



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE  
HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO  
BIOLÓGICAS



**PARTICIPACIÓN DE LOS CANALES DE SODIO Y DE CALCIO  
DEPENDIENTES DE VOLTAJE EN LOS EFECTOS CARDIACOS  
DE LOS DISOLVENTES DE ABUSO**

Tesis  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**M. en C. María Guadalupe Carreón Garcidueñas**

DIRECTOR DE TESIS:

D. en C. Daniel Godínez Hernández.

CO-DIRECTORA DE TESIS:

D. en C. Marcia Yvette Gauthereau Torres

Morelia, Michoacán, Junio 2018.

DIRECTOR DE TESIS:

D. en C. Daniel Godínez Hernández.

CO-DIRECTORA DE TESIS:

D. en C. Marcia Yvette Gauthereau Torres

MESA SINODAL:

D. en C. Homero Reyes de la Cruz

D. en C. Alfredo Saavedra Molina

D. en C. Maximiliano Ibarra Barajas

## Índice general

<b>Índice General</b>	<b>I</b>
<b>Índice de figuras</b>	<b>III</b>
<b>Índice de tablas</b>	<b>IV</b>
<b>Lista de abreviaturas</b>	<b>V</b>
<b>Resumen</b>	<b>VI</b>
<b>Abstract</b>	<b>VII</b>
I. Antecedentes	1
1.1 Inhalables	1
1.1.1 Definición y clasificación	1
1.2 Generalidades	3
1.2.1 Tolueno	3
1.2.1.1 Propiedades fisicoquímicas	3
1.2.1.2 Usos	4
1.2.1.3 Farmacocinética	4
1.2.2 Abuso de inhalables	5
1.2.3 Tipos de exposición a los disolventes	6
1.2.4 Efectos del uso de inhalables	7
1.2.5 Mecanismos de acción de los disolventes: Blancos moleculares	8
1.3 Anatomía cardíaca	9
1.3.1 Implicación de los canales iónicos de membrana en la contracción cardíaca	12
1.3.2 Tipos y clasificación de los canales iónicos	15
1.3.3 Canales iónicos de sodio	16
1.3.4 Canales iónicos de calcio	17
1.4 Muerte súbita por inhalación	18
1.5 Efectos cardíacos de los disolventes de abuso en modelos animales	20
1.6 Receptores	22
1.6.1 Receptores adrenérgicos	22
1.6.2 Receptores $\beta_1$ adrenérgicos	24
II. Justificación	26
III. Pregunta de investigación	2
IV. Hipótesis	27
V. Objetivo general	27
VI. Objetivos particulares	28
VII. Materiales y métodos	28
7.1 Animales	28
7.2 Fármacos	28
7.3 Exposición a disolventes	29
7.4 Preparación del corazón aislado y perfundido	30
7.5 Curva concentración-respuesta gradual	32
7.6 Medición de parámetros cardiovasculares	32
7.6.1 Presión de perfusión	32

	7.6.2 Fuerza de contracción ventricular	33
	7.6.3 Frecuencia cardiaca	33
	7.7 Análisis por Western Blot	34
VIII.	Análisis estadístico	36
IX.	Artículo	38
X.	Discusión	69
XI.	Conclusiones	77
XII.	Anexo. Artículos de divulgación	78
XIII.	Referencias	85

**Índice de figuras**

<b>1. Estructura química del tolueno</b>	<b>3</b>
<b>2. Estructura química del xileno</b>	<b>5</b>
<b>3. Estructura química del benceno</b>	<b>7</b>
<b>4. Encuesta nacional sobre el porcentaje de jóvenes que consumen drogas</b>	<b>9</b>
<b>5. Músculo cardíaco</b>	<b>13</b>
<b>6. Estructura de canales iónicos</b>	<b>16</b>
<b>7. Principales localizaciones de canales iónicos en la célula</b>	<b>17</b>
<b>8. Estado inactivo y activo de la proteína G</b>	<b>27</b>
<b>9. Mecanismo de señalización transduccional para los receptores <math>\beta_1</math></b>	<b>28</b>

