo) muestra el registro perteneciente a la PP, y el canal 2 (azul) el registro propio de la FCV. La manipulación excesiva del órgano y en particular de las aurículas, lo lleva a su pronta degradación.

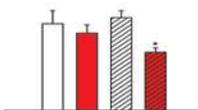


### Ensayo con el catéter de embolectomía

Luego de varios ensayos que nos llevaron a identificar que la mejor vía de acceso del globo ventricular es una de las venas pulmonares, además de hallar la manera de facilitar la introducción del globo agrandando el acceso con ayuda de una tijera, surgieron los problemas propios del uso del catéter de embolectomía. Sus requerimientos de presión para inflarse arriba de 400 mmHg y un volumen difícilmente ajustable, hacen de éste un instrumento inconveniente que debido a su gran tamaño produce la muerte del tejido cardiaco (figura 18).

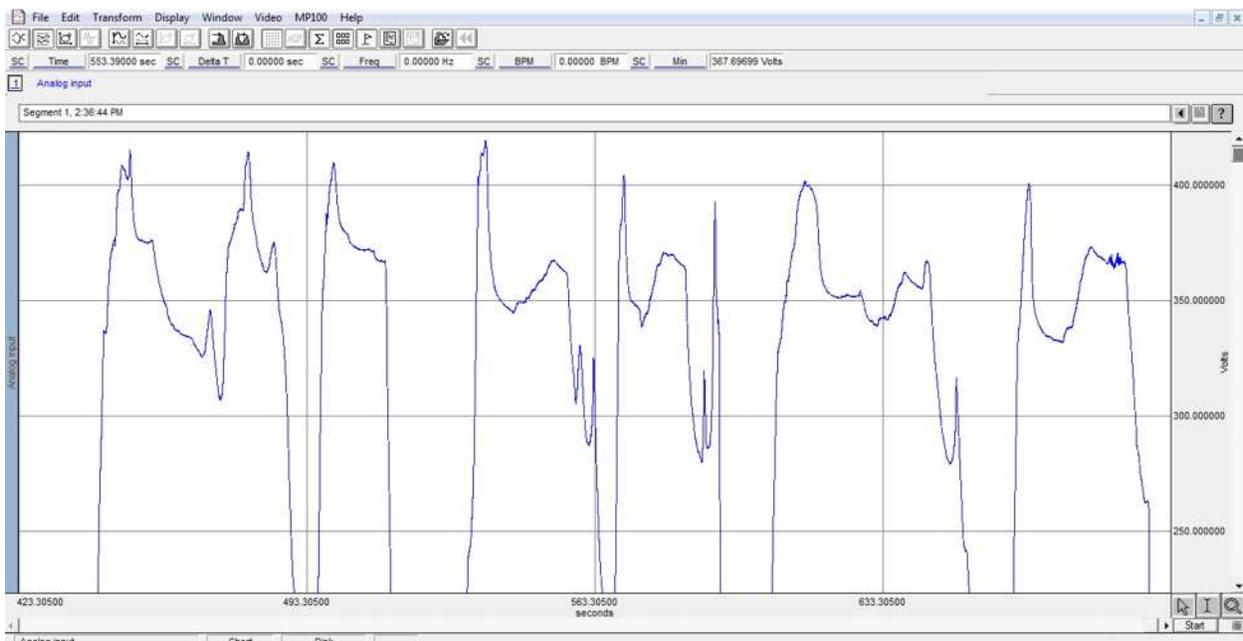


**Figura 18.** Registro de un ensayo de la preparación Langendorff. El canal 1 (rojo) muestra el registro perteneciente a la PP, y el canal 2 (azul) el registro propio de la FCV. El requerimiento de una forma de medir la FCV y la FC nos llevó a ensayar usando un catéter para embolectomía calibre F5 inflado con aire. El resultado de una presión basal arriba de 400 mmHg generada por el catéter y un volumen grande, conduce a la muerte del tejido cardiaco, en conjunto con periodos de ausencia de oxígeno.

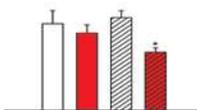


### Comportamiento elástico del catéter de embolectomía inflado con aire

Debido a la longitud del catéter de embolectomía y a que se encuentra sellado, se optó por llenar el catéter con aire; sin embargo, debido a que el aire puede comprimirse, se requerían altos valores de presión para poder inflar el globo y así permitir el registro. La figura 19 muestra el registro del comportamiento elástico del látex que conforma el globo de la punta del catéter de embolectomía. A partir de un estado basal de 0 mmHg y volumen igualmente de 0 mm<sup>3</sup>, se administra aire con ayuda de una jeringa montada en una bomba de infusión hasta llegar a una media de presión de  $409.82 \pm 4.09$  mmHg (media de presión máxima  $\pm$  e.e. n=7 mediciones). En este punto se llega a una etapa en la que el volumen obtenido es inversamente proporcional a la presión, consiguiéndose un volumen mínimo de alrededor de 0.8 mm<sup>3</sup> para la presión de  $350.75 \pm 7.86$  mmHg. El volumen fue determinado por desplazamiento de agua.

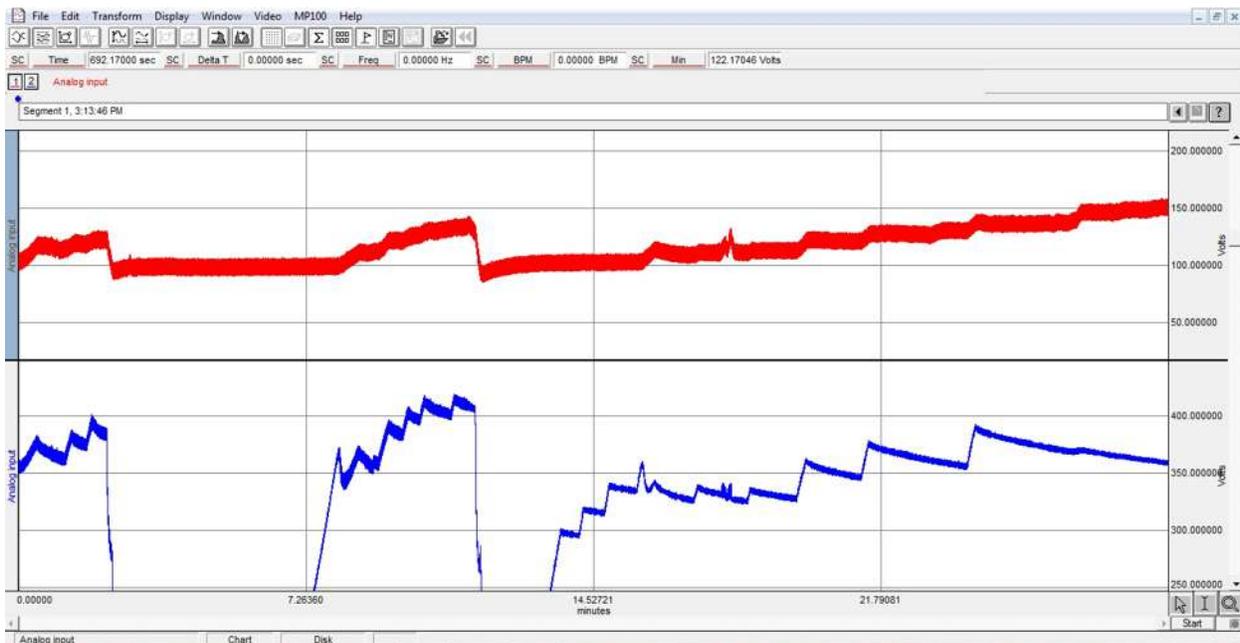


**Figura 19.** Registro del comportamiento mecánico del catéter de embolectomía como posible globo intraventricular. El presente registro se llevó a cabo con el fin de conocer la presión requerida para obtener un volumen de inflado; se observa una presión máxima mayor a 400 mmHg para vencer la resistencia del látex, previo a un descenso de presión, con lo que se genera un volumen del globo de alrededor de 0.8 mm<sup>3</sup>, sin posibilidad de conseguir un volumen menor.



### ***Catéter de embolectomía inflado con aire***

Si bien con ayuda del análisis mostrado en la figura 19 fue posible conocer la correlación volumen-presión del globo, al momento de probarlo en una preparación se observa que no es necesario que el globo se halle completamente inflado, ya que el registro del latido del corazón es posible a valores de presión menores a 400 mmHg; el problema encontrado entonces se deriva de la imposibilidad del globo de permanecer inflado a un mismo volumen a lo largo del experimento, (figura 20) ya que poco a poco el valor de presión del globo disminuye y con él, el volumen y, por ende, surge la imposibilidad de medir los parámetros cardiovasculares para los cuales fue diseñado el globo: FCV y FC.



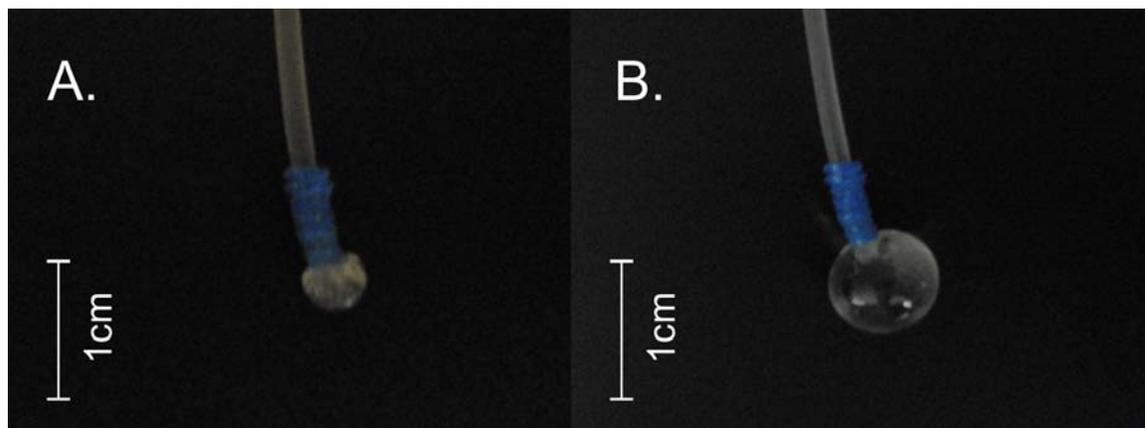
**Figura 20.** Registro de un ensayo de la preparación Langendorff. El canal 1 (rojo) muestra el registro perteneciente a la PP, y el canal 2 (azul) el registro propio de la FCV. Otro inconveniente del catéter de embolectomía consistió en sus altos requerimientos de presión para poder llegar a cierto volumen, lo que producía un valor inconsistente a lo largo del experimento y, por ende, dificultó la lectura y obtención de los datos.

Observando que el aire usado para inflar el globo del catéter de embolectomía era el responsable tanto de los valores altos de presión requeridos para conseguir un volumen deseado, como del efecto de disminución gradual del volumen a la hora de su utilización, se



optó por llenar el catéter con agua, pero durante el procedimiento éste sufrió una ruptura, lo que imposibilitó su uso.

Los resultados negativos del catéter de embolectomía, así como su elevado costo, marcaron las pautas para generar un globo intraventricular fabricado en el laboratorio a partir de un trozo de látex transparente y un catéter calibre 5F igualmente transparente que fuera llenado con agua destilada (figura 21). Si bien el líquido de llenado puede variar, la mejor opción sería uno de muy baja viscosidad para facilitar la eliminación de cualquier burbuja de aire a lo largo del catéter y dentro del globo.

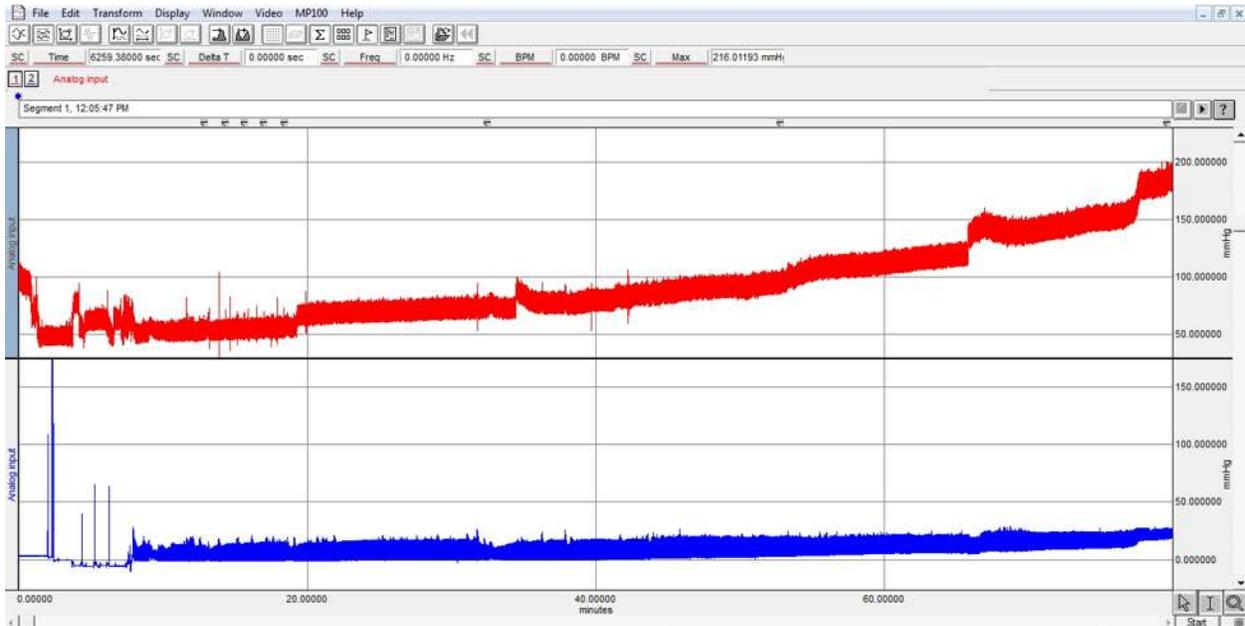


**Figura 21.** Globo intraventricular empleado en la preparación Langendorff de corazón aislado para determinar la FCV e indirectamente la FC. A. Estado lleno de agua destilada e inflado a presión atmosférica, empleado en el protocolo; B. Estado inflado con agua destilada a presiones mayores a la atmosférica.

Siguiendo la técnica de inserción del globo en el ventrículo izquierdo, como se describe antes, pudimos obtener registros más estables lo cual permitió que prosiguiéramos con otras condiciones que serían requeridas en el protocolo.



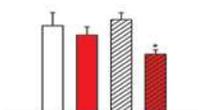
## Introducción de un globo ventricular inflado con líquido



**Figura 22.** Registro de un ensayo de la preparación Langendorff. El canal 1 (rojo) muestra el registro perteneciente a la PP, y el canal 2 (azul) el registro propio de la FCV. Para llevar a cabo este registro, se cambió el catéter para embolectomía por un globo intraventricular elaborado a partir de un trozo de látex. Un gran tamaño del globo lleva a la producción de este registro, en el que se observan aumentos graduales en la PP y una disminución en la amplitud del registro de FCV. El corazón aparece rígido al tacto y se observan zonas de necrosis donde se alojó el globo.

La figura 22 muestra el registro de una preparación tipo Langendorff de corazón de rata, en la que el registro en rojo pertenece a la PP del órgano, y el registro en azul, pertenece al obtenido gracias al globo ventricular hecho en el laboratorio. Durante este experimento se administraron 20  $\mu$ l de las soluciones de ADR en concentraciones crecientes, observándose claramente un aumento en la PP en forma dependiente de la concentración.

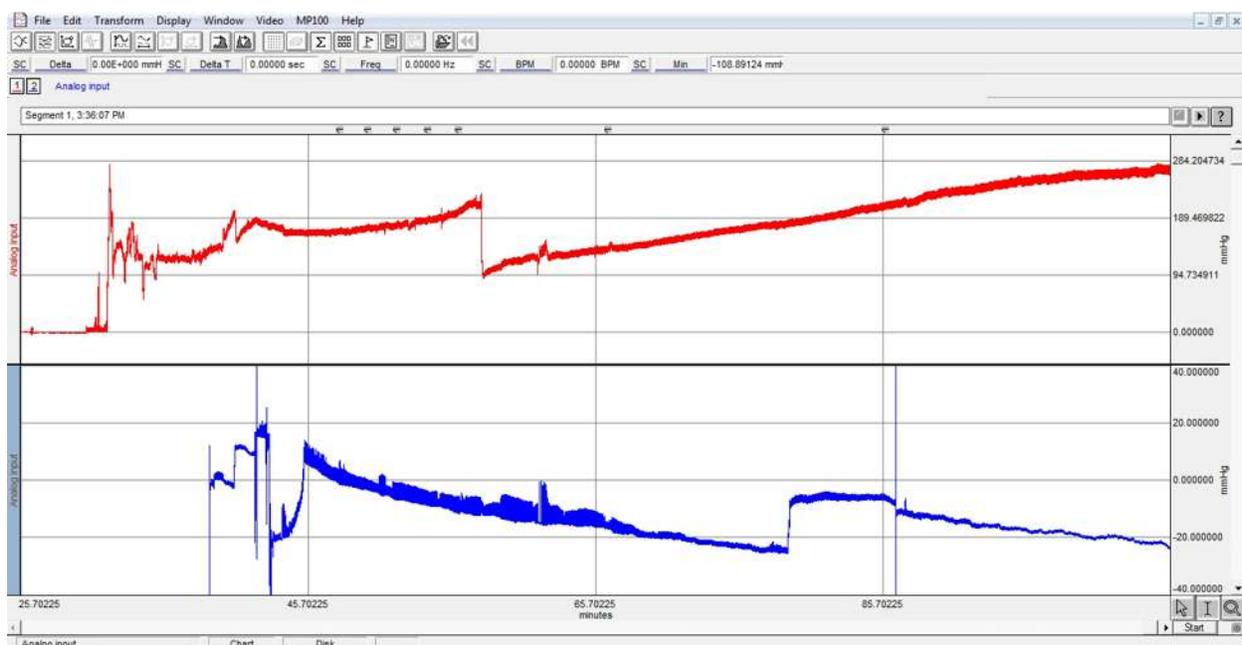
Este registro (figura 22) pone de manifiesto la importancia del tamaño del globo, el cual en este caso era lo suficientemente grande para cubrir las paredes del endocardio e impedir la correcta perfusión de éste y del músculo papilar. Existe un aumento gradual del registro para la PP y puntos de aumento brusco atribuidos a infartos localizados. El registro efectuado por el globo ventricular disminuye en cuanto a amplitud y poco a poco el corazón cesa de latir, se



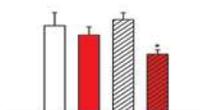
siente rígido al tacto y presenta zonas necróticas evidentes en el miocardio justo en la zona donde se alojó el globo ventricular.

