



UNIVERSIDAD MICHOACANA  
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO  
*Cuna de héroes, crisol de pensadores*

**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS  
"DR. IGNACIO CHÁVEZ"  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

Memoria de tesis:

**"Efecto de la exposición a tolueno sobre la memoria a largo  
plazo en ratas".**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD

P R E S E N T A:

Médico Especialista en Ginecología y Obstetricia  
**Abraham Jacobo Jacobo**

Dirección de tesis:  
Doctora en Ciencias en la Especialidad en Farmacología  
Marcia Yvette Gauthereau Torres

Co-Dirección de tesis:  
Doctor en Ciencias en la Especialidad en Farmacología  
Ofir Picazo Picazo

Morelia, Michoacán,  
México  
Agosto- 2017.



La maestría en Ciencias de la Salud de la  
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo  
Pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT

El estudiante de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo  
Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas  
“Dr. Ignacio Chávez”  
División de Estudios de Posgrado  
Laboratorio de Farmacodependencia  
Recibió beca de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y de la  
Secretaría de Salud de Michoacán  
durante la realización de su tesis de Maestría en Ciencias de la Salud

El presente trabajo fue financiado por la Coordinación de Investigación Científica, UMSNH, convocatoria 2016-2017

El Comité Tutorial designado por la División de Estudios de Posgrado de la

Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Aprobó la memoria de tesis que presentó:

Médico Especialista en Ginecología y Obstetricia

Abraham Jacobo Jacobo

Doctor en Ciencias Biomédicas

José Miguel Cervantes Alfaro

---

Doctora en Ciencias Fisiológicas

Bertha Fenton Navarro

---

Doctor en Investigación en Medicina

Luis Fernando Ortega Varela

---

Dirección de tesis:

Doctora en Ciencias en la Especialidad en Farmacología

**Marcia Yvette Gauthereau Torres**

Co-Dirección de tesis:

Doctor en Ciencias en la Especialidad en Farmacología

**Ofir Picazo Picazo**

Colaborador:

Maestro en Farmacología básica

Humberto Ruiz Vega †

La presente investigación se realizó en:

Laboratorio de Farmacodependencia

División de Estudios de Posgrado

Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas

“Dr. Ignacio Chávez”

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

## **Dedicatorias y agradecimientos**

A Dios, que siempre me ha guiado por el camino correcto, y me ha brindado todo lo necesario para continuar en el laberinto de la vida.

A mi esposa la Dra. María del Rosario y a mi hijo Hugo Abraham, que vivieron conmigo todo el proceso de la maestría, supieron sobrellevar y aguantar los buenos y malos momentos, les estoy muy agradecido, sin ellos no hubiera sido posible realizar este sueño.

A toda mi familia que ha estado conmigo en todos los momentos importantes y que me han visto crecer en todos los aspectos de mi vida.

A mi directora de tesis la Dra. Marcia Yvette Gauthereau y a mi Co director el Dr. Ofir Picazo, les estoy sumamente agradecido con la oportunidad que me brindaron de trabajar con ellos y recibir todo el apoyo necesario en todos los aspectos.

A todo mi comité tutorial, Dra. Bertha Fenton, Dr. José Miguel Cervantes, Dr. Luis Fernando Ortega, les doy las gracias por todo el apoyo que me brindaron y por todos los consejos que me dieron a lo largo de todo este camino.

A todos mis compañeros de generación, que juntos caminamos en busca del conocimiento y siempre estuvimos dispuestos a compartir nuestras experiencias, les deseo la mejor de la suerte en sus nuevos proyectos.

A mis compañeros del laboratorio, la Dra. Claudia Cervantes, M. en C. María Guadalupe Carreón, M. en C. Nallely Alvarado, les doy las gracias por todos sus consejos y por todo el apoyo que me brindaron a lo largo de su estancia con ellas.

Un agradecimiento especial a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y a la Secretaría de Salud de Michoacán, por apoyarme con las becas respectivas, para realizar esta maestría

A la memoria del maestro Humberto Ruiz Vega, Dios lo tenga en su gloria.

## Abreviaturas

---

<b>Ach</b>	Acetilcolina
<b>AMPA<sub>r</sub></b>	Receptor a 2-amino-3-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-ácido propanoico
<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza
<b>ATD</b>	Dominio amino-terminal extracelular
<b>BDNF</b>	Factor neurotrófico derivado del cerebro
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calcio
<b>CR</b>	Respuesta condicionada
<b>CREB</b>	Proteína de unión al elemento de respuesta de AMPc
<b>CS</b>	Estímulo condicionado
<b>CTD</b>	Dominio intracelular carboxilo-terminal
<b>DNA</b>	Ácido desoxi-ribonucleico
<b>EE</b>	Error estándar
<b>GABA<sub>A</sub></b>	Receptor a ácido $\gamma$ -aminobutírico subtipo A
<b>HATs</b>	Histona-acetiltransferasas
<b>HDACs</b>	Histona-diacetilidasas
<b>HDM</b>	Histona-dimetilasas
<b>HMTs</b>	Histona-metiltransferasa
<b>i.p</b>	Intraperitoneal
<b>IP3</b>	Inositol trifosfato
<b>K<sup>+</sup></b>	Potasio
<b>LBD</b>	Dominio de unión extracelular
<b>LTD</b>	Depresión a largo plazo

---

<b>LTP</b>	Potenciación a largo plazo
<b>m</b>	Metro
<b>min</b>	Minuto
<b>mAChR</b>	Receptor colinérgico muscarínico
<b>MAPK</b>	Proteína cinasa activada por mitógenos
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	Magnesio
<b>mGlucR</b>	Receptor metabotrópico a glutamato
<b>Na<sup>+</sup></b>	Sodio
<b>nAChR</b>	Receptor colinérgico nicotínico
<b>NMDAr</b>	Receptor a N-metil-D-aspartato
<b>ON</b>	Objeto novedoso
<b>OF</b>	Objeto familiar
<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>PK</b>	Proteína cinasa
<b>PN</b>	Postnatal
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>SNP</b>	Sistema nervioso periférico
<b>TMD</b>	Dominios transmembranales
<b>TNT</b>	2,4,6-trinitrotolueno
<b>tPA</b>	Plasminógeno tisular



## Relación de Tablas

No	Título	Página
1	Clasificación de los disolventes volátiles, de acuerdo a su estructura química.	4
2	Propiedades fisicoquímicas del tolueno.	5
3	Respuestas condicionantes basales por grupo.	44
4	Respuestas condicionantes post-tratamiento por grupo.	45
5	Comparaciones múltiples significativos post tratamiento.	46
6	Respuestas condicionantes pre y post-tratamiento en grupo control.	47
7	Respuestas condicionantes pre y post tolueno por grupo.	49
8	Comparaciones múltiples significativos post-tratamiento.	49
9	Exploración del objeto novedoso a la hora, ratas de 7-8 meses (condiciones basales).	51
10	Exploración del objeto novedoso a las 24 horas, ratas de 7-8 meses (condiciones basales).	53
11	Exploración del objeto novedoso a la hora, ratas de 5-6 meses (condiciones basales).	55
12	Exploración del objeto novedoso a las 24 horas, ratas de 5-6 meses (condiciones basales).	57
13	Exploración del objeto novedoso a la hora, ratas de 4 meses (condiciones basales).	59
14	Exploración del objeto novedoso a las 24 horas, ratas de 4 meses (condiciones basales).	61
15	Exploración del objeto novedoso a la hora, ratas de 7-8 meses (post-tratamiento).	63
16	Exploración del objeto novedoso a las 24 horas, ratas de 7-8 meses (post-tratamiento).	65

17	Exploración del objeto novedoso a la hora, ratas de 5-6 meses (post-tratamiento)	67
18	Exploración del objeto novedoso a las 24 horas, ratas de 5-6 meses (post-tratamiento).	69
19	Exploración del objeto novedoso a la hora, ratas de 4 meses (post-tratamiento).	71
20	Exploración del objeto novedoso a las 24 horas, ratas de 4 meses (post-tratamiento).	73
21	Pruebas de actividad locomotora	75

### Relación de figuras

No	Título	Página
1	Cámara de exposición a disolvente	34
2	Caja de condicionamiento operante de Skinner	35
3	Caja externa de atenuación de sonido	35
4	Interfase y sistema de computación con software Med-IV	36
5	Caja del objeto novedoso	37
6	Objetos familiares y novedosos	37
7	Diseño experimental de la prueba de reconocimiento de objeto novedoso	39

<b>No</b>	<b>Titulo</b>	<b>Pagina</b>
8	Número total de ratas Wistar, que ingresaron a la prueba de auto aprendizaje en la caja de Skinner.	41
9	Número total de ratas Wistar de 4 meses, que ingresaron a la prueba de auto aprendizaje en la caja de Skinner.	42
10	Número de día en que las ratas Wistar aprendieron la prueba de auto aprendizaje en la caja de Skinner.	43
11	Número de respuestas condicionantes basales, por grupo de edad (aire y pre-tolueno).	44
12	Número de respuestas condicionantes posterior a un mes de exposición a tolueno o a aire, por grupo de edad.	46
13	Número de respuestas condicionantes pre y posterior a un mes de exposición a aire, por grupo de edad.	48
14	Número de respuestas condicionantes pre y posterior a un mes de exposición a tolueno, por grupo de edad.	50
15	A) Exploración del objeto novedoso a la hora en grupo de ratas de 7-8 meses en condiciones basales. B) Índice de preferencia.	52
16	A) Exploración del objeto novedoso a las 24 horas en grupo de ratas de 7-8 meses en condiciones basales. B) Índice de preferencia.	54
17	A) Exploración del objeto novedoso a la hora en grupo de ratas de 5-6 meses en condiciones basales. B) Índice de preferencia.	56
18	A) Exploración del objeto novedoso a las 24 horas en grupo de ratas de 5-6 meses en condiciones basales. B) Índice de preferencia.	58
19	A) Exploración del objeto novedoso a la hora en grupo de ratas de 4 meses en condiciones basales. B) Índice de preferencia.	60
20	A) Exploración del objeto novedoso a las 24 horas en grupo de ratas de 4 meses en condiciones basales. B) Índice de preferencia.	62

21	A) Exploración del objeto novedoso a la hora en grupo de ratas de 7-8 meses post-tratamiento. B) Índice de preferencia.	64
22	A) Exploración del objeto novedoso a las 24 horas en grupo de ratas de 7-8 meses post-tratamiento. B) Índice de preferencia.	66
23	A) Exploración del objeto novedoso a la hora en grupo de ratas de 5-6 meses post-tratamiento. B) Índice de preferencia.	68
24	A) Exploración del objeto novedoso a las 24 horas en grupo de ratas de 5-6 meses post-tratamiento. B) Índice de preferencia.	70
25	A) Exploración del objeto novedoso a la hora en grupo de ratas de 4 meses post-tratamiento. B) Índice de preferencia.	72
26	A) Exploración del objeto novedoso a las 24 horas en grupo de ratas de 4 meses post-tratamiento. B) Índice de preferencia.	74
27	Prueba de actividad locomotora basal y post-tratamiento, grupo total.	76
28	Prueba de actividad locomotora basal y post-tratamiento, en campo abierto.	76
29	Prueba de actividad locomotora basal y post-tratamiento, en caja del objeto novedoso.	77

## Índice

<b>1. Introducción</b>	1
<b>2. Marco teórico</b>	3
2.1. Inhalables	3
2.1.1. Clasificación de los inhalables	3
2.2. Tolueno	5
2.2.1. Usos.	5
2.2.2. Farmacocinética	6
2.2.3. Mecanismo de acción del tolueno	7
2.2.4. Efectos del tolueno	8
2.3. Aprendizaje y memoria	9
2.3.1. Aprendizaje	9
2.3.2. Memoria	9
2.3.3. Clasificación de la memoria	10
2.3.3.1. Memoria a corto plazo	10
2.3.3.2. Memoria a largo plazo	10
2.3.3.3. Memoria declarativa	11
2.3.3.4. Memoria no declarativa	11
2.3.3.5. Otros tipos de memoria	12
2.3.3.5.1. Memoria prospectiva	12
2.3.3.5.2. Memoria de reconocimiento	13
2.3.3.5.3. Memoria falsa	13
2.3.4. Estructuras anatómicas implicadas en el proceso de aprendizaje y memoria	14
2.3.5. Hormonas que participan en el proceso aprendizaje y memoria	14
2.3.6. Aspectos moleculares de la memoria	15
2.3.7. Neurotransmisores que participan en aprendizaje y memoria	16
2.3.8. Receptores que participan en la memoria	16
2.3.8.1. Receptores NMDA	16
2.3.8.2. Receptores AMPA	17
2.3.8.3. Receptores nicotínicos	18
2.3.8.4. Receptores metabotrópicos de glutamato	19
2.3.8.5. Receptores dopamina	20

2.3.8.6. Receptores a nociceptina	20
2.3.8.7. Receptores sigma-1	20
2.3.9. Cambios epigenéticos en la formación de la memoria	21
2.3.10. Factores de transcripción que participan en la formación de la memoria	22
2.3.11. Consolidación de la memoria	22
2.3.12. Reconsolidación de la memoria	23
2.3.13. Plasticidad cerebral	24
2.3.14. Potenciación a largo plazo	24
2.3.15. Depresión a largo plazo	25
2.4. Disolventes de abuso y memoria	25
<b>3. Justificación</b>	<b>30</b>
<b>4. Hipótesis</b>	<b>31</b>
<b>5. Objetivo general</b>	<b>31</b>
5.1. Objetivos particulares	31
<b>6. Metodología</b>	<b>32</b>
6.1. Animales	32
6.2. Diseño experimental	32
6.3. Fármacos	33
6.4. Pruebas de actividad locomotora espontánea	33
6.5. Exposición a disolvente	33
6.6. Pruebas de auto aprendizaje	34
6.7. Modelo de reconocimiento de objeto novedoso	37
<b>7. Análisis de datos</b>	<b>40</b>
7.1. Análisis estadístico	40
<b>8. Resultados</b>	<b>41</b>
<b>9. Discusión</b>	<b>78</b>
<b>10. Conclusiones</b>	<b>84</b>
<b>11. Referencias</b>	<b>85</b>
	<b>129</b>
<b>Total de hojas</b>	



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



***"Efecto de la exposición a tolueno sobre la memoria a largo plazo en ratas".***

**Resumen**

**Introducción.** Los inhalables son sustancias volátiles a temperatura ambiente, que cuando se inhalan pueden producir un estado alterado de conciencia. El tolueno es el principal disolvente volátil empleado como droga de abuso, lo encontramos como parte de múltiples productos de uso común, como en la gasolina, en el "thinner" y en productos de limpieza. Es usado como droga de abuso, principalmente por los adolescentes. Existen reportes que indican que la inhalación de este disolvente produce alteraciones en la memoria. Además, basados en algunos estudios se propone que existen múltiples mecanismos por los que el tolueno podría dañar la memoria, como daño neuronal, apoptosis o inhibición de receptores, como los de N-Metil-D-Aspartato (NMDA) los cuales juegan un papel importante en el proceso de memoria a nivel de hipocampo. Hasta el momento, aun no está claro el mecanismo de acción por el cual el tolueno produce alteraciones en la memoria. **Hipótesis:** La exposición crónica a tolueno provoca una alteración en los procesos cognitivos de memoria. **Objetivo general:** Investigar si la exposición crónica a tolueno altera las capacidades cognitivas de memoria en las ratas. **Objetivos específicos:** 1. Estudiar el efecto de la exposición crónica al tolueno sobre la memoria, en un modelo de auto aprendizaje en ratas. 2. Analizar el efecto de la exposición crónica al tolueno sobre la memoria, en el modelo de objeto novedoso. **Material y métodos:** Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, divididos en 3 grupos (7-8 meses, 5-6 meses y 4 meses), cada uno con un subgrupo que fue expuesto a tolueno (4000 ppm) y un subgrupo control expuesto a aire. En una primera etapa, se realizó la prueba de auto-aprendizaje en la cámara condicionante (caja de Skinner) a todos los grupos. En una segunda etapa se hicieron las pruebas del objeto novedoso. A fin de evaluar si no existen alteraciones en la actividad locomotora, en una tercera etapa se realizó una prueba de locomoción en campo abierto y otra en la caja del objeto novedoso. En la cuarta etapa, para estudiar el efecto de los disolventes sobre la consolidación de la memoria, 24 h posteriores a las pruebas conductuales, los animales se colocaron en una cámara de exposición estática durante 30 min, 2 veces al día (con una diferencia de 6 h), durante un mes, para ser expuestos a tolueno (4000 ppm) o a aire. Al cabo de este periodo (a las 24 hrs), los animales se volvieron a evaluar en las pruebas conductuales iniciales. **Resultados:** Se estudiaron un total de 78 animales, divididos en 3 grupos de diferentes edades, de acuerdo a lo mencionado anteriormente. En las pruebas en la caja de Skinner se observó que el 83% de los animales aprendió la tarea, y que el tolueno no tuvo efectos significativos sobre la memoria de los animales. Resultados similares se apreciaron en la prueba del objeto novedoso. Al tomar en cuenta la edad de los animales, se presentaron diferencias significativas en algunos de los grupos. Además, el tolueno no afectó la actividad locomotora de los animales, observándose un promedio de respuestas similares entre el grupo expuesto a tolueno y el grupo expuesto a aire.

**Palabras clave:** Tolueno / memoria / Skinner / objeto novedoso.



*"Effect of toluene exposure on long-term memory in rats"*

**Summary**

**Introduction.** Inhalants are volatile substances at room temperature that are inhaled to produce an altered state of consciousness. Toluene is the main volatile solvent used as a drug of abuse, it can be found as part of multiple products commonly used such as gasoline, thinner and cleaning products. It is used as a drug of abuse mainly by adolescents. There are reports indicating that inhalation of this solvent causes memory alterations. In addition, there are multiple mechanisms by which toluene can damage memory, such as neuronal damage, apoptosis and inhibition of receptors, mainly N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) receptors, which play an important role in memory process at the hippocampus level. However, the mechanism of action by which toluene can produce memory alterations is not clear. **Hypothesis:** Chronic toluene exposure produces an alteration in cognitive memory processes. **General objective:** To investigate if chronic toluene exposure alters cognitive memory abilities in rats. **Specific objectives:** 1. To study the effect of chronic toluene exposure on memory in a model of autoshaping learning task in rats. 2. To analyze the effect of chronic toluene exposure on memory in the novel object recognition test. **Material and methods:** Male Wistar rats were divided into 3 groups (7-8 months, 5-6 months and 4 months), each one with a subgroup that was exposed to toluene (4000 ppm) and a control subgroup exposed to air. In a first stage, the autoshaping learning task was performed in the conditioning chamber (Skinner's box) to all groups. In a second stage the novel object recognition test were made. In order to evaluate if there were no alterations in locomotor activity, in a third stage a locomotion test was performed in the open field and another in the novel object box. In the fourth stage, to study solvent effect on memory consolidation, 24 h after the behavioral tests, animals were placed in a static exposure chamber for 30 min, twice a day (with a difference of 6 h), for one month, to be exposed to toluene (4000 ppm) or air. At the end of this period ( 24 h after the end of exposures), animals were reevaluated in the initial behavioral tests. **Results:** A total of 78 animals were studied, and as previously mentioned, they were divided into 3 groups of different ages. In the Skinner box test, it was observed that 83% of the animals learned the task, and that toluene had no significant effects on animal memory. Similar results were seen in the novel object recognition test. Taking into account animal age, there were significant differences in some of the groups. In addition, toluene did not affect the locomotor activity of the animals, with an average of similar responses between the toluene-exposed group and the air-exposed group.

**Keywords.** Toluene / memory / Skinner / novel / object



## **1. Introducción**

A nivel mundial, se calcula que en 2015 consumieron drogas alrededor de 255 millones de personas, 1 de cada 20 adultos, es decir 5.3% de la población de entre 15 y 64 años han consumido alguna droga ilícita,<sup>1</sup> principalmente sustancias del grupo del cannabis, los opioides, la cocaína o los estimulantes de tipo anfetamínico.<sup>2</sup>

El consumo de drogas por consumidores habituales y personas que sufren trastornos de consumo o dependencia en el 2015 fue de alrededor de 29.5 millones presentado un incremento del 0.3% con respecto a los últimos 5 años.<sup>1-3</sup>

El consumo de drogas sigue causando un daño considerable, reflejado en la pérdida de vidas y años productivos de muchas personas. En 2014 se informó de un total aproximado de 207,400 muertes relacionadas con las drogas. Esa cifra se corresponde con una mortalidad de 43.5 muertes por millón de personas en la población de entre 15 y 64 años.<sup>2</sup>

En la República Mexicana, la Encuesta Nacional de Adicciones de 2011 presenta una prevalencia de consumo de drogas para la población general entre 12 a 65 años de 1.8%, siendo la marihuana la droga más consumida, con un 1.2%, seguida de la cocaína con un 0.5% y después los inhalables con 0.1%. En la población adolescente de entre 12 y 17 años la prevalencia de consumo es de 1.5%, con los mismos tipos de drogas, con un ligero incremento de los inhalables a 0.3%. En relación al consumo de drogas por las mujeres, la prevalencia general es de 0.7% y con un consumo de marihuana de 0.3% y para inhalables 0.1%. Los promedios de inicio de consumo de drogas en los hombres son de 18 años y para mujeres de 20 años.<sup>4</sup>

La prevalencias de haber consumido drogas en alguna ocasión en estudiantes de secundaria y bachillerato en la República Mexicana, durante la encuesta en el 2014 fue de 17.2%, el consumo en el último año fue 12.2% y en el último mes 6.7%. Las drogas de mayor consumo son la marihuana (hombres 12.9%, mujeres 5.8%), inhalables (hombres 5.9%, mujeres 5.8%), cocaína (hombres 4.2%, mujeres 2.5%) y

tranquilizantes (hombres 3.2% y mujeres 4.3%). La edad de inicio de consumo es en promedio a los 12 años con un incremento exponencial a los 18 años.<sup>5</sup>

En Michoacán la encuesta nacional de consumo de drogas en estudiantes de secundaria y bachillerato 2014, revela que consumieron droga en alguna ocasión 15.4%, en el último año 10.1%, y en el último mes 5.7%, ligeramente por debajo del promedio nacional.<sup>5</sup>

Las personas que consumen drogas, en especial los inhalables, tienden a combinarlas con otras drogas, generalmente con alcohol, marihuana y cocaína.<sup>6,7</sup> Dentro de los drogas inhalables de mayor consumo se encuentra el "thinner", cuyo principal componente es el tolueno; además, a los inhalables los podemos encontrar en diversos productos comerciales como pinturas, pegamentos, productos de limpieza,<sup>8,9</sup> son fáciles de obtener por parte de niños y adolescentes,<sup>10</sup> y el grupo más vulnerable son las personas que están en situación de calle.<sup>11</sup> También existe el abuso de los inhalables durante el embarazo, sobre todo de adolescentes y adultos jóvenes, con múltiples repercusiones a la salud materna y al producto de la concepción.<sup>12</sup> Los adictos a inhalables pueden llegar a exponerse a varios miles de partes por millón (2000 – 15000 ppm) de disolventes volátiles en una sola sesión.<sup>13,14</sup> Esta situación contrasta claramente con lo que ocurre en el campo ocupacional, donde los individuos se exponen por periodos largos a bajas concentraciones de disolventes (50–200 ppm).<sup>15</sup> Se ha demostrado que el abuso de las drogas inhalables tiene efectos multisistémicos, en donde el sistema nervioso central presenta alteraciones a nivel cognitivo, en especial sobre el aprendizaje y la memoria.<sup>16,17</sup>

## **2. Marco teórico**

### **2.1. Inhalables**

Los inhalables son sustancias volátiles a temperatura ambiente, que cuando se inhalan pueden producir un estado alterado de conciencia y que raramente son administrados por otras vías diferentes a la inhalación.<sup>6,18,19</sup> El abuso de inhalables implica utilizar estas sustancias de manera voluntaria para producir una intoxicación, o sensación de bienestar.<sup>20</sup>

Los disolventes volátiles se encuentran en componentes usados en la industria y en múltiples productos domésticos,<sup>21,22</sup> tienen la característica de que disuelven la grasa y son generalmente líquidos con presiones de vapor altas, tienen puntos de ebullición bajos y son altamente lipofílicos.<sup>23</sup>

La mayoría de los productos comerciales que son sujeto de inhalación son mezclas complejas de disolventes, que contienen principalmente tolueno, pero también pueden contener otros disolventes en menor proporción, como xileno y benceno.<sup>12,16,24,25</sup>

#### **2.1.1. Clasificación de los inhalables**

Existen varias clasificaciones de los inhalables, pero en general se han propuesto cuatro categorías generales, que se basan en la forma en la que se encuentran en los productos domésticos, industriales y médicos.<sup>26-28</sup>

A) **Disolventes Volátiles:** Son líquidos que se evaporan a temperatura ambiente. Se encuentran en una gran variedad de productos en la industria y en el hogar, se pueden adquirir fácilmente; los más comunes son removedores de pinturas, líquidos para lavado en seco, quita grasas, gasolinas, pegamentos, líquidos correctores, etc.

B) **Aerosoles:** Son formas comerciales que contienen propelentes y disolventes. Éstos incluyen a las pinturas pulverizadas, desodorantes y fijadores de pelo.

C) **Gases:** Incluyen a los anestésicos de uso médico como el éter, el cloroformo, el halotano y el óxido nitroso. En este grupo también se incluyen a los gases que se utilizan en productos domésticos o comerciales, como los encendedores de butano, los tanques que contienen propano y los que se usan para enfriamiento en los refrigeradores.

D) **Nitritos:** Se considera una clase especial de inhalables, ya que a diferencia de la mayoría de los demás inhalables que actúan sobre el sistema nervioso, la acción principal de los nitritos es sobre los vasos sanguíneos, siendo vasodilatadores.

Los disolventes son las clase de inhalables de los que más se abusa y se puede clasificar de acuerdo a su estructura química en varios subgrupos.

**Tabla 1. Clasificación de los disolventes volátiles, de acuerdo a su estructura química.**<sup>29,30</sup>

Hidrocarburos alifáticos	Hexano, heptano
Hidrocarburos aromáticos	Tolueno, benceno, xileno
Hidrocarburos halogenados	1,1,1- tricloroetano, cloroformo, fluorotil
Hidrocarburos cíclicos	Ciclo hexano
Alcoholes	Etanol, metanol
Éteres	Dietil éter, isopropil éter
Ésteres	Etil acetato, isopropil acetato
Aldehídos	Formaldehído, acetaldehído
Cetonas	Acetona, metil-cetona, etil-cetona, ciclohexanona

## 2.2. Tolueno

El tolueno (metilbenceno, fenilmetano, toluol, benceno monometil, y metilbenzol), es un hidrocarburo aromático con una fórmula química condensada de  $C_6H_5CH_3$ , es un líquido incoloro con olor parecido a los disolventes de pintura. Tiene una alta afinidad por los lípidos, y es altamente inflamable.<sup>31</sup> Es miscible en la mayoría de los disolventes orgánicos no polares, pero casi inmisible en el agua.<sup>32,33</sup>

**Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas del tolueno.**<sup>19,31</sup>

<i>Propiedad</i>	<i>Información</i>
Peso molecular	92.13 g/mol
Color	Incoloro
Estado físico	Líquido
Punto de fusión	-95 C
Punto de Ebullición	110.6 C
Densidad	0.8669 g/ml

### 2.2.1. Usos

El tolueno existe de forma natural en el petróleo crudo y en el árbol tolú (*Myroxylon toluifera*). Se produce en el proceso de fabricación de la gasolina y otros combustibles del petróleo crudo; la gasolina contiene de 5 a 7% de tolueno, también está presente en el humo del cigarro. El tolueno se adiciona a los combustibles como antidetonante, se usa en la fabricación de pinturas, lacas, diluyentes de pintura, barniz de uñas, adhesivos, en algunos procesos de impresión y del cuero curtido y además es el producto de partida en la síntesis del 2,4,6-trinitrotolueno (TNT), que se utiliza como uno de los explosivos más usados con fines militares e industriales.<sup>32,33</sup>

### **2.2.2. Farmacocinética**

La exposición al tolueno puede ser en bajas concentraciones, cuando se utilizan productos en el hogar o en el escuela sin importantes riesgos para la salud; por otro lado, también existe la exposición ocupacional por el trabajo, en donde hay exposición repetida durante varias horas al día y por toda la semana, aunque los límites de exposición van de los 10 a 100 ppm,<sup>34</sup> y la inhalación intermitente en el caso de abuso, en donde las personas se exponen a concentraciones elevadas, que van desde las 500 hasta las 30 000 ppm.<sup>31</sup>

El tolueno se absorbe fácilmente por los pulmones, el tracto gastrointestinal y en menor proporción por la piel y las mucosas.<sup>35</sup> La concentración del tolueno en la sangre se incrementa durante los primeros 10 a 15 minutos después de la exposición, alcanzando rápidamente un nivel constante después de los 25 minutos.<sup>35</sup>

El tolueno se distribuye ampliamente en todos los tejidos, aunque tiene una alta afinidad por los tejidos ricos en lípidos y ampliamente vascularizados como el cerebro, hígado, pulmones y riñón;<sup>28,33,36</sup> además se acumula en el tejido adiposo cuando se absorbe por la piel o se ingiere, debido a sus propiedades hidrofílicas.<sup>37</sup> En el caso de la mujer embarazada, el tolueno atraviesa fácilmente la barrera placentaria y se distribuye por todos los tejidos maternos y fetales.<sup>38</sup>

Más del 80% del tolueno absorbido es metabolizado en el hígado, donde es oxidado a ácido benzoico vía alcohol bencílico. El ácido benzoico se conjuga casi en su totalidad con la glicina para formar ácido hipúrico, el cual se disocia en aniones de hipurato y protones.<sup>39</sup> Del 0.4 a 1.1 % es hidroxilado y excretado como una mezcla de orto, para, y meta-cresol, y más del 75% se elimina dentro de las 12h después de la exposición.<sup>37</sup> Algunos aniones son excretados en la orina con el amonio. En el metabolismo participa el citocromo P-450 y varias isoenzimas en las que destaca el CYP2E1.<sup>31,32,40,41</sup>

### **2.2.3. Mecanismos de acción del tolueno**

Los disolventes de abuso tienen efectos similares a los del alcohol en relación a su mecanismo de acción.<sup>14,42,43</sup>

El tolueno tiene efectos a nivel celular, alterando el funcionamiento en los canales iónicos [sodio ( $\text{Na}^+$ ), calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), potasio ( $\text{K}^+$ )] dependientes de voltaje implicados en la regulación de la excitabilidad neuronal;<sup>42,44,45</sup> inhibe los receptores N-metil-D-aspartato (NMDAr) en especial los conformados por las subunidades GluN2A<sup>44,45</sup> y GluN2B,<sup>48-50</sup> en el caso de los receptores colinérgicos nicotínicos (nAChR), inhibe principalmente los constituidos por las subunidades  $\alpha 4\beta 2$ ,<sup>51</sup> también se ha observado que en general hay un incremento o potenciación de los receptores ácido  $\gamma$ -aminobutírico subunidad alfa 1 (GABA-A), dependiendo de la área del sistema nervioso central (SNC) estudiada.<sup>52-55</sup>

Existe evidencia que indica que los diferentes neurotransmisores se pueden activar a diferentes dosis y concentraciones de tolueno con diferencias en la exposición aguda o crónica.<sup>31,56</sup> Se han demostrado incrementos de dopamina a nivel del núcleo acumbens y área ventral tegmental, sustancia nigra,<sup>20,53,57,58</sup> incrementos de serotonina en diferentes regiones cerebrales,<sup>59</sup> alteraciones en glutamato dependiendo si se trata de una exposición aguda o crónica.<sup>60,61</sup>

Además, se ha visto que la administración de tolueno intraperitoneal (300 mg/kg) y poten en ratones, produce un aumento de glutamato y de taurina extracelular a nivel de hipocampo;<sup>62</sup> aunque a dosis altas de 8000 y 12000 ppm se ha demostrado una disminución de glutamato, glutamina y GABA en varias regiones cerebrales,<sup>56</sup> por otra parte, hay evidencia de alteraciones en la transmisión sináptica en la capa profunda las neuronas piramidales de la corteza prefrontal.<sup>13</sup>

El tolueno puede producir cambios metabólicos y neuroquímicos, en el caso de la exposición aguda a este disolvente se ha observado que se produce una disminución de la función metabólica en el cerebro de rata, afectando principalmente al hipocampo, la protuberancia y el tálamo, además de la corteza prefrontal.<sup>28,56</sup>

También se han demostrado efectos apoptóticos y alteraciones epigenéticas que pueden tener algún impacto a largo plazo en la expresión de genes.<sup>63-65</sup> El tolueno puede producir un incremento en el estrés oxidativo, que tiene un efecto perjudicial en una exposición prolongada.<sup>31,40</sup>

#### **2.2.4. Efectos del tolueno**

El tolueno produce efectos multisistémicos, principalmente sobre los sistemas respiratorio, cardiovascular, renal,<sup>66-69</sup> sobre el hígado,<sup>24,70</sup> el sistema endocrino, aparato reproductivo,<sup>71-75</sup> y sistema nervioso en donde tiene un efecto depresor, pero a dosis bajas puede producir excitación paradójica.<sup>76</sup> Existen múltiples estudios en donde se ha demostrado su efecto teratogénico, provocando malformaciones congénitas por el consumo de inhalables durante el embarazo (síndrome fetal a disolventes),<sup>77-84</sup> alteraciones en el desarrollo postnatal y disminución de peso corporal.<sup>85-87</sup>

La exposición aguda a tolueno produce euforia, excitación seguida de depresión e incoordinación motora (en ratas se ha observado un efecto bifásico, con un incremento inicial de la actividad motora y posteriormente una disminución progresiva)<sup>88-91</sup> mareo, relajación, crisis convulsivas (aunque también se ha demostrado un efecto anticonvulsivante),<sup>51,92</sup> alucinaciones, delirio, pueden aparecer arritmias cardíacas, hipocalcemia, acidosis metabólica e incluso muerte súbita.<sup>32,93-97</sup>

Entre las alteraciones crónicas hay conjuntivitis, inflamación de las vías respiratorias, deterioro cognitivo general, alteraciones psiquiátricas, deterioro del aprendizaje y de la memoria a corto y largo plazo.<sup>61,98</sup> Se ha logrado determinar por estudios de imagen, atrofia de corteza cerebral y cerebelo, alteraciones en la comisura anterior y en el cuerpo caloso, leucoencefalopatía, daño axonal y desmielinización, entre muchas otras alteraciones.<sup>31,32,99-102</sup>



## **2.3. Aprendizaje y memoria**

### **2.3.1. Aprendizaje**

Es el fenómeno neurobiológico por el cual adquirimos conocimientos sobre el ambiente que nos rodea. Se puede adquirir a través de dos o más estímulos, experiencias o eventos.<sup>103</sup> El aprendizaje es la base de la memoria, si no hay aprendizaje no puede haber memoria más tarde.<sup>104</sup> Para que se este fenómeno son esenciales la atención y la memoria.