**Índice de tablas**

<b>1. Propiedades fisicoquímicas del tolueno</b>	<b>3</b>
<b>2. Propiedades fisicoquímicas del xileno</b>	<b>5</b>
<b>3. Propiedades fisicoquímicas del benceno</b>	<b>7</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

DPA	Duración del potencial de acción
AMP <sub>c</sub>	Adenosín monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de varianza
ATP	Trifosfato de adenosina
BSA	Albúmina sérica bovina
β <sub>1</sub> -AR	Receptores β <sub>1</sub> -adrenérgicos
Ca <sup>+2</sup>	Ión calcio
CCR	Curva concentración respuesta
Cl	Canales iónicos
Cl <sup>-</sup>	Ión cloruro
DAG	Diacilglicerol
e.e.	Error estándar
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
GABA	Ácido γ-aminobutírico
GDP	Difosfato de guanosina
GTP	Trifosfato de guanosina
GPCR <sub>s</sub>	Receptores acoplados a proteínas G
5-HT <sub>3</sub>	Receptores serotoninérgicos 5-HT <sub>3</sub>
INa	Corrientes de sodio
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
IP <sub>2</sub>	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
IP <sub>3</sub>	Fosfatidilinositol 1,4,5- trifosfato
K <sup>+</sup>	Ion potasio
KCl	Cloruro de potasio
kDA	Kilodaltones
Na <sup>+</sup>	Ión sodio
NIDA	Instituto Nacional de Abuso de Drogas de EUA
NMDA	N-metil-D-aspartato
PA	Potencial de acción
ppm	partes por millón
PKC	Proteína cinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVDF	Fluoruro de polivinildieno
RE	Retículo endoplásmico
RS	Retículo sarcoplásmico
rpm	revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SNC	Sistema Nervioso Central
TBS-T	Tris buffer saline tween
7TM	7 dominios transmembranales
mV	Milivoltios

## RESUMEN

La inhalación de disolventes puede llevar a la aparición de arritmias cardíacas y producir muerte súbita por inhalación. Los mecanismos relacionados con este fenómeno hasta la fecha no se comprenden por completo. El propósito de este trabajo fue investigar el efecto de la exposición aguda al tolueno sobre la sensibilización del corazón a la adrenalina y la participación de los canales de sodio y calcio dependientes de voltaje en este fenómeno. Se usó la preparación de órgano aislado utilizando la técnica de Langendorff, en corazones de rata expuestos a 6000 ppm de tolueno, para posteriormente realizar curvas concentración-respuesta a la adrenalina ( $1 \times 10^{-9}$  -  $1 \times 10^{-4}$  M) en presencia y en ausencia de lidocaína (bloqueador de canales de sodio dependientes de voltaje) ( $1 \times 10^{-5}$  M) y de nifedipina (bloqueador de canales de calcio dependientes de voltaje) ( $1 \times 10^{-8}$  M); se midieron tres parámetros: la presión de perfusión, la fuerza de contracción ventricular izquierda y la frecuencia cardíaca, también se realizó el análisis, mediante la técnica de Western Blot, de los canales de sodio y de calcio dependientes de voltaje y de los receptores  $\beta_1$  adrenérgicos. Encontramos que la exposición aguda a tolueno aumentó la presión de perfusión, la fuerza de contracción ventricular izquierda y la frecuencia cardíaca. Estas acciones fueron inhibidas por la lidocaína y la nifedipina. Nuestros resultados sugieren que la exposición aguda a tolueno modifica la función y la densidad tanto de los receptores  $\beta$  adrenérgicos como de los canales de sodio y de calcio dependientes de voltaje, debido probablemente a un mecanismo adrenérgico cardíaco y estos efectos podrían estar participando, al menos en parte, en la presentación de arritmias cardíacas. Hasta el momento este es el primer estudio en el que es posible establecer una participación directa de los canales de sodio y de calcio dependientes de voltaje y de la sensibilización a adrenalina en la modificación de la función cardíaca en ratas expuestas a tolueno.