### ***Isquemia y reperfusión***

La figura 23 muestra un experimento en el que el corazón de rata sufrió un periodo de isquemia justo en el periodo que va de su extracción hasta antes de su reperfusión. De manera semejante que en el registro de la figura 22, el corazón montado presenta un aumento gradual y desproporcionado en el registro propio de la PP y una disminución en la amplitud del registro del globo ventricular, la cual, sin embargo, es más notorio y llega a su mínima expresión de forma más rápida y evidente. El corazón se siente rígido al tacto y sin latido alguno, pero no se observan las zonas necróticas donde se albergó el globo.

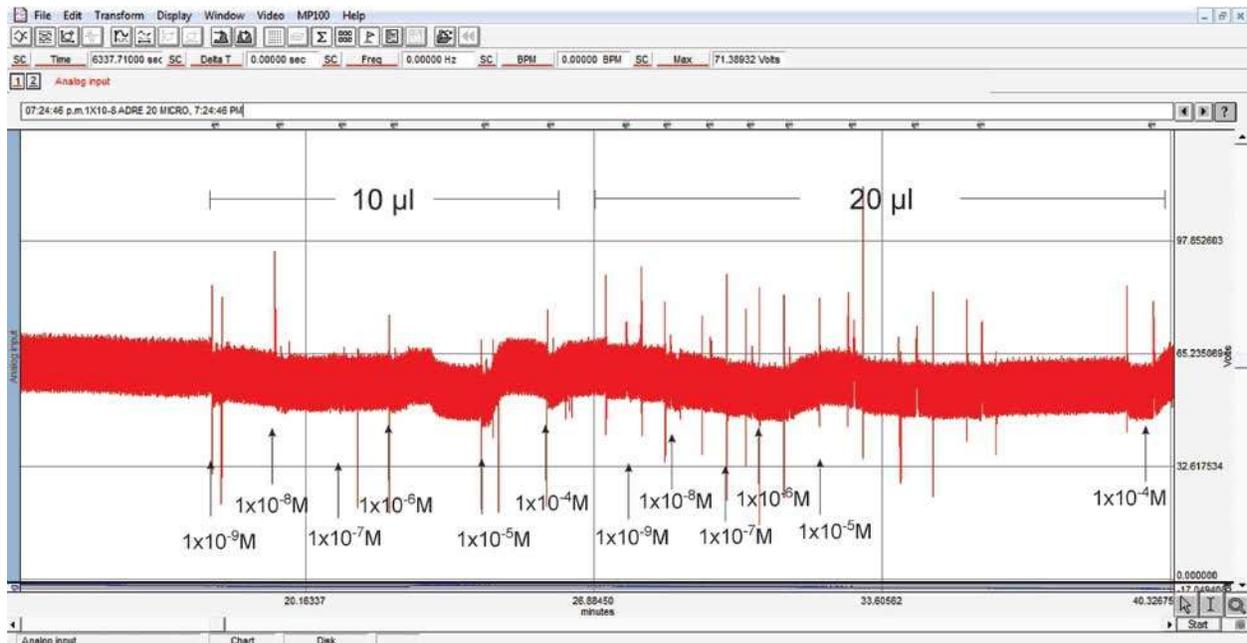


**Figura 23.** Registro de un ensayo de la preparación Langendorff. El canal 1 (rojo) muestra el registro perteneciente a la PP, y el canal 2 (azul) el registro propio de la FCV. Es el ejemplo de una técnica de extracción lenta del corazón que llevó a ocasionar isquemia. La PP basal aumenta de manera acelerada y disminuye la FCV. El corazón se siente rígido al tacto.



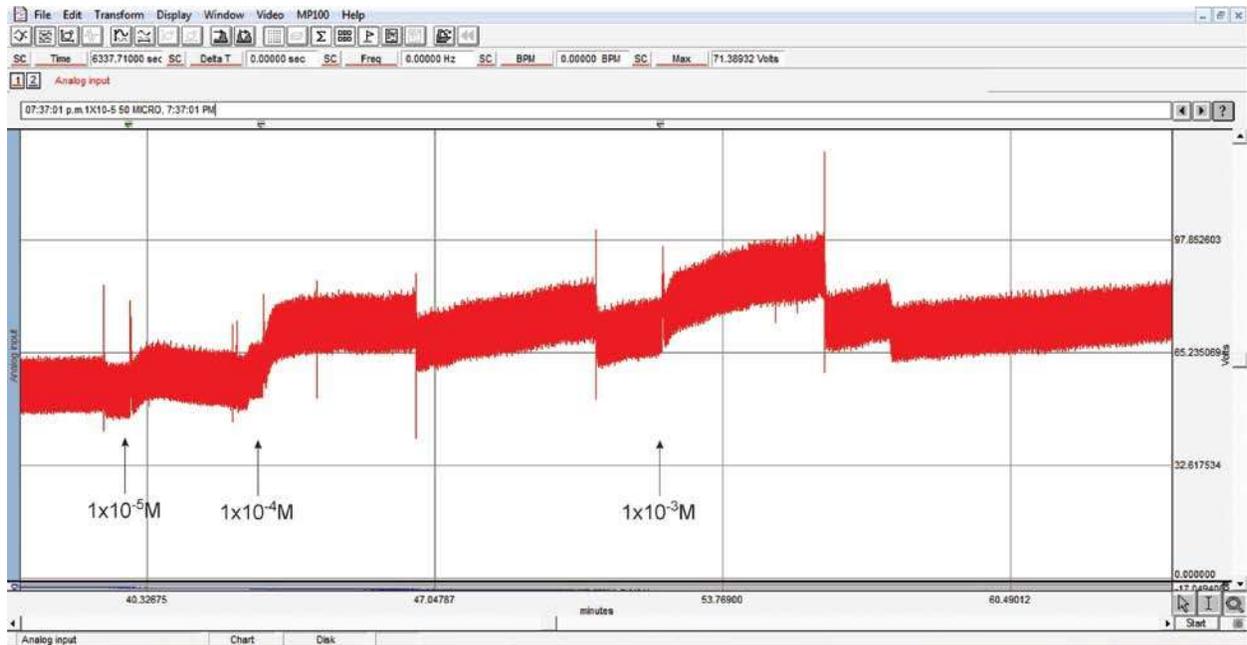
### Determinación del volumen de adrenalina

Como el protocolo experimental requería el uso de ADR en concentraciones crecientes del fármaco, fue necesario determinar el volumen adecuado a administrar, de tal manera que se observara un efecto notorio sin afectar la integridad del corazón montado. La figura 24 muestra el registro del efecto vasopresor mediado por la adrenalina sobre la PP del corazón de una rata control. Se administraron primeramente 10  $\mu\text{l}$  de las soluciones de ADR en concentraciones crecientes ( $1 \times 10^{-9}$  M,  $1 \times 10^{-8}$  M,  $1 \times 10^{-7}$  M,  $1 \times 10^{-6}$  M,  $1 \times 10^{-5}$  M,  $1 \times 10^{-4}$  M y  $1 \times 10^{-3}$  M) y enseguida 20  $\mu\text{l}$  de las mismas soluciones. El efecto presor se hace evidente como un aumento gradual del registro y regreso al estado basal para ambos volúmenes especificar en la figura. Cabe mencionar que, en particular para este registro, la inserción y extracción de la jeringa con la que se administró el fármaco provocó señales no deseadas en el registro como picos que irradian hacia arriba y abajo.



**Figura 24.** Variación de los volúmenes de adrenalina (10 y 20  $\mu\text{l}$ ). Se muestra el estudio del volumen de adrenalina (ADR) requerido para llevar a cabo la curva concentración-respuesta (CCR). El uso de 10 ó 20  $\mu\text{l}$  de las diferentes soluciones a usar, arrojó un registro en el que se observa el retorno de la PP a su estado basal luego de producirse el efecto presor propio de la ADR.





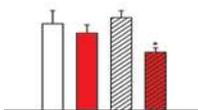
**Figura 25.** Variación de los volúmenes de adrenalina (50  $\mu$ l). Se muestra el estudio del volumen de adrenalina requerido para llevar a cabo la curva concentración-respuesta. El uso de 50  $\mu$ l de las diferentes concentraciones de adrenalina condujo a la sobreestimulación del órgano y al aumento consistente de la PP al usar las soluciones más concentradas.

La figura 25 muestra el registro del efecto de la administración de 50  $\mu$ l de concentraciones crecientes de las soluciones de ADR en forma creciente sobre la PP de un corazón aislado y perfundido tipo Langendorff.

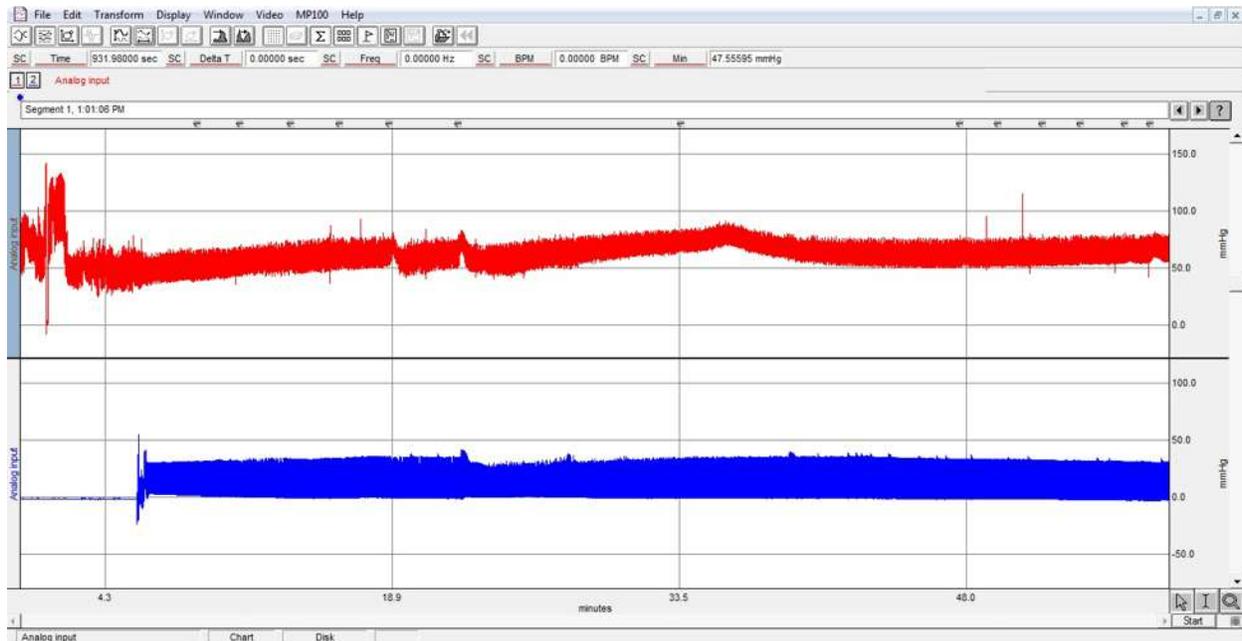
### **Registro típico**

La figura 26 es un ejemplo típico de una preparación de corazón aislado y perfundido tipo Langendorff. Se espera un valor basal de PP de alrededor de 40 mmHg y una FCV de 20 mmHg.

La primera parte del registro muestra el efecto presor producido por la administración de ADR en las concentraciones crecientes ( $1 \times 10^{-9}$  M,  $1 \times 10^{-8}$  M,  $1 \times 10^{-7}$  M,  $1 \times 10^{-6}$  M,  $1 \times 10^{-5}$  M y  $1 \times 10^{-4}$  M). Luego de la administración de la solución más concentrada de ADR ( $1 \times 10^{-4}$  M), se observa un aumento en el registro para la PP y un descenso posterior a la administración de los



antagonistas adrenérgicos PPL y PRZ, hasta una basal normal donde se repite la administración de las soluciones de ADR en concentraciones crecientes.

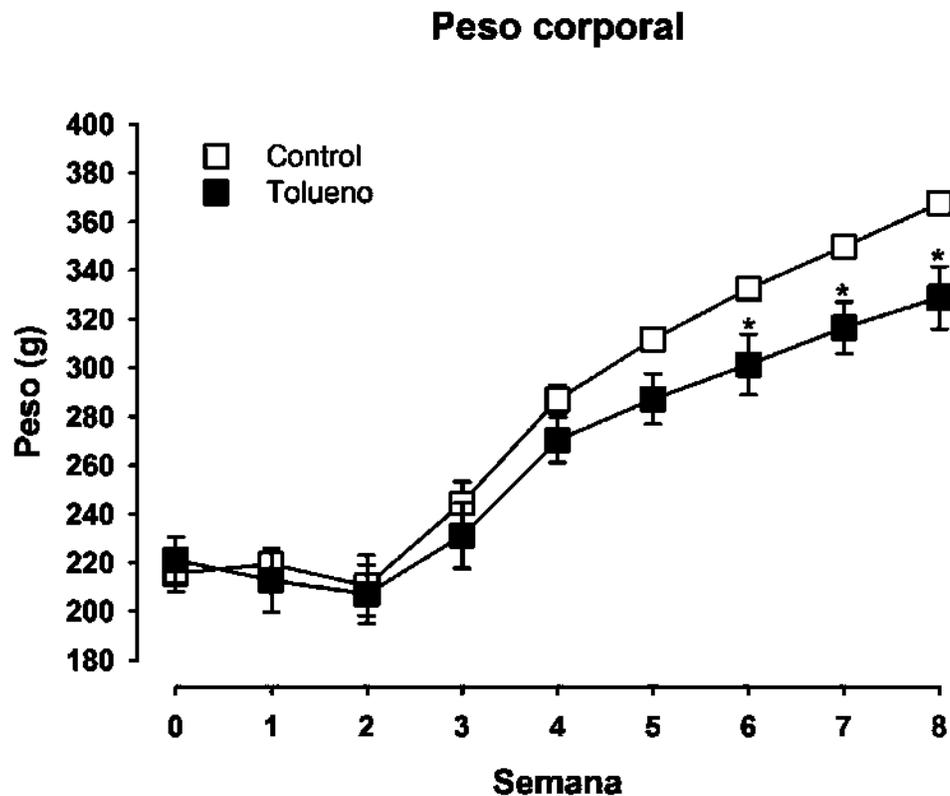


**Figura 26.** Ejemplo de un registro típico de la preparación de corazón aislado y perfundido tipo Langendorff. Se administraron soluciones de ADR en concentraciones crecientes, en ausencia y en presencia de PRZ y PPL. El canal mostrado en color rojo representa la PP y el canal mostrado de color azul representa la FCV.

En todos los casos, el globo ventricular se trabaja en un sistema cerrado a presión atmosférica, es decir, el globo ventricular no está inflado, sólo se encuentra lleno de agua destilada. Cada globo fabricado de forma correcta puede ser usado hasta para tres preparaciones si se hacen de forma continua y con materiales de calidad.



## 6.2. Efecto de la inhalación crónica de tolueno sobre el peso corporal.



**Figura 27.** Curso temporal que muestra el aumento de peso corporal de los animales durante las ocho semanas de exposición a tolueno. Los datos se representan como la media del peso en gramos  $\pm$  e.e. (n=5). \* $p < 0.05$  vs. control; ANOVA de dos vías, prueba de Tukey.

Antes de realizar los experimentos de corazón aislado y perfundido, las ratas se expusieron a tolueno (4000 ppm, 30 minutos, 2 veces al día por 60 días) o a aire, tiempo durante el cual se llevó a cabo el registro de su peso, consumo de alimento y de agua. La figura 27 muestra el curso temporal del aumento de peso corporal de las ratas expuestas a tolueno en comparación con el grupo control expuesto sólo a aire.

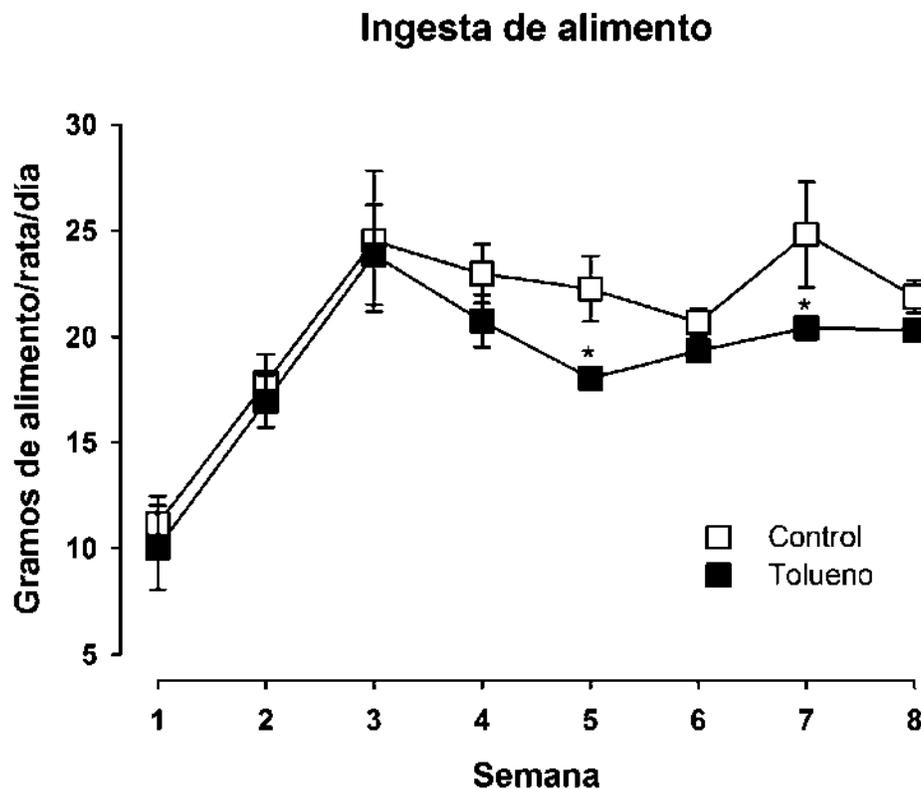
El peso correspondiente a la semana cero es el peso inicial de las ratas justo antes de comenzar su respectivo tratamiento. El aparente descenso hasta la semana 2 corresponde a la adaptación de los animales al alimento proporcionado. A partir de la semana 6 hubo una diferencia significativa en el peso de las ratas expuestas a tolueno en comparación con las ratas control, observándose que las expuestas al disolvente aumentaron menos de peso que las



expuestas a aire. Después de terminar el periodo de exposición las ratas fueron sacrificadas para realizar las respectivas CCR a adrenalina.