La atención es la capacidad de focalizar nuestra actividad mental en algo concreto y no distraernos con otros estímulos, está dirigida a conseguir objetivos específicos, se le conoce como "la luz de la búsqueda".<sup>105</sup> La atención es voluntaria, reflexiva y controlada, aunque tiene una capacidad limitada para procesar y codificar información.<sup>106</sup>

### **2.3.2. Memoria**

La memoria es la capacidad de recuperar y utilizar la información adquirida a través del tiempo.<sup>107</sup> Se considera una función intelectual que tiene relación estructural y funcional con el SNC y se caracteriza por la adquisición, el almacenamiento y la reposición de la información de las experiencias previas aprendidas, ingresadas por alguna vía sensorial (visual, oído, tacto, etc.).<sup>103,108</sup> La memoria implica múltiples procesos constructivos complejos que son muy fácil de llevarnos al error; cuando recordamos se agrupan fragmentos de información, la cual está almacenada bajo la influencia de nuestros conocimientos, actitudes y creencias actuales.<sup>109</sup> J Crystal en el 2015, refiere que la memoria tiene dos funciones específicas, recordar el pasado y planificar el futuro.<sup>110</sup>

### **2.3.3. Clasificación de la memoria**

Existen múltiples clasificaciones con una gran diversidad de tipos de memoria, pero en términos generales se puede clasificar de acuerdo al tiempo durante el cual es efectiva en:

**2.3.3.1. Memoria a corto plazo** (inmediata, sensorial, primaria, operacional, activa o de trabajo).

Consiste en tener la capacidad para mantener en la mente una experiencia durante algunos segundos a minutos, es temporal, de capacidad limitada, permite realizar actividades cognitivas básicas o inmediatas.<sup>106</sup>

La memoria inmediata se refiere a la cantidad limitada de información que se puede retener cuando se presenta el material para aprender.<sup>111</sup>

La memoria sensorial se define como el almacenamiento breve de información dentro de una modalidad específica.<sup>106</sup>

La memoria de trabajo se refiere a la capacidad para mantener las cosas en la mente el tiempo suficiente como para llevar a cabo acciones secuenciales o tareas complejas,<sup>106,112-114</sup> es fundamental en la vida diaria, juega un rol importante en la lectura, escritura, aritmética, aprendizaje, lenguaje, imaginación etc.<sup>115</sup> La corteza prefrontal se ha considerado fundamental en la memoria de trabajo.<sup>116</sup>

### **2.3.3.2. Memoria a largo plazo**

Este tipo de memoria retiene información durante un tiempo variable, desde minutos hasta tiempos ilimitados.

Algunos autores subdividen a esta memoria, en memoria declarativa o explícita y memoria no declarativa, implícita o procedimental de acuerdo a la naturaleza de lo que se recuerda:<sup>117</sup>

### **2.3.3.3. Memoria declarativa (explícita)**

Es el tipo de memoria con el que recordamos experiencias previas (objetos, rostros, nombres, conceptos). El acceso a esta memoria es consciente, y se ha dividido en memoria semántica y episódica.<sup>117,118</sup>

**Memoria semántica:** son recuerdos de hechos o conocimientos generales,<sup>119</sup> en donde los conocimientos guardados no tienen contexto, por ejemplo el significado de las palabras; la evaluación más común de la memoria semántica es la fluidez verbal.<sup>120</sup>

**Memoria episódica:** son recuerdos que se relacionan con experiencias o eventos (episodios) personales específicos,<sup>119-122</sup> que ocurrieron en un momento determinado y en algún lugar en el pasado,<sup>123,124</sup> es decir son recuerdos de naturaleza autobiográfica.<sup>125,126</sup> Este tipo de memoria consiste en aspectos como el "qué", "dónde" y "cuándo" se adquirió la memoria.<sup>120,121,124,127</sup> Las principales estructuras relacionadas con la memoria declarativa son el lóbulo temporal medial<sup>124</sup> y la corteza prefrontal medial,<sup>121</sup> interconectadas a través de un circuito que involucra al hipocampo y al giro parahipocámpal que incluye la corteza entorrinal, perirrinal y parahipocámpal,<sup>119,121,124</sup> también hay participación de la corteza parietal posterior por su interconexión con el lóbulo temporal medial.<sup>128</sup>

### **2.3.3.4. Memoria no declarativa (implícita o procedimental)**

La memoria no declarativa se adquiere a través de la ejecución de varias habilidades cognitivas y motoras, sin conciencia del momento ni del lugar de adquisición. Se va construyendo a través de la práctica y la repetición de varios ensayos, da lugar al aprendizaje de larga duración. El acceso es inconsciente y las áreas cerebrales relacionadas son el hipocampo, los ganglios basales y el cerebelo, entre otras. Suele ser una memoria fiel, rígida y duradera, derivada de tipos de aprendizaje básico y filogenéticamente antiguos, como la habituación y la sensibilización, el aprendizaje perceptivo y motor o los condicionamientos clásico e instrumental.<sup>129</sup>

Se han identificado dos subclases principales de memoria implícita: no asociativa y asociativa. En el aprendizaje no asociativo el sujeto aprende sobre las propiedades de un único estímulo, mientras que en el aprendizaje asociativo el sujeto aprende sobre la relación entre dos estímulos o entre un estímulo y una conducta.<sup>129</sup>

Las formas elementales de aprendizaje no asociativo son habituación y sensibilización. La **habituación** es la forma más simple de aprendizaje implícito y se refiere a la disminución de la respuesta a un estímulo benigno cuando este estímulo se presenta repetidas veces.<sup>130</sup> Por el contrario, en la **sensibilización** interviene un estímulo nocivo, el sujeto suele aprender a responder más enérgicamente no sólo a ese estímulo, sino también a otros, incluso los inocuos.<sup>131,132</sup> Los reflejos de defensa, retracción y escape se exaltan, el más estudiado es el reflejo de *Aplysia*.<sup>133</sup>

También se han diferenciado dos formas de aprendizaje asociativo, basándose en los procedimientos experimentales utilizados para establecer el aprendizaje. El **condicionamiento clásico o Pavloviano** que implica aprender una relación entre dos estímulos, y el condicionamiento operante que supone aprender la relación entre la conducta de un organismo y las consecuencias de dicha conducta.<sup>134</sup> El **condicionamiento operante** también es conocido como aprendizaje instrumental o por ensayo y error. Se caracteriza porque los organismos emiten espontáneamente, un número indeterminado de respuestas que forman parte de su repertorio conductual (caminar, emitir sonidos, etc.). A estas respuestas se les denomina operantes. Si alguna de estas respuestas es seguida de algún evento o estímulo favorable para el organismo, entonces esa conducta tenderá a repetirse. Al estímulo favorable que sigue a la respuesta se le llama reforzador.<sup>118</sup>

### **2.3.3.5. Otros tipos de memoria**

#### **2.3.3.5.1. Memoria prospectiva**

La memoria prospectiva se basa en nuestras intenciones que tenemos de poder actuar en el futuro.<sup>110,135</sup> A veces las intenciones de actuar son interrumpidas por otras necesidades inmediatas, es decir son suspendidas temporalmente pero

almacenadas en la memoria, lo que significa que tenemos que reactivar o recuperar estos recuerdos en un punto apropiado en el futuro.<sup>136</sup>

Existen dos tipos de memoria prospectiva: La memoria prospectiva basada en el tiempo, la cual implica recordar que se debe tomar alguna acción en un punto específico en el futuro, aquí, el gatillo se centra en el paso del tiempo. La memoria prospectiva basada en eventos, la cual implica recordar realizar una acción cuando se produce un evento. Aquí, el disparador para recuperar una memoria prospectiva es la ocurrencia de un evento específico en el entorno.<sup>110</sup>

#### **2.3.3.5.2. Memoria de reconocimiento.**

Es la capacidad de reconocer un estímulo previamente experimentado y se basa en dos procesos, el primero es un sentido de familiaridad que se experimenta de inmediato y varía de una leve intuición a estar plenamente convencido, (por ejemplo ves a una persona que te parece familiar, estás seguro que la conoces, pero no recuerdas de dónde o cuándo la conociste), el segundo proceso, es el recuerdo, que implica la recuperación de información o asociaciones cualitativas impulsadas por una señal crítica. (es decir de repente con esta persona que no recuerdas, se lleva a cabo una conversación casual, te da algunas pistas y de inmediato recuerdas su nombre y dónde la conociste).<sup>137</sup>

#### **2.3.3.5.3. Memoria falsa**

La memoria falsa son recuerdos semánticos o autobiográficos que no ocurrieron. Se ha asociado con distintas enfermedades neurológicas (traumatismos craneoencefálicos, encefalitis, herpes, aneurismas, esclerosis múltiple, etc.), aunque también se presenta en personas sanas. Se expresa a través de confabulaciones, que son declaraciones falsas sin un esfuerzo consciente por engañar. Los confabuladores no son conscientes de la falsedad de sus declaraciones.<sup>138</sup>

#### **2.3.4. Estructuras anatómicas implicadas en el proceso de aprendizaje y memoria.**

Existen múltiples regiones anatómicas en el SNC implicadas en el proceso de aprendizaje y memoria. Las áreas anatómicas y sus diferentes vías o zonas de asociación, van a depender del tipo de memoria de que se trate. En términos generales está involucrada la corteza cerebral (lóbulo frontal,<sup>139</sup> parietal,<sup>128,140</sup> temporal,<sup>119</sup> occipital, corteza límbica, circunvolución dentada),<sup>109</sup> el lóbulo temporal medial que incluye la región parahipocampal (corteza perirrinal, entorrinal y parahipocampal) y la región del hipocampo (giro dentado, cuerno de Ammon y subiculum),<sup>108,119,137,141</sup> núcleos grises centrales o núcleos basales (tálamo, amígdala, cuerpo estriado), cerebelo, cuerpos mamilares.<sup>140,142-144</sup>

#### **2.3.5. Hormonas que participan en el proceso de aprendizaje y memoria.**

Hay evidencia de que múltiples hormonas interactúan con el sistema nervioso central para modular la formación de la memoria. La glándula suprarrenal juega un papel importante a través de la médula suprarrenal que produce adrenalina y la corteza que produce cortisol o corticosterona en los roedores.<sup>143</sup> Los efectos de la adrenalina son mediados por la activación de los receptores  $\beta$  adrenérgicos que se encuentran localizados en las aferentes vagales que se proyectan sobre el núcleo del haz solitario en el tallo cerebral, enviando proyecciones noradrenérgicas sobre el locus coeruleos y de esta manera regulando la consolidación de la memoria.<sup>145</sup> Las emociones activan al locus coeruleos produciendo la liberación de noradrenalina en varias regiones corticales y subcorticales que mejoran la plasticidad sináptica y la memoria.<sup>143</sup> Los glucocorticoides participan en la modulación y consolidación de la memoria activando los receptores de glucocorticoides de baja afinidad.<sup>145</sup> La amígdala cerebral juega un papel crítico en la consolidación de la memoria, a través de la influencia del sistema adrenérgico y la liberación de noradrenalina.<sup>104</sup>

Múltiples hormonas participan en la consolidación de la memoria entre las que destacan, la hormona liberadora de corticotropina, adrenocorticotropina, vasopresina,

oxitocina, sustancia P, histamina, colecistoquinina,<sup>145</sup> y también existe participación de progesterona y la prolactina.<sup>146</sup> Las hormonas sexuales esteroideas, en especial el estradiol son importante en la regulación morfológica del hipocampo, aumentan la cantidad de NMDAr, participan en la plasticidad sináptica, potenciación a largo plazo (LTP), aprendizaje y memoria en roedores machos y hembras.<sup>147</sup> Hay estudios contradictorios sobre los efectos de la testosterona, pero en general han mostrado que existe una mejoría en la memoria espacial de trabajo.<sup>148</sup>

### **2.3.6. Aspectos moleculares de la memoria**

Existen múltiples mecanismos moleculares de la memoria, dependiendo de si se trata de organismos invertebrados o vertebrados, con diferencias de acuerdo al tipo de memoria de que se trate.

En el caso de los mamíferos, en términos generales, se requiere una conexión sináptica, donde tiene que participar una neurona presináptica y una neurona postsináptica, entre ambas existe el espacio o hendidura sináptica.

Para que se inicie el proceso de memoria, se requiere un estímulo sobre la neurona presináptica, es decir un potencial excitador, que provoca la liberación de glutamato hacia la hendidura sináptica, dicho neurotransmisor va a actuar sobre la membrana de la neurona postsináptica, en donde se encuentran múltiples receptores ionotrópicos glutamatérgicos, principalmente los NMDAr; estos receptores pueden ser activados por dos mecanismos, ya sea directamente por el glutamato<sup>149</sup> o a través de los receptores AMPA,<sup>150</sup> los cuales permiten que se abra su propio canal, dando paso a  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , que a su vez provocan la despolarización de la membrana post sináptica, permitiendo que se mueva el magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ), que se encuentra bloqueando el canal de los NMDAr, dando paso a al flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  del exterior hacia el interior de la célula,<sup>151,152</sup> el  $\text{Ca}^{2+}$  se une a la calmodulina y a la proteína cinasa (PK) dependiente de calmodulina y a la PK (A y C) que a su vez activan a la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) la cual se transporta al núcleo y activa a la proteína de unión al elemento de respuesta de AMPc (CREB), dando como resultado

la expresión de varios genes, como pueden ser el activador del plasminógeno tisular (tPA) y el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), entre muchos otros. Finalmente se van formar nuevas proteínas y van a producir cambios conformacionales en la neurona, así como la formación de nuevas sinapsis.<sup>153</sup>

### **2.3.7. Neurotransmisores que participan en aprendizaje y memoria**

Varios sistemas de neurotransmisión son importantes en el proceso de aprendizaje y memoria. El glutamato que es el neurotransmisor excitatorio más importante del SNC,<sup>154</sup> es el principal modulador de neuroplasticidad, y participa en la transmisión sináptica, potenciación a largo plazo, depresión a largo plazo, maduración neuronal y en la sinaptogénesis.<sup>155</sup> Otros neurotransmisores que participan en estos procesos son GABA, dopamina, serotonina,<sup>156</sup> y también se han reportado la participación de sustancia P, acetilcolina, y noradrenalina.<sup>157</sup>

### **2.3.8. Receptores que participan en la memoria**

#### **2.3.8.1. Receptor NMDA (Ácido N-metil-D-aspartico)**

Existen dos grandes grupos de receptores de glutamato: los receptores metabotrópicos y los ionotrópicos.

Los receptores de glutamatoérgicos ionotrópicos son canales iónicos activados por ligando divididos con respecto a sus propiedades farmacológicas en las siguientes sub-grupos de receptores: GluA (AMPA, 2-amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-ácido propanoico), GluK (Kainato), GluN (NMDA, ácido N-metil-D-aspartico), y GluD ( $\delta$ ), en donde en todos los casos el glutamato es el neurotransmisor.<sup>158-161</sup>

Los receptores NMDA son tetrámeros heterómeros con tres unidades principales y sus respectivas subunidades: GluN1 (NR1) con 8 diferentes isoformas o variantes de empalme (1a-4a y 1b-4b),<sup>162,163</sup> GluN2 (NR2) con las subunidades A,B,C,D y GluN3 (NR3) con las subunidades A,B.<sup>164</sup> Cada subunidad contiene su dominio amino-terminal extracelular (ATD), un dominio de unión extracelular (LBD), tres dominios transmembranales (TMD) M1, M3, M4 y un dominio intracelular carboxilo-terminal (CTD).<sup>162,165,166</sup>



La estructura habitual del receptor es una proteína integrada a la membrana compuesta de cuatro subunidades: dos GluN1 unidas a dos GluN2 o una combinación de GluN2 y GluN3, las subunidades integradas forman un canal catiónico que es diez veces más permeable al  $\text{Ca}^{2+}$  que al  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ ,<sup>151</sup> además el  $\text{Mg}^{2+}$  extracelular bloquea el canal y juega un papel fundamental en la activación y adecuado funcionamiento de los NMDAr,<sup>167,168</sup> se requiere de dos moléculas de glutamato y dos moléculas de sus co-agonistas ya sea glicina o D-serina para la activación de los NMDAr.<sup>169</sup> Los NMDAr están localizados en la región pre y post sináptica, en la membrana plasmática, aunque también se han encontrado de manera extra sináptica en la membrana de la neurona, espinas, eje de las dendritas, axones o glia.<sup>170,171</sup>

Los receptores GluN2A y GluN2B están presentes predominantemente en la corteza cerebral, la amígdala cerebral y el hipocampo;<sup>164,172</sup> la LTP depende principalmente de los receptores en los que predominan las subunidades GluN2A y la depresión a largo plazo (LTD) depende de los receptores donde predominan los GluN2B.<sup>173-176</sup>

Los NMDAr participan principalmente en el desarrollo, sobrevivencia y apoptosis neuronal, sinapsis, plasticidad sináptica, metaplasticidad, potenciación a largo plazo y depresión a largo plazo, así como en el aprendizaje y en la memoria.<sup>151,154,177-181</sup>

### **2.3.8.2 Receptor AMPA (2-amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-ácido propanoico)**

Los receptores AMPA pertenecen a la familia de receptores de glutamato, son ionotrópicos, son tetrámeros que se pueden presentar como homómeros o heterómeros con cuatro subunidades principales GluA1-4 (GluR1-4), donde cada subunidad contiene los mismos dominios que los NMDAr.<sup>182-184</sup>

El AMPAr es una proteína integrada a la membrana compuesta de cuatro subunidades, que forman un canal catiónico que es permeable al  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , y en menor proporción al  $\text{Ca}^{2+}$ .<sup>185</sup>

El AMPAr participan principalmente en sinapsis, plasticidad sináptica, metaplasticidad, potenciación a largo plazo y depresión a largo plazo, así como en el aprendizaje y en la memoria.<sup>186,187</sup>

### **2.3.8.3. Receptores nicotínicos**

Los receptores colinérgicos se dividen en dos grandes grupos, de acuerdo a la actividad de su alcaloide agonista natural en: muscarínicos metabotrópicos (mAChR) y nicotínicos ionotrópicos (nAChR), ambos activados por la acetilcolina (ACh).<sup>188</sup> Los receptores nAChR pertenecen a una gran familia de receptores de canales iónicos, con dos localizaciones principales: en músculo y en sistema nervioso.<sup>189</sup>

Existen 17 subunidades de receptores nicotínicos,  $\alpha 1$ - $\alpha 10$ ,  $\beta 1$ - $\beta 4$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ , la subunidad  $\alpha 8$  no se encuentra en humanos.<sup>189,190</sup> Los nAChR neuronales pueden ser homopentámeros o heteropentámeros, son selectivos para  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  y tienen una permeabilidad relativa de  $\text{Ca}^{2+}$ ,<sup>191</sup> contienen las subunidades ( $\alpha 2$ - $\alpha 7$ ,  $\beta 2$ - $\beta 4$ ),<sup>188,192,193</sup> organizadas alrededor de un poro central, contienen un dominio N-terminal extracelular que posee el sitio de unión del agonista, cuatro dominios transmembranales (M1-M4) y un dominio intracelular (M3-M4).<sup>194,195</sup>

Los nAChR neuronales son abundantes en zonas presinápticas y postsinápticas, se encuentran localizados principalmente en la corteza cerebral, el hipocampo, el hipotálamo, el tálamo, los núcleos basales, el área ventral tegmental, la sustancia negra y el cerebelo;<sup>196,197</sup> las subunidades de los nAChR forman múltiples combinaciones, entre las que destaca la  $\alpha 4\beta 2$  (se encuentra en el 90% en el SNC) y  $\alpha 7$  (alta permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$ )<sup>198-200</sup>, ambas tienen elevada afinidad a la nicotina;<sup>201</sup> y la  $\beta 4$  que es más abundante en el sistema nervioso periférico (SNP).<sup>197</sup>

A nivel del hipocampo y de la corteza cerebral se han encontrado por lo menos nueve subunidades de los nAChR, los subtipos más abundantes y más importantes son el  $\alpha 7$  y la combinación  $\alpha 4\beta 2$ ,<sup>202,203</sup> que se han asociado con la formación de la memoria, plasticidad sináptica, y en la potenciación a largo plazo, aunque aún se desconoce con certeza el papel que desempeñan las diferentes subunidades.<sup>204,205</sup>

Las principales funciones de los nAChR, en conjunto con su neurotransmisor la acetilcolina, participan en la regulación y liberación de neurotransmisores (glutamato, dopamina, noradrenalina, serotonina, GABA,)<sup>206–208</sup> en el proceso de sinapsis, neuroprotección, plasticidad sináptica, potenciación a largo plazo, atención, aprendizaje, memoria (adquisición y consolidación) además de sueño, excitación, ansiedad y dolor.<sup>209–212</sup>

#### **2.3.8.4. Receptores metabotrópicos de glutamato**

Los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs), forman parte de una gran familia de receptores acoplados a proteína G, que se componen de 872 a 912 aminoácidos.<sup>213</sup> Están constituidos por siete segmentos hidrofóbicos separados por tres segmentos extracelulares y tres intracelulares, contiene un dominio extracelular amino terminal y un dominio intracelular carboxi terminal que se acopla a la proteína G.<sup>214,215</sup>

Estos receptores pueden ser homodímeros (mGlu5r) o con menos frecuencia heterodímeros (mGlu2/4r). Se dividen en tres grupos de acuerdo a su estructura molecular, a la homología de su secuencia, a sus propiedades de transducción de señales y a sus características farmacológicas:<sup>216,217</sup>

Grupo I (mGlu1r y mGlu5r), el grupo II (mGlu2r y mGlu3r) y el Grupo III (mGlu4r, mGlu6r, mGlu7r, mGlu8r) los tres grupos con múltiples variantes de ensamble.<sup>218–220</sup>

Se encuentran localizados en múltiples regiones del encéfalo, predominando en la corteza cerebral, el hipocampo, el cerebelo y los núcleos basales<sup>214,221</sup>

Cada grupo de receptores tiene funciones específicas, pero en general participan modulando la actividad de los receptores de canales iónicos activados por ligando incluidos los NMDAr, en el desarrollo neuronal, plasticidad sináptica, LTP, LTD, aprendizaje y memoria.<sup>213,217,218,222</sup>

### **2.3.8.5. Receptores a dopamina**

Los receptores dopaminérgicos pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G. Se han dividido en dos familias de acuerdo a sus características moleculares, en D1 ( D1 y D5) y D2 (D2, D3, D4),<sup>223-225</sup> se encuentran distribuidos en múltiples regiones en el SNC entre las que destacan los núcleos basales, el núcleo acumbens, la sustancia negra, la corteza cerebral, el cerebelo y el hipocampo.<sup>226,227</sup>

Los receptores dopaminérgicos están constituidos por 7 dominios transmembranales de 20 a 25 residuos hidrofóbicos cada uno, están conectados por 3 asas intracelulares y 3 extracelulares, contienen un dominio extracelular amino terminal y un dominio intracelular carboxi terminal que interacciona con la proteína G.<sup>228</sup>

Cada tipo de receptor dopaminérgico tiene funciones específicas, pero en general participan en locomoción, motivación, ritmo circadiano, plasticidad sináptica, atención, aprendizaje y memoria.<sup>229</sup>

### **2.3.8.6. Receptores de nociceptina**

Son receptores acoplados a proteína G, y son miembros de la familia de los opioides, su agonista endógeno es el neuropeptido nociceptina/orfanina. Estos receptores se encuentran en el sistema nervioso central y órganos periféricos y participan en múltiples funciones entre las que destacan stress, depresión, respuesta cardiovascular, efectos de drogas de abuso y ansiedad. Recientemente se ha estudiado su función en el aprendizaje y en la memoria en donde participa en la plasticidad sináptica y la consolidación de la memoria.<sup>157</sup>

### **2.3.8.7. Receptores sigma-1**

Los receptores sigma-1 se encuentran ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central, participan en la regulación y modulación de canales iónicos

regulados por ligando, entre los que se encuentran: Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup>, NMDAr y receptores a inositol trifosfato (IP3).<sup>230</sup> Los receptores sigma-1 participan en varios procesos fisiológicos, tales como la liberación de neurotransmisores, plasticidad sináptica, neuroprotección, aprendizaje y memoria.<sup>230,231</sup>

### **2.3.9. Cambios epigenéticos en la formación de la memoria.**

El cerebro humano tiene alrededor de 100 billones de neuronas que están interconectadas a través de sinapsis, y se cree que proporcionan la base para la codificación, consolidación y recuperación de la memoria.<sup>232</sup>

El concepto de epigenética en las neurociencias, se refiere a todos los procesos que implican modificaciones en las histonas, ácido desoxi-ribonucleico (DNA) y ácido ribonucleico (RNA).<sup>232</sup>

Las principales modificaciones en la formación de la memoria son:

Cambios en la acetilación, metilación y fosforilación de las histonas, en donde las enzimas que regulan estos cambios son esenciales en la función de la memoria, en especial la familia de las histona-diacetilinas (HDACs), las histona-acetiltransferasas (HATs), histona-metiltransferasas (HMTs) e histona-dimetilasas (HDM).<sup>232-234</sup>

Cambios en la metilación del DNA, que son mediados por la acción de la DNA-metiltransferasa (DNMTs) y recientemente se demostró que puede existir dehidrometilación del DNA mediada por proteínas de traslocación (TET).<sup>232,233</sup> Los recientes estudios sobre el RNA no codificante en especial sobre los microRNA, han demostrado que inducen la degradación o inhibición de la traducción de proteínas, los cuales participan en la expresión génica de la memoria y en la plasticidad cerebral.<sup>232</sup>

### **2.3.10. Factores de transcripción que participan en la formación de la memoria y plasticidad sináptica.**

La transcripción es el primer paso regulador en la expresión génica. Está mediada por la acción concertada de una multitud de factores de transcripción basales y regulados, que en un momento dado, se unen para mediar la transcripción de genes específicos.<sup>107</sup>

Se han reportado en el genoma alrededor de tres mil factores de transcripción, los que destacan en la memoria son los siguientes: CREB (cAMP response element binding protein), C/EBP (CCAAT enhancer binding protein), AP-1 (Activating protein-1), Egr (early growth response factor) Rel/NF-KB (real/nuclear factor KB).<sup>107,118,235</sup> Entre los de mayor importancia se encuentra el CREB, que es un factor que interviene en muchas funciones importantes en el sistema nervioso, entre las que destacan las siguientes: regulador de la sobrevivencia celular, neurogénesis, neuroprotección, regeneración axonal, ritmo circadiano, adicción, plasticidad sináptica, formación del aprendizaje y memoria.<sup>104,233,235</sup>

### **2.3.11. Consolidación de la memoria**

La adquisición de la información puede ser adquirida de dos maneras, de forma accidental o incidental e intencional. La forma accidental consiste en un aprendizaje no planificado o indirecto que se produce durante la adquisición de la información, mientras que la intencional es un aprendizaje directo que está motivado o dirigido a algo particular.<sup>236</sup>

La información recién aprendida por un tiempo limitado es lábil, sin embargo con el tiempo la información se vuelve estable y se consolida,<sup>107,234</sup> por lo que requiere una cascada de eventos moleculares y celulares que alteren la eficacia sináptica; es decir, se requieren modificaciones en la transcripción y traducción de genes,<sup>118,235</sup> y modificaciones de proteínas en las neuronas a través de regiones cerebrales específicas con el fin de almacenar adecuadamente los recuerdos después de su adquisición.<sup>234</sup> Existen dos fases en la consolidación de la memoria: la fase temprana

y la fase tardía.<sup>232</sup> El sistema de consolidación puede durar horas, días, semanas e incluso años, dependiendo de la tarea aprendida.<sup>237</sup> El proceso de la consolidación se puede interrumpir por múltiples causas, como la llegada de nueva información, inhibición de factores de transcripción, cualquier bloqueo de la vía metabólica o enfermedades del sistema nervioso.<sup>107</sup>

El sistema de consolidación implica la interacción entre el hipocampo y las áreas neocorticales,<sup>119,238</sup> principalmente la corteza prefrontal media, la orbitofrontal, el lóbulo temporal medial y la corteza anterior del cíngulo.<sup>108,141</sup> Además todas las conexiones de la amígdala con diferentes estructuras cerebrales son fundamentales para la consolidación de la memoria.<sup>143</sup> Durante la consolidación, la memoria depende cada vez menos del hipocampo, debido a que la memoria se va almacenando en las redes corticales, permitiendo que el hipocampo almacene nueva información.<sup>141</sup>

Se ha demostrado que el sueño promueve el proceso de consolidación en la memoria declarativa, ya que existe un incremento en la fuerza sináptica en muchos circuitos cerebrales.<sup>118,119,237</sup>

### **2.3.12. Reconsolidación de la memoria**

La reconsolidación es el proceso por el cual los recuerdos se desestabilizan al recuperarse subsecuentemente y se reestabilizan para que persistan en el cerebro.<sup>118,239,240</sup> Hay numerosos estudios que han demostrado que al recordar o recuperar la memoria, una memoria que ya estaba consolidada, entra en un período transitorio lábil que requiere un proceso denominado reconsolidación para restaurar la memoria previamente formada.<sup>107,234,241</sup> La fase de reconsolidación de la memoria es única, ya que proporciona una oportunidad para borrar o modificar la memoria existente.<sup>234</sup> Múltiples cambios epigenéticos son necesarios para reconsolidación de la memoria, principalmente modificaciones a nivel del DNA y de las histonas.<sup>232,234</sup>

Algunos recuerdos se reconsolidan simultáneamente en múltiples regiones del cerebro, principalmente en la amígdala, el hipocampo y la corteza del cíngulo anterior.<sup>139,234</sup>

### **2.3.13. Plasticidad cerebral**

La plasticidad cerebral se produce cuando las neuronas sufren cambios morfológicos y fisiológicos, debido al aprendizaje, reflejándose estos cambios en la fisiología global del cerebro.