**Palabras clave:** Tolueno, canales de sodio, canales de calcio, adrenalina, arritmias.

## ABSTRACT

Inhalation of solvents can lead to the appearance of cardiac arrhythmias and to the production of sudden sniffing death. At this moment, the mechanisms related to this phenomenon are not fully understood. The purpose of this study was to investigate the effect of acute exposure to toluene on the sensitization of the heart to adrenaline and the involvement of voltage-gated sodium and calcium channels. A Langendorff preparation was used in rat hearts exposed to 6000 ppm toluene to perform adrenaline response-concentration curves ( $1 \times 10^{-9}$  -  $1 \times 10^{-4}$  M) in the presence and absence of lidocaine (voltage-gated sodium channel blocker) ( $1 \times 10^{-5}$  M) and nifedipine (voltage-dependent calcium channel blocker) ( $1 \times 10^{-8}$  M); three parameters were measured: perfusion pressure, left ventricular developed pressure and heart rate. In addition, we made an analysis using the Western Blot technique for sodium and calcium channels and adrenergic  $\beta_1$  receptors. We found that acute toluene exposure increased perfusion pressure, left ventricular developed pressure and heart rate. These actions were inhibited by lidocaine and nifedipine. Our results suggest that acute toluene exposure modifies the function and density of  $\beta_1$  adrenergic receptors and voltage-dependent sodium and calcium channels, probably due to a cardiac adrenergic mechanism, and these effects may be participating, at least in part, in the presence of cardiac arrhythmias. So far this is the first report in which it is possible to establish a direct participation of voltage-gated sodium and calcium channels and sensitization to adrenaline in cardiac function modification in toluene-exposed rats.

**Key words:** Toluene, sodium channels, calcium channels, adrenaline, arrhythmias.

## ANTECEDENTES

### 1.1 INHALABLES

#### 1.1.1 DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN

Los inhalables son sustancias volátiles a temperatura ambiente, que se administran por la vía de la inhalación con el fin de alterar el estado de conciencia y el estado de ánimo y así alcanzar estados placenteros [1]. De acuerdo a la definición de inhalables, la cual abarca una amplia gama de sustancias químicas encontradas en cientos de productos diferentes que pueden tener diversos efectos farmacológicos, se han propuesto cuatro categorías generales para clasificar a los inhalables: aerosoles, gases, nitritos y disolventes volátiles, basándose en la forma en la que éstos a menudo se encuentran en los productos domésticos, industriales y médicos [2].

1. **Aerosoles:** Son rociadores que contienen propulsores y disolventes. Éstos incluyen a las pinturas pulverizadas, atomizadores para desodorantes y fijadores de pelo, rociadores de aceite vegetal para cocinar y rociadores para proteger telas o tejidos [2].
2. **Gases:** Incluyen a los anestésicos de uso médico como el éter, el cloroformo, el halotano y el óxido nitroso, siendo este último gas el que más se consume en situación de abuso. También dentro de esta categoría se incluyen a los gases que se utilizan en productos domésticos o comerciales, como los encendedores de butano, los tanques de gas propano y los refrigerantes [2].
3. **Nitritos:** Se consideran una clase especial de inhalables, ya que a diferencia de la mayoría de los demás inhalables que actúan directamente sobre el

sistema nervioso central (SNC), la acción principal de los nitritos es dilatar los vasos sanguíneos y relajar los músculos. Asimismo, mientras que los demás inhalables se utilizan para alterar el estado de ánimo, los nitritos se usan principalmente para intensificar el placer sexual por producir vasodilatación en los órganos sexuales [2].