### 6.3. Efecto de la inhalación crónica de tolueno sobre la ingesta de agua y de alimento.

En la figura 28 se observa que existe una marcada tendencia del grupo expuesto a tolueno a consumir menor cantidad de alimento que el grupo control presentándose diferencias estadísticas significativas en las semana cinco y siete.

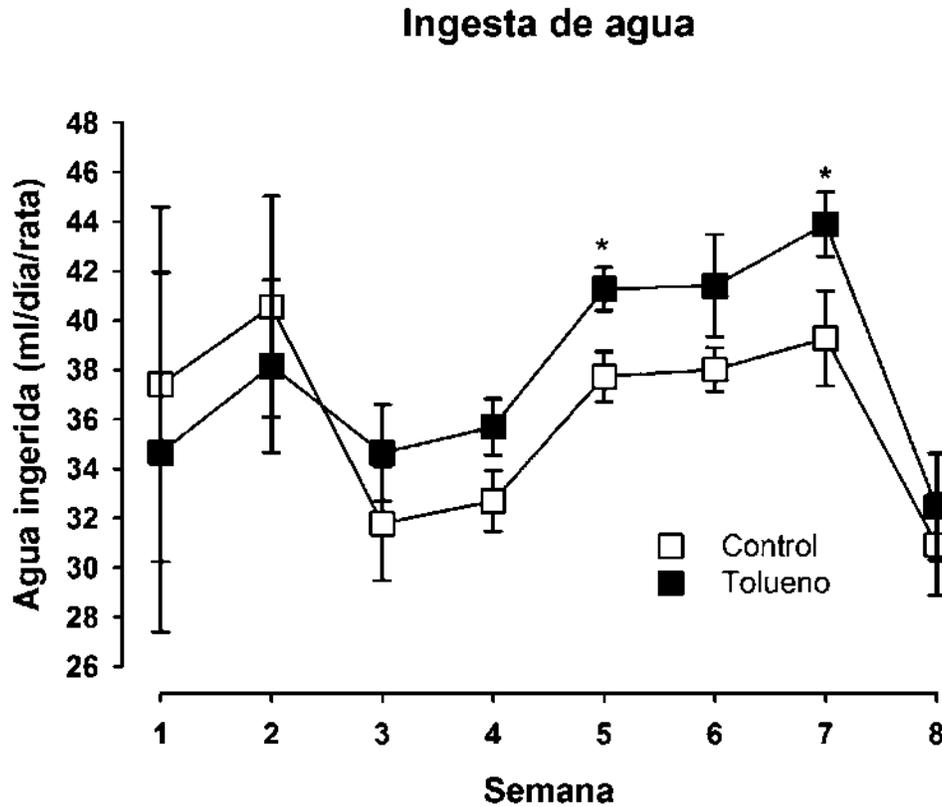


**Figura 28.** Curso temporal del consumo de alimento por rata por día a lo largo de las ocho semanas del periodo de exposición. Los datos se representan como la media del peso de alimento consumido (en gramos) por rata por día en cada semana  $\pm$  e.e. (n=5). \* $p < 0.05$  vs. control; ANOVA de dos vías, prueba de Tukey.

En la figura 29 se grafica el consumo de agua en mililitros por día por rata a lo largo de las ocho semanas del tratamiento. Se aprecia una tendencia de las ratas del grupo expuesto a tolueno a ingerir una mayor cantidad de agua a partir de la tercera semana de exposición y en



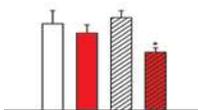
las semanas 5 y 7 existen diferencias estadísticas significativas entre las ratas del grupo expuesto a tolueno y el grupo control.



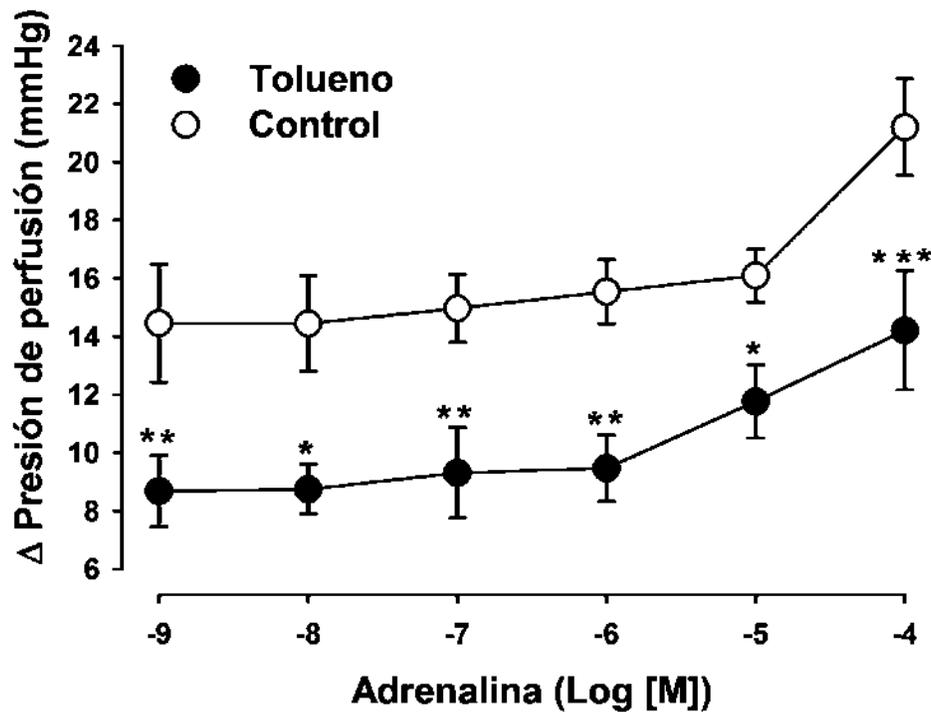
**Figura 29.** Curso temporal del consumo de agua por rata por día a lo largo de las ocho semanas del periodo de exposición. Los datos se representan como la media del volumen de agua ingerida (en mililitros) por rata por día en cada semana  $\pm$  e.e. (n=5). \* $p < 0.05$  vs. control; prueba *t* de Student.

#### 6.4. Efecto de la inhalación crónica de tolueno sobre la presión de perfusión.

La figura 30 muestra el efecto de concentraciones crecientes de ADR sobre la PP en corazones aislados de ratas expuestas de forma repetida a tolueno (4000 ppm, 30 minutos, 2 veces al día por 60 días) y de ratas control expuestas sólo a aire. Al comparar los dos grupos, se observa que existe un aumento en la PP, el cual fue dependiente de la concentración de ADR. Además, se aprecia un desplazamiento hacia debajo de la CCR correspondiente al grupo expuesto a tolueno, el cual mostró diferencia estadísticamente significativa para toda la CCR.



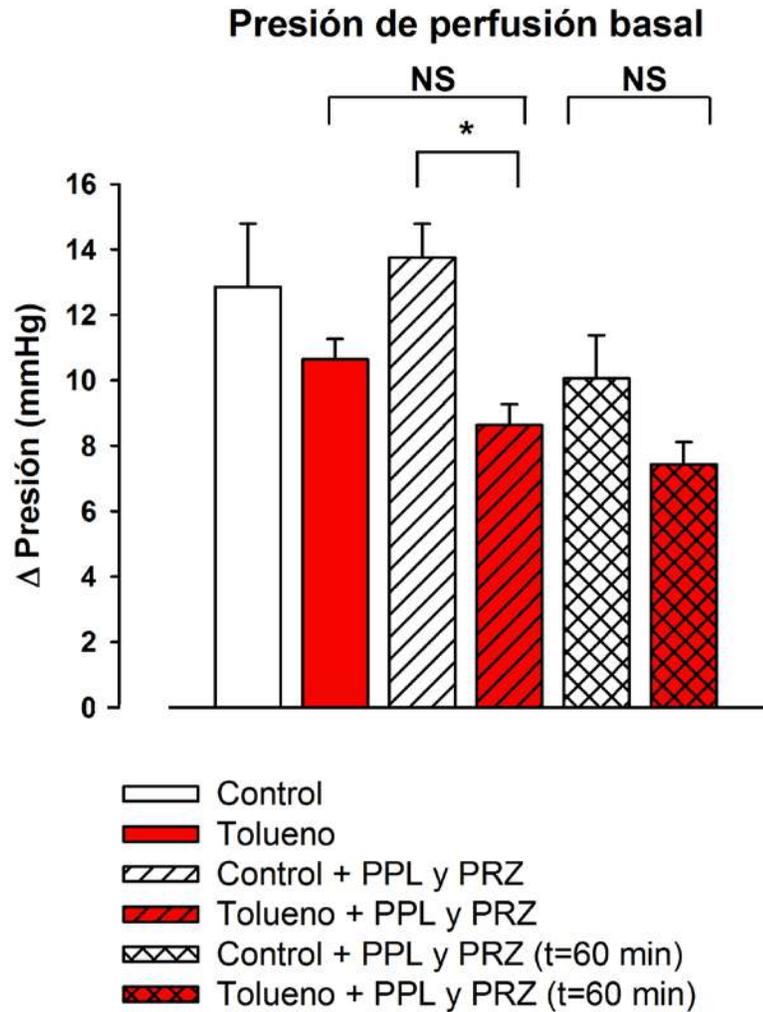
## Presión de perfusión



**Figura 30.** Efecto de la adrenalina sobre la presión de perfusión. Los datos se representan como la media de la diferencia entre el valor basal medio y el valor de presión de perfusión máximo después de la administración de la ADR  $\pm$  e.e. (n=5). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. control; ANOVA de dos vías, prueba de Tukey.

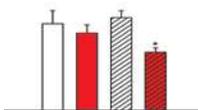
Pensando en que las diferencias observadas en la figura 30 entre los corazones del grupo expuesto a tolueno y los corazones de animales control no se debieran únicamente a la estimulación adrenérgica y que pudiera ser un efecto inducido por la inhalación de tolueno sobre los valores basales de la PP, se compararon las diferencias de presión de perfusión basales de ambos grupos (figura 31), hallándose una tendencia del grupo expuesto a tolueno a presentar una menor diferencia de presión en su registro; sin embargo, esta diferencia no llegó a ser estadísticamente significativa al compararlo con el grupo control. Cabe mencionar que este efecto observado es independiente de la administración de la ADR. Por otro lado, al comparar los valores de la PP basal en presencia de PPL y PRZ sí se observa una menor PP basal en el grupo de corazones expuestos a tolueno al compararse contra el grupo control (figura 31).

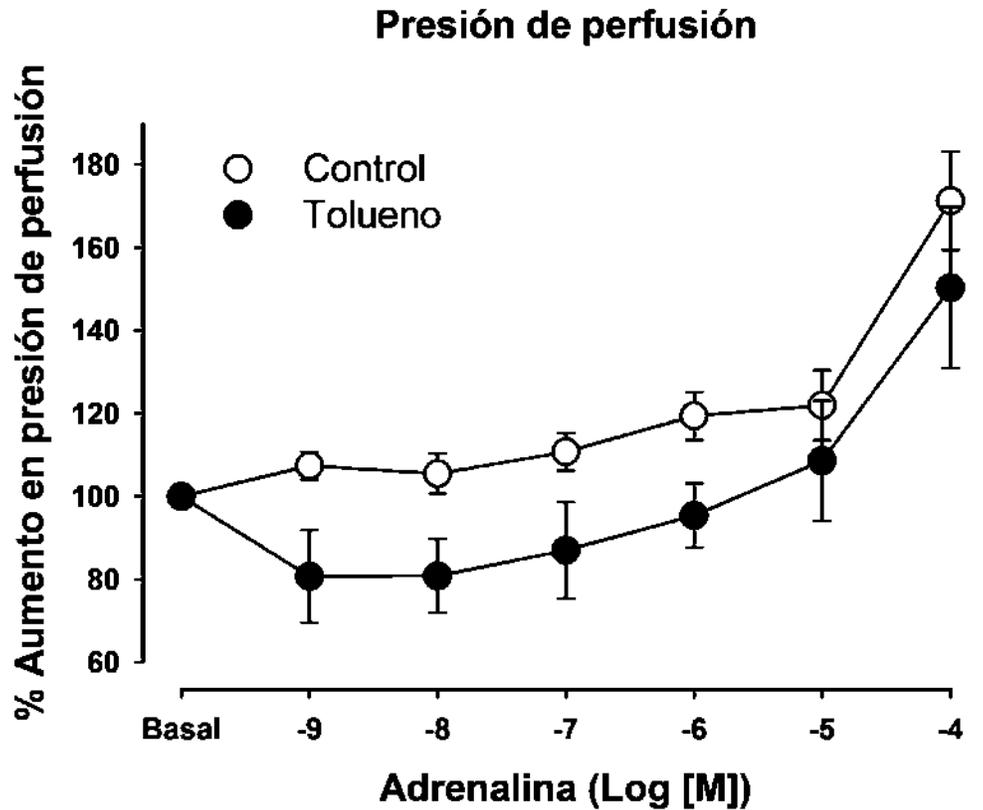




**Figura 31.** Efecto del tolueno sobre la presión de perfusión basal. Los datos se presentan como la media de la diferencia de presión máxima y mínima (rango) del registro basal + e.e. (n=5). \* $p < 0.05$  vs. control + PPL y PRZ. No significativo (NS). ANOVA de dos vías, prueba de Tukey.

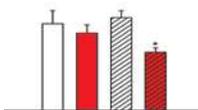
Si bien la diferencia de los valores basales de PP a tiempo 0 no alcanza a ser estadísticamente significativa, al graficar la CCR observada en la figura 30 como porcentaje de aumento de PP, las interacciones entre los puntos individuales pierden el nivel de significancia observado, pero se alcanza a apreciar un efecto vasorelajante, inducido por la exposición crónica a tolueno, desde la concentración más baja de ADR. Este efecto no se observa en la CCR del control (figura 32).



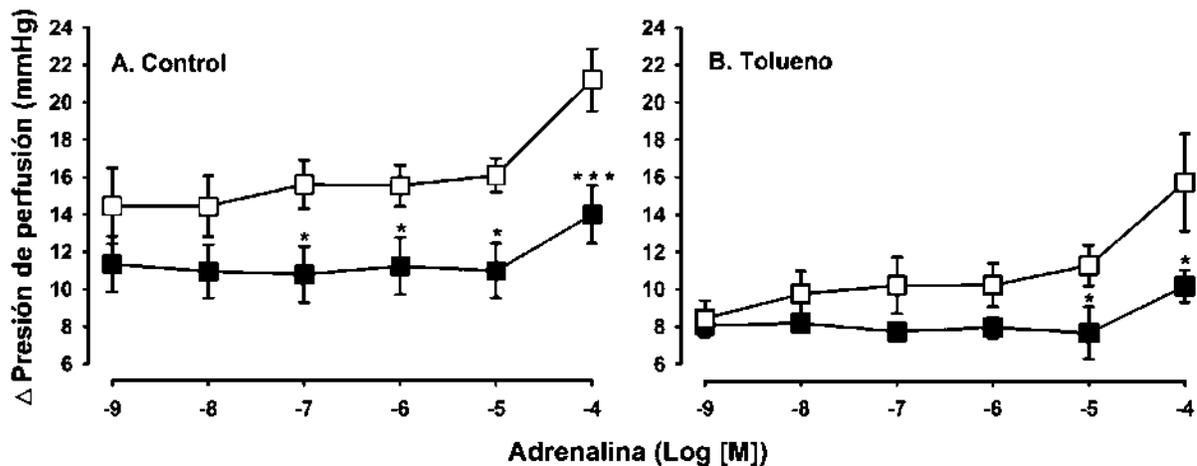


**Figura 32.** Efecto de la adrenalina sobre el porcentaje de aumento en la presión de perfusión. Los datos se representan como la media del porcentaje de aumento de presión vs. Su respectivo valor de presión basal después de la administración de la ADR  $\pm$  e.e. (n=5). No existen diferencias estadísticamente significativas. ANOVA de dos vías; prueba de Tukey.

En la figura 33 se graficaron las CCR para el efecto de la ADR sobre la PP en los corazones control (A) y expuestos a tolueno (B) en presencia y en ausencia de los antagonistas adrenérgicos PPL y PRZ ( $1 \times 10^{-6}$  M y  $6.35 \times 10^{-7}$  M, respectivamente). Tanto para el grupo expuesto a tolueno como para el grupo control, la respuesta presora de la ADR se abate en presencia de los antagonistas llegando a existir diferencias estadísticamente significativas a lo largo de toda la curva control y en las concentraciones más altas de ADR para el grupo expuesto a tolueno.