**Metaplasticidad** es cuando algunos patrones de estimulación no tienen efecto directo sobre la fuerza sináptica, sino únicamente modulan los cambios posteriores de plasticidad.<sup>131</sup>

**Plasticidad sináptica**, son los cambios en la eficiencia sináptica, ya sea depresión a largo plazo o potenciación a largo plazo, producidos por ciertos patrones de actividad sináptica, este proceso requiere de síntesis de proteínas y cambios estructurales en las conexiones sinápticas.<sup>235,242</sup> En la plasticidad sináptica a largo plazo existen cambios permanentes en la fuerza de las conexiones sinápticas, que representan cambios celulares en el aprendizaje y la formación de la memoria.<sup>107</sup>

La plasticidad duradera se acompaña de cambios funcionales y estructurales en sinapsis específicas; L-LTD (LTD-tardía) se acompaña de silenciamiento y o eliminación de sitios sinápticos, mientras que L-LTP (LTP-tardía) se acompaña del fortalecimiento y o formación de nuevos sitios sinápticos.<sup>242</sup>

### **2.3.14. La potenciación a largo plazo**

La potenciación a largo plazo es un incremento persistente de la eficacia de la transmisión sináptica, tras estimular la vía aferente con pulsos de corriente eléctrica de alta frecuencia, es específica de las sinapsis activadas.<sup>131,242,243</sup> Se le conocen dos fases E-LTP (LTP-temprana) de menos de 4h, en donde se llevan a cabo las modificaciones de las proteínas existentes en la sinapsis.<sup>244</sup> Y la fase L-LTP, de más de 4 h, en donde hay síntesis de nuevas proteínas y síntesis de RNA.<sup>118,232</sup>



La L-LTP se asocia a cambios estructurales en la sinapsis, hay nuevas espinas dendríticas en diferentes etapas de desarrollo y hay aumento de NMDAr.<sup>245</sup>

La estimulación sináptica provoca un aumento en la síntesis de proteínas locales, existe un aumento en el porcentaje de espinas dendríticas que contienen poli ribosomas, después de la inducción con LTP, además el RNA sintetizado de novo se puede dirigir a las sinapsis activas.<sup>242</sup>

### **2.3.15. La depresión a largo plazo**

Es la depresión sináptica es una disminución persistente de la eficacia de la transmisión sináptica y es análoga a la LTP.<sup>131</sup> Ambas dependen de la activación de los NMDAr para su inducción, tienen un curso temporal similar y requieren de síntesis de proteínas para estabilizarse a largo plazo.<sup>245</sup>

### **2.4. Disolventes de abuso y memoria**

Los inhalables en general y en particular el tolueno, producen un deterioro cognitivo, donde hay deterioro del aprendizaje y en la memoria a corto y largo plazo. Hay evidencia de atrofia de corteza cerebral y de cerebelo, leucoencefalopatía, daño axonal y desmielinización, además también se han observado alteraciones en las dendritas de neuronas piramidales de la corteza entorrinal.<sup>246</sup>

El tolueno como prototipo de los inhalables, tienen efecto directo sobre los receptores NMDA produciendo una inhibición a concentraciones de 9 mM en los NR1/2A y NR1/2C y a 1mM en los receptores NR1/2B, en los estudios realizados en ovocitos de rana *Xenopus laevis*;<sup>247</sup> además el tolueno demostró ser más sensible que el etanol, ya que presentó inhibición de los receptores con concentraciones 100 veces menor.<sup>247</sup> Los mismos resultados se obtuvieron cuando se realizó el estudio con benceno, xileno, etilbenceno y propilbenceno, en el mismo modelo experimental, observándose una inhibición rápida, dependiente de la dosis y reversible.<sup>248</sup>

Hay evidencia de disfunción sináptica de los NMDAr en el hipocampo, cuando se administra tolueno en fases tempranas del desarrollo del SNC.<sup>249</sup> Además cuando se

administra tolueno a ratas embarazadas, se ha demostrado que se producen alteraciones en el desarrollo del SNC, con alteraciones motoras en las crías.<sup>250</sup>

Miyagawa y col., en 1995, encontraron que al administrar 600 ppm de tolueno cada 24 h por 50 días a ratas macho a partir del día postnatal (PN) 23, no se produjeron cambios significativos en la memoria de trabajo en el prueba del laberinto del brazo radial.<sup>251</sup>

Hass y col., en 1999, expusieron a ratas hembras a tolueno a 1200 ppm, 6 horas por día, del día prenatal 7 hasta el postnatal 18, es decir, un total de 35 días, demostrando en las crías un incremento en actividad motora, pero sin cambios en la memoria-aprendizaje en el laberinto de Morris.<sup>252</sup>

Von Euler y col., en 2000, hicieron un estudio con ratas macho Sprague-Dawley PN 50, las que expusieron a tolueno inhalado 80 ppm, 5 días por semana, por 4 semanas, posteriormente las sometieron a las pruebas de memoria-aprendizaje en el laberinto de Morris, sin encontrar diferencias significativas en la latencia de escape. Sin embargo, durante la prueba de retención realizada una semana después del aprendizaje, las ratas expuestas a tolueno mostraron un tiempo más largo en el cuadrante correcto, lo que supone una mejoría en su memoria espacial, aunque no está claro el mecanismo.<sup>253</sup>

Chen y col., en 2004, demostraron alteraciones en la sinaptogénesis, administrando a ratas, tolueno intraperitoneal 1000mg/kg/día, (PN 4 al 9); además encontraron alteraciones en los NMDAr (PN 30) con incrementos en los NR2A a nivel de hipocampo y de cerebelo.<sup>254</sup> Por su parte Lee y col., en 2005, administraron a ratas Sprague Dawley (PN 4 al 9) tolueno (500 mg/kg, ip), encontrando también un aumento significativo en la expresión de los NR2A a nivel de hipocampo y de cerebelo en el día PN 30.<sup>255</sup> Win-Shwe y col., en 2007, en un estudio llevado a cabo en ratones también encontraron incrementos significativos en la expresión de RNAm del NR2A en hipocampo y sin cambios significativos en NR2B.<sup>256</sup>

Chen y col., en 2005, utilizaron ratas Sprague-Dawley (PN 4 a 7) administraron tolueno intraperitoneal a dosis de 200, 500 , 1000 mg/kg, al PN 8 se aspiraron células del cerebelo, para realizar cultivos de neuronas granulares, encontrando reducción intracelular de señales de  $Ca^{2+}$  en respuesta a glutamato/glicina y NMDA/glicina, además de disminución de la subunidad NR2B *in vitro* al 5o día, pero sin cambios al día 14. Estos cambios físicos y funcionales del NMDAr pueden contribuir a la disfunción cerebelar.<sup>257</sup>

Win Shwe y col., en 2010, administraron tolueno a ratones (C3H/HeN) del día postnatal 8 al 12 a concentraciones de 5 y 50 ppm durante 6 h, por 5 días, por vía de la inhalación, en dicho estudio observaron incrementos significativos de la expresión de RNAm de las subunidades NR1, NR2A y NR2B a nivel del hipocampo. Ellos sugieren que el tolueno puede incrementar la liberación del glutamato en la región sináptica y activar a los NMDAr en las neuronas post sinápticas, como un mecanismo compensador y de esta manera incrementar la expresión de los RNAm; también sugieren que el tolueno produce apoptosis en el hipocampo y que se puede compensar incrementando los NMDAr.<sup>258</sup>

Heung Seo y col., en el 2010, demostraron que hay reducción en la neurogénesis del hipocampo en ratones macho adultos C57B2/6 (8 a 9 semanas) , posterior a la administración de tolueno de manera aguda (500mg/kg, i.p.) además, se realizó la prueba del reconocimiento del objeto novedoso a las 24 h y 4 días después de la administración del tolueno, encontrando una disminución significativa de la memoria en los ratones tratados con tolueno en relación con el grupo control.<sup>259</sup>

Zhvania y col., en 2012, demostraron que hay pérdida de neuronas piramidales a nivel de CA1 y CA3 del hipocampo de ratas Wistar adolescentes y adultas, expuesta a tolueno (2000 ppm) durante un mes.<sup>260</sup> Por su parte Kyuhong Lee y col., en 2015, administraron tolueno 7000 ppm a ratas Sprague-Dawley, durante 4 horas por vía inhalatoria, encontrando una disminución significativa en la neurogénesis hipocampal.<sup>261</sup>

Beasley y col., en 2012, administraron tolueno a concentraciones de 0, 10, 100, 1000 ppm durante un mes (6h por día por 5 días a la semana) a ratas macho Long Evans, iniciando el día PN 67, y no encontraron cambios significativos en relación a motilidad, ansiedad, y prueba de autoaprendizaje en caja de Skinner.<sup>262</sup>

Shwey y Fujimaki en 2012, realizaron un estudio de retención de memoria no espacial en ratones hembras C3H/HeN, (7 semanas de edad) administraron tolueno de manera aguda (300 mg/kg i.p.), una hora antes de la fase de retención (cuando se coloca el objeto familiar y el objeto novedoso) en la prueba de reconocimiento de objetos, y después a través de RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa) analizaron la expresión de RNAm de NR1, NR2A, NR2B de los NMDAR en hipocampo, demostrando una disminución significativa en NR1 y NR2B, además de disminución en la retención de la memoria no espacial.<sup>263</sup>

Huerta-Rivas y col., en el 2012, estudiaron la memoria declarativa a corto plazo, con la prueba del objeto novedoso en ratas Wistar adolescentes (PN 35) y jóvenes (PN 56) exponiendo a los animales a diferentes concentraciones de tolueno (1000, 2000, 4000, 6000) de manera aguda (en una sola ocasión por 30 min), realizando la prueba 30 min después de la exposición, y encontrando una disminución significativa de la memoria en relación al grupo control con todas las dosis de tolueno, aunque llama la atención que el índice de reconocimiento en todos los grupos se encontró por arriba del 50%. Por otro lado para la exposición crónica, las ratas se expusieron a tolueno 6000 ppm, durante 12 días por 30 min por día (ratas adolescentes de PN 25 al 35 y las ratas jóvenes del PN 43 al 56), realizando la prueba a las 24 h, encontrando diferencia significativa en el índice de reconocimiento en relación a su control. En este estudio también se presentaron alteraciones epigenéticas en la acetilación de las histonas (H3y H4).<sup>264</sup>

Dick y col., en 2014, expusieron a ratas Wistar adolescentes (PN 27) a tolueno 10000 ppm por una hora, cada tercer día durante un mes, encontrado que no hay diferencias significativas en relación al aprendizaje motor en el rotarod, ni en el aprendizaje espacial en el laberinto de Morris; sin embargo, sí encontraron un retraso

en la adquisición del aprendizaje instrumental (caja de Skinner usando sacarosa al 5%).<sup>265</sup>

Callan y col., en 2015 expusieron a tolueno a ratas embarazadas (G8 a G20) a concentraciones de 8000 y 12000 ppm por 15 minutos, dos veces por día, evaluando la memoria espacial en el laberinto de Morris en las crías. En este estudio concluyeron que no hubo afectación en la capacidad de aprendizaje, pero sí se presentaron alteraciones leves en la memoria espacial a largo plazo con la concentración de 12000 ppm de tolueno.<sup>266</sup>

Furlong y col., en 2016, realizaron un estudio con ratas macho Wistar (PN 27), exponiendo a los animales a tolueno 10000 ppm, 1h diaria, 3 días a la semana, durante 4 semanas; 8 días después se realizaron pruebas de auto aprendizaje Pavloviano en caja de skinner con estímulo auditivo, sin encontrar diferencias significativas en el aprendizaje inicial en relación con el grupo control; no obstante 10 semanas después de la exposición a tolueno hubo un incremento en la expresión de las subunidades GluN2A y GluN2B del NMDAr a nivel del hipocampo.<sup>267</sup>

Montes y col., en 2017, estudiaron la memoria episódica en ratones Swiss Webster (PN 35-40), exponiéndolos a tolueno (1000, 2000, 4000, 6000 ppm) durante 30 min en una sola dosis y posteriormente realizando la prueba de reconocimiento del objeto novedoso, demostrando alteraciones en la memoria a partir de 2000 ppm. En este mismo estudio se expusieron los animales a tolueno de manera crónica a 2000 y 4000 ppm durante 30 min por 5 días por semana por 4 semanas, realizando la misma prueba de memoria cada semana, y demostrando alteraciones significativas en la memoria en comparación con el grupo control.<sup>268</sup>

### **3. Justificación**

A pesar de que existen diversos reportes epidemiológicos indicando que los trabajadores expuestos a disolventes de abuso por periodos prolongados, muestran deficiencias en el aprendizaje y en la memoria y que el consumo de inhalables es un problema importante de salud pública en México, este grupo de drogas de abuso es el menos estudiado.

Se sugiere que que hay múltiples mecanismos por los que el tolueno puede dañar la memoria, entre los más importantes se encuentran las alteraciones a nivel de receptores neuronales, principalmente los NMDAr, en donde esta descrito que actúa como un antagonista no competitivo.<sup>94</sup> Por lo tanto, es posible que la exposición repetida a altas concentraciones de tolueno en ratas tenga repercusiones sobre sus habilidades cognitivas en procesos de aprendizaje y memoria.

Hay evidencia proveniente de estudios realizados en ratas de que el tolueno destruye células piramidales del hipocampo y produce alteraciones en los circuitos neuronales de la memoria y aprendizaje,<sup>261</sup> así como también que altera el funcionamiento de múltiples receptores neuronales que se encuentran en gran cantidad en el hipocampo, que están relacionados con la memoria.<sup>257</sup>

Sin embargo, a la fecha aún hay pocos estudios en relación a la administración crónica de tolueno y sus efectos sobre el aprendizaje y memoria, además hay controversia en cuanto a las dosis, la duración de la exposición y el tipo de memoria que pueden afectar los disolventes de abuso.

#### **4. Hipótesis**

La exposición crónica a tolueno provoca una alteración en los procesos cognitivos de memoria.

#### **5. Objetivo general**

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

##### **5.1. Objetivos particulares**

1. Evaluar el efecto de la exposición crónica al tolueno sobre la memoria a largo plazo de tipo no declarativa, a través del condicionamiento clásico e instrumental, utilizando la prueba de auto aprendizaje, en la caja condicionante de Skinner.

2. Estudiar el efecto de la exposición crónica al tolueno sobre la memoria declarativa de tipo episódica en roedores, usando el modelo de reconocimiento del objeto novedoso.

## **6. Metodología**

### **6.1. Animales**

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, las cuales se dividieron en tres grupos: ratas de 7-8 meses, de 5-6 meses y de 4 meses, las que se mantuvieron bajo ciclo invertido de luz-oscuridad de 12:12 h, (luz de 21h a 09h) con libre acceso a comida y a agua. Todos los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo las regulaciones establecidas en la Norma Oficial Mexicana, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio "NOM-062-ZOO-1999".<sup>269</sup>

### **6.2. Diseño experimental**

El estudio se desarrolló en cinco etapas:

Los tres grupos de ratas estuvieron compuestos a su vez por dos subgrupos cada uno: el subgrupo de ratas expuestas a tolueno (4000 ppm) y el subgrupo control expuestas aire.

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

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

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

Cuarta etapa: para estudiar el efecto de los disolventes sobre la consolidación de la memoria, posterior a la prueba de memoria (24 h después), los animales se colocaron en la cámara de exposición estática durante 30 min, 2 veces al día, (con una diferencia de 6 h) durante las siguientes 4 semanas.

Quinta etapa: Al finalizar la etapa de exposición a tolueno (a las 24 hrs), los animales se volvieron a evaluar en las pruebas de actividad locomotora, en la de auto aprendizaje en la caja de Skinner y en la prueba del objeto novedoso.



### **6.3. Fármacos**

En este proyecto se empleó el tolueno (J.T. Baker) como disolvente de abuso representativo. Los animales se expusieron a tolueno en una cámara de exposición estática, de manera crónica<sup>22</sup> a una concentración de 4000 ppm, dos veces por día, (con una diferencia de 6 h entre cada exposición) durante 4 semanas, el grupo control se expuso a aire en las mismas condiciones. La concentración de tolueno se eligió porque simula la exposición en una situación de abuso a tolueno, además se ha visto que produce claros efectos conductuales en los animales pero con una recuperación total posterior.<sup>19</sup>

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

Se realizaron dos pruebas de actividad motora: una prueba en campo abierto en una superficie de 1 x 1m y la otra prueba se realizó dentro de la caja del objeto novedoso en una superficie de 40 x 40 cm. Se colocó a cada roedor durante 3 min para la habituación y 5 min para la realización de la prueba; dichas pruebas se grabaron para su evaluación. Se valoró la actividad vertical del animal, cuantificando el número de veces que el animal se levantó en sus dos patas, durante 5 min de prueba.<sup>270</sup> Ambas pruebas de motilidad se realizaron antes de la exposición del disolvente y después de un mes de exposición.

### **6.5. Exposición a tolueno**

Se utilizó una cámara de exposición estática de cristal de forma cilíndrica con un volumen de 29 l. Esta cámara consiste de una jarra cromatográfica con una tapa de acrílico. La tapa tiene puertos de inyección para administrar el disolvente y se encuentra unida en su parte interna al motor de un ventilador cuyas aspas proyectan hacia el interior de la cámara. Bajo los puertos de inyección se encuentra una malla metálica en donde se coloca un papel filtro, para que al administrar el disolvente éste no caiga directamente sobre el animal.<sup>264</sup> Para la exposición, cada rata se colocó de manera individual en el fondo de la cámara, se cerró la tapa, se inyectó una cantidad predeterminada de tolueno sobre el papel filtro y el ventilador se encendió a fin de

permitir la inmediata evaporación y distribución homogénea del disolvente. Las concentraciones de vapor deseadas se alcanzaron en un tiempo menor a 1 min y permanecieron constantes durante el tiempo de exposición (30 min). La cámara de exposición se encuentra por debajo de una campana de extracción de vapor, para evitar la acumulación de vapores en el laboratorio.



**Figura 1.** Cámara de exposición a disolventes

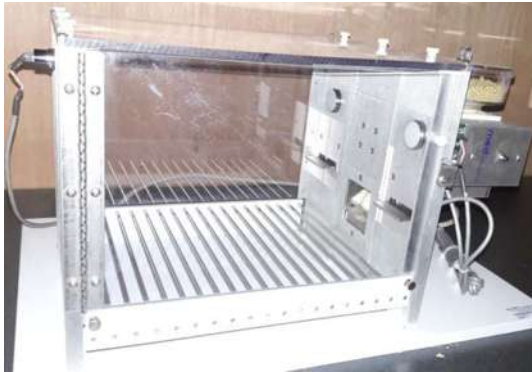
### **6.6. Prueba de auto-aprendizaje**

La prueba de auto aprendizaje combina los condicionamientos clásico e instrumental y requiere la integración de varias estructuras cerebrales (corteza pre frontal, hipocampo y cuerpo estriado) que intervienen en la formación de la memoria largo plazo.<sup>156</sup>

En este protocolo se utilizó la caja condicionante de Skinner (Med Associates, St Albans, VT), la cual es una caja con dimensiones de 30 x 25 x 25 cm, la pared anterior y posterior de la cámara son de aluminio y las paredes laterales de acrílico, hay una bandeja de comida (5 x 4cm) empotrada en la parte central de la pared anterior a 2 cm por encima del piso y a 5 cm a la izquierda se encuentra una palanca (a 4 cm por encima del piso) y una luz (blanca 28 V) a 6 cm por encima de la palanca. La caja condicionante se coloca dentro de otra caja externa que sirve para

atenuar los sonidos. Todas las respuestas fueron registradas a través de una interfase de computadora, usando el software Med -IV.<sup>271,272</sup>

A)



B)



**Figura 2.** Caja de condicionamiento operante de Skinner. (A , B)



**Figura 3.** Caja externa de atenuación de sonido



**Figura 4.** Interfase y sistema de computación con software Med-IV

La prueba consiste en colocar un animal hambriento (al que se le retiró la comida 24 h antes) en la cámara condicionante (caja de Skinner) para encontrar trozos de comida en el contenedor. Se dio una secuencia Pavloviana (estímulo-estímulo [S-S]) de luz y palanca (estímulo condicionado [CS]) seguida de comida o pellet (estímulo no condicionado [US]).<sup>273,274</sup> Después de un número de secuencias, el animal experimenta los estímulos condicionados y presenta la respuesta condicionada (CR), que consiste en presionar la palanca.<sup>156,275</sup> El incremento o decremento de CR se considera como una mejoría o deterioro de la memoria.<sup>276–278</sup>

La prueba de auto-aprendizaje que se utilizó, fue una modificación de la prueba utilizada por el Dr. Ofir Picazo y cols.,<sup>279,280</sup> en donde cada animal se colocó en la caja de Skinner por un período de habituación de 5 minutos teniendo acceso a 10 trozos de comida (45 mg cada uno) posteriormente se inició la prueba donde se le administraron otros 10 pellet con propósito de enseñanza. Se dieron un máximo de 7 sesiones de auto-aprendizaje con 24 horas de diferencia entre cada una, cada sesión consistió en 30 ensayos y 10 en la última sesión, cada ensayo consiste en 30 s de luz y 30 s de oscuridad. El resultado final fue el número de respuestas condicionadas del último día de sesión.<sup>156</sup> La prueba se realizó previo a la exposición del disolvente y 24 h posterior a las cuatro semanas de la aplicación al disolvente.

### 6.7. Modelo de reconocimiento de objeto novedoso

La tarea de reconocimiento de objetos, basada en el paradigma etológico de preferencia por la novedad, ha sido ampliamente utilizada como modelo para evaluar procesos de memoria declarativa de tipo episódica en roedores (Ennaceur y Delacour, 1988).<sup>120,268</sup> Los roedores son animales curiosos, por lo que su comportamiento natural es preferir el objeto novedoso (ON) por sobre el objeto familiar (OF).<sup>117</sup>

La prueba evalúa el tiempo que el roedor, previamente expuesto a dos objetos idénticos, explora un objeto novedoso. La primera parte de la prueba es la habituación, durante la segunda prueba (adquisición) el animal es inicialmente expuesto a dos objetos idénticos o familiares, mientras que en la tercera prueba (retención) se compara el tiempo que el animal utiliza en reconocer un objeto novedoso, que reemplaza a uno de los objetos familiares, con respecto al tiempo que explora el objeto familiar.<sup>117,245</sup>

La prueba fue dividida en una sesión de habituación, una de adquisición y dos de retención para evaluar memoria a corto y largo plazo.

Para llevar a cabo lo anterior se utilizó un campo abierto de acrílico de 40 x 40 x 30 cm.



**Figura 5.** Caja del objeto novedoso



**Figura 6.** Objetos familiares y novedosos

En la sesión de habituación, se colocó al roedor dentro de la caja durante 5 minutos, para que conociera y se habituara a la caja, luego se retiró al animal y se inició la sesión de adquisición.<sup>91</sup>

En la sesión de adquisición, se colocaron dos objetos del mismo tamaño y volumen de forma equidistante al vértice en cada esquina del campo abierto (objetos familiares "A1 y A2"), y al roedor se le dejó explorar por 5 minutos.<sup>281</sup>

Para evaluar la memoria a corto plazo, 60 minutos después de la sesión de adquisición al roedor se le permitió explorar durante 5 minutos el campo abierto donde se cambió previamente un objeto familiar por un objeto novedoso (A1 y B1).

En este caso, el objeto A1 le parece familiar, mientras B1 es el objeto novedoso.

Para evaluar la memoria a largo plazo, 24 horas post-reconocimiento se volvió a evaluar la preferencia por un nuevo objeto novedoso (A1 y B2).

La preferencia del animal por el objeto novedoso se registra cuando éste coloca la nariz a una distancia  $\leq 2\text{cm}$  del objeto novedoso,<sup>282</sup> lo toca con la nariz o coloca sus dos patas sobre el objeto novedoso,<sup>281</sup> no se registra si lo toca con el cuerpo o con la cola o si se acuesta encima del objeto.<sup>283,284</sup>

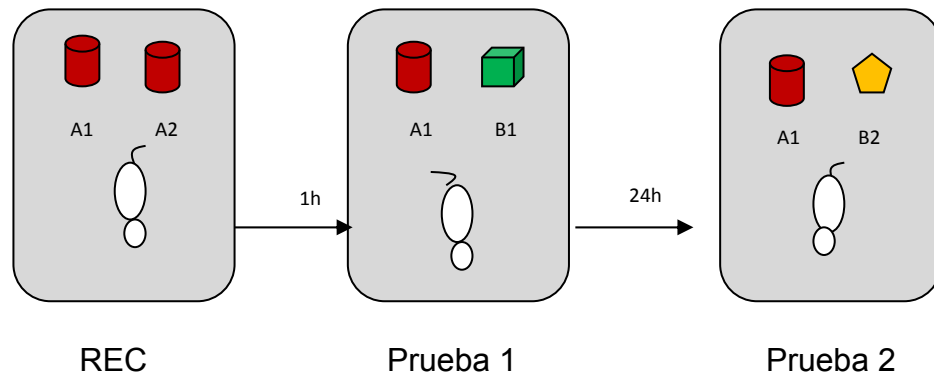
El campo abierto y los objetos fueron limpiados después de cada ensayo con etanol al 10% para eliminar rastros olfativos.<sup>281</sup>

Estas conductas se registraron en una cámara de video, lo cual permitió revisar a detalle la preferencia del roedor por el objeto novedoso y así calcular el índice de reconocimiento<sup>283</sup> ( $IR_{RO}$ ) con la siguiente fórmula:

$$IR_{RO} = \frac{\textit{T tiempo de exploración en el ON}}{\textit{T tiempo de exploración en el OF} + \textit{T tiempo de exploración en el ON}}$$

Donde OF, es el objeto familiar y ON es el objeto novedoso.  $IR_{RO} = 0.5$  indica que no hay preferencia hacia alguno de los dos objetos, mientras que un índice mayor a 0.5 indica una preferencia hacia el objeto novedoso. El índice de reconocimiento también se puede expresar como porcentaje.<sup>282</sup>

La prueba de reconocimiento del objeto novedoso se realizó previo a la exposición de tolueno y 24 h posteriores a las cuatro semanas de la exposición al disolvente, en donde se utilizaron objetos familiares y objetos novedosos diferentes a los usados en la primera etapa. Los objetos usados fueron figuras geométricas de madera.



**Figura 7.** Diseño experimental de la prueba de reconocimiento de objeto novedoso. Prueba conductual diseñada para evaluar la memoria episódica. REC: reconocimiento, objetos familiares "A1 y A2"; Prueba1: memoria a corto plazo (60 min post-reconocimiento), objeto familiar "A1" y objeto novedoso "B1"; Prueba2: memoria a largo plazo (24 horas post-reconocimiento), objeto familiar "A1" y objeto novedoso "B2".

## **7. Análisis de datos**

### **7.1. Análisis estadístico:**

Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  error estándar (E.E) de cada grupo experimental. Se realizaron pruebas de Kolmogorov-Smirnov para conocer la normalidad de los datos. En los datos que cumplieron los criterios de normalidad se realizó ANOVA de una vía, o ANOVA de medidas repetidas o en su defecto Kruskal-Wallis. Las diferencias entre cada grupo se analizó por medio de una prueba t-Student para pruebas independientes o t-Student para pruebas emparejadas según corresponda. En caso de no ajustarse los datos a las curvas de normalidad se realizaron pruebas no paramétricas ( U de Mann-Whitney o prueba de Wilcoxon).

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS versión 22, para la elaboración del material gráfico se usó el programa Sigma Plot (versión 15.0, SPSS Inc.). En todos los casos, se consideró que las diferencias entre los grupos fueron estadísticamente significativas con un valor de  $p < 0.05$ .

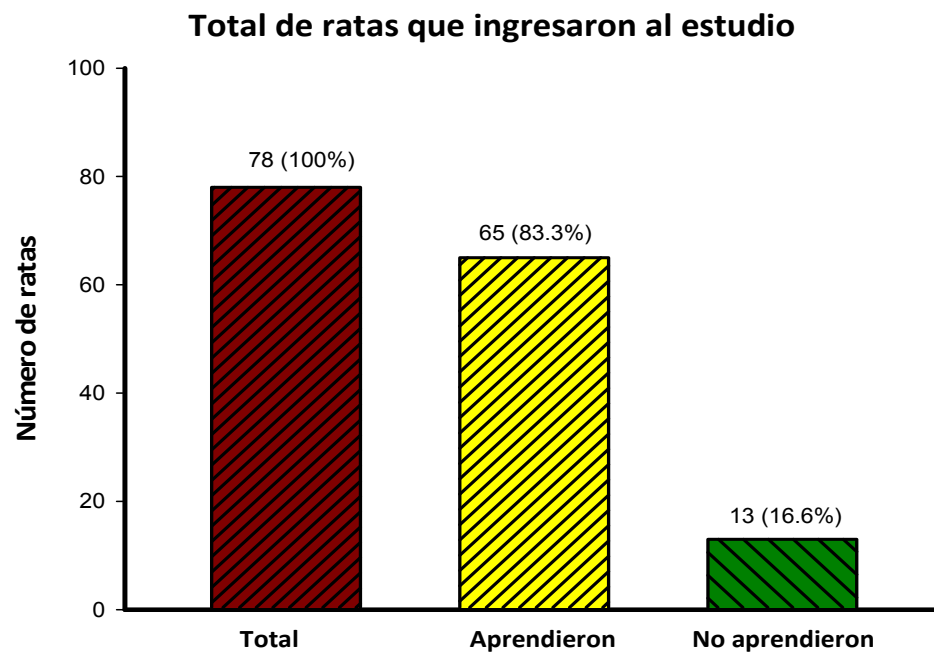


## 8. Resultados

- **Objetivo**
- **Estudiar el efecto de la exposición crónica al tolueno sobre la memoria, en un modelo de auto aprendizaje en ratas**

Se estudiaron un total de 78 ratas macho de la cepa Wistar machos, divididas en tres grupos: el primer grupo ratas de 7-8 meses, un segundo grupo de 5-6 meses y un tercer grupo de 4 meses.

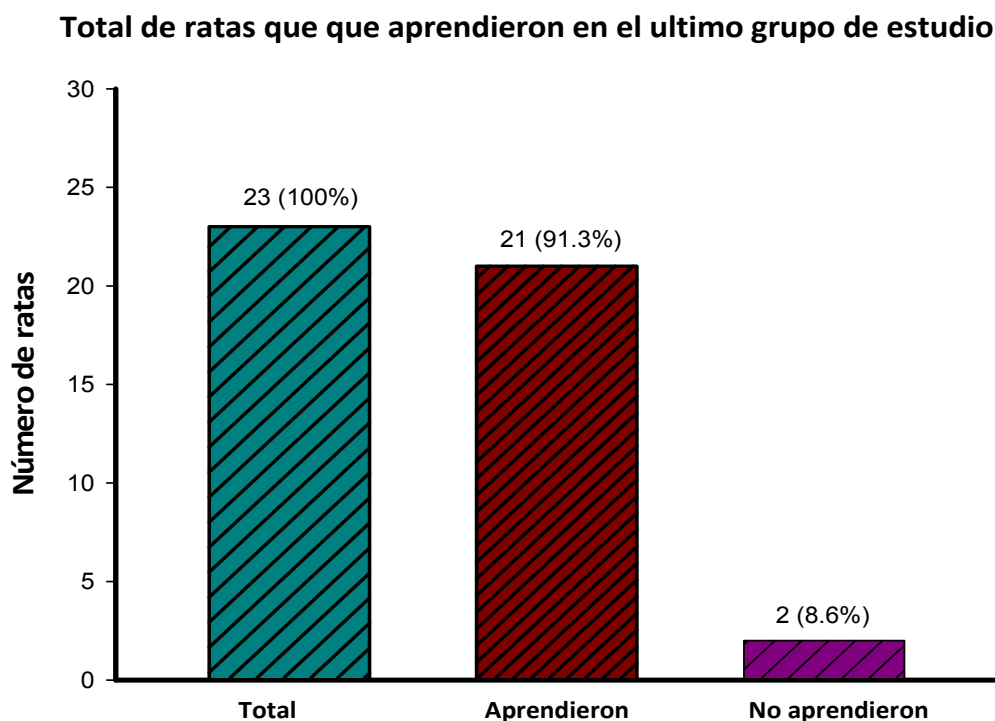
Los tres grupos se sometieron a las pruebas de auto aprendizaje en la caja de Skinner, en donde 65 ratas aprendieron la prueba (83.3%) y 13 no lograron aprender la tarea (16.6%) (Fig. 8).



**Figura 8.** Número total de ratas, que ingresaron a la prueba de auto aprendizaje en la caja de Skinner. Los resultados se muestran en número total y en porcentaje.

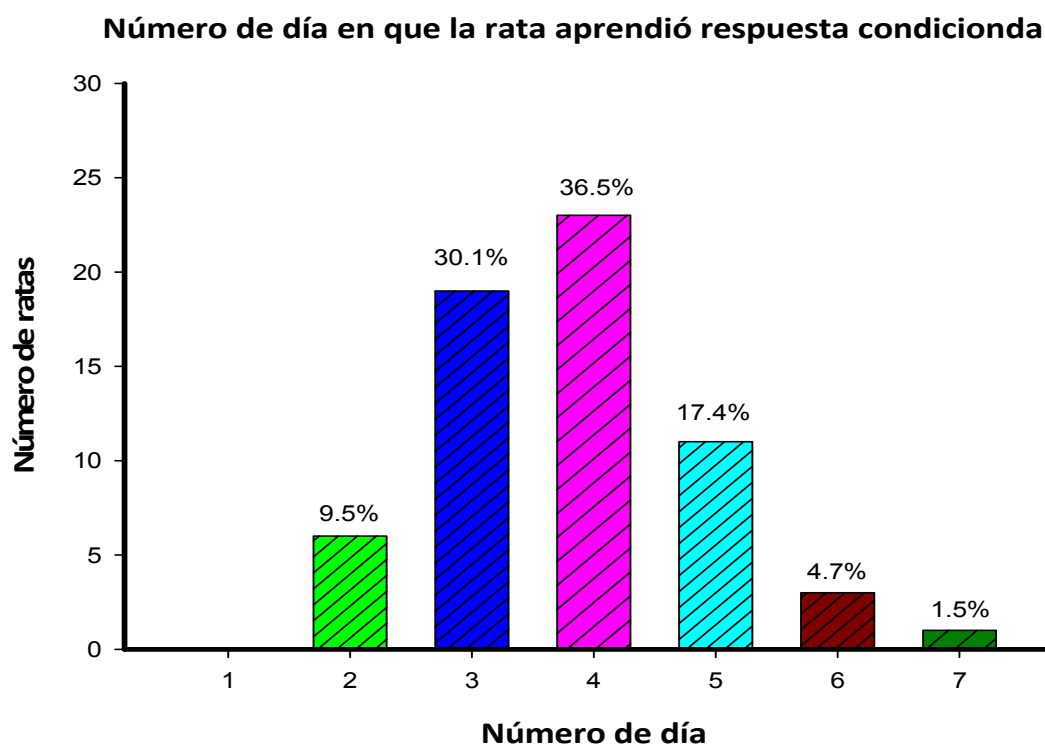
En el último grupo de estudio que corresponde a las ratas de 4 meses, fueron 23 ratas las que ingresaron a la prueba de auto aprendizaje de las cuales 21 aprendieron la prueba (91.3%) y 2 no aprendieron (8.6%) (Fig. 9). La diferencia con

el grupo total, es probable que se deba a que en este grupo ya se tenía experiencia con la prueba y estaba completamente sistematizada, por lo que consideramos que alrededor del 90% de los animales son los que logran aprender.



**Figura 9.** Número total de ratas de 4 meses, que ingresaron a la prueba de auto aprendizaje en la caja de Skinner. Los resultados se muestran en número total y en porcentaje.

En relación al número de día en que las ratas aprendieron la prueba, se observa que el mayor porcentaje corresponde al cuarto día con un 36.5%, en el tercer día aprendieron el 30.1%, el quinto día el 17.4%, el segundo día el 9.5%, el sexto día 4.7% y el séptimo sólo aprendió el 1.5% de los animales, de tal manera que la prueba se realizó en un máximo de 8 días para considerar que la rata no logró aprender la prueba (Fig. 10).



**Figura 10.** Número de día en que las ratas aprendieron la prueba de auto aprendizaje en la caja de Skinner. Los resultados se muestran en número total y en porcentaje.

En lo que respecta al número de respuestas condicionantes basales, previos a ingresar a la exposición al inhalable (tolueno), fueron un total de 63 animales los que participaron en esta fase de la prueba (2 ratas fallecieron en el transcurso del estudio) con una media de respuestas de  $53.38 \pm 1.27$ , con un mínimo de 38 y un máximo de 80 respuestas. Como se mencionó anteriormente, los animales se dividieron en 3 grupos: ratas de 7-8 meses, 5-6 meses y 4 meses, cada uno dividido en 2 subgrupos (aire y pretolueno). Se observó que hubo una disminución significativa en el número de respuestas en el grupo de ratas de 7-8 meses ( $p = 0.020$ ), (tabla 3, fig. 11). Al hacer comparaciones múltiples entre los diferentes grupos a través de ANOVA de una vía, se observó que no hubo diferencia significativa,  $F(5, 57) = 1.990$ ,  $p < 0.094$ , únicamente al realizar las pruebas post hoc hubo diferencia entre el grupo de 7-8 meses pre tolueno y el grupo de 5-6 meses pre tolueno. (Bonferroni:  $t(57) = -3.059$ ,  $p < 0.05$ )

Tabla 3. Respuestas condicionantes basales por grupo.