**4. Disolventes volátiles:** Son usualmente líquidos con presiones de vapor altas, y son altamente lipofílicos. Se encuentran dentro de un grupo numeroso de componentes usados en la industria y en productos domésticos [3]. Los disolventes volátiles están presentes en una variedad de productos económicos que se pueden obtener fácilmente y que son de uso común. Esta categoría incluye a los removedores de pinturas, líquidos para lavado en seco, desengrasantes, gasolinas, pegamentos, líquidos correctores y marcadores con punta de fieltro; su posesión es legal, son baratos y la inhalación de sus vapores no se considera una conducta de alto riesgo en comparación con otras drogas, lo que los convierte en drogas de abuso de fácil acceso [1]; cabe destacar que en la mayoría de los casos, los productos comerciales que son sujeto de inhalación son mezclas complejas de disolventes que contienen tolueno en mayor porcentaje, pero que también pueden poseer otros disolventes de abuso como el xileno y el benceno [4].

## 1.2 GENERALIDADES

### 1.2.1 TOLUENO

#### 1.2.1.1 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

El tolueno, conocido con los nombres comerciales de metilbenceno, toluol, benceno monometil y metilbenzol, tiene una fórmula química de  $C_6H_5CH_3$ , y es un líquido incoloro con olor parecido a los disolventes de pintura. Es miscible en la mayoría de los disolventes orgánicos apolares, pero casi inmisible en el agua [5] (Fig. 1; Tabla 1).

#### TOLUENO

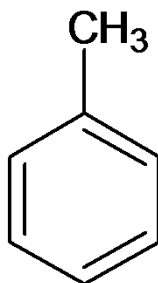


Figura 1. Estructura química del tolueno, que consiste en un anillo aromático con un grupo metilo.

**Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del tolueno (tomado y modificado de ATSDR, 2011).**

Propiedad	Información
Peso molecular	92.14 g/mol
Color	Incoloro
Estado físico	Líquido
Punto de fusión	-95 °C
Punto de ebullición	110.6 °C
Densidad	0.8669 g/ml

### **1.2.1.2 USOS**

El tolueno existe de forma natural en el petróleo crudo y en el árbol tolú. Se produce en el proceso de fabricación de la gasolina y otros combustibles del petróleo crudo [5], se adiciona a los combustibles (antidetonaante), y se usa en la fabricación de pinturas, lacas, diluyentes de pinturas, barniz para las uñas, adhesivos, caucho [6,7].

### **1.2.1.3 FARMACOCINÉTICA**

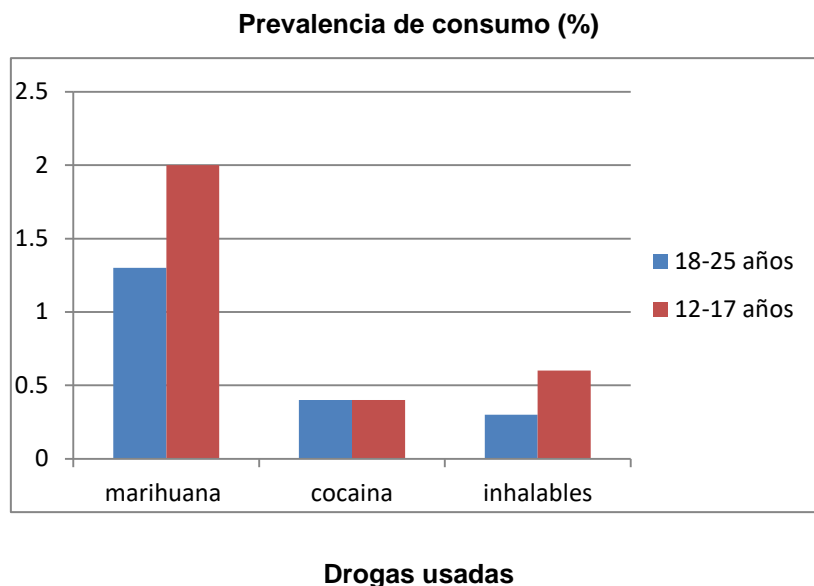
El tolueno es fácilmente absorbido por los pulmones y el tracto gastrointestinal y en menor grado por la piel. La absorción por los pulmones depende del volumen respiratorio, concentración en el aire del tolueno, tiempo de exposición, coeficiente de partición (sangre/aire), transportación en la sangre, solubilidad en los tejidos y tasa metabólica. 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 [4]. Después de ser absorbido, el tolueno es ampliamente distribuido a los diferentes tejidos dependiendo del coeficiente de partición, de la perfusión en el órgano, de la duración de la exposición y de la

velocidad de eliminación [4]. Una vez absorbido, el tolueno es distribuido a los tejidos ricos en lípidos y ampliamente vascularizados como el cerebro, el hígado, los pulmones y la sangre [5].