### Presión de perfusión en presencia de antagonistas



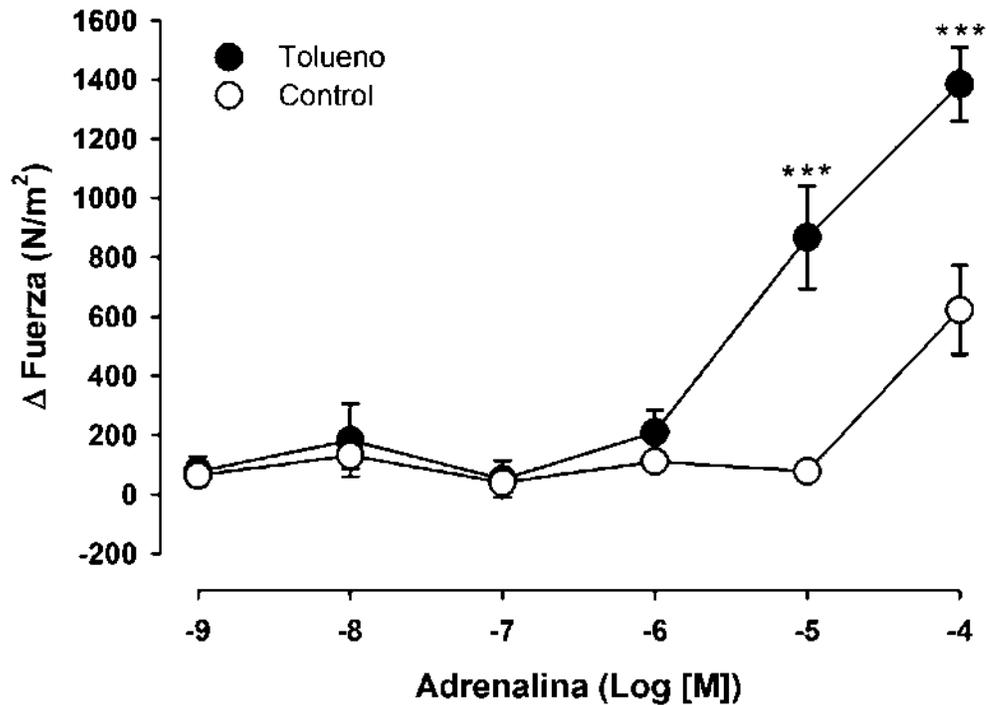
**Figura 33.** Curvas concentración-respuesta que muestran el efecto de la adrenalina sobre la presión de perfusión en ausencia y en presencia de los antagonistas adrenérgicos (PPL  $1 \times 10^{-6}$  M y PRZ  $6.35 \times 10^{-7}$  M). A. Corazones control; B. Corazones expuestos a tolueno. Los datos se presentan como la media de la diferencia entre los valores de presión máximos antes y después de la administración de la ADR en ausencia de los antagonistas (□) y en presencia de los antagonistas (■)  $\pm$  e.e. (n=5). \* $p < 0.05$  \*\*\* $p < 0.001$  vs. control o tolueno en presencia de antagonistas; ANOVA de dos vías, prueba de Tukey.

#### 6.5. Efecto de la inhalación crónica de tolueno sobre la fuerza de contracción ventricular.

La figura 34 muestra el efecto de concentraciones crecientes de ADR sobre la fuerza de contracción ventricular en corazones aislados de ratas expuestas de forma repetida a tolueno (4000 ppm, 30 minutos, 2 veces al día por 60 días) y ratas control expuestas sólo a aire. Se puede observar un aumento en la FCV dependiente de la concentración de ADR tanto en el grupo de tolueno, como en el grupo control. No obstante, el aumento de la FCV fue mayor en los corazones expuestos al disolvente, dicho efecto mostró una diferencia estadísticamente significativa a las 2 concentraciones más altas de ADR.



### Fuerza de contracción ventricular

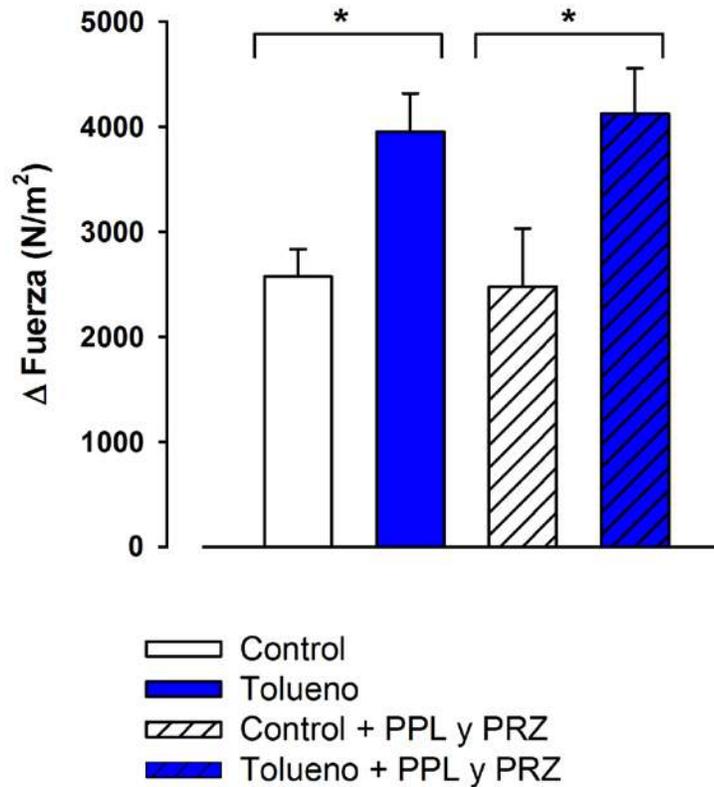


**Figura 34.** Curva concentración-respuesta que muestra el efecto de la adrenalina sobre la fuerza de contracción ventricular (efecto inotrópico). Los datos se presentan como la media de la diferencia entre los valores de presión máximos antes y después de la administración de la ADR  $\pm$  e.e. (n=5). \*\*\*p<0.001 vs. control; ANOVA de dos vías, prueba de Tukey.

Por otro lado, al montar y perfundir el corazón de las ratas que fueron expuestas a tolueno, se observó una mayor amplitud en el registro hecho por el globo ventricular, el cual se traduce como un efecto inotrópico mayor. La figura 35 muestra la FCV basal, expresada como la diferencia de presión del registro hecho por el globo ventricular para ambos grupos (tolueno y control), indicando que, a mayor diferencia de presión, mayor fuerza de contracción ventricular. Se puede observar que tanto en ausencia como en presencia de los antagonistas PPL y PRZ, los corazones de ratas expuestas a tolueno presentaron una mayor FCV que los corazones provenientes de ratas control. Cabe mencionar que este efecto observado es independiente de la administración de la ADR.



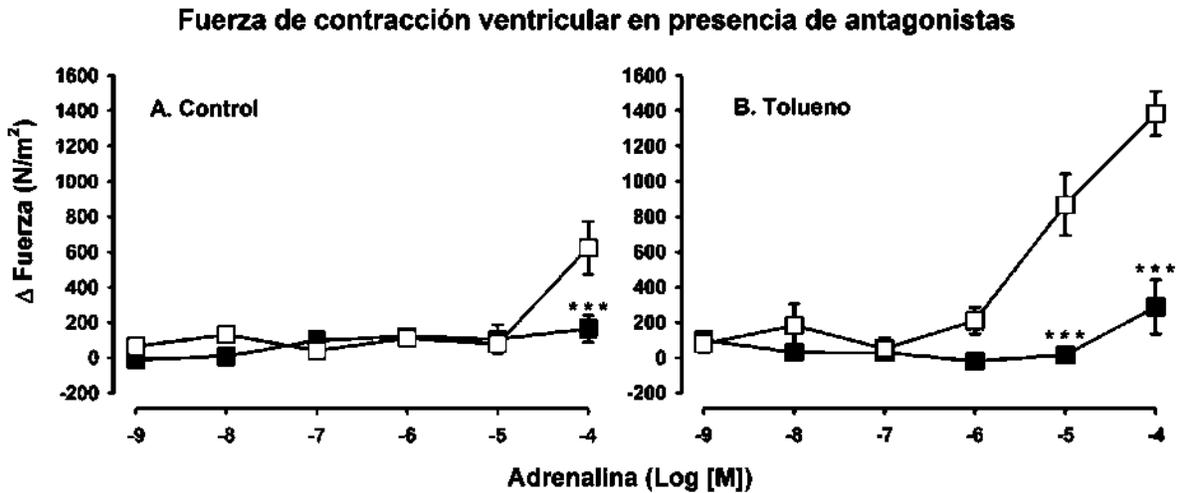
### Fuerza de contracción ventricular basal



**Figura 35.** Efecto del tolueno sobre la fuerza de contracción ventricular basal. Los datos se presentan como la media de la diferencia de presión máxima y presión mínima (rango) del registro basal + e.e. (n=5). \*p<0.05 vs. control; ANOVA de dos vías, prueba de Tukey.

De igual manera que para la PP, se evaluó el efecto de la ADR sobre la FCV en presencia y en ausencia de PPL y PRZ (figura 36), encontrándose que la presencia de antagonistas adrenérgicos abatió el efecto de la ADR sobre la FCV hallándose diferencia estadística significativa en el último punto y en los 2 últimos puntos para las gráficas correspondientes a los corazones control y expuestos a tolueno, respectivamente.





**Figura 36.** Curvas concentración-respuesta que muestran el efecto de la adrenalina sobre la fuerza de contracción ventricular en ausencia y en presencia de antagonistas adrenérgicos (PPL  $1 \times 10^{-6}$  M y PRZ  $6.35 \times 10^{-7}$  M) A. Corazones control; B. Corazones expuestos a tolueno. Los datos se presentan como la media de la diferencia entre los valores de presión máximos antes y después de la administración de la ADR en ausencia de los antagonistas (□) y en presencia de los antagonistas (■)  $\pm$  e.e. (n= 5). \*\*\* $p < 0.001$  vs. control; ANOVA de dos vías, prueba de Tukey.

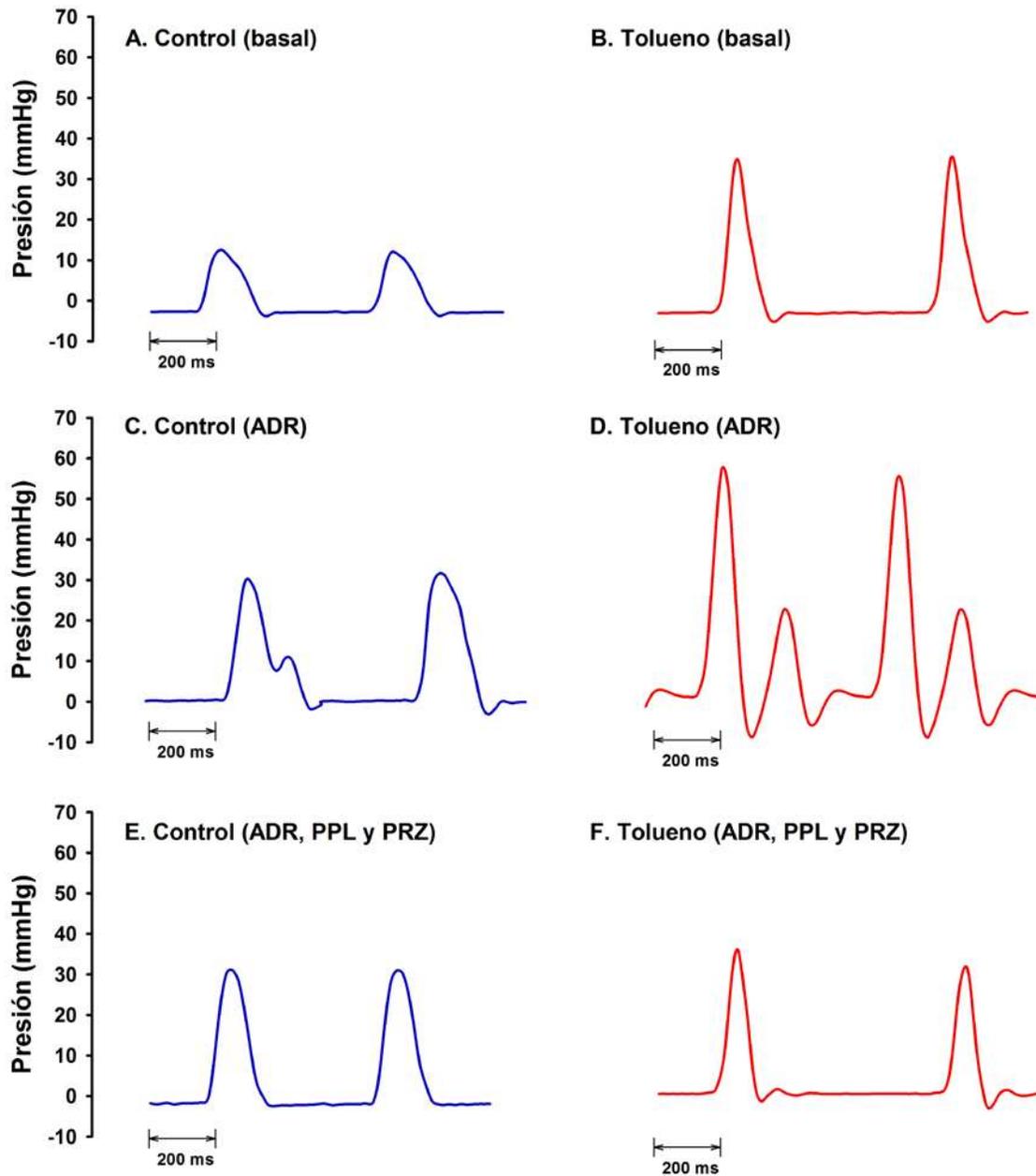
### 6.6. Efecto de la inhalación crónica de tolueno sobre las arritmias ventriculares inducidas por la adrenalina

La administración de ADR produjo la aparición de arritmias ventriculares observándose como irregularidades en el ciclo contráctil ventricular izquierdo en el 80% de los animales tanto del grupo control como del expuesto a tolueno; sin embargo, las arritmias ventriculares observadas difieren tanto en su intensidad como en el número de episodios por unidad de tiempo en ambos grupos (figura 37-C y 37-D).

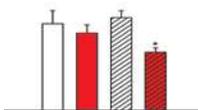
Para el caso del perfil de las arritmias presentes en el registro del grupo expuesto a tolueno, éstas son de mayor intensidad y amplitud y perduran por un tiempo mayor en contraste con aquéllas observadas en los registros del grupo control donde apenas son apreciados de uno a tres episodios dentro del rango de efecto de la ADR.



## Ciclo contráctil ventricular izquierdo

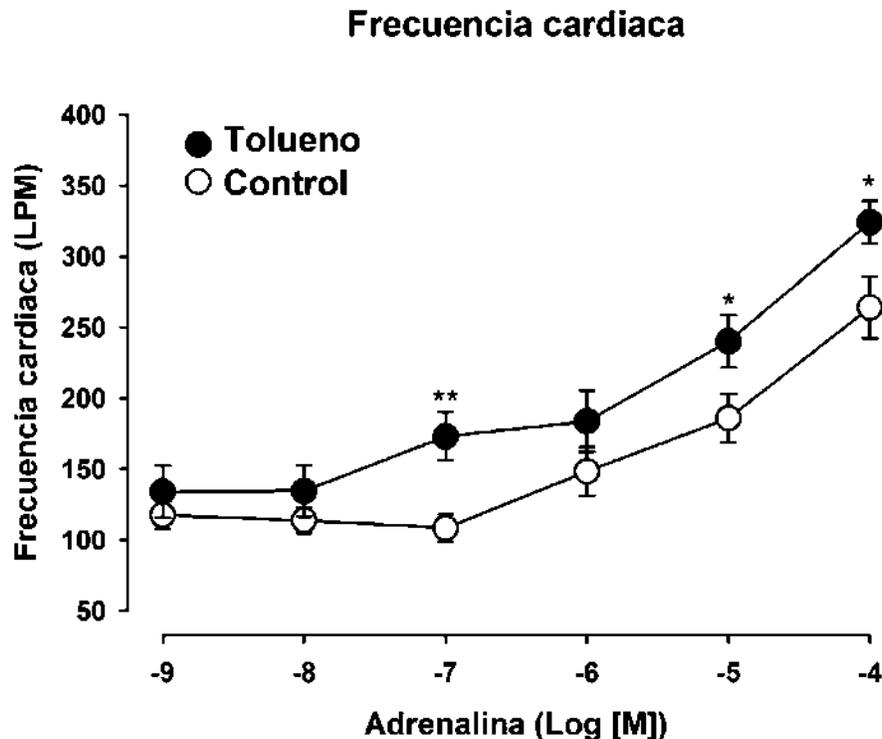


**Figura 37.** Estado basal del ciclo contráctil ventricular izquierdo de los corazones control (A) y de los corazones expuestos a tolueno (B). Perfil de las arritmias ventriculares inducidas por la administración de la solución más concentrada de adrenalina equivalente a 36 ng del agonista adrenérgico. Perfil del ciclo contráctil ventricular izquierdo para el grupo control (C) y perfil del ciclo cardiaco para los corazones expuestos a tolueno (D). Perfil del ciclo contráctil ventricular izquierdo de los corazones control (E) y de los corazones expuestos a tolueno (F) al administrar adrenalina en presencia de propranolol y prazosina. Los datos se expresan como los valores de presión máximos a lo largo de un periodo de 2 ciclos.



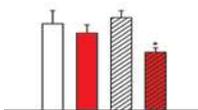
Las arritmias ventriculares observadas en la figura 37-C y 37-D no aparecen en los mismos registros cuando se adicionan los antagonistas PPL y PRZ a la preparación (figura 37-E y 37-F).