GRUPO	SUBGRUPO	N	MEDIA	EE	t	Gl	Sig (Bilt)
7-8 meses	Aire	9	54.22	3.39	-2.569	17	.020
	Pretolueno	10	45.30	1.26			
5-6 meses	Aire	11	54.00	4.02	.913	21	.372
	Pretolueno	12	58.08	2.17			
4 meses	Aire	10	54.70	3.22	.355	19	.727
	Pretolueno	11	53.09	3.17			

N= Número, EE= Error estándar, gl=Grados de libertad, Sig (Bilt)= Significancia bilateral Prueba estadística t de Student para muestras independientes. Significancia estadística  $p < 0.05$

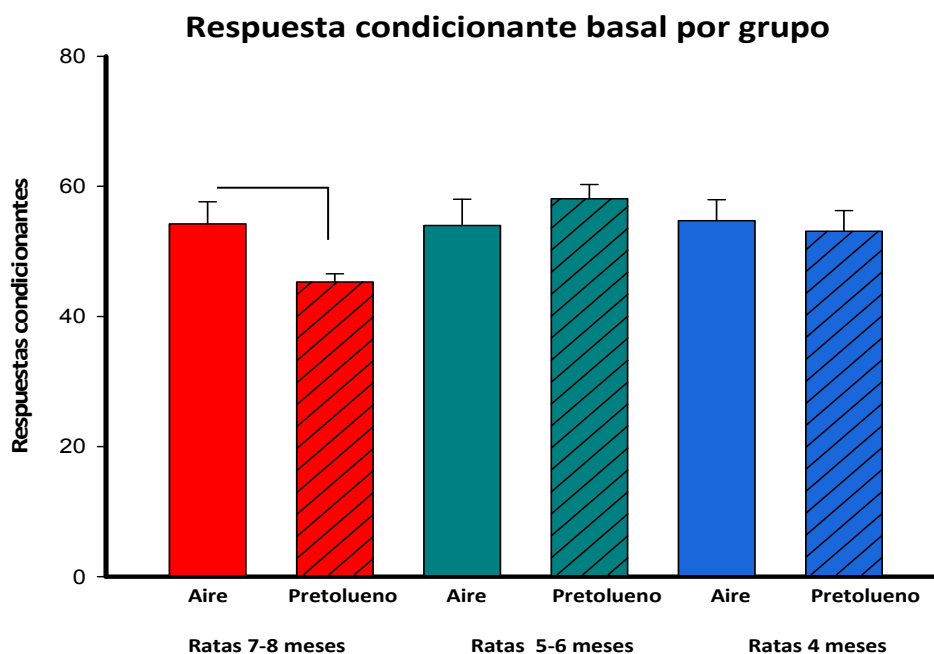


Figura 11. Número de respuestas condicionantes basales, por grupo de edad, en los subgrupos aire y pre-tolueno. Los resultados se muestran como media  $\pm$  error estándar,  $p < 0.05$ . Se observó diferencia significativa entre el grupo pretolueno y aire con una  $*p = 0.020$ .

En lo que respecta al número de respuestas condicionantes posterior a la exposición a tolueno o a aire durante un mes, fueron un total de 63 animales con una media de respuestas de  $54.37 \pm 2.31$ , con un mínimo de 5 y un máximo de 96 respuestas. Se dividieron en 3 grupos (ratas de 7-8 meses, 5-6 meses y 4 meses), cada uno dividido en 2 subgrupos (aire y tolueno). Se observó que no hubo diferencia significativa entre cada grupo (tabla 4). Al hacer comparaciones múltiples entre los diferentes subgrupos a través de ANOVA de una vía, se presentó diferencia significativa,  $F(5, 57) = 6.576$ ,  $p < 0.000$ , observándose en las pruebas post hoc, con la prueba Bonferroni, diferencia entre las ratas de 7-8 meses expuestas a tolueno y los demás subgrupos, donde las ratas expuestas al disolvente presentaron un menor número de respuestas (tabla 5, fig.12).

Tabla 4. Respuestas condicionantes post-tratamiento por grupo de edad.

GRUPO	SUBGRUPO	N	MEDIA	EE	t	GI	Sig (Bilt)
7-8 meses	Aire	9	43.11	3.76	-1.571	17	.135
	Tolueno	10	34.20	4.18			
5-6 meses	Aire	11	61.09	3.83	.068	21	.946
	Tolueno	12	61.50	4.56			
4 meses	Aire	10	56.90	7.20	1.030	19	.316
	Tolueno	11	65.09	3.83			

N= Número, EE= Error estándar, gl=Grados de libertad, Sig (Bilt)= Significancia bilateral  
 Prueba estadística t de Student para muestras independientes. Significancia estadística  $p < 0.05$

Tabla 5. Comparaciones entre el grupo de ratas de 7-8 meses expuesto a tolueno vs. los demás grupos.

Ratas 7-8 m Tolueno	Ratas 7-8 m	Aire	$t(57) = -1.271, p = 1.000$
	Ratas 5-6 m	Aire	$t(57) = -4.036, p = 0.002$
		Tolueno	$t(57) = -4.181, p = 0.002$
	Ratas 4 m	Aire	$t(57) = -3.328, p = 0.023$
		Tolueno	$t(57) = -4.636, p = 0.000$

Prueba estadística ANOVA de una vía. Post hoc prueba Bonferroni.  
Significancia estadística  $p < 0.05$ .

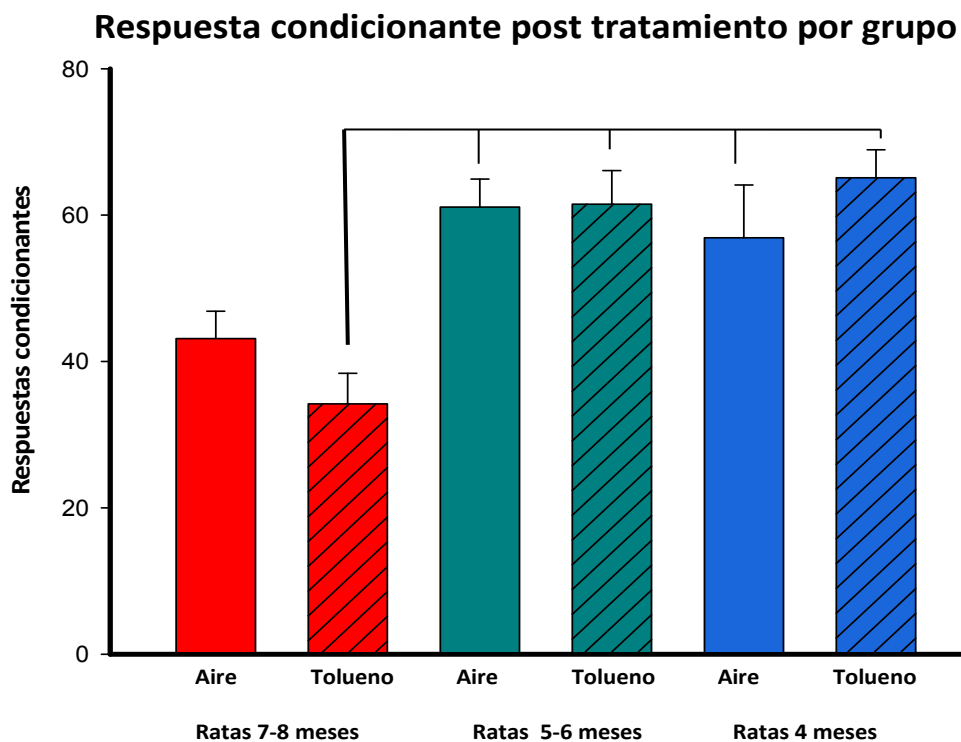


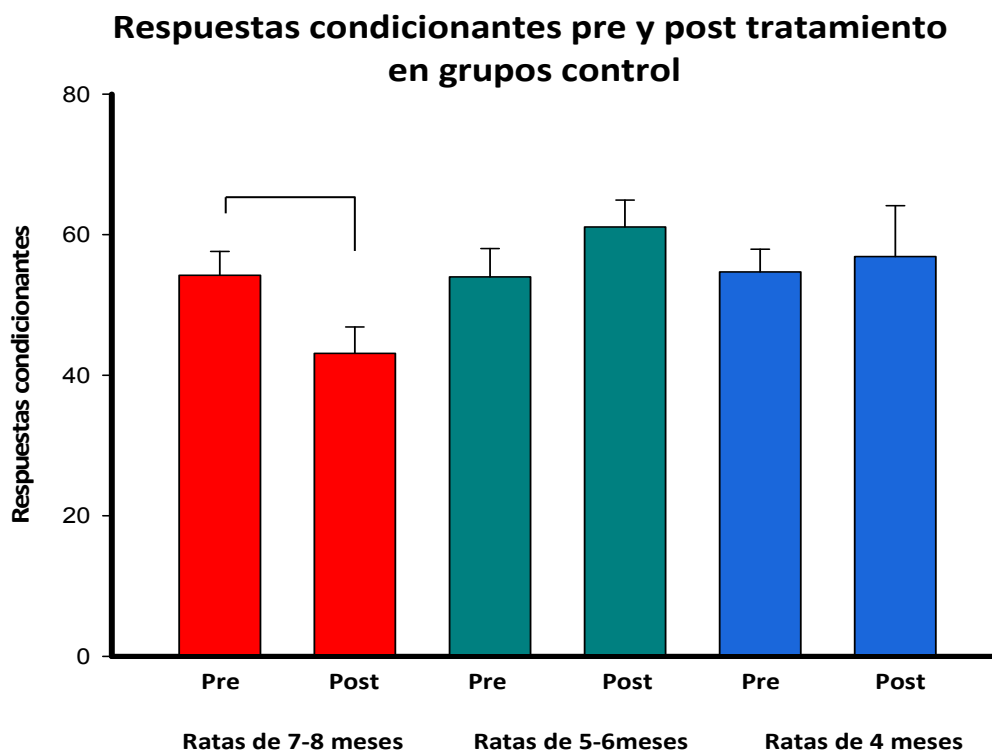
Figura 12. Número de respuestas condicionantes posterior a un mes de exposición a tolueno (4000 ppm) o a aire, por grupo de edad. Las barras representan la media ± error estándar,  $p < 0.05$ . Hubo diferencia significativa entre el grupo de 7 a 8 meses expuesto a tolueno y los grupos de ratas de 5-6 meses y 4 meses.(ver tabla 5)

Se analizó el número de respuestas condicionantes en las ratas control, pre y posterior a la exposición a aire durante un mes. Los animales se dividieron en los mismos 3 grupos (ratas de 7-8 meses, 5-6 meses y 4 meses), cada uno dividido en 2 subgrupos (pre aire y post aire). Se observó que hubo diferencia significativa únicamente en el grupo de 7-8 meses ( $p = 0.02$ ) (tabla 6, fig. 13), presentándose una disminución en el número de respuestas después del mes de exposición. Al hacer comparaciones múltiples entre los diferentes subgrupos a través de ANOVA de una vía, no hubo diferencia significativa  $F(5, 54) = 1.695$ ,  $p = 0.152$ . Tampoco hubo diferencia significativa al realizar ANOVA de medidas repetidas,  $F(2, 27) = 1.541$ ,  $p = 0.232$ .

**Tabla 6. Respuestas condicionantes pre y post-tratamiento en grupo control**

GRUPO	SUBGRUPO	N	MEDIA	EE	t	Gl	Sig (Bilt)
7-8 meses	<i>Pre-aire</i>	9	54.22	3.39	2.892	8	<b>.020</b>
	<i>Post-aire</i>	9	43.11	3.76			
5-6 meses	<i>Pre-aire</i>	11	54.00	4.02	- 1.663	10	.127
	<i>Post-aire</i>	11	61.09	3.83			
4 meses	<i>Pre-aire</i>	10	54.70	3.22	- .339	9	.742
	<i>Post-aire</i>	10	56.90	7.20			

N= Número, EE= Error estándar, gl=Grados de libertad, Sig (Bilt)= Significancia bilateral  
Prueba estadística t de Student para muestras relacionadas. Significancia estadística  $p < 0.05$



**Figura 13.** Número de respuestas condicionantes pre y posterior a un mes de exposición a aire, por grupo de edad. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar,  $*p < 0.05$ . Hubo diferencia significativa dentro del grupo de 7-8 meses con una de  $*p = 0.02$ .

Se analizó el número de respuestas condicionantes pre y posterior a la inhalación de tolueno durante un mes. Se dividieron en 3 grupos (ratas de 7-8 meses, 5-6 meses y 4 meses), cada uno dividido en 2 subgrupos (pretolueno y posttolueno). Se observó una disminución significativa en el grupo de 7-8 meses,  $p = 0.042$ , y en el grupo de 4 meses (tabla 7). Al hacer comparaciones múltiples entre los diferentes subgrupos a través de ANOVA de una vía, se observó diferencia significativa,  $F(5, 60) = 10.582$ ,  $p < 0.000$ , en las pruebas post hoc de Bonferroni, se observó una disminución en el número de respuestas en las ratas de 7-8 meses posttolueno con respecto a los demás subgrupos (tabla 8, fig. 14). También se presentaron diferencias significativas al realizar ANOVA de medidas repetidas,  $F(2, 30) = 15.633$ ,  $p < 0.000$ ; las diferencias con la prueba de Bonferroni, fueron entre el grupo de ratas de 7-8 meses y los grupos de 5-6 meses  $F(2, 30) = 5.027$ ,  $p < 0.000$  y 4 meses.  $F(2, 30) = 4.755$ ,  $p < 0.000$ .



Tabla 7. Respuestas condicionantes pre y post tolueno por grupo de edad.

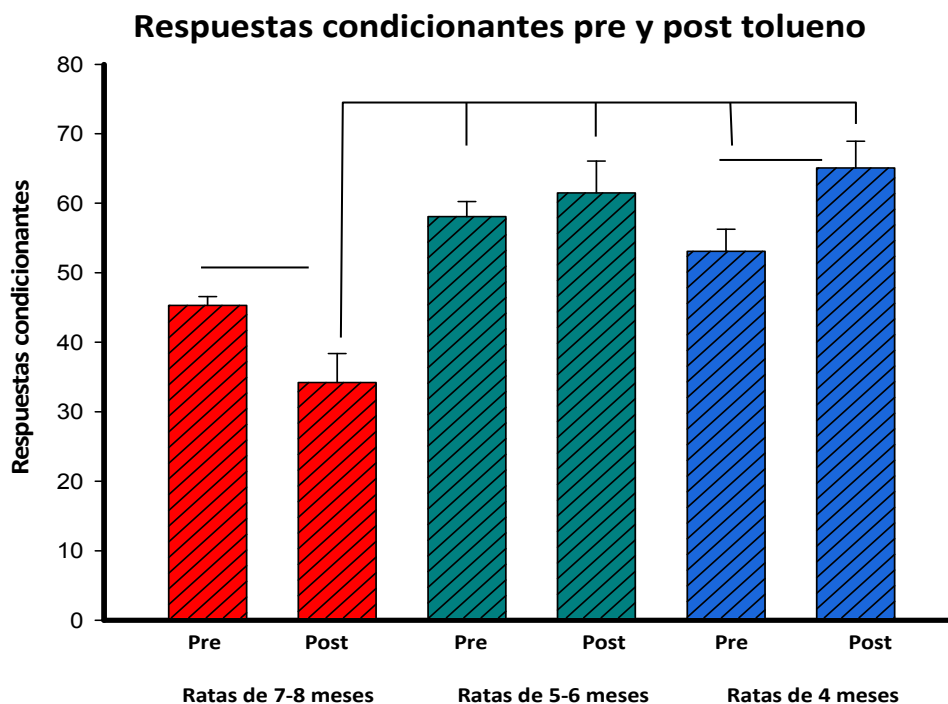
GRUPO	SUBGRUPO	N	MEDIA	EE	t	Gl	Sig (Bilt)
7-8 meses	<i>Pretolueno</i>	10	45.30	1.26	2.367	9	<b>.042</b>
	<i>Postolueno</i>	10	34.20	4.18			
5-6 meses	<i>Pretolueno</i>	12	58.08	2.17	-.914	11	.380
	<i>Postolueno</i>	12	61.50	4.56			
4 meses	<i>Pretolueno</i>	11	53.09	3.17	- 3.340	10	<b>.007</b>
	<i>Postolueno</i>	11	65.09	3.83			

N= Número, EE= Error estándar, gl=Grados de libertad, Sig (Bilt)= Significancia bilateral Prueba estadística t de Student para muestras relacionadas. Significancia estadística  $p < 0.05$

Tabla 8. . Comparaciones entre el grupo de ratas de 7-8 meses post- tolueno vs. los demás grupos.

<b>Ratas 7-8 m Post-tolueno</b>	Ratas 7-8 m	Pretolueno	$t(60) = -2.17, p = 0.505$
		Postolueno	$t(60) = -5.58, p < 0.000$
	Ratas 5-6 m	Pretolueno	$t(60) = -4.88, p < 0.000$
		Postolueno	$t(60) = -5.58, p < 0.000$
	Ratas 4 m	Pretolueno	$t(60) = -3.78, p = 0.005$
		Postolueno	$t(57) = -6.19, p < 0.000$

Prueba estadística ANOVA de una vía. Post hoc prueba Bonferroni. Significancia estadística  $p < 0.05$



**Figura 14.** Número de respuestas condicionantes pre y posterior a un mes de exposición tolueno (4000 ppm), por grupo de edad. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar,  $*p < 0.05$ . Se observó diferencia significativa (prueba t-Student) entre el grupo de 7-8 meses (pre vs. post) con una  $p < 0.04$  y entre el grupo post-tolueno y los grupos de 5-6 meses y 4 meses (Anova). (Ver tabla 8).

Los resultados nos permiten concluir que en el grupo de ratas de 7-8 meses hubo una disminución significativa en el número de respuestas condicionantes después de la exposición a tolueno; sin embargo, no podemos afirmar que la disminución de respuestas o la pérdida de memoria se deba a la inhalación de tolueno ya que en el grupo control también se presentó una disminución.

## Objetivo

- **Analizar el efecto de la exposición crónica a tolueno sobre la memoria, en el modelo de objeto novedoso.**

Se realizaron las pruebas de exploración del objeto novedoso en condiciones basales a la hora y a las 24 horas a todos los grupos, posteriormente los animales se expusieron a tolueno o a aire durante un mes, para después nuevamente realizar las mismas pruebas del objeto novedoso, con objetos distintos a los de la primera etapa.

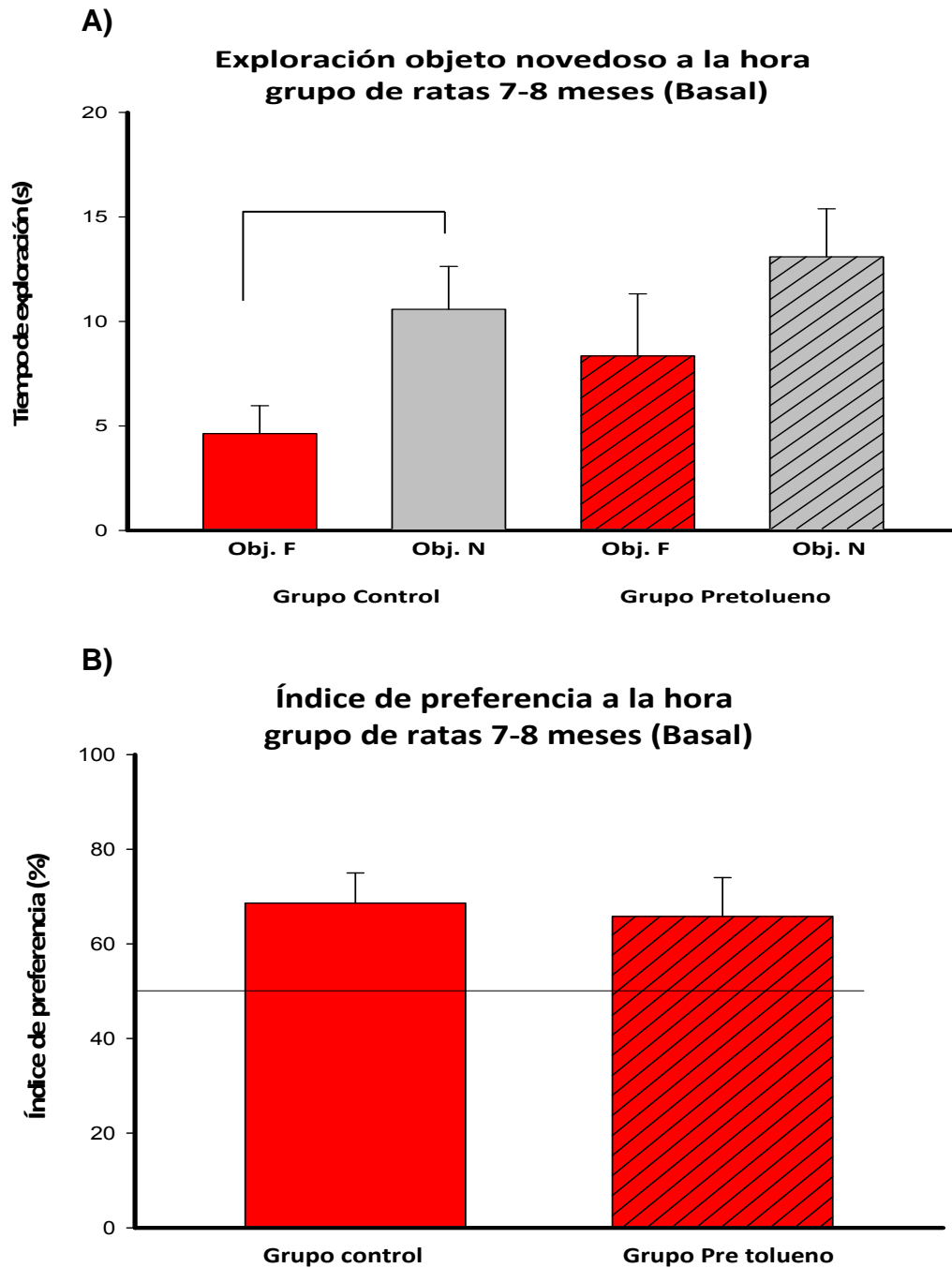
A todos los grupos se les realizó estadística descriptiva, calculando la media y el error estándar; en general, los datos no se ajustaron a la normalidad (prueba de Kolmogorov-Smirnov), por lo que se realizó estadística no paramétrica.

Cuando el grupo de ratas de 7-8 meses se evaluó en condiciones basales, se encontró que en el grupo control hubo una diferencia significativa entre la exploración del objeto familiar (EOF) y la exploración del objeto novedoso (EON) con una  $p < 0.03$ . En el grupo pre-tolueno, aunque hubo una tendencia a presentar una preferencia por el objeto novedoso, no se alcanzó significancia estadística. Los índices de preferencia en ambos grupos estuvieron por arriba del 60%, sin presentarse diferencias entre ambos grupos (tabla 9, fig. 15).

**Tabla 9. Exploración del objeto novedoso a la hora, ratas de 7-8 meses. (condiciones basales)**

Ratas 7-8 m	Exploración Objeto Familiar			Exploración Objeto Novedoso			Sig (Bilt)	Índice de Preferencia		Sig (Bilt)
	N	Media	EE	N	Media	EE	W	Media	EE	M-W
<b>Grupo Control</b>	8	4.63	1.33	8	10.58	2.04	<b>0.036</b>	68.61	6.37	0.779
<b>Grupo Pre-tolueno</b>	7	8.34	2.97	7	13.09	2.29	0.176	65.80	8.17	

N= Número, EE= Error estándar, W=Wilcoxon, Sig (Bilt)= Significancia bilateral, M-W= U Mann-Whitney. Prueba estadística de Wilcoxon y U Mann-Whitney, Significancia estadística  $p < 0.05$



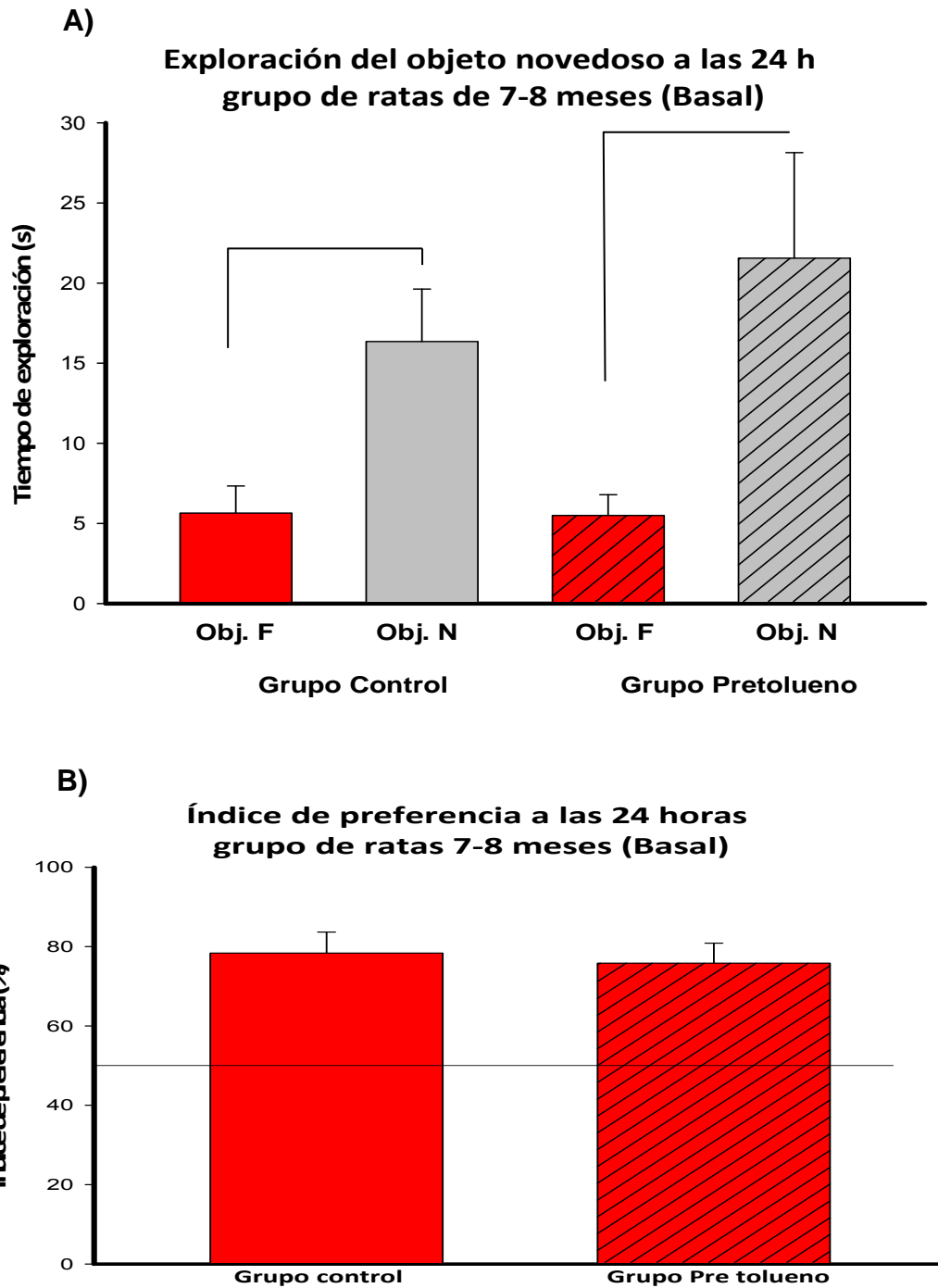
**Figura 15.** A) Exploración del objeto novedoso a la hora en el grupo ratas de 7-8 meses en condiciones basales. B) Índice de preferencia. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  error estándar,  $*p < 0.05$ . Hubo diferencia significativa (prueba Wilcoxon) en el grupo control  $*p < 0.03$ , sin observarse diferencia significativa en índice de preferencia.

En el grupo de ratas de 7-8 meses, en condiciones basales a las 24 horas, se observó que, tanto en el grupo control como en el grupo pre-tolueno, hubo una diferencia significativa entre la EOF y la EON ( $p < 0.01$  y  $p = 0.008$ , respectivamente). Por su parte, los índices de preferencia de ambos grupos estuvieron por arriba del 70%, sin presentarse diferencias entre ambos grupos (tabla 10, fig. 16).

**Tabla 10. Exploración del objeto novedoso a las 24 horas, ratas de 7-8 meses (condiciones basales)**

Ratas 7-8 m	Exploración Objeto Familiar			Exploración Objeto Novedoso			Sig (Bilt)	Índice de Preferencia		Sig (Bilt)
	N	Media	EE	N	Media	EE	W	Media	EE	MW
<b>Grupo Control</b>	8	5.64	1.29	8	16.35	3.26	<b>0.012</b>	78.35	5.27	0.743
<b>Grupo Pre-tolueno</b>	9	5.48	1.68	9	21.55	6.58	<b>0.008</b>	75.83	5.02	

N= Número, EE= Error estándar, W=Wilcoxon , Sig (Bilt)= Significancia bilateral, M-W= U Mann-Whitney. Prueba estadística de Wilcoxon y U Mann-Whitney . Significancia estadística  $p < 0.05$



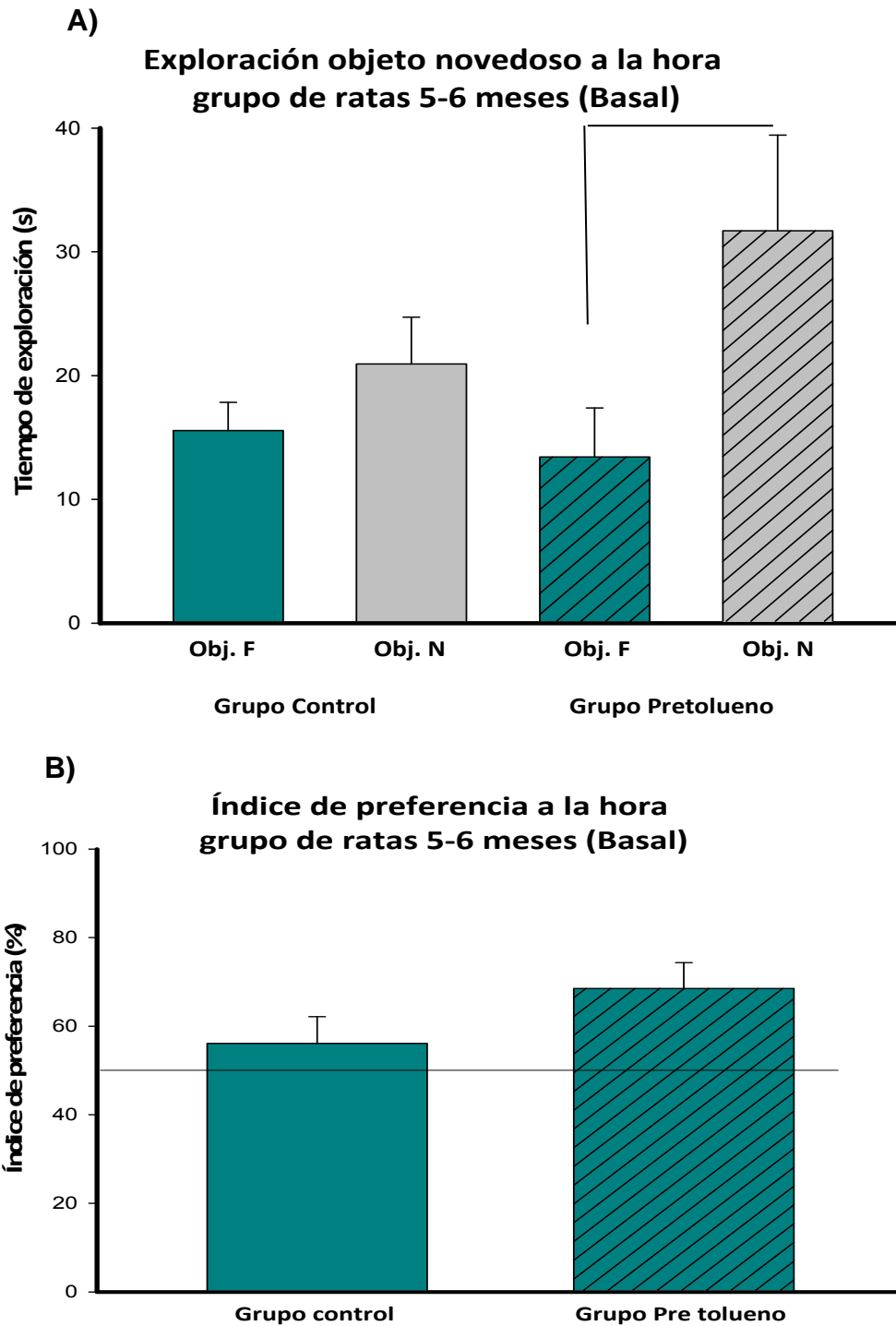
**Figura 16.** A) Exploración del objeto novedoso a las 24 horas en grupo ratas de 7-8 meses en condiciones basales. B) Índice de preferencia. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  error estándar,  $*p < 0.05$ . Hubo diferencia significativa (prueba Wilcoxon) entre el grupo control con  $*p < 0.01$  y entre el grupo pretolueno con  $p = 0.008$  sin observarse diferencia significativa en índice de preferencia.

Al evaluar el grupo de ratas de 5-6 meses en condiciones basales a la hora, se observó que en el grupo control no hubo una diferencia significativa entre la EOF y la EON, mientras que en el grupo pre-tolueno hubo una diferencia significativa entre la EOF y la EON, observada como una preferencia por el objeto novedoso ( $p = 0.009$ ). Los índices de preferencia de ambos grupos estuvieron por arriba del 50%, sin observarse diferencias entre ambos grupos. (tabla 11, fig. 17)

Tabla 11. Exploración del objeto novedoso a la hora, ratas de 5-6 meses (condiciones basal)

Ratas 5-6 m	Exploración Objeto Familiar			Exploración Objeto Novedoso			Sig (Bilt)	Índice de Preferencia		Sig (Bilt)
	N	Media	EE	N	Media	EE	W	Media	EE	M-W
<b>Grupo Control</b>	11	15.56	2.26	1 1	20.94	3.78	0.213	56.11	6.01	0.132
<b>Grupo Pre- tolueno</b>	10	13.43	3.94	1 0	31.70	7.73	<b>0.009</b>	68.51	5.84	

N= Número, EE= Error estándar, W=Wilcoxon , Sig (Bilt)= Significancia bilateral, M-W= U Mann-Whitney. Prueba estadística de Wilcoxon y U Mann-Whitney. Significancia estadística  $p < 0.05$



**Figura 17.** A) Exploración del objeto novedoso a la hora en grupo ratas de 5-6 meses en condiciones basales. B) Índice de preferencia. Los resultados se muestran en media  $\pm$  error estándar,  $*p < 0.05$ . Hubo diferencia significativa (prueba Wilcoxon) en el grupo pretolueno con  $*p = 0.009$  y sin diferencia significativa en índice de preferencia.