### 6.7. Efecto de la inhalación crónica de tolueno sobre la frecuencia cardiaca.

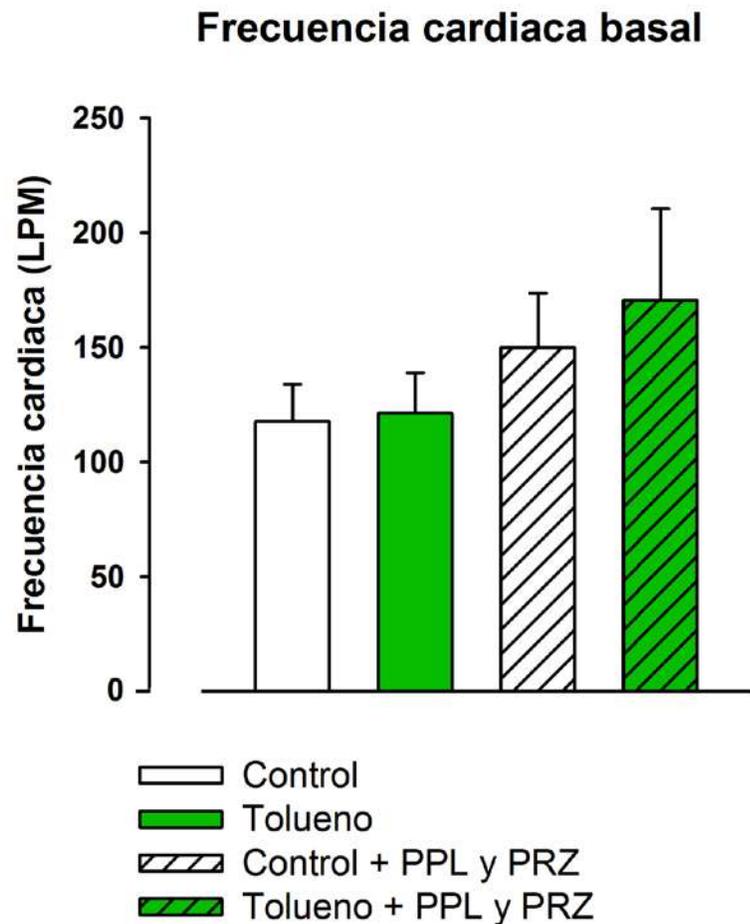


**Figura 38.** Curvas concentración-respuesta que muestran el efecto de la adrenalina sobre la frecuencia cardiaca (efecto cronotrópico). Los datos se presentan como la media de los valores de frecuencia en LPM después de la administración de la ADR  $\pm$  e.e. (n=5). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$  vs. control; ANOVA de dos vías, prueba de Tukey.

La figura 38 muestra el efecto de concentraciones crecientes de ADR sobre la frecuencia cardiaca (FC) en corazones aislados de ratas expuestas de forma repetida a tolueno (4000 ppm, 30 minutos, 2 veces al día por 60 días) y de ratas control expuestas sólo a aire. Se observa un aumento en la FC de forma dependiente de la dosis tanto para el grupo control, como para el grupo expuesto a tolueno. Sin embargo, el grupo expuesto a tolueno muestra un mayor aumento en la frecuencia cardiaca, en contraste con su homólogo sólo expuesto a aire, presentándose diferencias estadísticamente significativas. No hay cambios en los valores



basales de FC, aunque existe una tendencia a la alta de los corazones de ambos grupos en presencia de PPL y PRZ al compararlos consigo mismos en ausencia de antagonistas (figura 39).

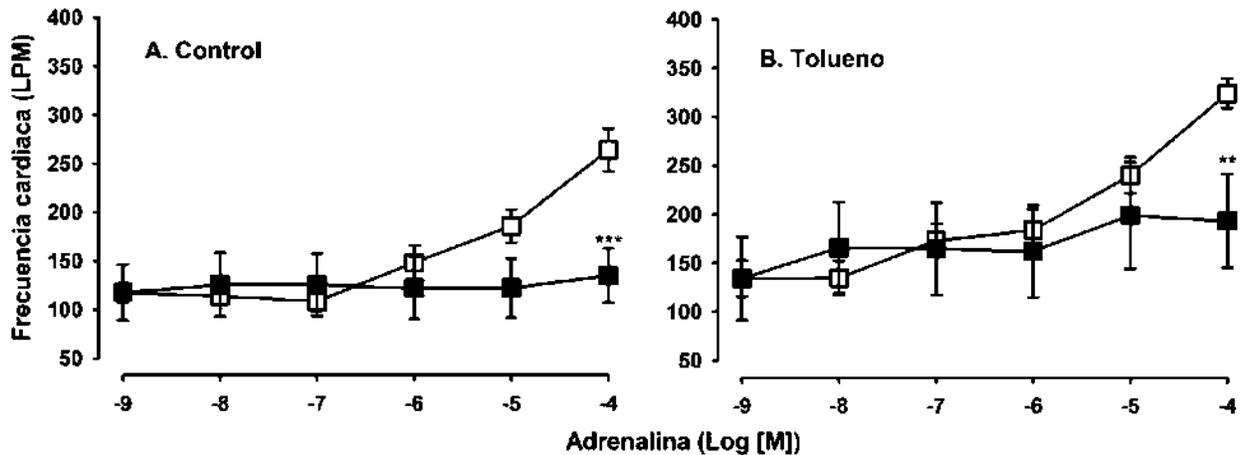


**Figura 39.** Efecto del tolueno sobre la frecuencia cardiaca. Los datos se presentan como la media de la frecuencia cardiaca en LPM + e.e. (n=5). No existen diferencias estadísticamente significativas. ANOVA de dos vías; prueba de Tukey, prueba *t* de Student.

En la figura 40 se muestran las CCR para el efecto de la ADR sobre la FC en ausencia y en presencia de PPL y PRZ de corazones expuestos a tolueno y a aire. Para ambos grupos el efecto cronotrópico positivo inducido por la ADR se ve abatido en presencia de los antagonistas adrenérgicos (PPL y PRZ), encontrándose diferencias estadísticamente significativas a la concentración más alta de ADR.



## Frecuencia cardiaca en presencia de antagonistas



**Figura 40.** Curva concentración-respuesta que muestra el efecto de la adrenalina sobre la frecuencia cardiaca en ausencia y presencia de antagonistas adrenérgicos (PPL  $1 \times 10^{-6}$  M y PRZ  $6.35 \times 10^{-7}$  M). . Corazones control; B. Corazones expuestos a tolueno. Los datos se presentan como la media de los valores de frecuencia en LPM después al administrar la ADR en ausencia de los antagonistas (□) y en presencia de los antagonistas (■)  $\pm$  e.e. (n=5). \*\*p<0.005 \*\*\*p<0.001 vs. control; ANOVA de dos vías, Prueba de Tukey.

Una vez terminadas las CCR, los corazones fueron retirados del equipo y pesados en una balanza analítica, observándose que no hubo diferencia estadística significativa entre la media del peso de los corazones del grupo control contra el grupo expuesto a tolueno ( $p=0.086$  vs. control. Prueba t de Student) ni al comparar el peso proporcional del órgano de acuerdo al peso corporal de los grupos expuestos al disolvente y a aire ( $p=0.598$  vs. Control, prueba t de Student).

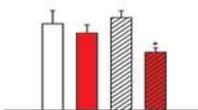


## 7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El fenómeno de muerte súbita por inhalación es una de las fronteras del conocimiento con las que se enfrenta el estudio de los disolventes volátiles como drogas de abuso, y los hallazgos realizados a partir de este trabajo podrán ayudar a comprender más a fondo los mecanismos por los que los VOCs producen este fenómeno.

Comenzaremos con resumir los resultados obtenidos para discutirlos de forma más organizada:

1. Se estandarizó la técnica para aislar y perfundir el corazón de rata siguiendo los lineamientos establecidos por Langendorff, hasta obtener registros fieles de la respuesta del corazón.
2. La inhalación crónica de tolueno indujo un menor aumento de peso en ratas jóvenes, así como menor consumo de alimento y mayor consumo de agua.
3. La inhalación crónica de tolueno lleva a facilitar la perfusión coronaria (presión de perfusión) en el corazón aislado de rata, así como a un menor efecto contráctil a nivel de éstos mediado por la ADR, en contraste con el grupo control.
4. A nivel del miocardio, la inhalación crónica de tolueno produjo la sensibilización de este tejido al efecto de la ADR, lo cual se tradujo en una mayor fuerza contráctil (efecto inotrópico positivo).
5. La inhalación crónica de tolueno por sí sola, indujo una mayor contracción basal comparada con la del grupo control.
6. Se observó la presencia de arritmias ventriculares, representadas como variaciones en el perfil del ciclo cardiaco de contracción ventricular, tanto en el grupo control como en el grupo expuesto a tolueno en respuesta a la administración de las soluciones más concentradas de ADR, dichas arritmias además se intensificaron en el grupo de corazones expuestos a tolueno.
7. La inhalación crónica de tolueno indujo un mayor efecto cronotrópico positivo en los corazones de ratas expuestas a tolueno que en los corazones control, en respuesta a la administración de ADR.



8. El uso de los antagonistas adrenérgicos PPL y PRZ en la preparación, produjo el abatimiento del efecto inotrópico y cronotrópico de la ADR sobre el corazón aislado de rata, así como disminución de la PP.

Resulta interesante que la inhalación de 4000 ppm de tolueno llevó a que se dieran tanto fenómenos de sensibilización como fenómenos de desensibilización en los parámetros cardiovasculares estudiados. Partiendo del consenso experimental de que el tolueno, -como miembro del grupo de los VOCs- parece interactuar únicamente con canales iónicos operados por voltaje o por ligando (Becstead *et al.*, 2000; Cruz *et al.*, 1998 y 2000; Bale *et al.*, 2002; Lopreato *et al.*, 2003; Shafer *et al.*, 2005, Gauthereau *et al.*, 2005; Del Rea *et al.*, 2006; Woodward *et al.*, 2004) y no con receptores metabotrópicos como es el caso de los receptores adrenérgicos, ya sean de tipo  $\alpha$  o  $\beta$ . Los efectos, observados en el grupo expuesto a tolueno luego de la estimulación con ADR, no parecen ser debidos a una interacción directa de este último con alguno de los receptores adrenérgicos, sino tal vez a una acción indirecta o a alteraciones en la vía transduccional adrenérgica. Sin embargo, se requieren más experimentos para elucidar estos efectos.

Se ha descrito que en el síndrome de muerte súbita las causas puede deberse a varias razones como son anomalías congénitas a nivel estructural de arterias coronarias, estenosis de válvula aórtica, prolapso de la válvula mitral, miocarditis, cardiomiopatía hipertrófica, hipertensión, arritmias hereditarias o adquiridas, además de otras causas como alteraciones metabólicas y hemodinámicas, catecolaminas y abuso de drogas como cocaína y metanfetaminas (Zipes, 2005).

Es un hecho conocido que el tolueno comparte muchas características farmacológicas con el etanol (Evans y Balster, 1991), incluso se ha observado que este último puede producir el síndrome de muerte súbita como lo hace el tolueno (Dyer *et al.*, 1977; Wannamethee y Shaper, 1992; Chiuve *et al.*, 2010). De la misma forma, la razón por la cual el etanol produce muerte súbita no está del todo clara, al igual que con el tolueno, así que la información hallada al



respecto para el etanol nos proporcionará un punto de partida para explicar nuestros hallazgos. Igualmente, la información disponible de otros inhalables servirá igualmente para indagar un mecanismo de acción probable.

### 7.1. Estandarización de la técnica de corazón aislado y perfundido tipo Langendorff

Sólo unos pocos modelos experimentales de órgano aislado se han usado tan extensamente como la preparación de corazón aislado según Langendorff. Desde su desarrollo ha sido empleada por biólogos, fisiólogos, médicos y farmacólogos para desentrañar los conocimientos referentes al funcionamiento del corazón.

Con el desarrollo de técnicas moleculares podría pensarse que este tipo de preparaciones quedaría en desuso; sin embargo, lo enriquece, ya que se pueden realizar desde estudios sobre el efecto de un solo gen en la fisiología del corazón hasta estudios de nuevos fármacos y efectos protectores de isquemia y estudio de arritmias (Skrzypic-Spring *et al.*, 2006; Riascos *et al.*, 2004).

### 7.2. Efecto de la inhalación crónica de tolueno sobre el peso corporal y consumo de agua y alimento

No son muchos los reportes que hablan del efecto de la inhalación de disolventes sobre el consumo de alimento y sus implicaciones en el desarrollo.

Un estudio de Gauthereau *et al.* (2009) en el que expusieron ratas en edad adulta a tolueno, xileno o benceno (6000 ppm para cada disolvente) no mostró diferencias de peso en contraste con el grupo control, excepto para el caso del grupo expuesto a benceno.

A partir de este estudio, hallamos que la edad de los animales influye sobre la menor ganancia de peso, ya que en nuestro estudio se usaron ratas jóvenes, cuyo desarrollo, al parecer, se vio mermado por la inhalación de tolueno. Aún faltaría ver si este efecto es



dependiente de la concentración de tolueno, ya que en nuestros experimentos se emplearon concentraciones de 4000 ppm y Gauthereau *et al.* usaron 6000 ppm, lo que no lo hace aún, del todo comparable.

Recientemente, Duncan *et al.* (2012) expusieron ratas de 24 días de nacimiento a una inhalación de tolueno (3000 ppm) de manera crónica e intermitente por 30 días, observándose un retardo en la ganancia de peso a partir de cinco semanas de iniciada la exposición. Estos datos concuerdan con los obtenidos por nuestro equipo de trabajo con la única diferencia de que la edad de los animales que se incluyeron en nuestro estudio alcanza los dos meses de nacimiento, edad que cae dentro del rango correspondiente a la adolescencia para las ratas (Laviola *et al.*, 2001).

Como una primera teoría que explique el menor aumento de peso de las ratas expuestas a tolueno podríamos mencionar alguna relación con la vía de señalización del sistema endocanabinoide, y que pudiera relacionarse con la tendencia de los animales de este grupo a consumir menos alimento que sus homólogos del grupo control y que se afianza por los periodos en los que existe una diferencia estadística significativa entre los gramos de alimento consumido por ambos grupos.

Existen evidencias que ligan al receptor CB1 con comportamiento relacionado con el consumo de alcohol y otras drogas relacionadas. Así, en un estudio de Houchi *et al.*, (2005) y Thanos *et al.* (2005), ratones knockout para el receptor CB1 mostraron una menor preferencia condicionada inducida por etanol que el control "silvestre".

El receptor CB1 también ejerce una gran influencia regulatoria sobre el consumo de alcohol, premisa hecha a partir de la disminución en el consumo de etanol inducida por la administración del antagonista selectivo para CB1: SR141716A, en ratones con predisposición al consumo del etanol (C57BL/6) (Arnone *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2003)



Al observar que la razón principal de un menor aumento de peso en el grupo de animales expuestos a tolueno pudiera ser solamente un menor consumo de alimento se esperaba que fuera reversible. Duncan *et al.* (2012) observaron que en su protocolo de exposición la disminución de peso podía revertirse. Luego de 8 semanas que duró el periodo de exposición, se presentó un periodo de abstinencia; la diferencia de peso era evidente después de 12 días de abstinencia, pero luego de 8 semanas de abstinencia ya no había diferencias estadísticamente significativas entre el peso de las ratas del grupo control y el grupo expuesto a tolueno.

De otra forma, partiendo del supuesto de que el comer y la adicción al tolueno estuvieran ligadas a un sistema de recompensa, la disminución de alimento consumido por los animales expuestos a tolueno llevaría a suponer que comenzó a desarrollarse una adicción (en este caso al tolueno inhalado), por lo que la droga sería preferida sobre el alimento. En términos de neurotransmisión, el gusto por la comida está estrechamente relacionado con la acción de las benzodiazepinas y sistemas opioides que llevan a facilitar el consumo de comida y agua (Shimura *et al.*, 2002).

En cuanto al comer, el sistema de recompensa contiene al área tegmental ventral, el núcleo accumbens y el *pallidum* ventral y finalmente se envía información al área hipotalámica lateral donde se encuentra el centro de la alimentación (Berridge y Robinson, 1998; Wise, 2002). Lesiones en el área tegmental ventral suprimieron el consumo de sacarosa en ratas sin afectar el consumo de otros sabores o agua (Shimura *et al.*, 2002)

De manera similar, se ha estudiado el efecto del tolueno sobre su papel sobre neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral. En un estudio hecho por Riegel *et al.* (2007) se encontró que el tolueno activa selectivamente neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral identificándose una concentración suficiente para activar directamente la neurotransmisión mesoacúmbica tanto en rebanadas de cerebro de ratas Sprague-Dawley como directamente por microdiálisis de tolueno *in vivo*.



Asimismo, se puede pensar que también se está produciendo una alteración de la percepción del sabor, como lo observado por Gauthereau *et al.* (2009). En ese reporte, ratas macho de la cepa Wistar fueron expuestas crónicamente a tolueno, a xileno o a benceno (6000 ppm,) desarrollándose una conducta de aumento en el consumo de solución de glutamato (sabor umami), sugiriendo entonces que la inhalación de disolventes ocasiona una alteración en la conducta de alimentación en ratas.

### 7.3. Muerte súbita por inhalación

La muerte súbita por inhalación de disolventes (e incluso otros tipos de muerte súbita), constituye un misterio médico y el que pueda ocurrir en personas, incluso después de la primera inhalación de disolventes o luego de un periodo crónico de exposición, la hacen aún más incomprensible (Shepherd, 1989). Aunado a esto, la morbilidad y mortalidad se ven aumentadas a causa de algunos métodos de administración como cubrir nariz y boca con una bolsa conteniendo el disolvente, lo que puede ocasionar asfixia (Bowen, 2011). Por este y otros factores, el abuso de VOCs ha sido reconocido en México como un reto para la prevención de su consumo por varias décadas (Medina-Mora *et al.*, 1997; Ortiz *et al.*, 2009).

La muerte súbita por inhalación puede también ocurrir directa e inmediatamente por anoxia, disfunción cardíaca (Adgey *et al.*, 1995), reacciones alérgicas extremas, heridas graves a los pulmones o depresión del SNC (Bowen *et al.*, 1999; Shepherd, 1989).

Observando algunos de los efectos puntuales que indujo el tolueno sobre los corazones de las ratas que fueron expuestas a tolueno, existen alteraciones marcadas a varios niveles dentro de los parámetros cardíacos que consideramos. Esas anormalidades observadas en los corazones expuestos a tolueno podrían sugerir síntomas tempranos de algún tipo de disfunción cardíaca o al menos alteraciones puntuales.