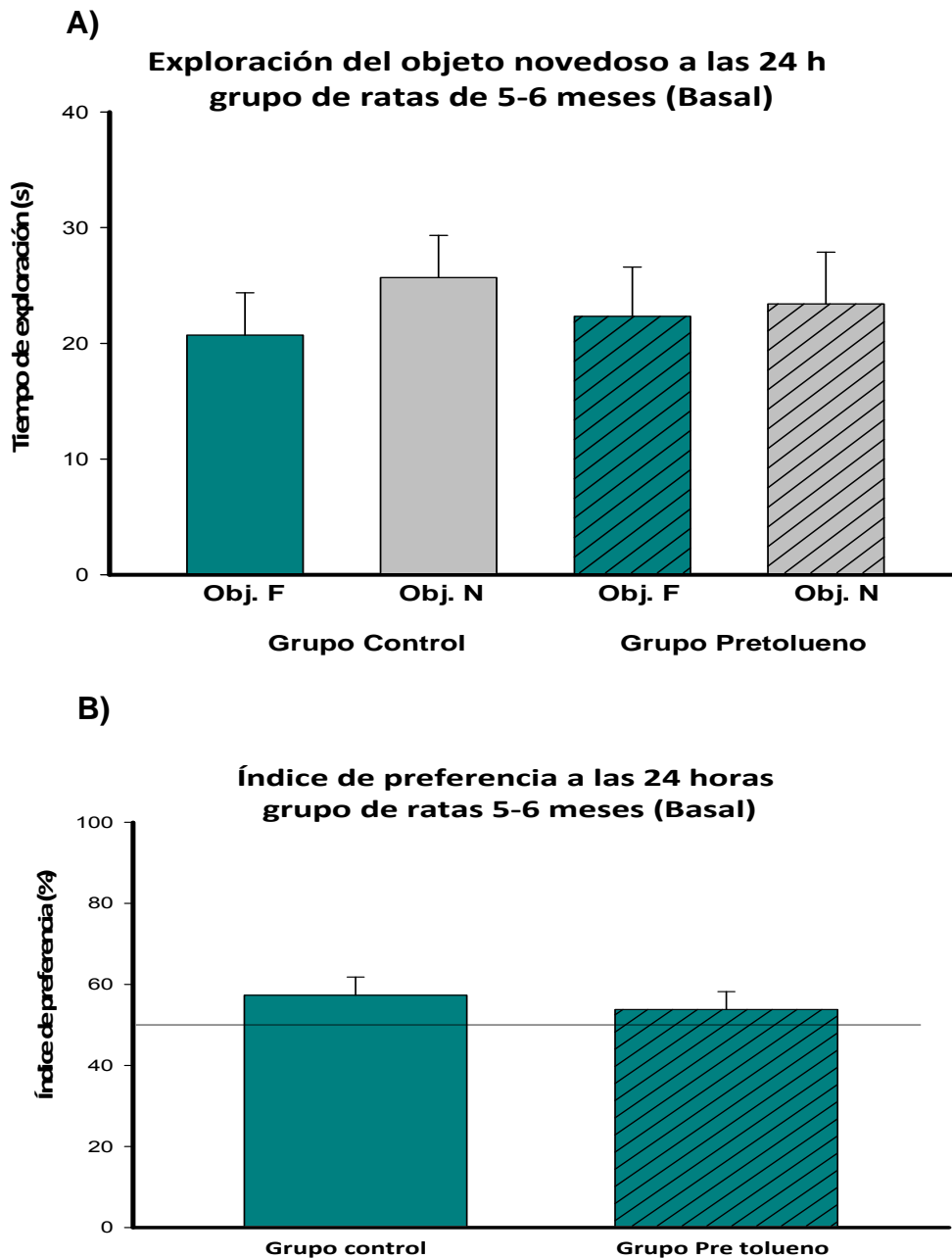


El grupo de ratas de 5-6 meses basal a las 24 horas, no hubo diferencia significativa en ninguno de los dos grupo, los índice de preferencia de ambos grupo por arriba del 50% y sin diferencias entre ambos grupos (tabla 12, fig. 18).

**Tabla 12. Exploración del objeto novedoso a las 24 horas, ratas de 5-6 meses ( Basal)**

Ratas 5-6 m	Exploración Objeto Familiar			Exploración Objeto Novedoso			Sig (Bilt)	Índice de Preferencia		Sig (Bilt)
	N	Media	EE	N	Media	EE		W	Media	
<b>Grupo Control</b>	11	20.70	3.66	11	25.68	3.64	0.213	57.29	4.49	0.562
<b>Grupo Pre- tolueno</b>	11	22.33	4.25	11	23.40	4.46	0.790	53.82	4.37	

N= Número, EE= Error estándar, W=Wilcoxon , Sig (Bilt)= Significancia bilateral, M-W= U Mann-Whitney. Prueba estadística de Wilcoxon y U Mann-Whitney. Significancia estadística  $p < 0.05$



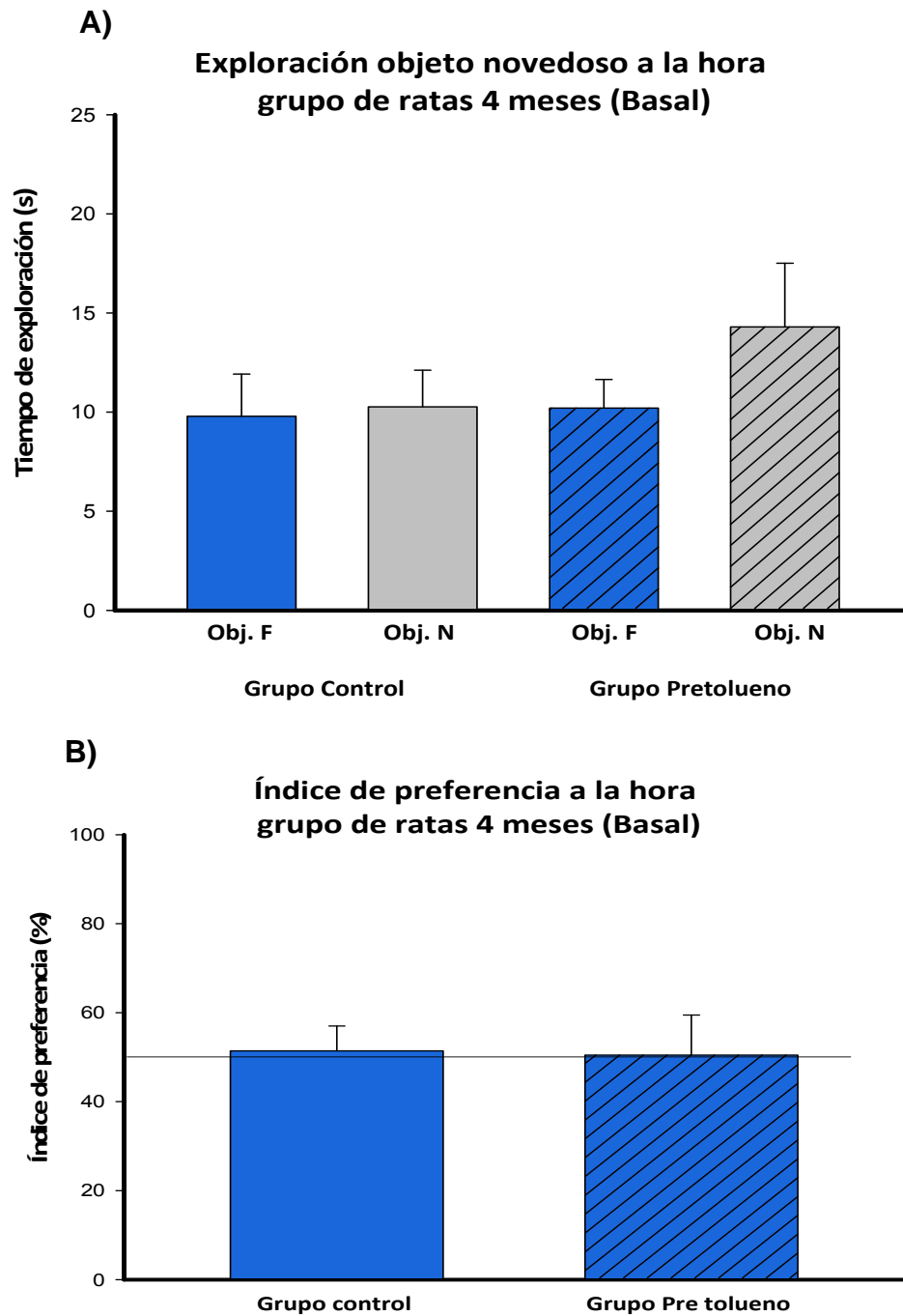
**Figura 18.** A) Exploración del objeto novedoso a las 24 horas en grupo ratas de 5-6 meses en condiciones basales. B) Índice de preferencia. Los resultados se muestran en media  $\pm$  error estándar,  $*p < 0.05$ . No hubo diferencia significativa (prueba Wilcoxon) en ningún grupo y sin diferencia significativa en índice de preferencia.

El grupo de ratas de 4 meses basal a la hora, no hubo diferencia significativa en ninguno de los dos grupo, los índice de preferencia de ambos grupo por arriba del 50% y sin diferencias entre ambos grupos (tabla 13, fig. 19).

Tabla 13. Exploración del objeto novedoso a la hora, ratas de 4 meses (condiciones basales)

Ratas 4 m	Exploración Objeto Familiar			Exploración Objeto Novedoso			Sig (Bilt)	Índice de Preferencia		Sig (Bilt)
	N	Media	EE	N	Media	EE	W	Media	EE	M-W
<b>Grupo Control</b>	9	9.78	2.13	9	10.26	1.84	0.767	51.40	5.59	0.552
<b>Grupo Pre- tolueno</b>	11	10.20	1.44	11	14.30	3.20	0.286	50.48	8.97	

N= Número, EE= Error estándar, W=Wilcoxon, Sig (Bilt)= Significancia bilateral, M-W= U Mann-Whitney. Prueba estadística de Wilcoxon y U Mann-Whitney. Significancia estadística  $p < 0.05$



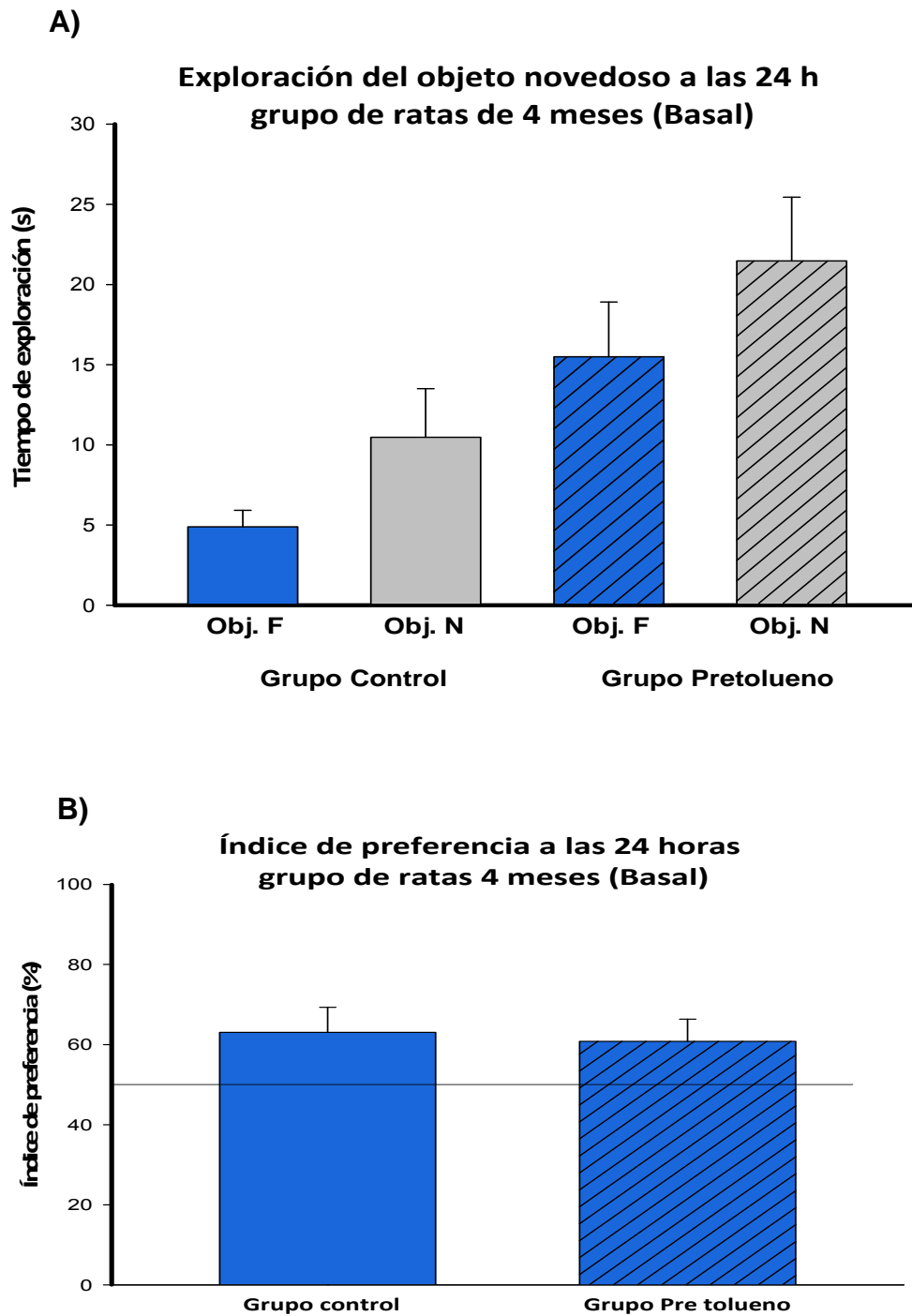
**Figura 19.** A) Exploración del objeto novedoso a la hora en grupo ratas de 5-6 meses en condiciones basales. B) Índice de preferencia. Los resultados se muestran en media  $\pm$  error estándar, \* $p < 0.05$ . No hubo diferencia significativa (prueba Wilcoxon) en ningún grupo y sin diferencia significativa en índice de preferencia.

El grupo de ratas de 4 meses basal a las 24 horas, no hubo diferencia significativa en ninguno de los dos grupo, los índice de preferencia de ambos grupos por arriba del 60% y sin diferencias entre ambos grupos (tabla 14, fig. 20).

Tabla 14. Exploración del objeto novedoso a las 24 horas, ratas de 4 meses (condiciones basales)

Ratas 4 m	Exploración Objeto Familiar			Exploración Objeto Novedoso			Sig (Bilt)	Índice de Preferencia		Sig (Bilt)
	N	Media	EE	N	Media	EE	W	Media	EE	M-W
<b>Grupo Control</b>	10	4.89	1.02	10	10.47	3.02	0.139	63.07	6.22	0.912
<b>Grupo Pre- tolueno</b>	10	15.49	3.42	10	21.47	3.97	0.059	60.82	5.53	

N= Número, EE= Error estándar, W=Wilcoxon , Sig (Bilt)= Significancia bilateral, M-W= U Mann-Whitney. Prueba estadística de Wilcoxon y U Mann-Whitney . Significancia estadística  $p < 0.05$



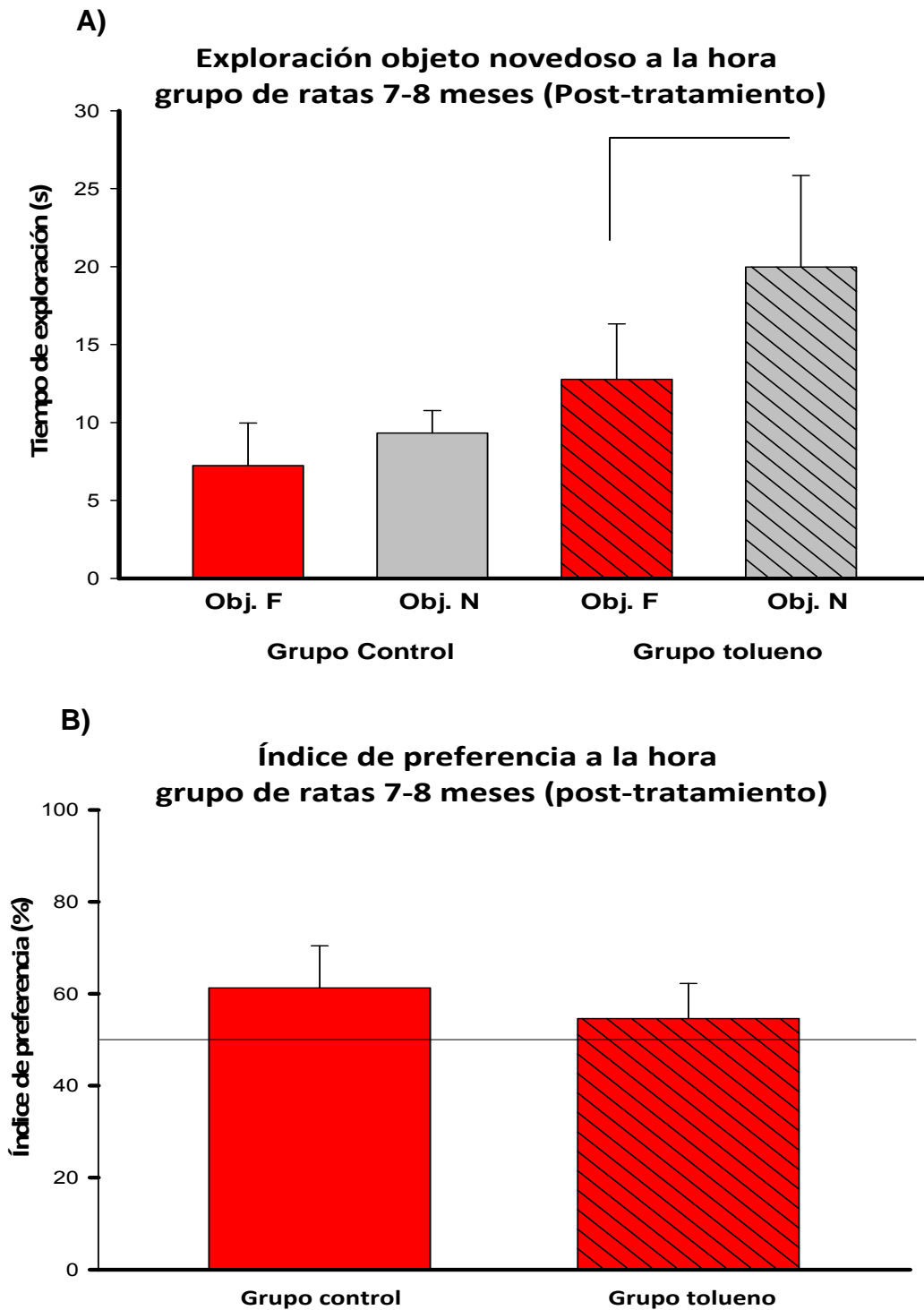
**Figura 20.** A) Exploración del objeto novedoso a las 24 horas en grupo ratas de 4 meses en condiciones basales. B) Índice de preferencia. Los resultados se muestran en media  $\pm$  error estándar,  $*p < 0.05$ . No hubo diferencia significativa (prueba Wilcoxon) en ningún grupo y sin diferencia significativa en índice de preferencia.

El grupo de ratas de 7-8 meses post-tratamiento a la hora, en el grupo control no hubo una diferencia significativa entre la EOF y la EON . En el grupo tolueno hubo una diferencia significativa entre la EOF y la EON con una  $p < 0.02$ , los índice de preferencia de ambos grupo por arriba del 50% y sin diferencias entre ambos grupos (tabla 15, fig. 21).

Tabla 15. Exploración del objeto novedoso a la hora, ratas de 7-8 meses (Post-tratamiento)

Ratas 7-8 m	Exploración Objeto Familiar			Exploración Objeto Novedoso			Sig (Bilt)	Índice de Preferencia		Sig (Bilt)
	N	Media	EE	N	Media	EE	W	Media	EE	M-W
<b>Grupo Control</b>	7	7.23	2.72	7	9.32	1.44	0.237	61.26	9.16	0.910
<b>Grupo Tolueno</b>	9	12.76	3.55	9	19.97	5.87	<b>0.021</b>	54.61	7.63	

N= Número, EE= Error estándar, W=Wilcoxon , Sig (Bilt)= Significancia bilateral, M-W= U Mann-Whitney. Prueba estadística de Wilcoxon y U Mann-Whitney. Significancia estadística  $p < 0.05$



**Figura 21.** A) Exploración del objeto novedoso a la hora en grupo ratas de 7-8 meses post-tratamiento. B) Índice de preferencia. Los resultados se muestran en media  $\pm$  error estándar,  $*p < 0.05$ . Hubo diferencia significativa (prueba Wilcoxon) en el grupo tolueno con una  $*p < 0.02$  y sin diferencia significativa en índice de preferencia.

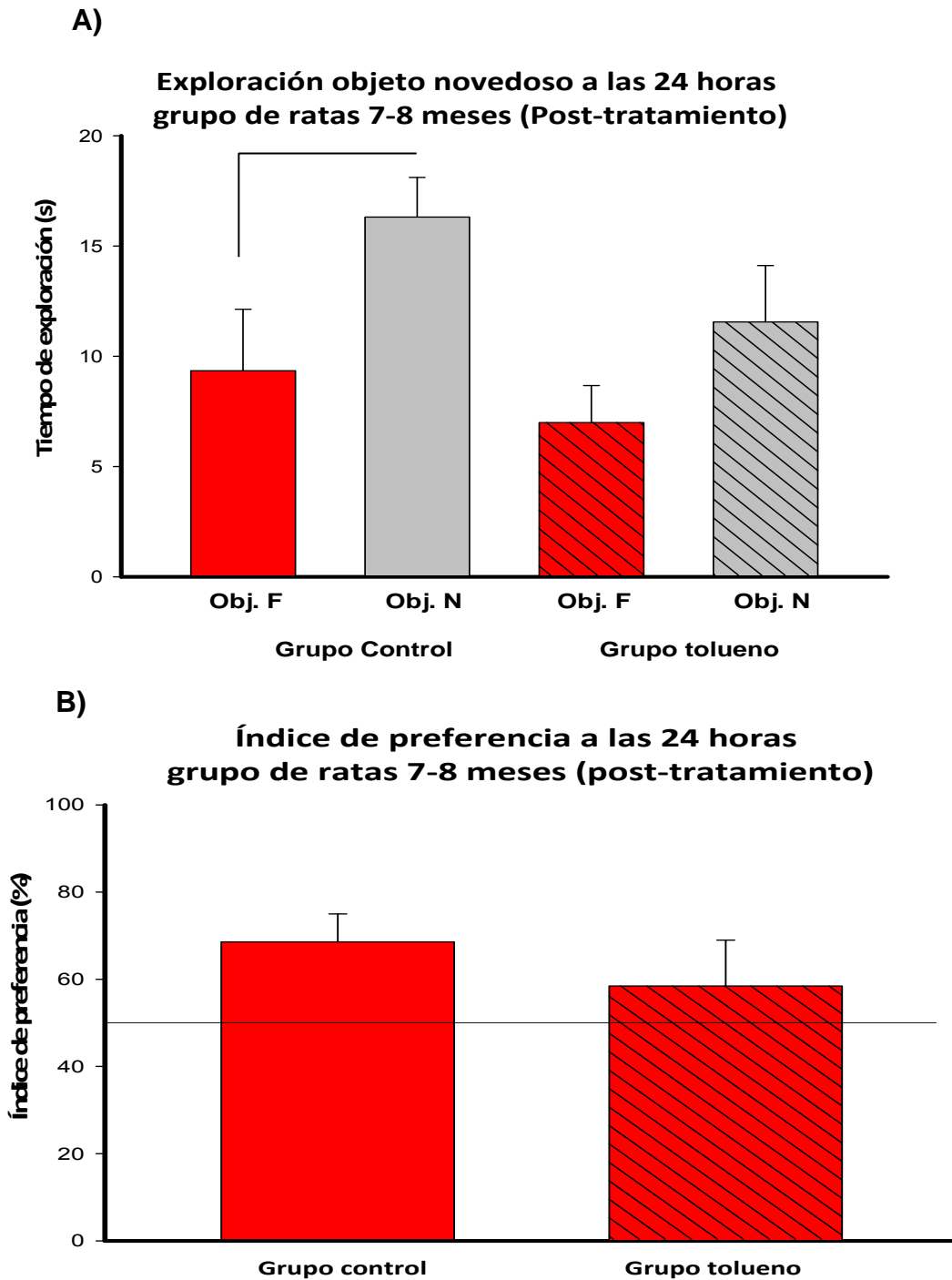


El grupo de ratas de 7-8 meses postratamiento a las 24 horas, en el grupo control hubo una diferencia significativa entre la EOF y la EON con una  $p < 0.01$ . En el grupo tolueno no hubo diferencia significativa entre la EOF y la EON, los índice de preferencia de ambos grupo por arriba del 50% y sin diferencias entre ambos grupos (tabla 16, fig. 22).

Tabla 16. Exploración del objeto novedoso a las 24 horas, ratas de 7-8 meses (Post-tratamiento)

Ratas 7-8 m	Exploración Objeto Familiar			Exploración Objeto Novedoso			Sig (Bilt)	Índice de Preferencia		Sig (Bilt)
	N	Media	EE	N	Media	EE		W	Media	
<b>Grupo Control</b>	7	9.34	2.78	7	16.31	1.79	<b>0.018</b>	68.56	6.40	0.613
<b>Grupo Tolueno</b>	8	6.99	1.67	8	11.55	2.55	0.161	58.46	6.40	

N=Número, EE= Error estándar, W=Wilcoxon, Sig (Bilt)= Significancia bilateral, M-W= U Mann-Whitney. Prueba estadística de Wilcoxon y U Mann-Whitney. Significancia estadística  $p < 0.05$



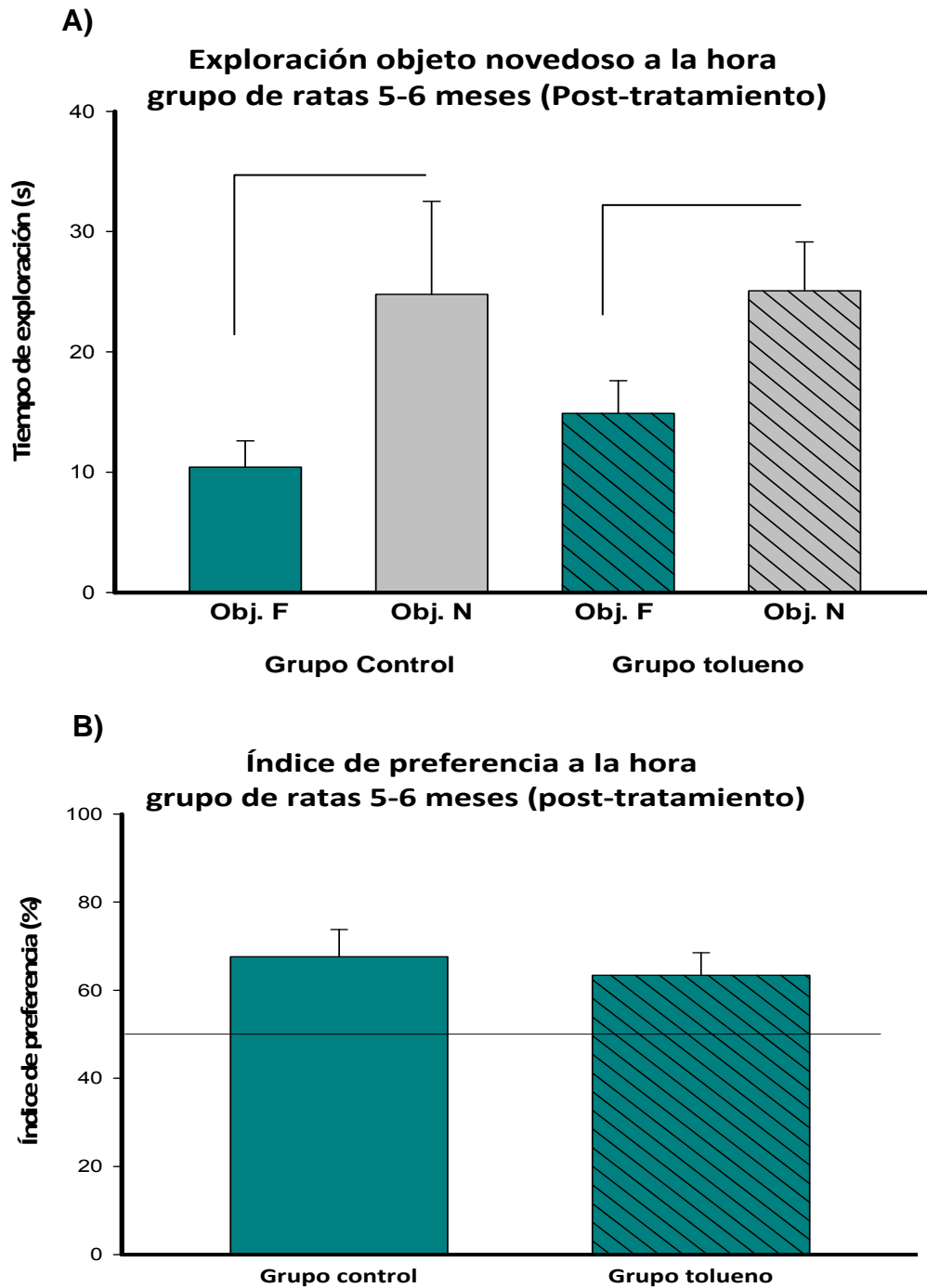
**Figura 22.** A) Exploración del objeto novedoso a las 24 horas en grupo ratas de 7-8 meses post-tratamiento. B) Índice de preferencia. Los resultados se muestran en media  $\pm$  error estándar,  $*p < 0.05$ . Hubo diferencia significativa (prueba Wilcoxon) en el grupo control con una  $*p < 0.01$  y sin diferencia significativa en índice de preferencia.

El grupo de ratas de 5-6 meses post-tratamiento a la hora, en el grupo control hubo diferencia significativa entre la EOF y la EON  $p = 0.009$  . En el grupo tolueno hubo una diferencia significativa entre la EOF y la EON con una  $p < 0.02$ , los índice de preferencia de ambos grupo por arriba del 60% y sin diferencias entre ambos grupos (tabla 17, fig. 23).

Tabla 17. Exploración del objeto novedoso a la hora, ratas de 5-6 meses (Post-tratamiento)

Ratas 5-6 m	Exploración Objeto Familiar			Exploración Objeto Novedoso			Sig (Bilt)	Índice de Preferencia		Sig (Bilt)
	N	Media	EE	N	Media	EE	W	Media	EE	M-W
<b>Grupo Control</b>	10	10.42	2.18	10	24.78	7.72	<b>0.009</b>	67.60	6.20	0.582
<b>Grupo Tolueno</b>	12	14.89	2.70	12	25.07	4.05	<b>0.023</b>	63.40	5.10	

N= Número, EE= Error estándar, W=Wilcoxon, Sig (Bilt)= Significancia bilateral, M-W= U Mann-Whitney. Prueba estadística de Wilcoxon y U Mann-Whitney. Significancia estadística  $p < 0.05$



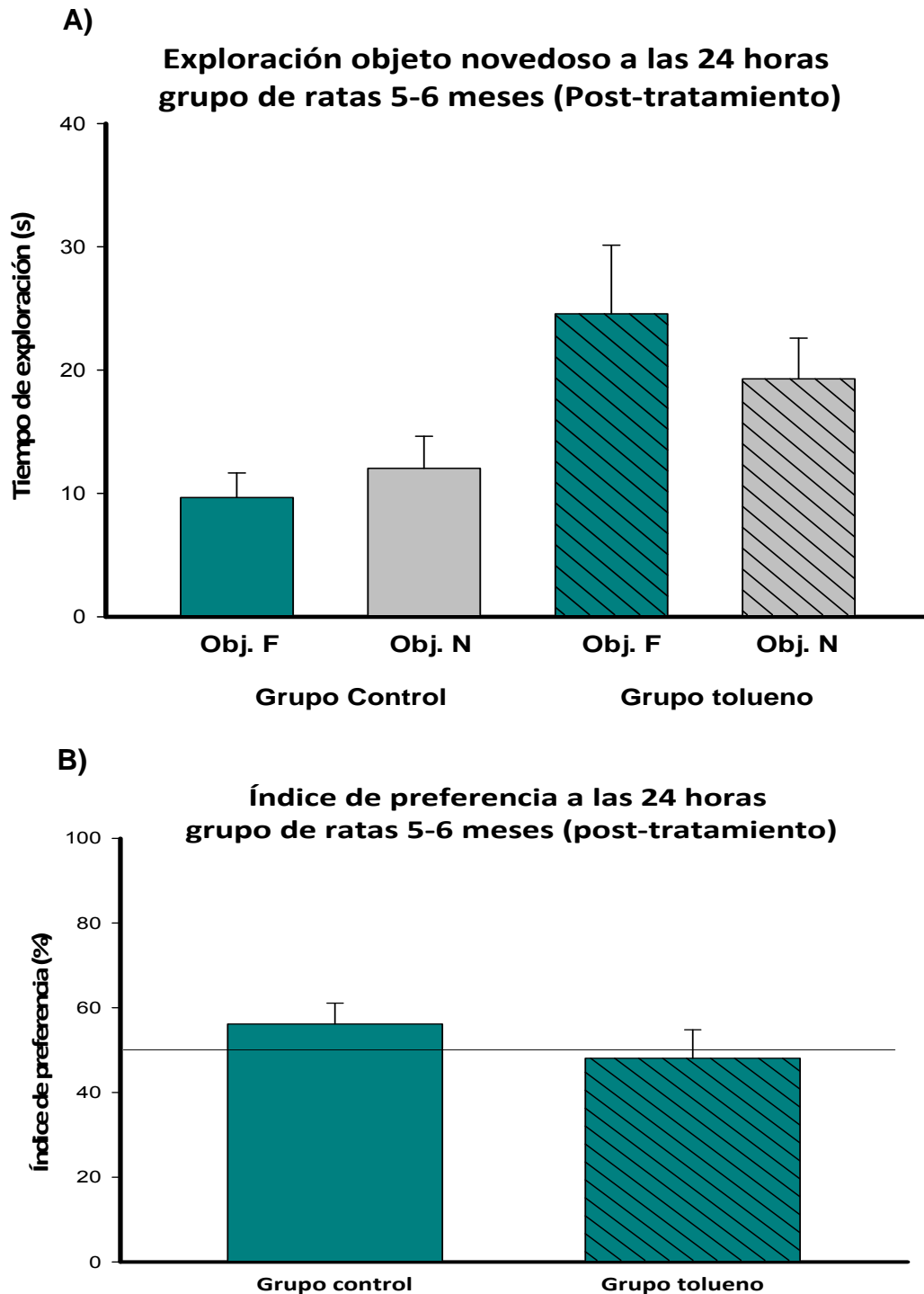
**Figura 23.** A) Exploración del objeto novedoso a la hora en grupo ratas de 7-8 meses post-tratamiento. B) Índice de preferencia. Los resultados se muestran en media  $\pm$  error estándar,  $*p < 0.05$ . Hubo diferencia significativa (prueba Wilcoxon) en el grupo control con una  $*p = 0.009$  y en el grupo tolueno con una  $**p < 0.02$ , sin diferencia significativa en índice de preferencia.