Para este caso en particular, la presión de perfusión basal (figura 31) se ve disminuida en los corazones de ratas expuestas a tolueno en comparación con los corazones control (menor capacidad de contracción), pero esta diferencia sólo fue significativa en el momento en el que los corazones están en presencia de los antagonistas; sin embargo, sería más fácil suponer que lo observado se debe un daño tisular y no a una respuesta a nivel adrenérgico, ya que no existe presencia de ningún agonista adrenérgico cuya respuesta pudiera ser bloqueada por los antagonistas (PPL y PRZ), además de que no hay evidencia de que por sí solos pudieran actuar como agonistas inversos.

El efecto descrito arriba nos estaría hablando de que se produce una degradación más rápida de las preparaciones Langendorff de los corazones expuestos a tolueno; para que esto tenga sentido, es necesario observar que la baja en la presión de perfusión parece producirse también en los corazones control, (aunque sólo sea una tendencia) pero después de un tiempo largo (t=60 min), esperando que en tiempos mayores a 60 min realmente exista una diferencia que lleve a soportar este hecho (figura 31). Si bien esto se observa *in vitro*, sería difícil predecir si se trata de un determinante para que ocurra la muerte súbita por inhalación de tolueno; sin embargo, se requieren más estudios al respecto.

Shepherd (1989), habla de la inducción de taquiarritmias ventriculares como una posible hipótesis para que se produzca la muerte súbita por inhalación, esto como producto de una sensibilización cardíaca a la ADR. Si bien el perfil de contracción ventricular izquierdo registrado (figura 37-D) parece ser propio de taquiarritmias ventriculares y las curvas concentración-respuesta correspondientes a la FCV (figura 34) parecen indicar que existe una sensibilización cardíaca, falta información que pueda entenderse como una correspondencia entre estos dos hechos.



#### 7.4. Efecto de la inhalación crónica de tolueno sobre la presión de perfusión.

Para comprender lo observado con la PP hablaremos del músculo liso vascular, ya que un aumento de la PP es un efecto primordialmente inducido sobre los vasos coronarios (Broadley, 1970). El efecto observado en nuestros resultados acerca de este parámetro cardiovascular se traduce como una menor contracción de los vasos del seno coronario de los corazones del grupo expuesto a tolueno comparado con los corazones del grupo control de forma independiente de la concentración (figura 30).

El fenómeno de hipotensión derivado de una exposición crónica como la que se observa en el presente trabajo, quizás tiene origen en una inducción del tolueno a cambiar las características de unión de agonistas o antagonistas con receptores a monoaminas acoplados a proteínas G, como ocurre con el receptor a serotonina (Celani *et al.*, 1983; Yamawaki *et al.*, 1982), el receptor a dopamina (Celani *et al.*, 1983; Hillefors-Berglung *et al.*, 1995) y receptores muscarínicos (Tsunaga y Honma, 2000).

Por ejemplo, un tratamiento subagudo con tolueno llevó a una reducción de la afinidad en el sitio de unión de la [3H]spiperona para el receptor a dopamina tipo D2 en el *striatum* y para receptores corticales a [3H]-5-HT. Según Celani *et al.* (1983), esto sugiere que se llevaría a cabo una regulación a la baja en las sinapsis, ya que para operar requieren una mayor cantidad de NT. Después de una exposición crónica, este efecto estaría aumentado. Aunque es cierto que el tolueno puede afectar la unión del ligando con su receptor, hablando de receptores a monoaminas, esto podría o no ocurrir en receptores cardiacos, ya que este efecto no se representa en todas las regiones del cerebro para receptores muscarínicos (Tsunaga y Honma, 2000).

Una teoría que podría ser más apegada a lo que sucede, se basa en un reporte hecho por Maki *et al.* en 1996, en él observaron que la activación de AR- $\alpha$  en miocitos de ratas



neonatas podía regular la expresión de canales de calcio tipo-L produciéndose un decremento en el ARNm que codifica para este canal.

Directamente, la activación de PKC resulta en un decremento de la corriente de calcio  $I_{Ca-L}$  por fosforilación del canal de calcio tipo-L inhibiendo la actividad del mismo (Kamp y Hell, 2000). También se ha establecido que la activación de AR- $\alpha_1$  no afecta la  $I_{Ca-L}$  en miocitos ventriculares de ratas adultas, pero su estimulación conlleva un incremento de la  $I_{Ca-L}$  en miocitos de ratas neonatas (Liu *et al.*, 1994)

Como la  $I_{Ca-L}$  no se ve modificada en ratas adultas, parece ser que tampoco se produciría la disminución del ARNm que codifica para el canal de calcio tipo-L por la sola estimulación adrenérgica; sin embargo, el bloqueo de este canal iónico por el tolueno sí podría producir un aumento en la densidad del canal en los miocitos ventriculares; de ser así la mayor entrada de calcio actuaría como regulador negativo sobre la expresión de los AR- $\alpha_1$  disminuyendo la población del receptor adrenérgico según un mecanismo recíproco a aquél establecido por Maki *et al.* (1996).

En la aseveración anterior, se estableció el posible mecanismo para lo que podría ser una desensibilización  $\alpha_1$ -adrenérgica sobre el músculo liso vascular, que conlleva a una menor contracción del músculo, pero también existe la posibilidad de que en lugar de un mecanismo de desensibilización  $\alpha_1$ -adrenérgica ocurriera un mecanismo de sensibilización  $\beta$ -adrenérgica que llevaría a una mayor relajación de los vasos del seno coronario.

La sensibilización beta adrenérgica inducida por el tolueno se corrobora por los datos obtenidos sobre la fuerza de contracción ventricular (donde la FCV es mayor en los corazones del grupo expuesto a tolueno, figura 34) y sobre la frecuencia cardiaca ya que el tolueno indujo de igual modo un aumento en este parámetro (figura 38).



En cuanto al músculo liso de los vasos coronarios, de entre los receptores adrenérgicos del tipo  $\beta$ , los AR- $\beta_1$  son los receptores predominantes en conductos coronarios grandes de varias especies como humanos (Amenta et al., 1991), monos, perros (Toda y Okamura, 1990), vacas (Purdy, 1988), ratas y cerdos. Sin embargo, varios estudios hechos con radioligandos han demostrado la presencia de un número importante de AR- $\beta_2$  en vasos coronarios (Schwartz y Velly, 1983). Observaciones *in vivo* muestran que la vasodilatación mediada por ADR o ISO involucra AR-  $\beta_1$  y AR- $\beta_2$  (Vatner *et al.*, 1986; 1981).

Hay un acuerdo general que dice que los AR- $\beta_2$  son el subtipo predominante en la microcirculación coronaria. A través de estudios de radioligando en secciones transmurales de corazón de perro se llegó a la conclusión de que las arteriolas (16-55  $\mu\text{m}$  de diámetro) contienen predominantemente AR- $\beta_2$  (Murphree y Saffitz., 1988); sin embargo, en estudios similares en preparaciones de anillos aislados de arterias coronarias intramurales de rata se sugirió la participación de los AR- $\beta_1$  en vasorelajación (Nyborg y Mikkelsen, 1985).

A partir de estos antecedentes, de haber un aumento en la población de estos receptores en vasos coronarios (ya sea AR- $\beta_1$  y/o AR- $\beta_2$ ) posterior a la exposición a tolueno (sección 7.5), se estaría explicando, al menos en parte, el descenso observado en la PP para los corazones expuestos a tolueno al administrar las primeras concentraciones de ADR.

En cuanto a lo observado sobre la PP basal, al no existir una diferencia estadísticamente significativa entre los valores de PP en ausencia de ADR de los corazones expuestos a tolueno y los que fueron expuestos a aire, la diferencia observada entre los valores basales de PP cuando se adicionan los antagonistas podría suponerse que son producto de daño tisular en los corazones de ratas expuestas a tolueno.

Por otro lado, el bloqueo de la respuesta basal en el caso de la presión de perfusión en presencia de tolueno y los resultados sobre la FCV (en donde se aprecia que no hay diferencias con los antagonistas) podría sugerir el efecto de un tono simpático modesto que se hace



evidente en los corazones expuestos a tolueno. Asimismo, el tono presente afecta de forma diferencial la presión de perfusión y la FCV de tal forma que la presencia de este tono es insuficiente para modificar la FCV tanto en la ausencia como en la presencia del tolueno.

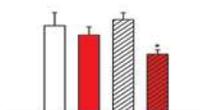
### 7.5. Efecto de la inhalación crónica de tolueno sobre la fuerza de contracción ventricular

A partir de la CCR para la FCV podríamos comenzar a especular sobre la presentación de un fenómeno de sensibilización a nivel adrenérgico inducido por la exposición a tolueno. De acuerdo a nuestros resultados pudimos observar que sí se produce un aumento en la sensibilidad a ADR en este parámetro, ya que en las CCR a ADR en presencia de PPL y PRZ se aprecia claramente que se abate la respuesta contráctil del músculo cardiaco.

También podríamos suponer que el tolueno produce una alteración sobre la afinidad de los agonistas y antagonistas adrenérgicos para unirse con su receptor, en este caso el AR- $\beta$ , pero existe evidencia que podría refutar esta posibilidad, ya que en un estudio de Tsunga *et al.* (1999) el tolueno no fue capaz de alterar la unión de del agonista con el AR- $\beta_2$  expresado en células de ovario de hámster chino.

Por otro lado, el tolueno es capaz de afectar la formación de cAMP, alterando la señal transduccional mediada por la inhibición de carbacol sobre la formación de adenilato ciclasa en el subtipo M2 de los receptores muscarínicos. El tolueno además atenúa la actividad de la carbamilcolina aumentándose la formación de cAMP; sin embargo, este efecto no se observa al evaluar el efecto del tolueno sobre la estimulación mediada por AR- $\beta_2$ , en donde apenas facilitó de forma leve la formación de cAMP (Tsuga *et al.*, 1999).

Lo anterior puede funcionar como un antecedente para llegar a proponer un posible mecanismo de acción del tolueno sobre la FCV del corazón de rata luego de una exposición crónica. Debido a que los AR- $\beta_1$  presentes en el miocardio llevan a cabo su función por acoplamiento con la proteína Gs, de la misma manera que los AR- $\beta_2$  en el experimento de



Tsunga *et al.* (1999), podríamos pensar que de igual forma no habría un aumento significativo en la formación de cAMP, por lo que nos deja como opción el siguiente paso en la vía transduccional, que es la activación del canal de calcio. Este canal puede activarse de forma directa por la subunidad  $\alpha_s$  de la proteína Gs, así que podría ocurrir una alteración en éste, lo que llevaría a una alteración en el efecto inotrópico y cronotrópico inducido por la ADR.

Se sabe que el tolueno es capaz de inhibir las corrientes de calcio  $I_{Ca}$  mediadas por los canales de calcio tipo-L dependientes de voltaje (Shafer *et al.*, 2005). Sin embargo, el tolueno tiene un efecto contrario en los canales intracelulares sensibles a rianodina alojados en el RS (Maclver, 2009).

Según los experimentos hechos por Maclver (2009) sobre preparaciones de rebanadas de cerebro, se observa que el tolueno es capaz de incrementar las corrientes postsinápticas de forma persistente aún en la presencia de  $Cd^{+2}$ , (usado para bloquear la entrada de calcio a la célula), este efecto del tolueno es bloqueado en células pretratadas con rianodina (bloqueador de canal de calcio sensible a cafeína), por lo que concluyen que el tolueno estimula la liberación de calcio del RS.

Si bien los reportes hechos por Shafer y Maclver se refieren a canales neuronales, podría suponerse que se puede producir el mismo efecto en sus homólogos cardiacos; a partir de estas premisas podemos proponer un mecanismo de acción para la posible sensibilización adrenérgica a nivel de la FCV, inducida por la inhalación crónica de tolueno.

En una primera etapa, al haber una disminución en el influjo de calcio al citoplasma inducida por el bloqueo del tolueno sobre los canales de calcio tipo-L, se propiciaría una regulación a la alta de este canal iónico para contrarrestar el efecto depresor del disolvente. Además de eso, podría pensarse que la liberación de iones de calcio desde el RS, contribuye de alguna manera a la inactivación de los canales de calcio. Esto ocurre porque el calcio del RS liberado al espacio citosólico puede ser sentido por los canales de calcio tipo-L, de esta



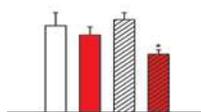
manera, considerando que el tolueno promueva la salida de calcio del RS a través de los receptores RYR2, se esperaría el aumento en la densidad de canales de calcio tipo-L (Sham *et al.*, 1995; Sham 1997).

Se ha reportado un aumento en la densidad de canales de calcio tipo-L funcionales en cardiomiocitos de pacientes con alcoholismo crónico y sin ningún tipo de cardiomiopatía (Fatjó *et al.*, 2007), lo que se podría extrapolar a los efectos del tolueno para fundamentar el mecanismo pensado; además, pensando en que el tolueno es capaz de bloquear las  $I_{Ca-L}$  (Shafer *et al.*, 2005) se pueden comparar sus efectos con un fármaco bloqueador de canales de calcio como el verapamil.

En un estudio hecho por Schoder *et al.* (2007) se observó que después de 24 h de tratamiento constante de ratones con verapamil, se indujo un aumento en el ARNm que codifica para el canal iónico, así como un aumento en la expresión de proteína analizada mediante Western blot y en la  $I_{Ca-L}$  en configuración de célula completa.

Un estudio hecho por Maki *et al.* (1996) demostró que la actividad adrenérgica podía regular la expresión de los canales de calcio tipo-L; una mayor actividad adrenérgica vía PKA (AR- $\beta$ ) llevaría a un aumento tanto en la población de canales de calcio tipo-L, como en el ARNm para el mismo canal y por otro lado la entrada de corrientes de calcio tipo-L, en respuesta a la estimulación beta-adrenérgica, actúa como un regulador negativo del efecto de la estimulación del AR- $\beta$  en la actividad de la adenilato ciclasa y por ende aumentar la población del AR- $\beta$  (Yu *et al.*, 1993).

A partir de las premisas anteriores, en una segunda etapa en la sensibilización adrenérgica ventricular, el aumento en la población de canales de calcio tipo-L podría propiciar el aumento de los AR- $\beta$ . Se sugiere que se pudiera estar presentando un posible aumento en la densidad de AR- $\beta$ , ya que el aumento en la respuesta de contracción se abate por la adición de antagonistas adrenérgicos. Además de esto, es interesante que en los experimentos hechos



por Maki *et al.* (1996), luego del aumento de la corriente de calcio tipo-L inducida por agonistas adrenérgicos, ocurre un aumento de esta corriente al medirla mediante la técnica de “patch clamp” en la configuración de célula completa, aún en ausencia del agonista adrenérgico. Esto explicaría, al menos en parte, el aumento en la FCV basal observado en los corazones de ratas que fueron expuestas a tolueno.

En otro panorama, ya que el tolueno puede disminuir la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Na}^{+}$  a la célula (Shafer *et al.*, 2005; Gauthereau *et al.*, 2005) se podría producir una alteración significativa en el intercambio de estos dos iones y quizás también la reducción de calcio en el retículo sarcoplásmico; de ser así, consecuentemente se podría llevar a la disminución de la fuerza contráctil y a la larga podría desencadenar el fenómeno de sensibilización presuntamente observado en forma de un mecanismo de regulación homeostática.

#### 7.6. Efecto de la inhalación crónica de tolueno sobre las arritmias ventriculares

En nuestros experimentos, la administración de ADR, por sí sola, provoca arritmias ventriculares en los corazones de rata, como se observa en la figura 37; estos datos concuerdan con los obtenidos por Lessard *et al.* en 1976, en los que altas concentraciones de ADR producen arritmias ventriculares en el modelo de corazón aislado de conejo, en animales sin manipular.

Por otro lado, la presencia de estas arritmias cardiacas se ve intensificada y aumentada en número de episodios por unidad de tiempo en los corazones de ratas expuestas de forma crónica a tolueno, lo que no concuerda con el mismo estudio hecho por Lessard *et al.* (1976), ya que ellos llegaron a la conclusión de que el freón no tiene un efecto sensibilizante sobre las arritmias cardiacas inducidas por la ADR *in vitro*; sin embargo, las condiciones de estudio y el inhalable utilizado son diferentes, mientras que en nuestro estudio se administró el tolueno de manera crónica por vía inhalatoria, Lessard *et al.* (1976) lo realizaron directamente sobre la preparación *in vitro* por periodos cortos, lo que parece no ser suficiente para inducir la



sensibilización, además de que los registros de la época no permiten un análisis tan minucioso como el hecho por nuestro equipo de investigación al permitimos el acercamiento al registro digital y observación directa del ciclo contráctil ventricular izquierdo gracias a un mejor equipamiento que el que existía en aquella época.

Cabe aclarar que los reportes existentes sobre el aumento en la intensidad de arritmias ventriculares por la administración conjunta de inhalables y catecolaminas exógenas son escasos y en condiciones de tipo agudo, siendo ésta la primera vez que se habla de la inducción de este efecto después de una administración crónica de tolueno en modelos experimentales con animales.

La inducción de arritmias ventriculares intensificadas por la administración de inhalables se reportó por primera vez por Levy (1914), quien demostró que el desarrollo de fibrilación ventricular en perros bajo anestesia profunda con cloroformo ocurre después de la inyección intravenosa de ADR usando agentes sensibilizantes como cloroformo y ciclopropano; más tarde, en otro reporte hecho por Lessard *et al.* en 1977 se encontró que el freón induce sensibilización al efecto arritmogénico de la ADR en el modelo de conejo anestesiado. Sin embargo, esto se hace evidente a concentraciones de ADR mayores a los niveles circulantes de ADR naturales, como los que se observan bajo periodos de estrés y similares a las concentraciones de ADR que probamos en nuestro protocolo.

En un estudio más reciente, Noda y Hashimoto (2004) reportaron que después de la administración simultánea de halotano y ADR exógena en conejillos de indias a concentraciones de halotano de un 4% e infusión de ADR de 12.5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ , se producen arritmias en el 100% de los animales. Sin embargo, el mecanismo por el que cualquiera de los inhalables produce esta intensificación de arritmias resulta incierto.

Zukerman y Wheeler (1991) especularon que uno de los posibles mecanismos para la intensificación en las arritmias inducidas por halotano en células cardíacas aisladas podría



deberse a una propagación alterada de impulsos eléctricos como una reducción del flujo de iones  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Na}^{+}$ , si bien se trata de un experimento de exposición aguda *in vitro*, podría funcionar como punto de partida.

Ahora se sabe que el tolueno puede alterar el paso de iones de  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Na}^{+}$  y  $\text{K}^{+}$  a través de las membranas celulares disminuyendo su flujo (Shafer *et al.*, 2005; Cruz *et al.*, 2003; Del Rea *et al.*, 2006), de ahí que quizás el mecanismo arritmogénico del tolueno en presencia de catecolaminas pudiera estar relacionado también con alteraciones similares a las observadas por Zukerman y Wheeler.

Además, una posible liberación espontánea de  $\text{Ca}^{+2}$  del RS de las células cardiacas inducida por tolueno podría conducir a movimientos contráctiles erráticos que se pudieran traducir como arritmias (Noda y Hashimoto, 2004).

No obstante, el mecanismo propuesto anteriormente podría aplicarse solamente en periodos de exposición aguda, en los que el efecto y la administración del tolueno son puntuales. En lo que se refiere a la exposición crónica a tolueno y nuestro modelo, en el que no hay disolvente presente en la preparación de corazón aislado, el efecto intensificador del tolueno permanece; para este caso, podrían participar alteraciones en la conducción de impulsos provenientes del nodo SA o modificaciones en la formación de estos impulsos. En este caso, estaríamos hablando quizás de corrientes amplificadas derivadas de una regulación a la alta de canales iónicos.

Otros investigadores como Maze y Smith (1983) pusieron especial atención sobre receptores adrenérgicos. Ellos indicaron los  $\text{AR-}\beta_1$  juegan un papel esencial en el desarrollo de taquiarritmias ventriculares en experimentos con perros anestesiados con halotano, a diferencia de los  $\text{AR-}\beta_2$  que carecen de algún papel (Hayashi *et al.*, 1991), de esta forma, la mayor densidad de receptores adrenérgicos, corroborada a nivel funcional con el experimento para la FCV, parecería tener repercusión sobre este fenómeno.



Observando que las arritmias ventriculares inducidas por ADR, no aparecen en la presencia de PPL y PRZ (figura 37-E y 37-F), podemos suponer un mecanismo adrenérgico como el especulado por Maze y Smith (1983).

Al encontrar que los reportes de Maze y Smith, Zukerman y Wheeler, Lessard y Noda, y Hashimoto concuerdan entre sí y podría decirse que también concuerdan con los resultados obtenidos a partir de nuestros experimentos, lo que impulsaría a suponer un mecanismo de acción similar para el caso de la inhalación de tolueno, aunque debido al periodo de exposición crónico realizado en este trabajo, quedan aún varias dudas por aclarar. Todo lo anterior sólo nos lleva a pensar que el mecanismo para la intensificación de arritmias ventriculares, sea cual sea, tiene un origen multifactorial y que se requieren más estudios al respecto.

### 7.7. Efecto de la inhalación de tolueno sobre la frecuencia cardiaca.

La automaticidad del nodo SA es responsable de iniciar el ritmo cardiaco. Esa automaticidad se genera por una acción sinérgica entre la activación y desactivación cíclica de los canales iónicos membranales (incluidos los canales de calcio tipo-L sensibles a voltaje) y los canales RYR2 del RS a través de la activación del intercambiador de sodio-calcio (NCX) (Bogdanov *et al.*, 2001; Joung *et al.*, 2011).

El aumento en la captación de calcio por los almacenes intracelulares, principalmente el retículo sarcoplásmico, incrementa el potencial de acción máximo al reducir la concentración de calcio citosólico y disminuir la corriente del NCX; esta hiperpolarización promueve el reclutamiento de corrientes marcapasos claves, como la  $I_{Ca-T}$  y la  $I_f$  (corriente activada por hiperpolarización). El aumento resultante en la entrada de calcio durante la despolarización del marcapasos incrementa su concentración provocando su liberación de los reservorios del RS e incrementando la corriente del NCX (Imtiaz *et al.*, 2010).

Son varias las corrientes iónicas que contribuyen al efecto cronotrópico de la estimulación  $\beta$ -adrenérgica. En un estudio hecho por Honjo *et al.*, (2003) sobre el nodo SA aislado de conejo, la adición de ISO tuvo un marcado efecto cronotrópico aun después del



tratamiento con rianodina, aumentando el ritmo espontáneo en un ~50%, lo que sugiere que la liberación de calcio del RS no es un factor dominante en la acción del marcapasos durante la estimulación  $\beta$ -adrenérgica normal en el nodo SA de mamíferos.

En el nodo SA aislado de conejo, el ISO también incrementó las corrientes  $I_{Ca-L}$ ,  $I_K$ , e  $I_{st}$  (corriente entrante sostenida), cambió las curvas de activación de la  $I_{K,r}$  (corriente rectificadora de potasio) e  $I_f$ , y aceleró la desactivación de la  $I_{K,r}$  (Zaza *et al.*, 1996; Lei *et al.*, 2000). Todas estas acciones conjuntas contribuyen al efecto cronotrópico de la estimulación  $\beta$ -adrenérgica, aunque la desactivación y activación de  $I_{K,r}$  podría ser el factor más importante (Zhang *et al.*, 2001).

Dentro de la automaticidad del nodo SA, el tolueno puede afectar la expresión de corrientes iónicas mediadas por el canal RYR (McIver *et al.*, 2009), y del canal de calcio tipo-L y tipo-T (Shafer *et al.*, 2005), modificando la concentración de calcio citosólico y variando la acción sinérgica entre los ciclos que median la automaticidad del marcapasos; además podría afectar la corriente rectificadora de potasio.

Debido a que la regulación adrenérgica se hace primordialmente a través de los canales de calcio tipo-L (Maki *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 1993) y esta corriente contribuye al efecto cronotrópico positivo de la estimulación  $\beta$ -adrenérgica se esperaría que el efecto cronotrópico mayor se observara en el grupo expuesto a tolueno con relación al control, pero ya que la corriente de calcio tipo-L no es un factor dominante (sino más bien la activación e inactivación de la  $I_{K,r}$  (Zhang *et al.*, 2001)); esto explicaría que el grado de diferencia para la FC entre el grupo tolueno y el grupo control no alcanzara el grado de diferencia observado para la FCV.



## 8. CONCLUSIONES

La exposición a 4000 ppm de tolueno induce una menor ganancia de peso en ratas adolescentes (8 semanas).

La exposición repetida a 4000 ppm de tolueno indujo:

- Un aumento en la FCV y en la FC,
- La promoción de taquiarritmias ventriculares en presencia de ADR,
- Un menor aumento de la PP debido a una menor contracción de los vasos coronarios.

Todos los efectos anteriores están mediados por receptores adrenérgicos, ya que en todos los casos la respuesta resultante fue bloqueada por la presencia de PPL y PRZ.

Se sugiere una sensibilización del tejido cardiaco al efecto de la ADR en los corazones de ratas expuestas crónicamente a tolueno.

La exposición repetida a 4000 ppm de tolueno indujo también un aumento en la FCV basal, a través de un mecanismo que no es adrenérgico, ya que esta respuesta no se inhibe con la presencia de los antagonistas adrenérgicos PPL y PRZ

Este trabajo sienta las bases para comprender mejor el fenómeno de muerte súbita por inhalación después de un periodo crónico de exposición de tolueno; sin embargo, se requieren más experimentos para tratar de dilucidar los mecanismos involucrados.



## 9. PERSPECTIVAS

Se desea realizar estudios de biología molecular para comparar las poblaciones de los receptores y canales que se ha propuesto que contribuyen a los efectos observados en este trabajo.

Ya que el corazón está compuesto por varios tipos de tejido, se pretende diseñar experimentos en el que se pongan a prueba preparaciones celulares más simples como la aorta y las aurículas y el uso de agonistas y antagonistas selectivos.

Si bien el tolueno es el disolvente prototipo, se podrían llevar a cabo estudios de tipo estructura-actividad en el que se prueben otros disolventes en condiciones similares a las empleadas aquí.

## 10. REFERENCIAS

- Adgey AA, Johnston PW, McMechan S. Sudden cardiac death and substance abuse. *Resuscitation*, 1995; 29(3): 219-221
- Alfaro-Rodríguez A, Bueno-Nava A, González-Piña R, Arch-Tirado E, Vargas-Sánchez J, Ávila-Luna A. Chronic exposure to toluene changes to sleep-wake pattern and brain monoamine content in rats *Acta Neurobiol Exp* 2011; 71:183-192.
- Amenta F, Coppola L, Gallo P, Ferrante F, Forlani A, Monopoli A, Napoleone P. Autoradiographic localization of beta-adrenergic receptors in human large coronary arteries. *Circ Res* 68: 1591–1599, 1991.
- Arnone M, Maruani J, Chaperon F, Thiebot MH, Poncelet M, Soubrie P, Le Fur G. Selective inhibition of sucrose and ethanol intake by SR 141716, an antagonist of central cannabinoid (CB1) receptors. *Psychopharmacology (Berl)*. 1997; 132(1):104–106.
- Asencio E, Narváez R, Dorantes J, Oseguera J, Orea TA, Hernández RP, Rebollar V, Mont L, Brugada J. Conceptos actuales sobre la muerte súbita *Gac Méd Méx* 2005; 141(2):89-94.
- Arlien-Søborg P. Solvent neurotoxicity. CRC Press. Boca Raton, Florida. pp. 61-106, 1992.
- ATSDR. Agency for toxic substances and disease registry. U.S. Department of health and human services. Toxicological profile for toluene. Atlanta, Georgia. pp. 170-171, 2000.



- Ayres PH, Taylor DW. 1989. Solvents. En: Principles and methods of toxicology. Segunda edición. Hayes W ed Raven Pres, Ltd, Nueva York
- Bale AS, Smothers CT, Woodward JJ. Inhibition of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by the abused solvent, toluene. *British Journal of Pharmacol.* 2002; 137:375-383
- Bass M. Sudden sniffing death. *The Journal of the American Medical Association.* 212(12): 2075-2079, 1970.
- Balster RL. Neural basis of inhalant abuse. *Drug and Alcohol Dependence.* 1998; 51: 207-214.
- Beckstead MJ, Weiner JL, Eger EI, Gong DH, Mihic J. Glycine and  $\gamma$ -Aminobutyric acid<sub>A</sub> receptor function is enhanced by inhaled drugs of abuse. *Molecular Pharmacol.* 2000; 57:1199-1205.
- Benignus VA, Muller KE, Barton CN, Bittikofer JA. Toluene levels in blood and brain of rats during and after respiratory exposure. *Toxicol Appl Pharmacol* 1981; 61:326-334.
- Berridge KC, Robinson TE. What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Res Rev.* 1998;28:309-369
- Bloom FE. Neurotransmisión y sistema nervioso central. En: Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica 11 ed p.317-340
- Bogdanov KY, Vinogradova TM, Lakatta EG. Sinoatrial nodal cell ryanodine receptor and Na(+)-Ca(2+) exchanger: molecular partners in pacemaker regulation. *Circ Res.* 2001;88(12):1254-1258
- Boron WF, Boulpaep EL *Medical Physiology*
- Bowen SE. Two serious and challenging medical complications associated with volatile substances misuse: sudden sniffing death and fetal solvent syndrome. *Substance use & misuse.* 2011; 46:68-72.
- Bowen SE, McDonald P. Abuse Pattern of toluene exposure alters mouse behavior in a waiting-for-reward operant task. *Neurotoxicol Teratol.* 2009; 31(1):18-25
- Broadley KJ. An analysis of the coronary vascular responses to catecholamines, using a modified Langendorff heart preparation. *Br. J. Pharmac.* 1970; 40:617-629
- Celani MF, Fuxe K, Agnati LF, Andersson K, Hansson T, Gustafsson JA, Battistini N, Eneroth P. Effects of subacute treatment with toluene on central monoamine receptors in the rat. Reduced affinity in [<sup>3</sup>H]5-hydroxytryptamine binding sites and in [<sup>3</sup>H]spiperone binding sites linked to dopamine receptors. *Toxicol Lett* 1983; 17:275.281
- Chiuve SE, Rimm EB, Mukamal KJ, Rexrode KM, Stampfer MJ, Manson JE, *et al.* Light to Moderate Alcohol Consumption and Risk of Sudden Cardiac Death in Women. *Heart Rhythm.* 2010; 7(10):1374-1380



- Consejería de Sanidad Dirección General de Salud Pública Servicio de Sanidad Ambiental Región de Murcia. RIESGO QUÍMICO - ACCIDENTES GRAVES TOLUENO Murcia: Consejería de sanidad de la Región de Murcia; 2007
- Costanzi S, Siegel J, Tikhonova IG, Jacobson KA. Rhodopsin and others: a historical perspective on structural studies of protein-coupled receptors *Curr Pharm Des.* 2009; 15(35): 3994-4002.
- Crespo JA, Rodríguez CA. Bases neuroanatómicas, neurobiológicas y del aprendizaje de la conducta de adicción a la cocaína. *Revista Latinoamericana de psicología.* 2007; 39(1):83-107
- Cruz SL, Tooraj M, Thomas B, Balster RL, Woodward JJ. Effects of the abused solvent toluene on recombinant N-methyl-D-aspartate and non-N-methyl-D-aspartate receptors expressed in *Xenopus oocytes*. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 1998; 286:334-340.
- Cruz SL, Balster RL, Woodward JJ. Effects of volatile solvents on recombinant N-methyl-D-aspartate receptors expressed in *Xenopus oocytes*. *British Journal of Pharmacology.* 2000; 131:1303-1308.
- Cruz SL, Orta-Salazar G, Gauthereau MY, Millan-Perez Peña L, Salinas-Stefanón EM. Inhibition of cardiac sodium currents by toluene exposure. *Br J Pharmacol.* 2003 Oct;140(4):653-60
- Cruz SL and Bowen SE. Neural Mechanisms of action of drugs of abuse and Natural Reinforces. *J Pharmacol.* 2008; 61-87
- Del Rea AM, Dopico AM, Woodward JJ: Effects of the abused inhalant toluene on ethanol-sensitive potassium channels expressed in *oocytes* *Brain Res.* 2006; 1087(1):75-82
- Dinwiddie SH. Abuse of inhalants: a review. *Addiction.* 1994; 89: 925-939.
- Dohm C, Lichtor JL, Finn RS, Uitvlugt A, Coalson DW, Rupani G, de Wit H, Zacny JP. Subjective and psychomotor effects of nitrous oxide in healthy volunteers. *Behav. Pharmacol.* 1992; 3:19-30
- Doring HJ, Dehnert H. The isolated perfused heart according to Langendorff. *BVM-Biomesstechnie Verlag;* 1988
- Duncan JR, Dick AL, Egan G, Kolbe S, Gavrilesco M, Wright D, Lubman DI, Lawrence AJ. Adolescent toluene inhalation in rats affects white matter maturation with the potential for recovery following abstinence. *PLoS One.* 2012;7(9):e44790
- Dyer AR, Stamler J, Paul O, *et al.* Alcohol consumption, cardiovascular risk factors, and mortality in two Chicago epidemiologic studies. *Circulation* 1977;56:1067-74.
- Echeverria D, Fine L, Langolf G, Schork T, Sampaio C. Acute behavioral comparisons of toluene and ethanol in human subjects. *British Journal of Industrial Medicine.* 1991; 48: 750-761.