El grupo de ratas de 5-6 meses postratamiento a las 24 horas, no hubo diferencia significativa en ninguno de los dos grupo, el índice de preferencia del grupo control por arriba del 50% y del grupo tolueno de 48 %, pero sin diferencias entre ambos grupos (tabla 18, fig. 24).

**Tabla 18. Exploración del objeto novedoso a las 24 horas, ratas de 5-6 meses (Post-tratamiento)**

Ratas 5-6 m	Exploración Objeto Familiar			Exploración Objeto Novedoso			Sig (Bilt)	Indice de Preferencia		Sig (Bilt)
	N	Media	EE	N	Media	EE	W	Media	EE	M-W
<b>Grupo Control</b>	10	9.65	1.99	10	12.02	2.61	0.203	56.18	4.89	0.353
<b>Grupo Tolueno</b>	10	24.56	5.56	10	19.28	3.31	0.878	48.08	6.69	

N= Número, EE= Error estándar, W=Wilcoxon, Sig (Bilt)= Significancia bilateral, M-W= U Mann-Whitney. Prueba estadística de Wilcoxon y U Mann-Whitney. Significancia estadística  $p < 0.05$



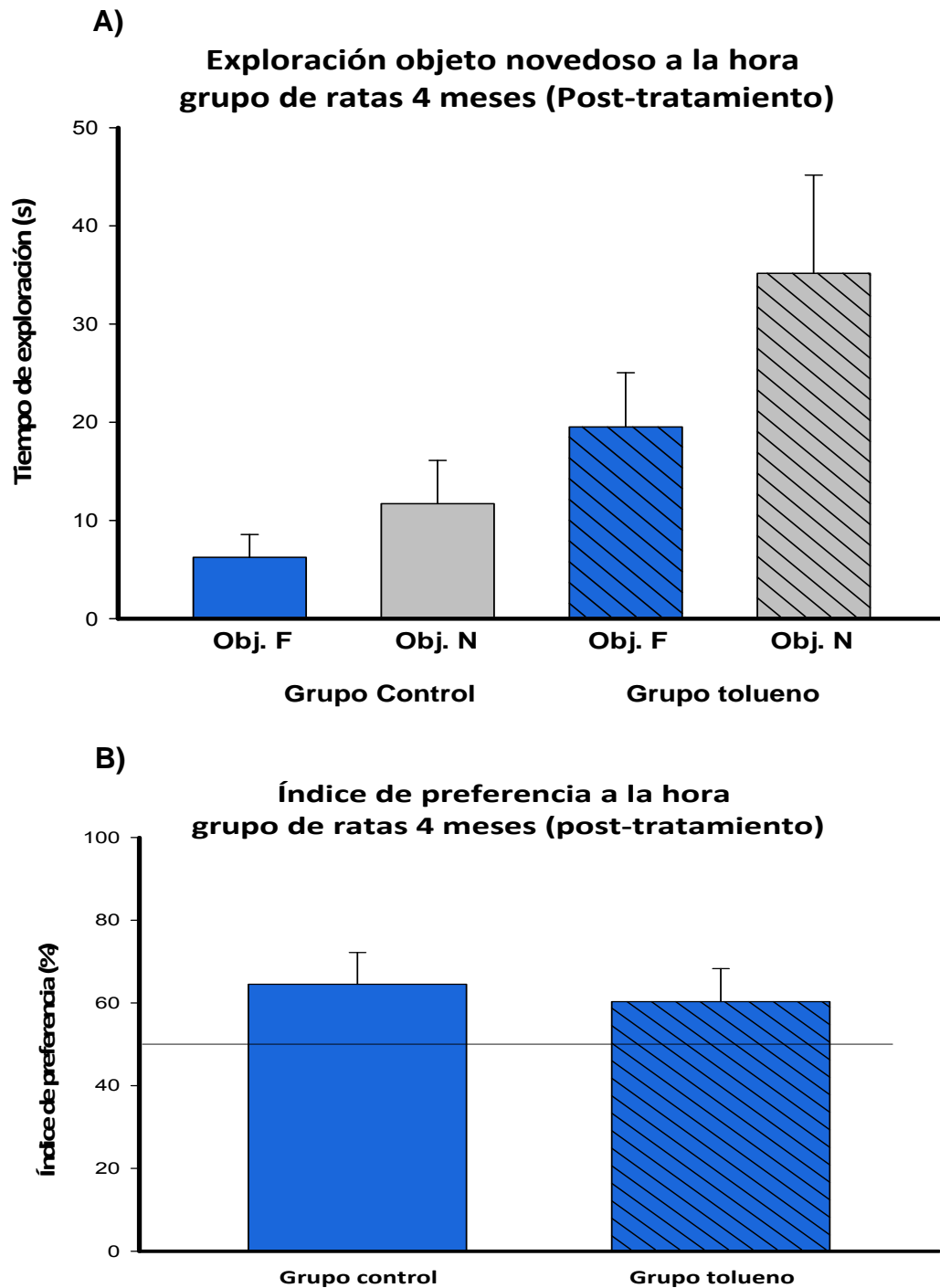
**Figura 24.** A) Exploración del objeto novedoso a las 24 horas en grupo ratas de 5-6 meses post-tratamiento. B) Índice de preferencia. Los resultados se muestran en media  $\pm$  error estándar,  $*p < 0.05$ . No hubo diferencia significativa (prueba Wilcoxon) en ningún grupo y sin diferencia significativa en índice de preferencia.

El grupo de ratas de 4 meses post-tratamiento a la hora, en el grupo control no hubo diferencia significativa entre la EOF y la EON. En el grupo tolueno hubo una diferencia significativa entre la EOF y la EON con una  $p < 0.07$ , los índices de preferencia de ambos grupo por arriba del 60% y sin diferencias entre ambos grupos (tabla 19, fig. 25).

**Tabla 19 . Exploración del objeto novedoso a la hora, ratas de 4 meses (Post-tratamiento)**

Ratas 4 m	Exploración Objeto Familiar			Exploración Objeto Novedoso			Sig (Bilt)	Índice de Preferencia		Sig (Bilt)
	N	Media	EE	N	Media	EE	W	Media	EE	M-W
<b>Grupo Control</b>	7	6.25	2.32	7	11.71	4.40	0.310	64.53	7.63	0.669
<b>Grupo Tolueno</b>	10	19.53	5.51	10	35.16	10.0	0.074	60.33	7.96	

N= Número, EE= Error estándar, W=Wilcoxon , Sig (Bilt)= Significancia bilateral, M-W= U Mann-Whitney. Prueba estadística de Wilcoxon y U Mann-Whitney. Significancia estadística  $p < 0.05$



**Figura 25.** A) Exploración del objeto novedoso a la hora en grupo ratas de 4 meses post-tratamiento. B) Índice de preferencia. Los resultados se muestran en media  $\pm$  error estándar,  $*p < 0.05$ . No hubo diferencia significativa (prueba Wilcoxon) en ningún grupo, sin diferencia significativa en índice de preferencia.

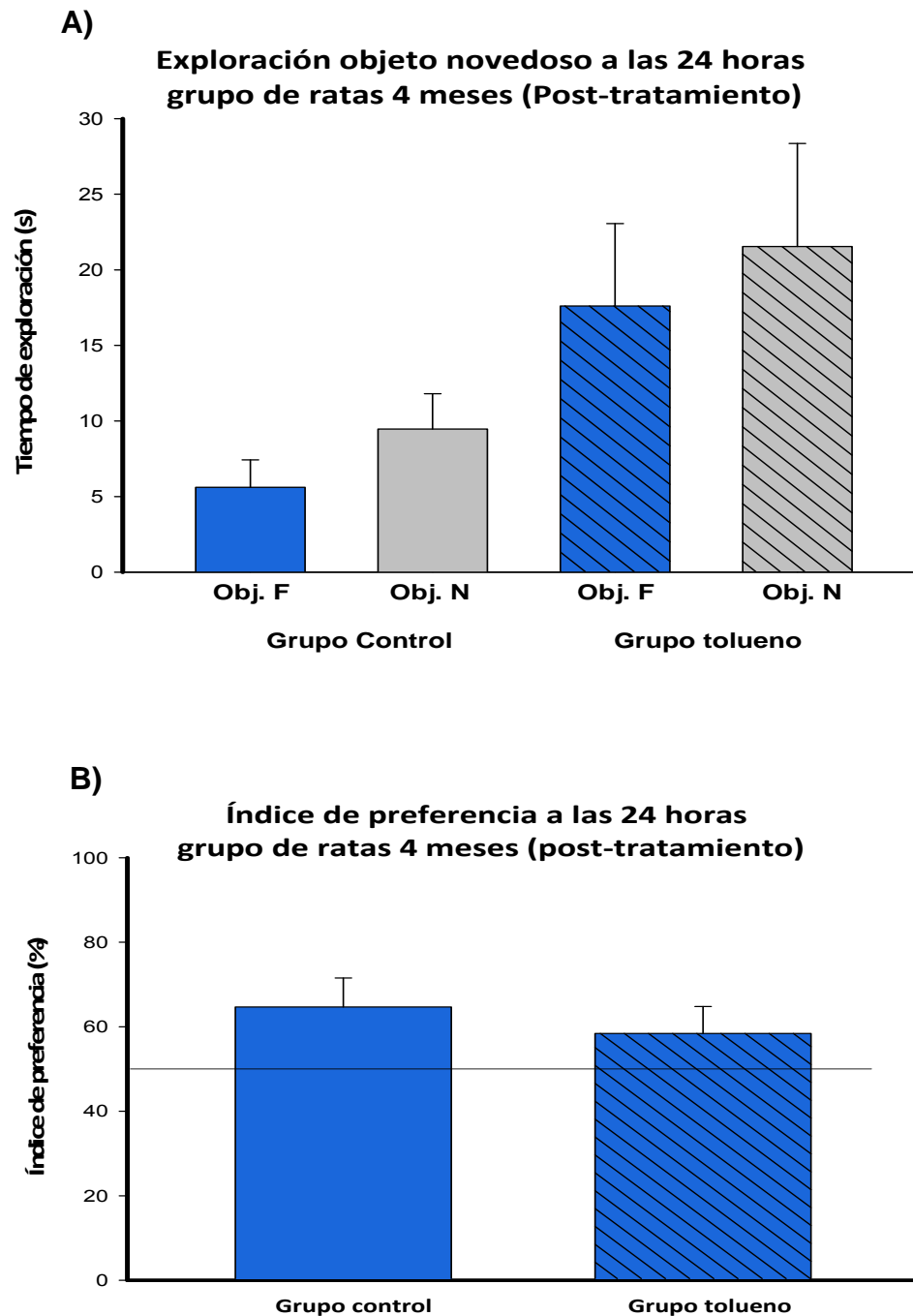


El grupo de ratas de 4 meses post-tratamiento a las 24 horas, no hubo diferencia significativa en ninguno de los dos grupo, los índice de preferencia de ambos grupos por arriba del 50%, pero sin diferencias entre ambos grupos (tabla 20, fig. 26).

**Tabla 20. Exploración del objeto novedoso a las 24 horas, ratas de 4 meses (Post-tratamiento)**

Ratas 4 m	Exploración Objeto Familiar			Exploración Objeto Novedoso			Sig (Bilt)	Índice de Preferencia		Sig (Bilt)
	N	Media	EE	N	Media	EE	W	Media	EE	M-W
<b>Grupo Control</b>	9	5.60	1.82	9	9.45	2.34	0.086	64.66	6.86	0.412
<b>Grupo Tolueno</b>	11	17.59	5.45	11	21.53	6.81	0.374	58.42	6.36	

N= Número, EE= Error estándar, W=Wilcoxon , Sig (Bilt)= Significancia bilateral, M-W= U Mann-Whitney. Prueba estadística de Wilcoxon y U Mann-Whitney . Significancia estadística  $p < 0.05$



**Figura 26.** A) Exploración del objeto novedoso a las 24 horas en grupo ratas de 4 meses post-tratamiento. B) Índice de preferencia. Los resultados se muestran en media  $\pm$  error estándar,  $*p < 0.05$ . No hubo diferencia significativa (prueba Wilcoxon) en ningún grupo, sin diferencia significativa en índice de preferencia.

**Prueba de actividad locomotora**

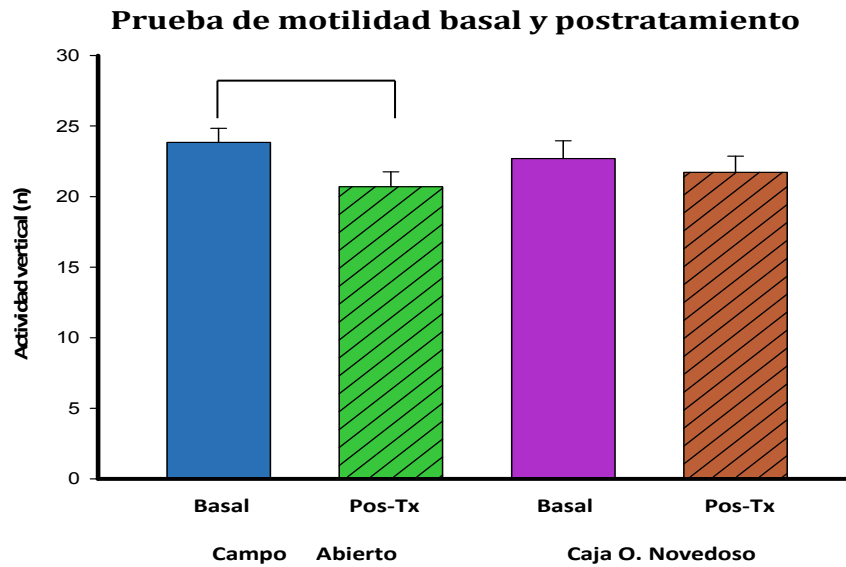
La prueba de actividad locomotora se realizó a todas las ratas; se llevaron a cabo dos pruebas: una en campo abierto y la otra en la caja del objeto novedoso, valorando en ambas pruebas la actividad vertical, es decir el número de veces que las ratas se paraban en sus dos patas. Ambas pruebas se realizaron de manera previa y posterior a la exposición a de tolueno o a aire.

En la prueba de actividad locomotora dentro de la caja del objeto novedoso, se observó que no hubo diferencia significativa entre las pruebas basales y las posteriores a los tratamientos en ninguno de los grupos, mientras que en las pruebas de motilidad en campo abierto si hubo diferencia entre la prueba basal y la post-tratamiento con una  $t(62)=2.650$ ,  $p = 0.01$  (tabla 21, fig. 27).

**Tabla 21. Pruebas de actividad locomotora**

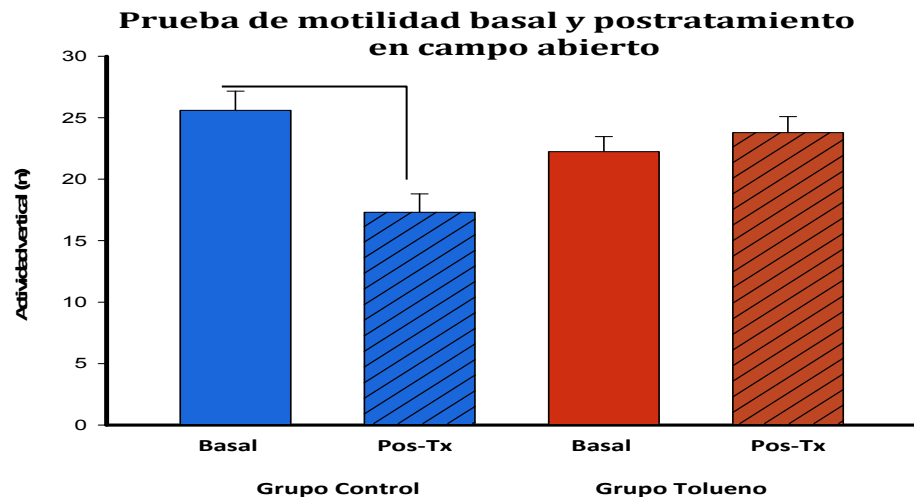
Prueba motilidad		N	Media	EE	Sig (Bilt)
<b>Campo abierto</b>	<b>Basal</b>	63	23.84	.99	<b>0.010</b>
	<b>Post Tx</b>	63	20.70	1.06	
<b>Caja del objeto novedoso</b>	<b>Basal</b>	63	22.70	1.25	0.468
	<b>Post Tx</b>	63	21.70	1.14	

N= Número, EE= Error estándar, Sig (Bilt)= Significancia bilateral  
 Prueba estadística t de Student (muestras relacionadas), significancia estadística  $p < 0.05$



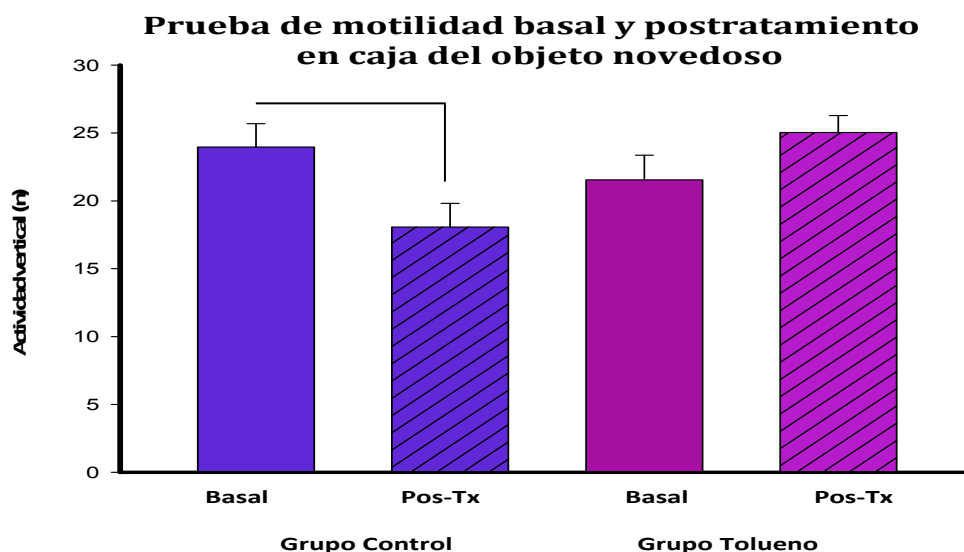
**Figura 27.** Prueba de actividad locomotora en condiciones basales y post-tratamiento, grupo total. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar,  $*p < 0.05$ . Se observó una diferencia significativa (prueba t Student) en la prueba en campo abierto con una  $*p = 0.01$ , sin presentarse diferencia significativa en la prueba en la caja del objeto novedoso.

En la prueba en campo abierto hubo una disminución significativa en la actividad locomotora del grupo control posterior al tratamiento (aire) con una  $t(29)=5.513$ ,  $p < 0.000$ , mientras que en el grupo tolueno no hubo diferencia significativa (fig. 28).



**Figura 28.** Prueba de actividad locomotora en condiciones basales y post-tratamiento, en campo abierto en el grupo control (aire) y tolueno. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar,  $*p < 0.05$ . Se observó diferencia significativa (prueba t Student) en el grupo control con una  $*p < 0.000$ , sin observarse diferencia significativa en el grupo tolueno.

En la prueba de actividad locomotora en la caja del objeto novedoso también hubo una disminución significativa en el grupo control entre la prueba basal y posterior al tratamiento (aire) con una  $t(29) = 3.758$ ,  $p < 0.001$ , mientras que en el grupo tolueno no hubo diferencia significativa (fig. 29).



**Figura 29.** Prueba de actividad locomotora en condiciones basales y post-tratamiento, en caja del objeto novedoso en el grupo control (aire) y tolueno. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar,  $*p < 0.05$ . se observó diferencia significativa (prueba t Student) en el grupo control con una  $*p < 0.001$ , sin diferencia significativa en el grupo tolueno.

Todos los grupos pudieron realizar las pruebas de auto aprendizaje en caja de Skinner y las pruebas de reconocimiento del objeto novedoso sin alteraciones motrices. Las diferencias significativas en los grupos control, se debe a comportamiento de los roedores, en donde en algunos grupos sobre todo en los ratas 7-8 meses, que eran las de mayor peso, tenían menos actividad vertical.

Podemos concluir que ambas pruebas valoran adecuadamente la motilidad de los animales, aunque en la prueba dentro de la caja del objeto novedoso realizada al grupo total no se apreciaron diferencias significativas entre las pruebas basales y post-tratamiento.

## **9. Discusión**

Las drogas son un problema de salud en el mundo, en nuestro país las drogas de mayor consumo son la marihuana, cocaína y los inhalables, con un incremento de consumo en los adolescentes.<sup>2-4</sup> Dentro de las drogas inhalables de mayor consumo se encuentran productos derivados del petróleo tales como el "thiner" y distintos productos como pinturas, adhesivos, pegamentos y productos de limpieza, que son fácil de adquirir y que son comunes en los hogares de nuestro país.<sup>8,9</sup> La mayor parte de estos productos son mezclas complejas de disolventes, en donde su principal componente es el tolueno.<sup>12,16</sup>

La principal vía por la que el tolueno ingresa al organismo, es por vía inhalatoria, a través de los pulmones, y además tiene una alta afinidad por los tejidos ricos en lípidos, entre los que destaca el sistema nervioso central.<sup>27,32,35</sup>

El tolueno tiene múltiples mecanismos de acción a nivel del SNC, que puede afectar los mecanismos de la memoria a diferentes niveles. A nivel celular altera canales iónicos de Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>,<sup>42,44,45</sup> también inhibe receptores NMDA (GluN2A y GluN2B),<sup>48-50</sup> inhibe receptores nicotínicos ( $\alpha 4\beta 2$ ),<sup>51</sup> y puede alterar la concentración de diferentes neurotransmisores como son el glutamato, la serotonina y la dopamina.<sup>54,55</sup> Hay evidencia de alteraciones en la transmisión sináptica además de efectos apoptóticos y alteraciones epigenéticas.<sup>63-65</sup> Se ha demostrado atrofia de corteza cerebral y cerebelo, leucoencefalopatías, daño axonal y desmielinización, además de pérdida neuronal y disminución de neurogénesis hipocampal por exposición a tolueno.<sup>96-99</sup>

En múltiples estudios se ha demostrado que la administración aguda o crónica de tolueno produce deterioro del aprendizaje y de la memoria a corto y a largo plazo.

En nuestro trabajo se estudió la memoria a largo plazo de tipo no declarativa, a través del condicionamiento clásico e instrumental, utilizando la prueba de auto-aprendizaje en la caja condicionante de Skinner. Todos los animales iniciaron la prueba aproximadamente a los dos meses, edad a la que son consideradas ratas

jóvenes, sometiéndose a la prueba un total de 78 animales, de los cuales 65 (83.3%) lograron aprender, aunque en el último grupo de estudio se incremento hasta el 91.3%, esto debido quizás a que en este último grupo ya se tenía sistematizada de manera adecuada la prueba. La prueba de autoaprendizaje se realizó durante 7 días, haciendo una modificación del tiempo de aprendizaje, ya que la prueba original consistía de 3 días (dos de enseñanza y un día de prueba final); si nos hubiéramos quedado con tres días de prueba solamente el 39.6% de los animales hubieran participado en el estudio, mientras que para el día séptimo sólo el 1.5% de los animales lograron aprender, por lo que consideramos que 7 días de prueba son suficientes, para considerar si el animal aprendió o no. Se consideró que el animal aprendió la prueba, cuando su número de respuestas condicionantes fue mayor a 38 respuestas, ya que en el grupo total, la mínima de respuestas fue de 38 y una máxima de 80. En el caso de nuestro laboratorio es la primera vez que se trabaja con este modelo de memoria, por lo que no tenemos datos comparativos.

En el caso de la prueba en condiciones basales, (antes de la exposición a disolvente), hubo una diferencia significativa en el número de respuestas condicionantes en el grupo de 7-8 meses, presentando un menor número de respuestas el grupo pre-tolueno ( $p = 0.02$ ). Por otro lado, en las respuestas condicionantes post-tratamiento (aire o tolueno), no hubo diferencia significativa en la comparación por grupos, pero haciendo comparaciones múltiples a través de ANOVA de una vía, hubo diferencia significativa entre el grupo de 7-8 meses expuesto a tolueno y los grupos de 5-6 meses y 4 meses, expuestos tanto a aire como a tolueno. Inicialmente, estos hallazgos nos hicieron pensar que en el grupo de 7-8 meses expuesto a tolueno se produjo una disminución en la memoria, con respecto a los otros grupos.

Cuando se comparó el número de respuestas condicionantes de los tres grupos, antes y después de la exposición a aire (control) durante un mes, se observo que hubo diferencia significativa únicamente en el grupo de 7-8 meses ( $p = 0.02$ ); sin embargo, este es el grupo control (aire), por lo que no tendría por qué haber

disminución en las respuestas. Lo mismo sucedió cuando se comparó el número de respuestas condicionantes pre y posterior a la inhalación de tolueno durante un mes, en donde hubo diferencia significativa en el grupo de 7 -8 meses ( $p < 0.042$ ).

Como se expresó anteriormente, únicamente en el grupo de ratas de 7-8 meses, tanto en el subgrupo control como en el subgrupo tolueno hubo disminución en el número de respuestas condicionantes, ya que en los otros dos grupos no hubo ninguna diferencia. Basados en estos hallazgos, no se puede considerar que la disminución de las respuestas condicionantes se deba al tolueno. La única diferencia que existe entre los tres grupos es el tiempo en que se aprendió la prueba y se volvió nuevamente a realizar para evaluar la memoria, en el caso del grupo de ratas de 7-8 meses pasaron de 3 a 4 meses entre que aprendieron la tarea y se evaluó la memoria, en el grupo de 5-6 meses pasaron 2 meses y en el grupo de 4 meses fue un mes; por lo que se pudiera pensar que hay una disminución de la memoria en relación a la edad y al tiempo entre que aprendieron la prueba y se volvieron a evaluar y no en relación con el tratamiento, ya que en los otros grupos no hubo diferencia significativa.

El motivo por el cual los grupos no son homogéneos es por que originalmente se tenía contemplado únicamente al grupo de ratas de 4 meses, pero durante el desarrollo de los experimentos tuvimos acceso a un número mayor de animales por lo que se pudo trabajar con estos tres grupos.

Ya se comentó que existen múltiples mecanismos por los cuales el tolueno afecta el aprendizaje y la memoria, sin embargo en este estudio no se logró demostrar esta asociación.

Nuestros resultados concuerdan con otros estudios en donde tampoco hubo pérdida de memoria, al administrar tolueno de manera crónica, a distintas dosis y usando otros modelos de memoria, principalmente el laberinto acuático de Morris. Por ejemplo Miyagawa y col., en 1995, utilizaron ratas macho, administraron 600 ppm de tolueno cada 24 h por 50 días a partir del día PN 23, y no encontraron



cambios significativos en la memoria de trabajo.<sup>251</sup> Hass y col., en 1999, administraron a ratas hembras (Wistar) tolueno inhalado a 1200 ppm, 6 horas por día, del día prenatal 7 hasta el postnatal 18, un total de 35 días, sin observar cambios en la memoria-aprendizaje en el laberinto de Morris.<sup>252</sup> Von Euler y col., en 2000, hicieron un estudio con ratas macho Sprague-Dawley PN 50, a las que expusieron a tolueno 80 ppm, por 5 días por semana, por 4 semanas, posteriormente se sometieron a las pruebas de memoria-aprendizaje en el laberinto de Morris, sin encontrar diferencias significativas en la latencia de escape.<sup>253</sup> Beasley y col., en 2012, administraron tolueno a concentraciones de 0, 10, 100 y 1000 ppm durante un mes (6 h por día por 5 días por semana) a ratas macho Long Evans, iniciando el día PN 67, y no encontraron cambios significativos en la prueba de autoaprendizaje en caja de Skinner.<sup>262</sup> Dick y col., en 2014, administraron a ratas Wistar adolescentes (PN 27) tolueno a una concentración de 10000 ppm por una hora, cada tercer día durante un mes, y no encontraron alteraciones en el aprendizaje espacial en el laberinto de Morris, sin embargo sí encontraron que existía retraso en la adquisición del aprendizaje instrumental (caja de Skinner usando sacarosa al 5%).<sup>265</sup> Furlong y col., en 2016, realizaron un estudio con ratas macho Wistar (PN 27), exponiendo a tolueno 10000 ppm, 1 h diario, 3 días a la semana, durante 4 semanas y 8 días después se realizaron pruebas de auto aprendizaje Pavloviano en la caja de skinner utilizando un estímulo auditivo, sin encontrar diferencias significativas en el aprendizaje inicial en relación con el grupo control.<sup>267</sup>

También estudiamos en este trabajo la memoria declarativa de tipo episódica en roedores, usando el modelo de reconocimiento del objeto novedoso, en donde ya se comentó que los roedores, de manera natural, prefieren el objeto novedoso sobre el objeto familiar. Al igual que en el protocolo de autoaprendizaje en la caja de Skinner, todos los grupos se sometieron a la prueba en condiciones basales antes de la exposición al disolvente (a la hora y a las 24 horas), y posteriormente, después de un mes de exposición, ya sea tolueno o a aire, se realizó nuevamente la prueba con otros objetos.

La prueba del objeto novedoso se sistematizó adecuadamente, en las pruebas basales hubo diferencias significativas en algunos grupos entre el EOF y EON, pero esos hallazgos cumplen con el objetivo de la prueba, es decir, que tengan preferencia sobre el objeto novedoso. En relación al índice de preferencia todos estuvieron por encima del 50%, lo que nos indica que tuvieron preferencia por el objeto novedoso.

Cuando se volvieron a realizar las pruebas de reconocimiento del objeto novedoso posterior a un mes de la aplicación del disolvente o aire, volvimos encontrar datos similares que en las pruebas basales, ya que nuevamente el índice de preferencia se mantuvo por arriba del 50%, por lo que podemos considerar que no hubo alteraciones en la memoria declarativa de tipo episódica en este grupo de roedores.

Nuestros resultados no concuerdan con otros estudios, aunque hay diferencias muy marcadas en los diferentes protocolos. Por ejemplo Heung Seo y col., en 2010 administraron tolueno 500mg/kg, i.p. a ratones macho adultos C57B2/6 realizando la prueba del objeto novedoso a las 24 h y 4 días después del tolueno, demostrando una disminución significativa de la memoria en el reconocimiento del objeto novedoso; <sup>259</sup> similares resultados se observaron en el estudio de Shwey y Fujimaki en 2012, cuando se administró tolueno a dosis de 300 mg/kg, i.p, una hora antes de la fase de retención.<sup>263</sup> Huerta-Rivas y col., en el 2012 expusieron a ratas Wistar a tolueno en concentraciones de 1000, 2000, 4000 y 6000 ppm en una sola ocasión por 30 minutos y 30 minutos después se realizó la prueba, encontrando diferencias significativas en el índice de reconocimiento en todos los grupos; en el mismo estudio se administró tolueno a una concentración de 6000 ppm durante 30 min por 12 días (en ratas adolescentes de PN 25 al 35 y en ratas jóvenes del PN 43 al 56) y al realizar la prueba a las 24 h, encontraron diferencias significativas en relación con el grupo control.<sup>264</sup> El grupo de Páez-Martínez en 2017, hizo un estudio con ratones macho Swiss Webster (PN 35-40), exponiéndolos a tolueno 1000, 2000, 4000 y 6000 ppm durante 30 min una sola vez y posteriormente realizaron la prueba de reconocimiento del objeto novedoso, demostrando alteraciones en la memoria a

partir de 2000 ppm; en este mismo estudio se administró tolueno de manera crónica a concentraciones 2000 y 4000 ppm durante 30 min por 5 días a la semana por 4 semanas, realizando la misma prueba de memoria cada semana, demostrando alteraciones significativas en la memoria en relación con el grupo control.<sup>268</sup>.

En nuestro trabajo se hicieron las pruebas tanto en condiciones basales previo a la exposición a tolueno, como una vez transcurrido el mes de tratamiento y no vimos cambios en el comportamiento de la prueba, ya que todos los índices de preferencia en general están por arriba del 50% y sin cambios con relación al grupo control.

Un aspecto importante a considerar en nuestro estudio es la edad que tenían las ratas al exponerlas al tolueno, ya que el desarrollo del SNC es fundamental para la memoria y el aprendizaje, por lo que entre más temprano en el desarrollo del SNC se exponga al tolueno es más factible que haya alteraciones en la memoria, y en nuestro caso eran ratas adultos jóvenes con un SNC ya desarrollado; además, se podría considerar la administración de una dosis más elevada de tolueno, ya que al parecer una dosis promedio de consumo no provocó alteración, o en su defecto se podrían hacer administraciones por tiempo más prolongado.

Es posible que exista un mecanismo compensador en el SNC posterior a la administración de tolueno, ya que en varios estudios se ha demostrado un incremento en la expresión de receptores NMDA principalmente en las subunidades GluN2A y GluN2B.<sup>254-256</sup> Otros estudios también han demostrado un incremento de glutamato en varias regiones del SNC,<sup>54,55</sup> y sugieren que este incremento podría activar a los NMDAr en las neuronas post sinápticas como otro mecanismo compensador. En nuestro caso, todos estos mecanismos pudieron haber sido los responsables de que no se presentaran una pérdida significativa de la memoria, por lo que sería interesante hacer más estudios al respecto.

## **10. Conclusiones**

- Se sistematizaron la prueba de autoaprendizaje y la prueba de reconocimiento del objeto novedoso de manera adecuada.
- La exposición a tolueno 4000 ppm no afectó la actividad locomotora de los animales, previo al inicio de las pruebas de memoria.
- La exposición a tolueno 4000 ppm, no tuvo efectos significativos sobre la pérdida de la memoria declarativa de tipo episódica, usando el modelo de reconocimiento del objeto novedoso.
- La exposición a tolueno 4000 ppm, no tuvo efectos significativos sobre la pérdida de la memoria a largo plazo de tipo no declarativa, a través del condicionamiento clásico e instrumental, utilizando la prueba de auto aprendizaje, en la caja condicionante de Skinner
- El grupo de ratas de 7-8 meses presentaron una disminución significativa de la memoria tanto en el grupo control como en el expuesto a tolueno, en la prueba de auto aprendizaje en la caja condicionante de Skinner, lo cual quizás estuvo relacionado con la edad y con el tiempo que transcurrió entre que aprendieron la prueba y que se volvió a realizar la evaluación.

## 11. Referencias

1. *United Nations Office on Drugs and Crime, World Drug Report 2017*. Vienna Austria; 2017.
2. United National Office on Drugs and Crime. *World Drugs Report 2016*. New York; 2016.
3. United National Office on Drugs and Crime. *World Drugs Report 2015*. New York; 2015.
4. Villatoro-Velázquez, JA, Medina-Mora ME, Fleiz-Bautista C, Téllez-Rojo MM, Mendoza-Alvarado LR R-MM, Gutiérrez-Reyes JP, Castro-Tinoco M, Hernández-Ávila M, Tena-Tamayo C ASC y G-C V. *Encuesta Nacional de Adicciones 2011. Reporte de Drogas*. Vol 1. (Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz / Secretaría de Salud, ed.). México DF; 2012.
5. Villatoro-Velázquez JA, Oliva Robles, N. FI, D., Bustos Gamiño, M., Mujica Salazar, A., Martín del Campo Sánchez, R. NA, ME.. R y M-M. *Encuesta Nacional de Consumo de Drogas En Estudiantes 2014. Reporte de Drogas*. (Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz (INPRFM), ed.). México DF; 2015.
6. Shamblen SR, Miller T. Inhalant Initiation and the Relationship of Inhalant Use to the Use of other Substances. *J Drug Educ*. 2012;42(3):327-346. doi:10.2190/DE.42.3.e.
7. Kouyoumdjian C, Guzmán BL, Leon N. Lifetime Use of Cigarettes, Alcohol, Marijuana and Inhalants in Latino Early Adolescents. *J Ethn Subst Abuse*. 2015;14(2):113-132. doi:10.1080/15332640.2014.973625.
8. Scott KD, Scott AA. Adolescent inhalant use and executive cognitive functioning. *Child Care Health Dev*. 2014;40(1):20-28. doi:10.1111/cch.12052.
9. Medina Mora Ma. Elena. Aspectos epidemiológicos del uso de sustancias inhalables en la República mexicana. *Salud Ment*. 1987;10 No 4.
10. Ober AJ, Miles JN V, Ewing B, Tucker JS, D'Amico EJ. Risk for Inhalant Initiation Among Middle School Students: Understanding Individual, Family, and Peer Risk and Protective Factors. *J Stud Alcohol Drugs*. 2013;74(6):835-840. doi:10.15288/jsad.2013.74.835.

11. Nakawaki B, Crano W. Patterns of Substance Use, Delinquency, and Risk Factors Among Adolescent Inhalant Users. *Subst Use Misuse*. 2015;50(1):114-122. doi:10.3109/10826084.2014.961611.
12. Bukowski J a. Review of the epidemiological evidence relating toluene to reproductive outcomes. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2001;33(2):147-156. doi:10.1006/rtph.2000.1448.
13. Beckley JT, Woodward JJ. The abused inhalant toluene differentially modulates excitatory and inhibitory synaptic transmission in deep-layer neurons of the medial prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology*. 2011;36(7):1531-1542. doi:10.1038/npp.2011.38.
14. Gauthereau-torres MY, Godínez-Hernández D, Manzo-avalos S, Saavedra-molina A. 4 . Alcohol and inhalants : Mechanisms of action similarities. *Res Signpost*. 2009;661(2):61-84.
15. Foo SC, Jeyaratnam J, Koh D. Chronic neurobehavioural effects of toluene. *Br J Ind Med*. 1990;47(7):480-484. doi:10.1136/oem.47.7.480.
16. Museridze DP, Tsaishvili TS, Svanidze IK, et al. Effect of toluene intoxication on spatial behavior and learning of rats within early stages of postnatal development. *Neurophysiology*. 2010;42(2):118-123. doi:10.1007/s11062-010-9139-3.
17. Baydala L. Inhalant abuse. *Paediatr Child Health*. 2010;15(7):443-454. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21886449>.
18. Wu L-T, Pilowsky DJ, Schlenger WE. Inhalant abuse and dependence among adolescents in the United States. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2004;43(10):1206-1214. doi:10.1097/01.chi.0000134491.42807.a3.
19. Páez-Martínez N, López-Rubalcava C, Cruz S. Avances en la investigación básica de los efectos in vivo de los disolventes de abuso. *Salud Ment*. 2003;26(6):8-16.
20. Woodward JJ, Beckley J. Effects of the Abused Inhalant Toluene on the Mesolimbic Dopamine System. *J Drug Alcohol Res*. 2014;3(5):1-8. doi:10.4303/jdar/235838.
21. Evans EB, Balster RL. CNS depressant effects of volatile organic solvents. *Neurosci Biobehav Rev*. 1991;15(2):233-241. doi:S0149-7634(05)80003-X [pii].
22. Duncan JR, Gibbs SJ, Lawrence AJ. Chronic intermittent toluene inhalation in

- adolescent rats alters behavioural responses to amphetamine and MK801. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2014;24(3):480-486. doi:10.1016/j.euroneuro.2013.06.001.
23. Anderson CE, Loomis GA. Recognition and prevention of inhalant abuse. *Am Fam Physician.* 2003;68(5):869-874+876.
24. Neghab M, Hosseinzadeh K, Hassanzadeh J. Early liver and kidney dysfunction associated with occupational exposure to sub-threshold limit value levels of benzene, toluene, and xylenes in unleaded petrol. *Saf Health Work.* 2015;6(4):312-316. doi:10.1016/j.shaw.2015.07.008.
25. Niaz K, Bahadar H, Maqbool F, Abdollahi M. A review of environmental and occupational exposure to xylene and its health concerns. *EXCLI J.* 2015;14:1167-1186. doi:10.17179/excli2015-623.
26. Williams JF, Storck M, and the Committee on Substance Abuse, and Committee on Native American Child Health. Inhalant Abuse. *Pediatrics.* 2007;119(5):1009-1017. doi:10.1542/peds.2007-0470.
27. Balster RL, Cruz SL, Howard MO, Dell CA, Cottler LB. Classification of abused inhalants. *Addiction.* 2009;104(6):878-882. doi:10.1111/j.1360-0443.2008.02494.x.
28. Lubman DI, Yücel M, Lawrence a J. Inhalant abuse among adolescents: neurobiological considerations. *Br J Pharmacol.* 2008;154(2):316-326. doi:10.1038/bjp.2008.76.
29. Páez-Martínez NI, López-Rubalcava C, Cruz SL. Avances recientes en la investigación de los mecanismos celulares de acción de los disolventes de abuso. *Salud Ment.* 2003;26(5):43-50.
30. Beckley JT, Woodward JJ. Volatile solvents as drugs of abuse: focus on the cortico-mesolimbic circuitry. *Neuropsychopharmacology.* 2013;38(13):2555-2567. doi:10.1038/npp.2013.206.
31. Cruz SL, Rivera-García MT, Woodward JJ. Review of Toluene Actions: Clinical Evidence, Animal Studies, and Molecular Targets. *J Drug Alcohol Res.* 2014;3(235):1-8. doi:10.4303/jdar/235840.

32. ATSDR. Toxicological Profile for Toluene - Draft. *US Dep Heal Hum Serv.* 2015;(September). <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp41.pdf>.
33. ATSDR. Toxicological Profile for Toluene - Draft. *US Dep Heal Hum Serv.* 2000;(September). <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp41.pdf>.
34. Echeverria D, Fine L, Langolf G, Schork A, Sampaio C. Acute neurobehavioural effects of toluene. *Br J Ind Med.* 1989;46(7):483-495. doi:10.1136/oem.46.7.483.
35. Cohr KH, Stokholm J. Toluene. A toxicologic review. *Scand J Work Environ Heal.* 1979;5(2):71-90. doi:10.5271/sjweh.2664.
36. Meydan S., Nacar A., Oztürk HO., et al. The protective effects of caffeic acid phenethyl ester against toluene-induced nephrotoxicity in rats. *Toxicol Ind Health.* 2016;32(1):15-21. doi:10.1177/0748233713485890.
37. Decharat S. Hippuric acid levels in paint workers at steel furniture manufacturers in Thailand. *Saf Health Work.* 2014;5(4):227-233. doi:10.1016/j.shaw.2014.07.006.
38. Bowen SE, Hannigan JH, Irtenkauf S. Maternal and fetal blood and organ toluene levels in rats following acute and repeated binge inhalation exposure. *Reprod Toxicol.* 2010;24(3-4):343-352. doi:10.1016/j.reprotox.2007.06.005.
39. Marchand A, Aranda-Rodriguez R, Tardif R, Nong A, Haddad S. Human inhalation exposures to toluene, ethylbenzene, and m-xylene and physiologically based pharmacokinetic modeling of exposure biomarkers in exhaled air, blood, and urine. *Toxicol Sci.* 2015;144(2):414-424. doi:10.1093/toxsci/kfv009.
40. Jiménez-Garza O, Baccarelli AA, Byun H-M, Márquez-Gamiño S, Barrón-Vivanco BS, Albores A. CYP2E1 epigenetic regulation in chronic, low-level toluene exposure: Relationship with oxidative stress and smoking habit. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2015;286(3):207-215. doi:10.1016/j.taap.2015.04.016.
41. Al-Ghamdi SS, Raftery MJ, Yaqoob MM. Acute solvent exposure induced activation of cytochrome P450E1 causes proximal tubular cell necrosis by oxidative stress. *Toxicol Vitr.* 2003;17(3):335-341. doi:10.1016/S0887-2333(03)00021-3.
42. 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;140(4):653-660. doi:10.1038/sj.bjp.0705481.
43. Echeverria D, Fine L, Langolf G, Schork T, Sampaio C. Acute behavioural comparisons of toluene and ethanol in human subjects. *Br J Ind Med*. 1991;48(11):750-761. doi:10.1136/oem.48.11.750.
  44. Del Re 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. doi:10.1016/j.brainres.2006.03.031.
  45. Gmaz JM, Matthews BA, McKay BE. Toluene inhalation modulates dentate gyrus granule cell output in vivo. *Neurotoxicol Teratol*. 2012;34(4):403-412. doi:10.1016/j.ntt.2012.04.011.
  46. Win-Shwe TT, Nakajima D, Fujimaki H. Can T-cell deficiency affect spatial learning ability following toluene exposure? *Neuroimmunomodulation*. 2010;17(2):132-134. doi:10.1159/000258697.
  47. Win-Shwe TT, Kunugita N, Yamamoto S, Arashidani K, Fujimaki H. Strain Differences Influence N-Methyl-D-Aspartate Receptor Subunit Gene Expression in the Olfactory Bulb of an Allergic Mouse Model following Toluene Exposure. *Neuroimmunomodulation*. 2010;17(5):340-347. doi:10.1159/000292028.
  48. Bale AS, Jackson MD, Krantz QT, et al. Evaluating the NMDA-glutamate receptor as a site of action for Toluene, in vivo. *Toxicol Sci*. 2007;98(1):159-166. doi:10.1093/toxsci/kfm080.
  49. Bale AS, Tu Y, Carpenter-Hyland EP, Chandler LJ, Woodward JJ. Alterations in glutamatergic and gabaergic ion channel activity in hippocampal neurons following exposure to the abused inhalant toluene. *Neuroscience*. 2005;130(1):197-206. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.08.040.
  50. Dick ALW, Pooters T, Gibbs S, et al. NMDA receptor binding is reduced within mesocorticolimbic regions following chronic inhalation of toluene in adolescent rats. *Brain Res*. 2015;1624:239-252. doi:10.1016/j.brainres.2015.07.037.
  51. Bowen SE, Batis JC, Paez-Martinez N, Cruz SL. The last decade of solvent research in animal models of abuse: Mechanistic and behavioral studies. *Neurotoxicol Teratol*.

- 2006;28(6):636-647. doi:10.1016/j.ntt.2006.09.005.
52. Beckstead MJ, Weiner JL, Li EIE, Gong DH, Mihic SJ. Glycine and  $\alpha$ -Aminobutyric Acid A Receptor Function Is Enhanced by Inhaled Drugs of Abuse. *Mol Pharmacol.* 2000;57:1199-1205.
53. Nimitvilai S, You C, Arora DS, et al. Differential effects of toluene and ethanol on dopaminergic neurons of the ventral tegmental area. *Front Neurosci.* 2016;10(SEP):1-12. doi:10.3389/fnins.2016.00434.
54. Williams JM, Stafford D, Steketee JD. Effects of repeated inhalation of toluene on ionotropic GABA A and glutamate receptor subunit levels in rat brain. *Neurochem Int.* 2005;46(1):1-10. doi:10.1016/j.neuint.2004.07.006.
55. Shelton KL, Nicholson KL. Benzodiazepine-like discriminative stimulus effects of toluene vapor. *Eur J Pharmacol.* 2013;720(1-3):131-137. doi:10.1016/j.ejphar.2013.10.036.
56. O'Leary-Moore SK, Galloway MP, McMechan AP, Irtenkauf S, Hannigan JH, Bowen SE. Neurochemical changes after acute binge toluene inhalation in adolescent and adult rats: A high-resolution magnetic resonance spectroscopy study. *Neurotoxicol Teratol.* 2009;31(6):382-389. doi:10.1016/j.ntt.2009.07.005.
57. 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. doi:10.1038/sj.npp.1301273.
58. Beckley JT, Evins CE, Fedarovich H, Gilstrap MJ, Woodward JJ. Medial Prefrontal Cortex Inversely Regulates Toluene-Induced Changes in Markers of Synaptic Plasticity of Mesolimbic Dopamine Neurons. *J Neurosci.* 2013;33(2):804-813. doi:10.1523/JNEUROSCI.3729-12.2013.
59. Rivera-García MT, López-Rubalcava C, Cruz SL. Preclinical characterization of toluene as a non-classical hallucinogen drug in rats: Participation of 5-HT, dopamine and glutamate systems. *Psychopharmacology (Berl).* 2015;232(20):3797-3808. doi:10.1007/s00213-015-4041-8.

60. Shane A. Perrine, Shonagh K. O Leary-Moore, Matthew P. Galloway, John H. Hannigan SEB. Binge Toluene Exposure Alters Glutamate, Glutamine and GABA in the Adolescent Rat Brain as Measured by Proton Magnetic. *Drug Alcohol Depend.* 2011;115(313):1-12. doi:10.1016/j.drugalcdep.2010.11.001.
61. Duncan JR, Lawrence AJ. Conventional Concepts and New Perspectives for Understanding the Addictive Properties of Inhalants. *J Pharmacol Sci.* 2013;122(4):237-243. doi:10.1254/jphs.13R04CP.
62. Win-Shwe TT, Mitsushima D, Nakajima D, et al. Toluene induces rapid and reversible rise of hippocampal glutamate and taurine neurotransmitter levels in mice. *Toxicol Lett.* 2007;168(1):75-82. doi:10.1016/j.toxlet.2006.10.017.
63. Royland JE, Kodavanti PRS, Schmid JE, MacPhail RC. Toluene effects on gene expression in the hippocampus of young adult, middle-age, and senescent Brown Norway Rats. *Toxicol Sci.* 2012;126(1):193-212. doi:10.1093/toxsci/kfr340.
64. Santiago F, Alves G, Otero UB, et al. Monitoring of gas station attendants exposure to benzene, toluene, xylene (BTX) using three-color chromosome painting. *Mol Cytogenet.* 2014;7(1):15. doi:10.1186/1755-8166-7-15.
65. Moro AM, Brucker N, Charão M, et al. Evaluation of genotoxicity and oxidative damage in painters exposed to low levels of toluene. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2012;746(1):42-48. doi:10.1016/j.mrgentox.2012.02.007.
66. Ana-Lilia GY, Carlos K, Kazimierz W, Elva-Leticia PL, Katarzina W, Gloria B. Occupational exposure to toluene and its possible causative role in renal damage development in shoe workers. *Int Arch Occup Environ Health.* 2006;79(3):259-264. doi:10.1007/s00420-005-0001-7.
67. Dickson RP, Luks AM. Toluene toxicity as a cause of elevated anion gap metabolic acidosis. *Respir Care.* 2009;54(8):1115-1117.
68. Al-Ghamdi SS, Raftery MJ, Yaqoob MM. Organic solvent-induced proximal tubular cell apoptosis via caspase-9 activation. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2004;16(3):147-152. doi:10.1016/j.etap.2003.12.002.

69. Voss J-U, Roller M, Brinkmann E, Mangelsdorf I. Nephrotoxicity of organic solvents: biomarkers for early detection. *Int Arch Occup Environ Health*. 2005;78(6):475-485. doi:10.1007/s00420-005-0611-0.
70. Vaghasia KK, Bhavyata K, Linzbuoy G, Hyacinth HN. Renal and hepatotoxic alterations in adult mice on inhalation of specific mixture of organic solvents. *Toxicol Ind Health*. 2013;31(12):1158-1164. doi:10.1177/0748233713485892.
71. Luderer U, Morgan MS, Brodtkin CA, Kalman DA, Faustman EM. Reproductive endocrine effects of acute exposure to toluene in men and women. *Occup Environ Med*. 1999;56(10):657-666.
72. Dick ALW, Simpson A, Qama A, Andrews Z, Lawrence AJ, Duncan JR. Chronic intermittent toluene inhalation in adolescent rats results in metabolic dysfunction with altered glucose homeostasis. *Br J Pharmacol*. 2015;172(21):5174-5187. doi:10.1111/bph.13284.
73. Svensson BG, Nise G, Erfurth EM, Olsson H. Neuroendocrine effects in printing workers exposed to toluene. *Br J Ind Med*. 1992;49(6):402-408.
74. Plenge-Bönig A, Karmaus W. Exposure to toluene in the printing industry is associated with subfecundity in women but not in men. *Occup Environ Med*. 1999;56(7):443-448. doi:10.1136/oem.56.7.443.
75. Reutman SR, LeMasters GK, Knecht EA, et al. Evidence of reproductive endocrine effects in women with occupational fuel and solvent exposures. *Environ Health Perspect*. 2002;110(8):805-811.
76. Samuel-Herter SR, Slaght SL, McKay BE. Age-dependent time courses of recovery for motor functions following acute toluene intoxication in rats. *Dev Psychobiol*. 2014;56(4):657-673. doi:10.1002/dev.21134.
77. Costa LG, Guizzetti M, Burry M, Oberdoerster J. Developmental neurotoxicity: Do similar phenotypes indicate a common mode of action? A comparison of fetal alcohol syndrome, toluene embryopathy and maternal phenylketonuria. *Toxicol Lett*. 2002;127(1-3):197-205. doi:10.1016/S0378-4274(01)00501-X.

78. Bowen SE, Hannigan JH. Developmental toxicity of prenatal exposure to toluene. *AAPS J.* 2006;8(2):E419-E424. doi:10.1208/aapsj080249.
79. Bowen SE, Hannigan JH, Cooper PB. Abuse pattern of gestational toluene exposure alters behavior in rats in a "waiting-for-reward" task. *Neurotoxicol Teratol.* 2009;31(2):89-97. doi:10.1016/j.ntt.2008.11.002.
80. Roberts LG, Nicolich MJ, Schreiner CA. Developmental and reproductive toxicity evaluation of toluene vapor in the rat. II. Developmental toxicity. *Reprod Toxicol.* 2007;23(4):521-531. doi:10.1016/j.reprotox.2007.01.009.
81. Soberanes-Chávez P, López-Rubalcava C, de Gortari P, Cruz SL. Exposure to toluene and stress during pregnancy impairs pups' growth and dams' lactation. *Neurotoxicol Teratol.* 2013;40:9-16. doi:10.1016/j.ntt.2013.07.011.
82. Bowen SE, Irtenkauf S, Hannigan JH, Stefanski AL. Alterations in rat fetal morphology following abuse patterns of toluene exposure. *Reprod Toxicol.* 2009;27(2):161-169. doi:10.1016/j.reprotox.2009.01.002.
83. Jones HE, Balster RL. Neurobehavioral consequences of intermittent prenatal exposure to high concentrations of toluene. *Neurotoxicol Teratol.* 1997;19(4):305-313. doi:10.1016/S0892-0362(97)00034-2.
84. Bowen SE, Batis JC, Mohammadi MH, Hannigan JH. Abuse pattern of gestational toluene exposure and early postnatal development in rats. *Neurotoxicol Teratol.* 2005;27(1):105-116. doi:10.1016/j.ntt.2004.09.007.
85. Donald JM, Hooper K, Hopenhayn-Rich C. Reproductive and development toxicity of toluene: A review. *Environ Health Perspect.* 1991;94:237-244. doi:10.2307/3431317.
86. Jarosz PA, Fata E, Bowen SE, Jen KLC, Coscina D V. Effects of abuse pattern of gestational toluene exposure on metabolism, feeding and body composition. *Physiol Behav.* 2008;93(4-5):984-993. doi:10.1016/j.physbeh.2007.12.016.
87. Warner R, Ritchie HE, Woodman P, Oakes D, Pourghasem M. The effect of prenatal exposure to a repeat high dose of toluene in the fetal rat. *Reprod Toxicol.* 2008;26(3-4):267-272. doi:10.1016/j.reprotox.2008.09.002.

88. Bowen SE, Kimar S, Irtenkauf S. Comparison of toluene-induced locomotor activity in four mouse strains. *Pharmacol Biochem Behav.* 2010;95(2):249-257. doi:10.1016/j.pbb.2010.01.014.
89. Batis JC, Hannigan JH, Bowen SE. Differential effects of inhaled toluene on locomotor activity in adolescent and adult rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2010;96(4):438-448. doi:10.1016/j.pbb.2010.07.003.
90. MacPhail RC, Farmer JD, Jarema KA. Toluene effects on the motor activity of adolescent, young-adult, middle-age and senescent male Brown Norway rats. *Neurotoxicology.* 2012;33(1):111-118. doi:10.1016/j.neuro.2011.12.006.
91. Chan M, Chung S, Stoker AK, Markou A, Chen H-H. Sarcosine attenuates toluene-induced motor incoordination, memory impairment, and hypothermia but not brain stimulation reward enhancement in mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2012;265(2):158-165. doi:10.1016/j.taap.2012.10.004.
92. Cruz SL, Gauthereau MY, Camacho-Muñoz C, López-Rubalcava C, Balster RL. Effects of inhaled toluene and 1,1,1-trichloroethane on seizures and death produced by N-methyl-D-aspartic acid in mice. *Behav Brain Res.* 2003;140(1-2):195-202.
93. Howard MO, Bowen SE, Garland EL, Perron BE, Vaughn MG. Inhalant use and inhalant use disorders in the United States. *Addict Sci Clin Pract.* 2011;6(1):18-31. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22003419>.
94. Bowen SE, Hannigan JH. Binge toluene exposure in pregnancy and pre-weaning developmental consequences in rats. *Neurotoxicol Teratol.* 2013;38(313):29-35. doi:10.1016/j.ntt.2013.04.002.
95. Baskerville JR, Tichenor G a, Rosen PB. Toluene induced hypokalaemia: case report and literature review. *Emerg Med J.* 2001;18(6):514-516. doi:10.1136/emj.18.6.514.
96. Camara-Lemarroy CR, Rodríguez-Gutiérrez R, Monreal-Robles R, González-González JG. Acute toluene intoxication--clinical presentation, management and prognosis: a prospective observational study. *BMC Emerg Med.* 2015;15:19. doi:10.1186/s12873-015-0039-0.

97. Ryu YH, Lee JD, Yoon PH, Jeon P, Kim DI, Shin DW. Cerebral perfusion impairment in a patient with toluene abuse. *J Nucl Med*. 1998;39(4):632-633.
98. Takebayashi K, Sekine Y, Takei N, et al. Metabolite alterations in basal ganglia associated with psychiatric symptoms of abstinent toluene users: a proton MRS study. *Neuropsychopharmacology*. 2004;29(5):1019-1026. doi:10.1038/sj.npp.1300426.
99. Duncan JR, Dick ALW, Egan G, et al. Adolescent Toluene Inhalation in Rats Affects White Matter Maturation with the Potential for Recovery Following Abstinence. *PLoS One*. 2012;7(9):1-12. doi:10.1371/journal.pone.0044790.
100. Eisenberg DP. Neurotoxicity and Mechanism of Toluene Abuse. *Einstein Q J Biol Med*. 2003;(19):150-159.
101. Nomura T, Yaguchi H, Mito Y, Tajima Y. MR images in a patient with chronic toluene poisoning. *Intern Med*. 2016;55(7):851-852. doi:10.2169/internalmedicine.55.6086.
102. Aydin K, Sencer S, Demir T, Ogel K, Tunaci A, Minareci O. Cranial MR findings in chronic toluene abuse by inhalation. *Am J Neuroradiol*. 2002;23(7):1173-1179.
103. Weinberger NM. *New Perspectives on the Auditory Cortex: Learning and Memory*. Vol 129. 1st ed. Elsevier B.V.; 2015. doi:10.1016/B978-0-444-62630-1.00007-X.
104. Johansen JP, Cain CK, Ostroff LE, LeDoux JE. Molecular Mechanisms of Fear Learning and Memory. *Cell*. 2011;147(3):509-524. doi:10.1016/j.cell.2011.10.009.
105. Proulx E, Piva M, Tian MK, Bailey CDC, Lambe EK. Nicotinic acetylcholine receptors in attention circuitry: the role of layer VI neurons of prefrontal cortex. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71(7):1225-1244. doi:10.1007/s00018-013-1481-3.
106. Kent PL. Working Memory: A Selective Review. *Appl Neuropsychol Child*. 2016;5(3):163-172. doi:10.1080/21622965.2016.1167491.
107. Alberini CM. Transcription Factors in Long-Term Memory and Synaptic Plasticity. *Physiol Rev*. 2009;89(1):121-145. doi:10.1152/physrev.00017.2008.
108. Preston AR, Eichenbaum H. Interplay of hippocampus and prefrontal cortex in memory. *Curr Biol*. 2013;23(17):1-21. doi:10.1016/j.cub.2013.05.041.
109. Schacter DL. Constructive memory: past and future. *Dialogues Clin Neurosci*. 2012;14(1):7-18. doi:10.1097/BOR.0b013e32834b5457.

110. Crystal JD, Wilson AG. Prospective memory: a comparative perspective. *Behav Process.* 2015;112:88-99. doi:10.1016/j.beproc.2014.07.016.
111. Jeneson A, Squire LR. Working memory, long-term memory, and medial temporal lobe function. *Learn Mem.* 2011;19(1):15-25. doi:10.1101/lm.024018.111.
112. Melby-Lervåg M, Redick TS, Hulme C. Working Memory Training Does Not Improve Performance on Measures of Intelligence or Other Measures of "Far Transfer": Evidence From a Meta-Analytic Review. *Perspect Psychol Sci.* 2016;11(4):512-534. doi:10.1177/1745691616635612.
113. Leszczyński M, Fell J, Axmacher N. Rhythmic Working Memory Activation in the Human Hippocampus. *Cell Rep.* 2015;13(6):1272-1282. doi:10.1016/j.celrep.2015.09.081.
114. von Bastian CC, Oberauer K. Effects and mechanisms of working memory training: a review. *Psychol Res.* 2014;78(6):803-820. doi:10.1007/s00426-013-0524-6.
115. Danielsson H, Zottarel V, Palmqvist L, Lanfranchi S. The effectiveness of working memory training with individuals with intellectual disabilities – a meta-analytic review. *Front Psychol.* 2015;6(August):1-10. doi:10.3389/fpsyg.2015.01230.
116. Boschini EA, Buckley MJ. Differential contributions of dorsolateral and frontopolar cortices to working memory processes in the primate. *Front Syst Neurosci.* 2015;9(October):Article 144. doi:10.3389/fnsys.2015.00144.
117. Sumiyoshi T. Verbal Memory. In: *Cognitive Enhancement.* ; 2015:237-247. doi:10.1007/978-3-319-16522-6\_8.
118. Kandel ER, Dudai Y, Mayford MR. The molecular and systems biology of memory. *Cell.* 2014;157(1):163-186. doi:10.1016/j.cell.2014.03.001.
119. Huijgen J, Samson S. The hippocampus: A central node in a large-scale brain network for memory. *Rev Neurol (Paris).* 2015;171(3):204-216. doi:10.1016/j.neurol.2015.01.557.
120. Riedel WJ, Blokland A. Declarative Memory. In: *Cognitive Enhancement.* ; 2015:215-236. doi:10.1007/978-3-319-16522-6\_7.
121. Allen T a, Fortin NJ. The evolution of episodic memory. *Proc Natl Acad Sci U S A.*



- 2013;110 Suppl:10379-10386. doi:10.1073/pnas.1301199110.
122. Farovik A, Dupont LM, Eichenbaum H. Distinct roles for dorsal CA3 and CA1 in memory for sequential nonspatial events. *Learn Mem.* 2010;17(1):12-17. doi:10.1101/lm.1616209.
123. Zhou W, Crystal JD. Validation of a rodent model of episodic memory. *Anim Cogn.* 2011;14(3):325-340. doi:10.1007/s10071-010-0367-0.
124. Dickerson BC, Eichenbaum H. The episodic memory system: neurocircuitry and disorders. *Neuropsychopharmacology.* 2010;35(1):86-104. doi:10.1038/npp.2009.126.
125. Holland AC, Kensinger EA. Emotion and autobiographical memory. *Phys Life Rev.* 2010;7(1):88-131. doi:10.1016/j.pprev.2010.01.006.
126. Rybak-Korneluk A, Wichowicz H, Żuk K, Dziurkowski M. Autobiographical memory and its meaning in selected mental disorders. *Psychiatr Pol.* 2016;50(5):959-972. doi:10.12740/PP/38518.
127. Howard MW, Eichenbaum H. The hippocampus, time, and memory across scales. *J Exp Psychol Gen.* 2013;142(4):1211-1230. doi:10.1037/a0033621.
128. Olson IR, Berryhill M. Some surprising findings on the involvement of the parietal lobe in human memory. *Neurobiol Learn Mem.* 2009;91(2):155-165. doi:10.1016/j.nlm.2008.09.006.
129. Hawkins RD, Byrne JH. Associative learning in invertebrates. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7(5):1-17. doi:10.1101/cshperspect.a021709.
130. Kempzell AT, Fieber LA. Habituation in the tail withdrawal reflex circuit is impaired during aging in *Aplysia californica*. *Front Aging Neurosci.* 2016;8(FEB):1-8. doi:10.3389/fnagi.2016.00024.
131. Bailey CH, Kandel ER, Harris KM. Structural Components of Synaptic Plasticity and Memory Consolidation. 2015:1-30. doi:10.1101/cshperspect.a021758.
132. Byrne JH, Hawkins RD. Nonassociative learning in invertebrates. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7(5):1-15. doi:10.1101/cshperspect.a021675.
133. Hawkins RD. Possible contributions of a novel form of synaptic plasticity in *Aplysia* to reward, memory, and their dysfunctions in mammalian brain. *Learn Mem.*

- 2013;20(10):580-591. doi:10.1101/lm.031237.113.
134. Rescorla RA. Pavlovian conditioning and its proper control procedures. *Psychol Rev.* 1967;74(1):71-80. doi:10.1037/h0024109.
135. Rose NS, Rendell PG, Hering A, Kliegel M, Bidelman GM, Craik FIM. Cognitive and neural plasticity in older adults' prospective memory following training with the Virtual Week computer game. *Front Hum Neurosci.* 2015;9(October):1-13. doi:10.3389/fnhum.2015.00592.
136. Crystal JD. Remembering the past and planning for the future in rats. *Behav Processes.* 2013;93:39-49. doi:10.1016/j.beproc.2012.11.014.
137. Eichenbaum H, Yonelinas AP, Ranganath C. The Medial Temporal Lobe and Recognition Memory. *Annu Rev Neurosci.* 2007;30(1):123-152. doi:10.1146/annurev.neuro.30.051606.094328.
138. Mendez MF, Fras IA. The false memory syndrome: Experimental studies and comparison to confabulations. *Med Hypotheses.* 2011;76(4):492-496. doi:10.1016/j.mehy.2010.11.033.
139. Stern CA, Gazarini L, Vanvossen AC, Hames MS, Bertoglio LJ. Activity in prelimbic cortex subserves fear memory reconsolidation over time. *Learn Mem.* 2014;21(1):14-20. doi:10.1101/lm.032631.113.
140. Erlich JC, Bialek M, Brody CD. A cortical substrate for memory-guided orienting in the rat. *Neuron.* 2011;72(2):330-343. doi:10.1016/j.neuron.2011.07.010.
141. Kitamura T, Inokuchi K. Role of adult neurogenesis in hippocampal-cortical memory consolidation. *Mol Brain.* 2014;7(13):1-8. doi:10.1186/1756-6606-7-13.
142. Bae SE, Holmes NM, Westbrook RF. False context fear memory in rats. *Learn Mem.* 2015;22(10):519-525. doi:10.1101/lm.039065.115.
143. McIntyre CK, McGaugh JL, Williams CL. Interacting brain systems modulate memory consolidation. *Neurosci Biobehav Rev.* 2012;36(7):1750-1762. doi:10.1016/j.neubiorev.2011.11.001.
144. Nadel L, Hardt O. Update on memory systems and processes. *Neuropsychopharmacol Rev.* 2011;36(1):251-273. doi:10.1038/npp.2010.169.