- Einav S, Amitai Y, Reichman J, Geber D. Bradycardia in toluene poisoning. *Journal of Toxicol. Clin. Toxicol.* 1997; 35(3):295-298.
- Encuesta Nacional de Adicciones (ENA, 2011). CONADIC/SSA, IMP, INEGI. Informe Ejecutivo, México, 2012.
- Evans EB, Balster RL. CNS depressant effects of volatile organic solvents. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews.* 1991; 15: 233-241.
- Fatjó F, Sancho-Bru P, Fernández-Solà J, Sacanella E, Estruch R, Bataller R, Nicolás JM. Up-regulation of myocardial L-type Ca<sup>2+</sup> channel in chronic alcoholic subjects without cardiomyopathy. *Alcohol Clin Exp Res.* 2007;31(7):1099-1105
- Flanagan RJ, Ives RJ. Volatile substance abuse. *Bull Narc.* 1994; 46:49-78.
- Flowers L. Toxicological review of toluene, CAS no. 108-88-3, EPA/635/R-05/004, 2-3, 2005.
- Galinkin JL, Janiszewski DJ, Young CJ, Klafta JM, Klock PA, Coalson DW, Apfelbaum JL, Zacny JP. Subjective, psychomotor, cognitive and analgesic effects of subanesthetic concentrations of sevoflurane and nitrous oxide. *Anesthesiology* 1997; 87:1082-1088.
- Ganong WF. *Fisiología médica* 18a ed. México: Editorial El Manual Moderno; 2002
- Gauthereau MY, Martínez-Revollar G, Plancarte-Miranda M, Girón-Abarca L, Campos-Campos B, Mercado-Camargo R. Effects of Chronic Solvent Abuse Exposure on Umami Taste Perception. *Proc. West. Pharmacol.Soc* 2009, 52:99-104.
- Gillies M, Bellomo R, Doolan L, *et al.* Bench –to-bedside review: Inotropic drug therapy alter adult cardiac surgery – a systematic literature review. *Critical Care* 2005; 9:266-279
- Goudi AJ, Emmett-Oglesby MW. *Psychoactive drugs: tolerance and sensitization.* Human Press, New Jersey; 1989
- Guyton Arthur C, Hall John E. *Guyton and Hall: Textbook of medical physiology* 12° ed. Editorial Mosby; 2011
- Hakalahti AE, Vierimaa MM, Lilja MK, Kumpula E, Tuusa JT and Petäjä-Repo UE. Human  $\beta_1$ -Adrenergic receptor is subject to constitutive and regulated N-terminal cleavage. *The JBC.* 2010; 285(37):28850-28861.
- Hayashi Y, Sumikawa K, Kuro M, *et al.* Roles of beta-1 and beta-2 adrenoceptors in the mechanisms of halothane myocardial sensitization in dogs. *Anesth Analg.* 1991;72:435–439.
- Hillefors-Berglung M, Liu Y, von Euler G. Persistent, specific and dose-dependent effects of toluene exposure on dopamine D2 agonist binding in the rat caudate-putamen. *Toxicology* 1995; 100:185-194



- Honjo H, Inada S, Lancaster MK, Yamamoto M, Niwa R, Jones SA, Shibata N, Mitsui K, Horiuchi T, Kamiya K, Kodama I, Boyett MR. Sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release is not a dominating factor in sinoatrial node pacemaker activity. *Circ Res*. 2003;92(3):41-44
- Houchi H, Babovic D, Pierrefiche O, Ledent C, Daoust M, Naassila M. CB1 receptor knockout mice display reduced ethanol-induced conditioned place preference and increased striatal dopamine D2 receptors. *Neuropsychopharmacology*. 2005; 30(2):339–349.
- Imtiaz MS, von der Weid PY, Laver DR, van Helden DF. SR Ca<sup>2+</sup> store refill--a key factor in cardiac pacemaking. *J Mol Cell Cardiol*. 2010; 49(3):412-26
- IUPHAR-DB. Richard A. Bond, David B. Bylund, Douglas C. Eikenburg, J. Paul Hieble, Rebecca Hills, Kenneth P. Minneman, Sergio Parra. Adrenoceptors:  $\beta$ 3-adrenoceptor. Last modified on 13/02/2012. Accessed on 09/03/2013. IUPHAR database (IUPHAR-DB), <http://www.iuphar-db.org/DATABASE/ObjectDisplayForward?objectId=30>.
- IUPHAR-DB Richard A. Bond, David B. Bylund, Douglas C. Eikenburg, J. Paul Hieble, Rebecca Hills, Kenneth P. Minneman, Sergio Parra. Adrenoceptors:  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptor. Last modified on 25/10/2012. Accessed on 09/03/2013. IUPHAR database (IUPHAR-DB), <http://www.iuphar-db.org/DATABASE/ObjectDisplayForward?objectId=22>.
- IUPHAR-DB Richard A. Bond, David B. Bylund, Douglas C. Eikenburg, J. Paul Hieble, Rebecca Hills, Kenneth P. Minneman, Sergio Parra. Adrenoceptors:  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptor. Last modified on 25/10/2012. Accessed on 09/03/2013. IUPHAR database (IUPHAR-DB), <http://www.iuphar-db.org/DATABASE/ObjectDisplayForward?objectId=23>.
- IUPHAR-DB Richard A. Bond, David B. Bylund, Douglas C. Eikenburg, J. Paul Hieble, Rebecca Hills, Kenneth P. Minneman, Sergio Parra. Adrenoceptors:  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptor. Last modified on 25/10/2012. Accessed on 09/03/2013. IUPHAR database (IUPHAR-DB), <http://www.iuphar-db.org/DATABASE/ObjectDisplayForward?objectId=24>.
- IUPHAR-DB Richard A. Bond, David B. Bylund, Douglas C. Eikenburg, J. Paul Hieble, Rebecca Hills, Kenneth P. Minneman, Sergio Parra. Adrenoceptors:  $\alpha_{2A}$ -adrenoceptor. Last modified on 16/02/2012. Accessed on 09/03/2013. IUPHAR database (IUPHAR-DB), <http://www.iuphar-db.org/DATABASE/ObjectDisplayForward?objectId=25>.
- IUPHAR-DB Richard A. Bond, David B. Bylund, Douglas C. Eikenburg, J. Paul Hieble, Rebecca Hills, Kenneth P. Minneman, Sergio Parra. Adrenoceptors:  $\alpha_{2B}$ -adrenoceptor. Last modified on 16/02/2012. Accessed on 09/03/2013. IUPHAR database (IUPHAR-DB), <http://www.iuphar-db.org/DATABASE/ObjectDisplayForward?objectId=26>.
- IUPHAR-DB Richard A. Bond, David B. Bylund, Douglas C. Eikenburg, J. Paul Hieble, Rebecca Hills, Kenneth P. Minneman, Sergio Parra. Adrenoceptors:  $\alpha_{2C}$ -adrenoceptor. Last modified on 16/02/2012. Accessed on 09/03/2013. IUPHAR database (IUPHAR-DB), <http://www.iuphar-db.org/DATABASE/ObjectDisplayForward?objectId=27>.
- IUPHAR-DB Richard A. Bond, David B. Bylund, Douglas C. Eikenburg, J. Paul Hieble, Rebecca Hills, Kenneth P. Minneman, Sergio Parra. Adrenoceptors:  $\beta_1$ -adrenoceptor. Last modified on



24/08/2012. Accessed on 09/03/2013. IUPHAR database (IUPHAR-DB), <http://www.iuphar-db.org/DATABASE/ObjectDisplayForward?objectId=28>.

- IUPHAR-DB Richard A. Bond, David B. Bylund, Douglas C. Eikenburg, J. Paul Hieble, Rebecca Hills, Kenneth P. Minneman, Sergio Parra. Adrenoceptors:  $\beta_2$ -adrenoceptor. Last modified on 05/10/2012. Accessed on 09/03/2013. IUPHAR database (IUPHAR-DB), <http://www.iuphar-db.org/DATABASE/ObjectDisplayForward?objectId=29>.
- Joung B, Chen PS, Lin SF. The role of the calcium and the voltage clocks in sinoatrial node dysfunction. *Yonsei Med J.* 2011;52(2):211-219
- Kamp TJ, Hell JW. Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C. *Circ Res* 2000;87:1095–102.
- Latarjet M, Ruiz Liard A. Anatomía Humana Vol II 3° ed. Montevideo, Uruguay: Editorial Médica Panamericana, S.A. 1995
- Laviola G, Pascucci T, Pieretti S (2001) Striatal dopamine sensitization to Damphetamine in periadolescent but not in adult rats. *Pharmacol Biochem Behav* 68: 115–124.
- Lei M, Brown HF, Terrar DA. Modulation of delayed rectifier potassium current,  $i_k$ , by isoprenaline in rabbit isolated pacemaker cells. *Exp Physiol.* 2000; 85: 27–35
- Lessard Y, Desbrosses S, Paulet G. De l'action du difluorodichlorométhane (FC12) et de l'adrénaline sur le cœur isolé de lapin. *C. R. Soc. Biol.* 1976; 170:654-660
- Lessard Y, Desbrosses S, Paulet G. Arrythmie cardiaque che le lapin sous l'action de l'adrénaline et du difluorodichlorométhane (FC12). *C. R. Soc. Biol.* 1977; 171:883-895
- Levy G. The genesis of ventricular extrasystoles under chloroform with special references to consecutive ventricular fibrillation. *Heart.* 1914;5:299–334.
- Liu Q-Y, Karpinski E, Pang PKT. The L-type calcium channel current is increased by alpha-1 adrenoceptor activation in neonatal rat ventricular cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;271:935–43.
- Lo PS, Chen HH Immunohistochemical localization of toluene-induced c-Fos protein expression in the rat brain. *Toxicol Lett* 2005; 157: 151–160.
- Lopreato GF, Phelan R, Borghese CM, Beckstead MJ, Mihic SJ. Inhaled drugs of abuse enhance serotonin-3 receptor function. *Drug Alcohol Depend.* 2003; 70:11-15.
- Lorenzana-Jiménez M and Salas M. Behavioral effects of chronic toluene exposure in the developing rat. *Neurotoxicology and Teratology* 1990; 12:353-357
- MacIver MB. Abused inhalants enhance GABA-mediated synaptic inhibition. *Neuropharmacol.* 2009; 34(10):2296-2304.



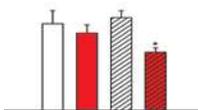
- Maki T, Gruver EJ, Davidoff AJ, Izzo N, Toupin D, Colucci W, et al. Regulation of calcium channel expression in neonatal myocytes by catecholamines. *J Clin Invest* 1996;97:656–63.
- Marjot R, McLeod AA. Chronic non-neurological toxicity from volatile solvent substance abuse. *Human Toxicology*. 8:301-306, 1989.
- Martínez *et al*, 2003
- Maze M, Smith CM. Identification of receptor mechanism mediating epinephrine induced arrhythmias during halothane anesthesia in the dog. *Anesthesiology*. 1983;59:322–326.
- Medina-Mora ME, Gutiérrez R, Vega L. What happened to street kids? An analysis of the Mexican experience. *Substance use and misuse*, 1997; 32(3), 293-316
- Millar RP, Newton CL. The year in G protein-coupled receptor research. *Mol Endocrinol*. 2010; 24(1):261-274.
- Mutlu V and Kültegin Ö. Possible biological mechanisms of sudden sniffing death syndrome due to toluene exposure. *Journal of Dependence* 2007; 8:141-145
- Murphree SS, Saffitz JE. Delineation of the distribution of beta-adrenergic receptor subtypes in canine myocardium. *Circ Res* 63: 117–125, 1988.
- Nyborg NC, Mikkelsen EO. Characterization of beta-adrenoceptor subtype in isolated ring preparations of intramural rat coronary small arteries. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1985 Nov-Dec;7(6):1113-7.
- Noda Y, Hashimoto K. Development of a halothane-adrenaline arrhythmia model using in vivo Guinea pigs. *J Pharmacol Sci*. 2004; 95(2):234-9.
- Ortiz A, Martinez R, Meza D. Grupo Interinstitucional para el desarrollo del Sistema de Reporte de Información en Drogas. (2009). Tendencias en el área metropolitana No. 46 [Information reporting systems on illicit drug use. Trends in Mexico City metropolitana rea. Report No. 46]. Retrieved May 15, 2010, from <http://www.inprf.org.mx/avisos/srid/Principal.html>
- Purdy RE, Stupecky GL, Coulombe PR. *Further evidence for a homogeneous population of beta-1-adrenoceptors in bovine coronary artery*. *J Pharmacol Exp Ther* 245: 67–71, 1988.
- Quiroz GF, Acosta E, Benjamín B, Rogelio C, Ignacio L. *Tratado de anatomía humana Vol II*. 42° ed. México, DF: Editorial Porrúa; 2010
- Rampe D, and M Kane J. Activators of voltage-dependent L-type calcium channels. *Drug Dev. Res.* 33(3): 344-363, 1994



- Riascos Bernal Dario, Baltaxe Erik, Pascual A. Gabriela. La preparación de Langendorff: corazón de mamífero aislado perfundido. Revisión del tema. Universitas Médica 2004; 45 (3): 111-117
- Riegel AC, Zapata A, Shippenberg TS, French ED. The abused inhalant toluene increases dopamine release in the *nucleus accumbens* by directly stimulating ventral tegmental area neurons. Neuropsychopharmacology 2007; 32: 1558–1569.
- Schroder E, Magyar J, Burgess D, Andres D, Satin J. Chronic verapamil treatment remodels ICa<sub>L</sub> in mouse ventricle. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2007;292(4):H1906-1916
- Schwartz J, Velly J. The beta-adrenoceptor of pig coronary arteries: determination of beta<sub>1</sub> and beta<sub>2</sub> subtypes by radioligand binding. Br J Pharmacol 79: 409–414, 1983.
- Shafer TJ, Bushnell PJ, Benignus VA, Woodward JJ. Perturbation of voltage-sensitive Ca<sup>2+</sup> channel function by volatile organic solvents. J Pharmacol Exp Ther. 2005; 315(3):1109-1118.
- Sham JS, Cleemann L, Morad M. Functional coupling of Ca<sup>2+</sup> channels and ryanodine receptors in cardiac myocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995; 92:121-125
- Sham JS. Ca<sup>2+</sup> release-induced inactivation of Ca<sup>2+</sup> current in rat ventricular myocytes: Evidence for local Ca<sup>2+</sup> signaling. J. Physiol. 1997; 500:285-295
- Sharp CW, 1992. Introduction of inhalant abuse. In Sharp CW Beauvais F, Spence R (Eds). Inhalant abuse. A volatile research agenda. NIDA Research Monograph 192. NIH Publication No. 93-3480, Institute of drug abuse, Rockville, MD, pp 1-10
- Shelton KL. Inhaled toluene vapor as a discriminative stimulus. Behav Pharmacol 2007; 18: 219–229.
- Shepherd RT Mechanism of sudden death associated with volatile substances abuse Human Toxicol. 1989; 8:287-289.
- Shimura T, Kamada Y, Yamamoto T. Ventral tegmental lesions reduce overconsumption of normally preferred taste fluid in rats. Behav Brain Res. 2002; 134:123-130.
- Skrzypiec-Spring M, Grotthus B, Szelag A, Schulz R. Isolated heart perfusion according to Langendorff –still viable in the new millennium. J Pharmacol Toxicol Methods. 2007; 55:113–126.
- Sobotta J, Putz R, Pabst R, Putz R. Atlas de anatomía humana Sobotta: Tronco, abdomen y miembro inferior, Vol. 2. Ed. Médica Panamericana 22° ed, 2006.
- Sutherland FJ, Hearse DJ. The isolated blood and perfusion fluid perfusion heart. Pharmacological research. 2000; 41:6 613-627



- Sutherland FJ, Shattock MJ, Baker KE y Hearse DJ. Mouse isolated perfused heart: characteristics and cautions. *Clinical and experimental Pharmacology and Physiology* 2003; 30, 867-878.
- Thanos PK, Dimitrakakis ES, Rice O, Gifford A, Volkow ND. Ethanol self-administration and ethanol conditioned place preference are reduced in mice lacking cannabinoid CB1 receptors. *Behav Brain Res.* 2005; 164(2):206–213.
- Thiesen FV, Noto AR and Barros HMT, *Clin. Toxicol.* 2007;45:557
- Tillard R, Shafer TJ, Woodward JJ: Toluene inhibits voltage-sensitive calcium channels expressed in pheochromocytoma cells. *Neurochem Int*, 41:391-397, 2002.
- Toda N, Okamura T. Beta adrenoceptor subtype in isolated human, monkey and dog epicardial coronary arteries. *J Pharmacol Exp Ther* 253: 518–524, 1990.
- Tsuga H, Rui-Sheng W, Honma T. Effects of toluene on regulation of adenylyl cyclase by Stimulation of G-protein-coupled receptors expressed in CHO cells. *Jpn. J. Pharmacol.* 1999; 81:305-308
- Tsunga H, Honma T. Effects of short-term toluene exposure on ligand binding to muscarinic acetylcholine receptors in the rat frontal cortex and hippocampus. *Neurotoxicology and Teratology* 2000; 22:603-606.
- Vatner DE, Knight DR, Homcy CJ, Vatner SF, Young MA. Subtypes of beta-adrenergic receptors in bovine coronary arteries. *Circ Res* 59: 463–473, 1986.
- Vatner SF, Macho P. Regulation of large coronary vessels by adrenergic mechanisms in conscious dogs. *Basic Res Cardiol* 76: 508–517, 1981.
- Villatoro JA, Cruz SL, Ortiz A, Medina-Mora ME. Volatile substances misuse in Mexico: correlates and trends. *Substance use & misuse.* 2011;46:40-45.
- Wang L, Liu J, Harvey-White J, Zimmer A, Kunos G. Endocannabinoid signaling via cannabinoid receptor 1 is involved in ethanol preference and its age-dependent decline in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100(3):1393–1398.
- Wannamethee G, Shaper AG. Alcohol and sudden cardiac death. *Br Heart J* 1992;68:443–8.
- Westfall TC y Westfall DP. Agonistas y antagonistas adrenérgicos. En: Goodman & Gilman. *Las bases farmacológicas de la terapéutica* 2006; 11 ed. p. 237-295
- Wilcosky TC, Simonsen NR. Solvent exposure and cardiovascular disease. *American Journal of Industrial Medicine.* 19: 569-586 1991.
- Wise RA. Brain reward circuitry: insights from unsensed incentives. *Neuron.* 2002;36:229-240



- Woodward JJ, Nowak M, Davies DL: Effects of the abused solvent toluene on recombinant P2X receptors expressed in HEK293 cells, *Mol. Brain Res.* 2004;125:86–95.
- Yamawaki S, Segawa T, Sarai K. Effects of acute and chronic toluene inhalation on behavior and [<sup>3</sup>H]-serotonin binding in rat. *Life Sci* 1982; 30:1997-2002
- Ytreus Kirsti. The ischemic heart-Experimental models. *Pharmacological research*, 2000;42:3 193-203.
- Yu HJ, Ma H, Green RD. Calcium entry via L-type calcium channels acts as a negative regulator of adenylyl cyclase activity and cyclic AMP levels in cardiac myocytes. *Mol Pharmacol* 1993;44:689–93.
- Zaza A, Robinson RB, DiFrancesco D. Basal responses of the L-type Ca<sup>2+</sup> current and hyperpolarization-activated currents to autonomic agonists in the rabbit sino-atrial node. *J Physiol.* 1996; 491: 347–355
- Zhang H, Holden AV, Boyett MR. Modelling the effect of β-adrenergic stimulation on the rabbit sinoatrial node. *J Physiol.* 2001; 533: 38–39.
- Zacny JP, Sparacino G, Hoffman PM, Martin R, Lichtor JL. The subjective, behavioral and cognitive effects of subanesthetic concentrations of isoflurane and nitrous oxide in healthy volunteers. *Psychopharmacology*, 1994; 114:409-416
- Zipes DP. Epidemiology and mechanisms of sudden cardiac death. *Can J Cardiol.* 2005; 21:37-40
- Zuckerman RL, Wheeler DM. Effect of halothane on arrhythmogenic responses induced by sympathomimetic agents in single rat heart cells. *Anesth Analg.* 1991;72:596–603.