145. Roozendaal B, McGaugh JL. Memory modulation. *Behav Neurosci.* 2011;125(6):797-824. doi:10.1037/a0026187.
146. Zimmerknopf E, Xavier GF, Kinsley CH, Felicio LF. Prior parity positively regulates learning and memory in young and middle-aged rats. *Comp Med.* 2011;61(4):366-377.
147. Frick KM, Kim J, Tuscher JJ, Fortress AM. Sex steroid hormones matter for learning and memory: estrogenic regulation of hippocampal function in male and female rodents. *Learn Mem.* 2015;22(9):472-493. doi:10.1101/lm.037267.114.
148. Spritzer MD, Daviau ED, Coneeny MK, Engelman SM, Prince WT, Rodriguez-Wisdom KN. Effects of testosterone on spatial learning and memory in adult male rats. *Horm Behav.* 2011;59(4):484-496. doi:10.1016/j.yhbeh.2011.01.009.
149. Kumar A. NMDA receptor function during senescence: Implication on cognitive performance. *Front Neurosci.* 2015;9(DEC):1-15. doi:10.3389/fnins.2015.00473.
150. Chung C. NMDA receptor as a newly identified member of the metabotropic glutamate receptor family: Clinical implications for neurodegenerative diseases. *Mol Cells.* 2013;36(2):99-104. doi:10.1007/s10059-013-0113-y.
151. Zhuo M. Plasticity of NMDA receptor NR2B subunit in memory and chronic pain. *Mol Brain.* 2009;2:4. doi:10.1186/1756-6606-2-4.
152. Santangelo RM, Acker TM, Zimmerman SS, et al. Novel NMDA receptor modulators: an update. *Expert Opin Ther Pat.* 2012;22(11):1337-1352. doi:10.1517/13543776.2012.728587.
153. Wang H, Peng R. Basic roles of key molecules connected with NMDAR signaling pathway on regulating learning and memory and synaptic plasticity. *Mil Med Res.* 2016;3(1):26. doi:10.1186/s40779-016-0095-0.
154. Newcomer JW, Farber NB, Olney JW. NMDA receptor function, memory, and brain aging. *Dialogues Clin Neurosci.* 2000;2(3):219-232.
155. Koukouli F, Maskos U. The multiple roles of the  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor in modulating glutamatergic systems in the normal and diseased nervous system. *Biochem Pharmacol.* 2015;97(4):378-387. doi:10.1016/j.bcp.2015.07.018.

156. Tellez R, Gómez-Viquez L, Meneses A. GABA, glutamate, dopamine and serotonin transporters expression on memory formation and amnesia. *Neurobiol Learn Mem.* 2012;97(2):189-201. doi:10.1016/j.nlm.2011.12.002.
157. Andero R. Nociceptin and the nociceptin receptor in learning and memory. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2015;62:45-50. doi:10.1016/j.pnpbp.2015.02.007.
158. Vyklicky V, Korinek M, Smejkalova T, et al. Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels. *Physiol Res.* 2014;63 Suppl 1:S191-203. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24564659>.
159. Strong KL, Jing Y, Prosser AR, Traynelis SF, Liotta DC. NMDA receptor modulators: an updated patent review (2013 – 2014). *Expert Opin Ther Pat.* 2014;24(12):1349-1366. doi:10.1517/13543776.2014.972938.
160. Morisot N, Ron D. Alcohol-dependent molecular adaptations of the NMDA receptor system. *Genes, Brain Behav.* 2017;16(1):139-148. doi:10.1111/gbb.12363.
161. Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, et al. Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. *Pharmacol Rev.* 2010;62(3):405-496. doi:10.1124/pr.109.002451.
162. Regan MC, Romero-Hernandez A, Furukawa H. A structural biology perspective on NMDA receptor pharmacology and function. *Curr Opin Struct Biol.* 2015;33:68-75. doi:10.1016/j.sbi.2015.07.012.
163. Wyllie DJA, Livesey MR, Hardingham GE. Influence of GluN2 subunit identity on NMDA receptor function. *Neuropharmacology.* 2013;74:4-17. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.01.016.
164. Cercato MC, Coletti N, Snitcofsky M, et al. Hippocampal NMDA receptors and the previous experience effect on memory. *J Physiol Paris.* 2014;108(4-6):263-269. doi:10.1016/j.jphysparis.2014.08.001.
165. Horak M, Petralia RS, Kaniakova M, Sans N. ER to synapse trafficking of NMDA receptors. *Front Cell Neurosci.* 2014;8(November):394. doi:10.3389/fncel.2014.00394.

166. Ogden KK, Traynelis SF. New advances in NMDA receptor pharmacology. *Trends Pharmacol Sci.* 2011;32(12):726-733. doi:10.1016/j.tips.2011.08.003.
167. Wang D, Jacobs SA, Tsien JZ. Targeting the NMDA receptor subunit NR2B for treating or preventing age-related memory decline. *Expert Opin Ther Targets.* 2014;18(10):1121-1130. doi:10.1517/14728222.2014.941286.
168. Zhou Q, Sheng M. NMDA receptors in nervous system diseases. *Neuropharmacology.* 2013;74:69-75. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.03.030.
169. Costa B, Irvine M, Fang G. A novel family of negative and positive allosteric modulators of NMDA receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010;335(3):614-621. doi:10.1124/jpet.110.174144.
170. Zhou X, Chen Z, Yun W, Ren J, Li C, Wang H. Extrasynaptic NMDA Receptor in Excitotoxicity: Function Revisited. *Neurosci.* 2015;21(4):337-344. doi:10.1177/1073858414548724.
171. Petralia RS, Petralia RS. Distribution of Extrasynaptic NMDA Receptors on Neurons. *Sci World J.* 2012;2012:1-11. doi:10.1100/2012/267120.
172. Sanz-Clemente A, Nicoll RA, Roche KW. Diversity in NMDA Receptor Composition. *Neurosci.* 2013;19(1):62-75. doi:10.1177/1073858411435129.
173. Warburton EC, Barker GRI, Brown MW. Investigations into the involvement of NMDA mechanisms in recognition memory. *Neuropharmacology.* 2013;74:41-47. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.04.013.
174. Park P, Volianskis A, Sanderson TM, et al. NMDA receptor-dependent long-term potentiation comprises a family of temporally overlapping forms of synaptic plasticity that are induced by different patterns of stimulation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2014;369(1633):20130131. doi:10.1098/rstb.2013.0131.
175. Yang K, Jackson MF, MacDonald JF. Recent progress in understanding subtype specific regulation of NMDA receptors by G Protein Coupled Receptors (GPCRs). *Int J Mol Sci.* 2014;15(2):3003-3024. doi:10.3390/ijms15023003.
176. Bliss TVP, Collingridge GL. Expression of NMDA receptor-dependent LTP in the hippocampus: bridging the divide. *Mol Brain.* 2013;6:5. doi:10.1186/1756-6606-6-5.

177. Morris RGM. NMDA receptors and memory encoding. *Neuropharmacology*. 2013;74:32-40. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.04.014.
178. Dore K, Aow J, Malinow R, Augustine G. The Emergence of NMDA Receptor Metabotropic Function : Insights from Imaging. 2016;8(July):1-9. doi:10.3389/fnsyn.2016.00020.
179. Shipton O a, Paulsen O. GluN2A and GluN2B subunit-containing NMDA receptors in hippocampal plasticity. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2013;369(1633):1-17. doi:10.1098/rstb.2013.0163.
180. Rebola N, Srikumar BN, Mulle C. Activity-dependent synaptic plasticity of NMDA receptors. *J Physiol*. 2010;588(1):93-99. doi:10.1113/jphysiol.2009.179382.
181. Gray JA, Zito K, Hell JW. Non-ionotropic signaling by the NMDA receptor: controversy and opportunity. *F1000Research*. 2016;5(May):1-8. doi:10.12688/f1000research.8366.1.
182. Lussier MP, Sanz-Clemente A, Roche KW. Dynamic Regulation of N -Methyl-d-aspartate (NMDA) and ?-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic Acid (AMPA) Receptors by Posttranslational Modifications. *J Biol Chem*. 2015;290(48):28596-28603. doi:10.1074/jbc.R115.652750.
183. Karakas E, Regan MC, Furukawa H. Emerging structural insights into the function of ionotropic glutamate receptors. *Trends Biochem Sci*. 2015;40(6):328-337. doi:10.1016/j.tibs.2015.04.002.
184. Zhu S, Gouaux E. Structure and symmetry inform gating principles of ionotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology*. 2017;112:11-15. doi:10.1016/j.neuropharm.2016.08.034.
185. Niu L. Mechanism-based design of 2,3-benzodiazepine inhibitors for AMPA receptors. *Acta Pharm Sin B*. 2015;5(6):500-505. doi:10.1016/j.apsb.2015.07.007.
186. Good CH, Lupica CR. Afferent-Specific AMPA Receptor Subunit Composition and Regulation of Synaptic Plasticity in Midbrain Dopamine Neurons by Abused Drugs. *J Neurosci*. 2010;30(23):7900-7909. doi:10.1523/JNEUROSCI.1507-10.2010.
187. Compans B, Choquet D, Hosy E. Review on the role of AMPA receptor nano-

- organization and dynamic in the properties of synaptic transmission. *Neurophotonics*. 2016;3(4):41811. doi:10.1117/1.NPh.3.4.041811.
188. Albuquerque EX, Pereira EFR, Alkondon M, Rogers SW. Mammalian Nicotinic Acetylcholine Receptors: From Structure to Function. *Physiol Rev*. 2009;89(1):73-120. doi:10.1152/physrev.00015.2008.
189. Zoli M, Pistillo F, Gotti C. Diversity of native nicotinic receptor subtypes in mammalian brain. *Neuropharmacology*. 2015;96:302-311. doi:10.1016/j.neuropharm.2014.11.003.
190. Schaaf CP. Nicotinic acetylcholine receptors in human genetic disease. *Genet Med*. 2014;16(9):649-656. doi:10.1038/gim.2014.9.
191. Lipovsek M, Fierro A, Pérez EG, et al. Tracking the molecular evolution of calcium permeability in a nicotinic acetylcholine receptor. *Mol Biol Evol*. 2014;31(12):3250-3265. doi:10.1093/molbev/msu258.
192. Wilking JA, Stitzel JA. Natural genetic variability of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit genes in mice: Consequences and confounds. *Neuropharmacology*. 2015;96:205-212. doi:10.1016/j.neuropharm.2014.11.022.
193. Chatzidaki A, Millar NS. Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem Pharmacol*. 2015;97(4):408-417. doi:10.1016/j.bcp.2015.07.028.
194. Shorey-Kendrick LE, Ford MM, Allen DC, et al. Nicotinic receptors in non-human primates: Analysis of genetic and functional conservation with humans. *Neuropharmacology*. 2015;96:263-273. doi:10.1016/j.neuropharm.2015.01.023.
195. Cecchini M, Changeux J-P. The nicotinic acetylcholine receptor and its prokaryotic homologues: Structure, conformational transitions & allosteric modulation. *Neuropharmacology*. 2014;96(December):1-13. doi:10.1016/j.neuropharm.2014.12.006.
196. Leslie FM, Mojica CY, Reynaga DD. Nicotinic receptors in addiction pathways. *Mol Pharmacol*. 2013;83(4):753-758. doi:10.1124/mol.112.083659.
197. Posadas I, López-Hernández B, Ceña V. Nicotinic receptors in neurodegeneration. *Curr Neuropharmacol*. 2013;11(3):298-314. doi:10.2174/1570159X11311030005.

198. Cheng Q, Yakel JL. The effect of  $\alpha 7$  nicotinic receptor activation on glutamatergic transmission in the hippocampus. *Biochem Pharmacol.* 2015;97(4):439-444. doi:10.1016/j.bcp.2015.07.015.
199. Xiao Y, Abdrakhmanova GR, Baydyuk M, Hernandez S, Kellar KJ. Rat neuronal nicotinic acetylcholine receptors containing alpha7 subunit: pharmacological properties of ligand binding and function. *Acta Pharmacol Sin.* 2009;30(6):842-850. doi:10.1038/aps.2009.69.
200. Shen J, Yakel JL. Functional  $\alpha 7$  Nicotinic ACh Receptors on Astrocytes in Rat Hippocampal CA1 Slices. *J Mol Neurosci.* 2012;48(1):14-21. doi:10.1007/s12031-012-9719-3.
201. Wang Y, Wang Z, Wang J, et al. The modulation of nicotinic acetylcholine receptors on the neuronal network oscillations in rat hippocampal CA3 area. *Sci Rep.* 2015;5(1):1-10. doi:10.1038/srep09493.
202. Baenziger JE, Hénault CM, Therien JPD, Sun J. Nicotinic acetylcholine receptor-lipid interactions: Mechanistic insight and biological function. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2015;1848(9):1806-1817. doi:10.1016/j.bbamem.2015.03.010.
203. Campbell NR, Fernandes CC, John D, Lozada AF, Berg DK. Nicotinic control of adult-born neuron fate. *Biochem Pharmacol.* 2011;82(8):820-827. doi:10.1016/j.bcp.2011.06.021.
204. Arroyo S, Bennett C, Hestrin S. Nicotinic modulation of cortical circuits. *Front Neural Circuits.* 2014;8(March):30. doi:10.3389/fncir.2014.00030.
205. Kutlu MG, Gould TJ. Nicotinic Receptors, Memory, and Hippocampus. In: Balfour DJK, Munaf? MR, eds. Vol 23. Current Topics in Behavioral Neurosciences. Cham: Springer International Publishing; 2015:137-163. doi:10.1007/978-3-319-13665-3\_6.
206. Rahman S, Engleman EA, Bell RL. Nicotinic receptor modulation to treat alcohol and drug dependence. *Front Neurosci.* 2015;8(JAN):1-11. doi:10.3389/fnins.2014.00426.
207. Lebbe EKM, Peigneur S, Wijesekara I, Tytgat J. *Conotoxins Targeting Nicotinic Acetylcholine Receptors: An Overview.* Vol 12.; 2014. doi:10.3390/md12052970.



208. Levin ED, Hall BJ, Rezvani AH. Heterogeneity Across Brain Regions and Neurotransmitter Interactions with Nicotinic Effects on Memory Function. In: *Current Topics in Behavioral Neurosciences*. Vol 23. ; 2015:87-101. doi:10.1007/978-3-319-13665-3\_4.
209. Halff AW, Gomez-Varela D, John D, Berg DK. A Novel Mechanism for Nicotinic Potentiation of Glutamatergic Synapses. *J Neurosci*. 2014;34(6):2051-2064. doi:10.1523/JNEUROSCI.2795-13.2014.
210. Parfitt GM, Campos RC, Barbosa ÂK, Koth AP, Barros DM. Participation of hippocampal cholinergic system in memory persistence for inhibitory avoidance in rats. *Neurobiol Learn Mem*. 2012;97(2):183-188. doi:10.1016/j.nlm.2011.12.001.
211. Pandya AA, Yakel JL. Effects of neuronal nicotinic acetylcholine receptor allosteric modulators in animal behavior studies. *Biochem Pharmacol*. 2013;86(8):1054-1062. doi:10.1016/j.bcp.2013.05.018.
212. Hahn B. Nicotinic Receptors and Attention. In: Balfour DJK, Munaf? MR, eds. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*. Vol 23. Current Topics in Behavioral Neurosciences. Cham: Springer International Publishing; 2015:103-135. doi:10.1007/978-3-319-13665-3\_5.
213. Hamilton A, Zamponi GW, Ferguson SSG. Glutamate receptors function as scaffolds for the regulation of  $\beta$ -amyloid and cellular prion protein signaling complexes. *Mol Brain*. 2015;8(1):18. doi:10.1186/s13041-015-0107-0.
214. Pruneda-Álvarez LG, Pérez-Vázquez FJ, Salgado-Bustamante M, Martínez-Salinas RI, Pelallo-Martínez NA, Pérez-Maldonado IN. Exposure to indoor air pollutants (polycyclic aromatic hydrocarbons, toluene, benzene) in Mexican indigenous women. *Indoor Air*. 2012;22(2):140-147. doi:10.1111/j.1600-0668.2011.00750.x.
215. Niswender CM, Conn PJ. Metabotropic Glutamate Receptors: Physiology, Pharmacology, and Disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2010;50(1):295-322. doi:10.1146/annurev.pharmtox.011008.145533.
216. Pomierny-ChamióŁo L, Rup K, Pomierny B, Niedzielska E, Kalivas PW, Filip M. Metabotropic glutamatergic receptors and their ligands in drug addiction. *Pharmacol Ther*. 2014;142(3):281-305. doi:10.1016/j.pharmthera.2013.12.012.

217. Maksymetz J, Moran SP, Conn PJ. Targeting metabotropic glutamate receptors for novel treatments of schizophrenia. *Mol Brain*. 2017;10(1):15. doi:10.1186/s13041-017-0293-z.
218. Mukherjee S, Manahan-Vaughan D. Role of metabotropic glutamate receptors in persistent forms of hippocampal plasticity and learning. *Neuropharmacology*. 2013;66:65-81. doi:10.1016/j.neuropharm.2012.06.005.
219. Gregory KJ, Dong EN, Meiler J, Conn PJ. Allosteric modulation of metabotropic glutamate receptors: Structural insights and therapeutic potential. *Neuropharmacology*. 2011;60(1):66-81. doi:10.1016/j.neuropharm.2010.07.007.
220. Nicoletti F, Bockaert J, Collingridge GL, et al. Metabotropic glutamate receptors: From the workbench to the bedside. *Neuropharmacology*. 2011;60(7-8):1017-1041. doi:10.1016/j.neuropharm.2010.10.022.
221. Sheffler DJ, Gregory KJ, Rook JM, Conn PJ. Allosteric Modulation of Metabotropic Glutamate Receptors. In: *Biophysical Chemistry*. Vol 257. ; 2011:37-77. doi:10.1016/B978-0-12-385952-5.00010-5.
222. Sanderson TM, Hogg EL, Collingridge GL, Corr? a SAL. Hippocampal metabotropic glutamate receptor long-term depression in health and disease: focus? on mitogen-activated protein kinase pathways. *J Neurochem*. 2016;139:200-214. doi:10.1111/jnc.13592.
223. Korshunov KS, Blakemore LJ, Trombley PQ. Dopamine: A Modulator of Circadian Rhythms in the Central Nervous System. *Front Cell Neurosci*. 2017;11(April):91. doi:10.3389/fncel.2017.00091.
224. Liu X-S, Hou Y, Yan T-L, et al. Dopamine D3 Receptor-Regulated NR2B Subunits of N-Methyl- d -Aspartate Receptors in the Nucleus Accumbens Involves in Morphine-Induced Locomotor Activity. *CNS Neurosci Ther*. 2014;20(9):823-829. doi:10.1111/cns.12276.
225. Kumar R, Riddle LR, Griffin SA, et al. Evaluation of D2 and D3 dopamine receptor selective compounds on l-dopa-dependent abnormal involuntary movements in rats. *Neuropharmacology*. 2009;56(6-7):956-969. doi:10.1016/j.neuropharm.2009.01.019.

226. Bodea GO, Blaess S. Establishing diversity in the dopaminergic system. *FEBS Lett.* 2015;589(24PartA):3773-3785. doi:10.1016/j.febslet.2015.09.016.
227. Sokoloff P, Le Foll B. The dopamine D3 receptor, a quarter century later. Herman J, ed. *Eur J Neurosci.* 2017;45(1):2-19. doi:10.1111/ejn.13390.
228. Maramai S, Gemma S, Brogi S, et al. Dopamine D3 Receptor Antagonists as Potential Therapeutics for the Treatment of Neurological Diseases. *Front Neurosci.* 2016;10(OCT):451. doi:10.3389/fnins.2016.00451.
229. Ledonne A, Mercuri NB. Current Concepts on the Physiopathological Relevance of Dopaminergic Receptors. *Front Cell Neurosci.* 2017;11(February):1-9. doi:10.3389/fncel.2017.00027.
230. Maurice T, Su T-P. The pharmacology of sigma-1 receptors. *Pharmacol Ther.* 2009;124(2):195-206. doi:10.1016/j.pharmthera.2009.07.001.
231. Pabba M, Wong AYC, Ahlskog N, et al. NMDA Receptors Are Upregulated and Trafficked to the Plasma Membrane after Sigma-1 Receptor Activation in the Rat Hippocampus. *J Neurosci.* 2014;34(34):11325-11338. doi:10.1523/JNEUROSCI.0458-14.2014.
232. Fischer A. Epigenetic memory: The Lamarckian brain. *EMBO J.* 2014;33(9):945-967. doi:10.1002/embj.201387637.
233. Guan JS, Xie H, Ding X. The role of epigenetic regulation in learning and memory. *Exp Neurol.* 2015;268:30-36. doi:10.1016/j.expneurol.2014.05.006.
234. Jarome TJ, Lubin FD. Epigenetic mechanisms of memory formation and reconsolidation. *Neurobiol Learn Mem.* 2014;115(5):116-127. doi:10.1016/j.nlm.2014.08.002.
235. Ortega-Martínez S. A new perspective on the role of the CREB family of transcription factors in memory consolidation via adult hippocampal neurogenesis. *Front Mol Neurosci.* 2015;8(August):1-12. doi:10.3389/fnmol.2015.00046.
236. Morici JF, Bekinschtein P, Weisstaub N V. Medial prefrontal cortex role in recognition memory in rodents. *Behav Brain Res.* 2015;292:241-251. doi:10.1016/j.bbr.2015.06.030.

237. Dudai Y, Karni A, Born J. The Consolidation and Transformation of Memory. *Neuron*. 2015;88(1):20-32. doi:10.1016/j.neuron.2015.09.004.
238. Furini CRG, Myskiw JC, Benetti F, Izquierdo I. New frontiers in the study of memory mechanisms. *Rev Bras Psiquiatr*. 2013;35(2):173-177. doi:10.1590/1516-4446-2012-1046.
239. De Jaeger X, Courtney J, Brus M, et al. Characterization of spatial memory reconsolidation. *Learn Mem*. 2014;21(6):316-324. doi:10.1101/lm.033415.113.
240. Merlo E, Ratano P, Ilioi EC, Robbins MALS, Everitt BJ, Milton AL. Amygdala Dopamine Receptors Are Required for the Destabilization of a Reconsolidating Appetitive Memory. *eNeuro*. 2015;2(February):ENEURO.0024-14.2015. doi:10.1523/ENEURO.0024-14.2015.
241. Schwabe L, Nader K, Pruessner JC. Reconsolidation of human memory: Brain mechanisms and clinical relevance. *Biol Psychiatry*. 2014;76(4):274-280. doi:10.1016/j.biopsych.2014.03.008.
242. Schacher S, Hu J-Y. The less things change, the more they are different: contributions of long-term synaptic plasticity and homeostasis to memory. *Learn Mem*. 2014;21(3):128-134. doi:10.1101/lm.027326.112.
243. Barrientos RM, Frank MG, Watkins LR, Maier SF. Memory impairments in healthy aging: Role of aging-induced microglial sensitization. *Aging Dis*. 2010;1(3):212-231. doi:10.1097/OPX.0b013e3182540562.
244. Schimanski LA, Barnes CA. Neural protein synthesis during aging: Effects on plasticity and memory. *Front Aging Neurosci*. 2010;2(AUG):1-16. doi:10.3389/fnagi.2010.00026.
245. Wang D, Cui Z, Zeng Q, et al. Genetic enhancement of memory and long-term potentiation but not CA1 long-term depression in NR2B transgenic rats. *PLoS One*. 2009;4(10):1-8. doi:10.1371/journal.pone.0007486.
246. Pascual R, Bustamante C. Structural neuroplasticity induced by melatonin in entorhinal neurons of rats exposed to toluene inhalation. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2011;71(4):541-547.

247. Cruz SL, Mirshahi T, Thomas B, Balster RL, Woodward JJ. Effects of the abused solvent toluene on recombinant N-methyl-D-aspartate and non-N-methyl-D-aspartate receptors expressed in *Xenopus oocytes*. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998;286(1):334-340. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9655877>.
248. Cruz SL, Balster RL, Woodward JJ. Effects of volatile solvents on recombinant N-methyl-D-aspartate receptors expressed in *Xenopus oocytes*. *Br J Pharmacol*. 2000;131(7):1303-8. doi:10.1038/sj.bjp.0703666.
249. Chen HH, Lin YR, Chan MH. Toluene exposure during brain growth spurt and adolescence produces differential effects on N-methyl-d-aspartate receptor-mediated currents in rat hippocampus. *Toxicol Lett*. 2011;205(3):336-340. doi:10.1016/j.toxlet.2011.06.026.
250. Bowen SE, Mohammadi MH, Batis JC, Hannigan JH. Gestational toluene exposure effects on spontaneous and amphetamine-induced locomotor behavior in rats. *Neurotoxicol Teratol*. 2007;29(2):236-246. doi:10.1016/j.ntt.2006.09.027.
251. Miyagawa M, Honma T, Sato M. Effects of subchronic exposure to toluene on working and reference memory in rats. *Neurotoxicol Teratol*. 1995;17(6):657-664. doi:10.1016/0892-0362(95)02008-X.
252. Hass U, Lund SP, Hougaard KS, Simonsen L. Developmental neurotoxicity after toluene inhalation exposure in rats. *Neurotoxicol Teratol*. 1999;21(4):349-357. doi:10.1016/S0892-0362(99)00013-6.
253. von Euler M, Pham TM, Hillefors M, Bjelke B, Henriksson B, von Euler G. Inhalation of low concentrations of toluene induces persistent effects on a learning retention task, beam-walk performance, and cerebrocortical size in the rat. *Exp Neurol*. 2000;163(1):1-8. doi:10.1006/exnr.1999.7288.
254. Chen HH, Lee YF, Chan MH, Lo PS. The role of N-methyl-D-aspartate receptors in neurobehavioral changes induced by toluene exposure during synaptogenesis. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1025:552-555. doi:10.1196/annals.1316.067.
255. Lee Y-F, Lo P-S, Wang Y-J, Hu A, Chen H-H. Neonatal toluene exposure alters N-methyl-D-aspartate receptor subunit expression in the hippocampus and cerebellum in juvenile rats. *Neuropharmacology*. 2005;48(2):195-203.

- doi:10.1016/j.neuropharm.2004.09.008.
256. Win-Shwe TT, Tsukahara S, Ahmed S, et al. Athymic nude mice are insensitive to low-level toluene-induced up-regulation of memory-related gene expressions in the hippocampus. *Neurotoxicology*. 2007;28(5 SPEC. ISS.):957-964. doi:10.1016/j.neuro.2007.08.002.
257. Chen HH, Wei CT, Lin YR, Chien TH, Chan MH. Neonatal toluene exposure alters agonist and antagonist sensitivity and NR2B subunit expression of NMDA receptors in cultured cerebellar granule neurons. *Toxicol Sci*. 2005;85(1):666-674. doi:10.1093/toxsci/kfi100.
258. Win-Shwe TT, Yoshida Y, Kunugita N, Tsukahara S, Fujimaki H. Does early life toluene exposure alter the expression of NMDA receptor subunits and signal transduction pathway in infant mouse hippocampus? *Neurotoxicology*. 2010;31(6):647-653. doi:10.1016/j.neuro.2010.08.006.
259. Seo H-S, Yang M, Song M-S, et al. Toluene inhibits hippocampal neurogenesis in adult mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 2010;94(4):588-594. doi:10.1016/j.pbb.2009.11.015.
260. Zhvania MG, Chilachava LR, Japaridze NJ, Gelazonia LK, Lordkipanidze TG. Immediate and persisting effect of toluene chronic exposure on hippocampal cell loss in adolescent and adult rats. *Brain Res Bull*. 2012;87(2-3):187-192. doi:10.1016/j.brainresbull.2011.10.021.
261. Yoon J-H, Seo H-S, Lee J, Moon C, Lee K. Acute high-level toluene exposure decreases hippocampal neurogenesis in rats. *Toxicol Ind Health*. 2015;32(11):1910-1920. doi:10.1177/0748233715599087.
262. Beasley TE, Evansky PA, Bushnell PJ. Behavioral effects of sub-acute inhalation of toluene in adult rats. *Neurotoxicol Teratol*. 2012;34(1):83-89. doi:10.1016/j.ntt.2011.11.001.
263. Win-Shwe TT, Fujimaki H. Acute administration of toluene affects memory retention in novel object recognition test and memory function-related gene expression in mice. *J Appl Toxicol*. 2012;32(4):300-304. doi:10.1002/jat.1693.

264. Huerta-Rivas A, López-Rubalcava C, Sánchez-Serrano SL, Valdez-Tapia M, Lamas M, Cruz SL. Toluene impairs learning and memory, has antinociceptive effects, and modifies histone acetylation in the dentate gyrus of adolescent and adult rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2012;102(1):48-57. doi:10.1016/j.pbb.2012.03.018.
265. Dick ALW, Axelsson M, Lawrence AJ, Duncan JR. Specific impairments in instrumental learning following chronic intermittent toluene inhalation in adolescent rats. *Psychopharmacology (Berl).* 2014;231(8):1531-1542. doi:10.1007/s00213-013-3363-7.
266. Callan SP, Hannigan JH, Bowen SE. Prenatal toluene exposure impairs performance in the Morris Water Maze in adolescent rats. *Neuroscience.* 2015:1-8. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.08.050.
267. Furlong TM, Duncan JR, Corbit LH, et al. Toluene inhalation in adolescent rats reduces flexible behaviour in adulthood and alters glutamatergic and GABAergic signalling. *J Neurochem.* 2016;139(5):806-822. doi:10.1111/jnc.13858.
268. Montes S, Solís-Guillén R del C, García-Jácome D, Páez-Martínez N. Environmental enrichment reverses memory impairment induced by toluene in mice. *Neurotoxicol Teratol.* April 2017. doi:10.1016/j.ntt.2017.04.003.
269. Ochoa Muñoz LI. NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. *D Of la Fed.* 2001.
270. de Almeida WAO, Esteves AM, de Almeida CL, et al. The effects of long-term dopaminergic treatment on locomotor behavior in rats. *Sleep Sci.* 2014;7(4):203-208. doi:10.1016/j.slsci.2014.10.003.
271. Yates JR, Batten SR, Bardo MT, Beckmann JS. Role of ionotropic glutamate receptors in delay and probability discounting in the rat. *Psychopharmacology (Berl).* 2015;232(7):1187-1196. doi:10.1007/s00213-014-3747-3.
272. Guy EG, Fletcher PJ. The effects of nicotine exposure during Pavlovian conditioning in rats on several measures of incentive motivation for a conditioned stimulus paired with water. *Psychopharmacology (Berl).* 2014;231(11):2261-2271. doi:10.1007/s00213-013-3375-3.

273. Meneses A. Effects of the 5-HT<sub>7</sub> receptor antagonists SB-269970 and DR 4004 in autoshaping Pavlovian/instrumental learning task. *Behav Brain Res.* 2004;155(2):275-282. doi:10.1016/j.bbr.2004.04.026.
274. Perez-García GS, Meneses A. Effects of the potential 5-HT<sub>7</sub> receptor agonist AS 19 in an autoshaping learning task. *Behav Brain Res.* 2005;163(1):136-140. doi:10.1016/j.bbr.2005.04.014.
275. Meneses A. A Pharmacological Analysis of an Associative Learning Task: 5-HT<sub>1</sub> to 5-HT<sub>7</sub> Receptor Subtypes Function on a Pavlovian/Instrumental Autoshaped Memory. *Learn Mem.* 2003;10(5):363-372. doi:10.1101/lm.60503.10.
276. Manuel-Apolinar L, Meneses A. 8-OH-DPAT facilitated memory consolidation and increased hippocampal and cortical cAMP production. *Behav Brain Res.* 2004;148(1-2):179-184. doi:10.1016/S0166-4328(03)00186-4.
277. Tellez R, Gómez-Viquez L, Liy-Salmeron G, Meneses A. GABA, glutamate, dopamine and serotonin transporters expression on forgetting. *Neurobiol Learn Mem.* 2012;98(1):66-77. doi:10.1016/j.nlm.2012.05.001.
278. Meneses A, Perez-Garcia G, Liy-Salmeron G, Ponce-López T, Lacivita E, Leopoldo M. 5-HT<sub>7</sub> receptor activation: procognitive and anti-amnesic effects. *Psychopharmacology (Berl).* 2014:595-603. doi:10.1007/s00213-014-3693-0.
279. Espinosa-Raya J, Plata-Cruz N, Neri-Gómez T, Camacho-Arroyo I, Picazo O. Effects of short-term hormonal replacement on learning and on basal forebrain ChAT and TrkA content in ovariectomized rats. *Brain Res.* 2011;1375:77-84. doi:10.1016/j.brainres.2010.12.044.
280. Ortiz-Pérez A, Espinosa-Raya J, Picazo O. An enriched environment and 17-beta estradiol produce similar pro-cognitive effects on ovariectomized rats. *Cogn Process.* 2016;17(1):15-25. doi:10.1007/s10339-015-0746-1.
281. Morales-Montor J, Picazo O, Besedovsky H, et al. Helminth infection alters mood and short-term memory as well as levels of neurotransmitters and cytokines in the mouse hippocampus. *Neuroimmunomodulation.* 2014;21(4):195-205. doi:10.1159/000356521.
282. Han M, Kim J. Effect of dietary iron loading on recognition memory in growing rats.



*PLoS One*. 2015;10(3):1-20. doi:10.1371/journal.pone.0120609.

283. Olarte-Sánchez CM, Kinnavane L, Amin E, Aggleton JP. Contrasting networks for recognition memory and recency memory revealed by immediate-early gene imaging in the rat. *Behav Neurosci*. 2014;128(4):504-522. doi:10.1037/a0037055.
284. Suárez-Pereira I, Carrión ÁM. Updating stored memory requires adult hippocampal neurogenesis. *Sci Rep*. 2015;5:13993. doi:10.1038/srep13993.