### **1.2.2 ABUSO DE INHALABLES**

El uso de inhalables es un problema importante de salud en México y hasta ahora sigue siendo el grupo de drogas menos estudiado, no solo por las edades tan tempranas a las cuales se inicia su uso, sino también por el incremento en su uso; en los últimos años [8]. Se ha reportado un incremento en el uso de inhalables en la región centro sur de nuestro país, en el cual encontramos al estado de Michoacán del 2008 al 2012 de un 4.2% a un 7.5%. Hasta hace pocos años en México, el abuso de inhalables se limitaba a un grupo minoritario, los jóvenes de un nivel socioeconómico bajo, pero se ha extendido y ahora se observa en todos los sectores, convirtiéndose así en una droga de elección sobre todo entre la comunidad estudiantil, quien no había sido considerada anteriormente como grupo de alto riesgo [8].

De acuerdo a la encuesta realizada por el INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía) en el 2011 [9], se señala que los inhalables (63.3%), la marihuana (55.7%) y los sedantes (50.9%) son las principales drogas de consumo entre los jóvenes de 12 a 17 años. [9](Fig. 4).



**Figura 4. Encuesta Nacional sobre porcentaje de jóvenes de 12 a 25 años que consumen drogas por grupos de edad de inicio para cada tipo de sustancia (Villatoro et al., 2011).**

### **1.2.3 TIPOS DE EXPOSICIÓN A LOS DISOLVENTES**

Se puede entrar en contacto con los disolventes de muchas maneras: en el hogar, en el trabajo ó por inhalación intencional con el propósito de alterar el estado de ánimo. Las exposiciones casuales incluyen exposiciones ocasionales, esto quiere decir, episodios breves en tiempo donde generalmente las personas no se percatan de que están en contacto con un disolvente de abuso, como cuando un disolvente es usado con propósitos domésticos, por ejemplo, las ceras para o cuando un individuo carga su carro con gasolina. Las exposiciones ocupacionales o laborales se refieren a la presencia crónica de bajos niveles de inhalables alrededor de 50ppm para el caso del tolueno, en el lugar de trabajo y durante tiempos prolongados, aproximadamente 6 ó más horas al día durante cinco días a la semana. La concentración de

disolventes en el aire en un lugar de trabajo va del intervalo de 100 ppm hasta pocos miles de ppm dependiendo del disolvente [10].

Los niveles de exposición durante los episodios de abuso son muchos mas altos que las concentraciones presentadas durante las exposiciones ocasionales u ocupacionales, los adictos a inhalables pueden exponerse por unos cuantos minutos a varios miles de partes por millón (2000-30000ppm) de disolventes volátiles [11]. El abuso típico implica de 15 a 20 inhalaciones de concentraciones muy altas de disolvente, lo cual, ocurre en periodos muy cortos de tiempo (10–15 minutos) [8,10].

Los disolventes volátiles ingresan al organismo por la nariz o por la boca de diversas maneras [2]:

1. Aspirando o inhalando los vapores directamente de los recipientes.
2. .Rociando los aerosoles directamente en la nariz o la boca.
3. Aspirando o inhalando los vapores de sustancias que han sido rociadas o depositadas dentro de una bolsa de plástico o papel.
4. Colocando en la bolsa un trapo que ha sido impregnado con un inhalable, lo cual en México es comúnmente conocido como “mona”.

#### **1.2.4 EFECTOS DEL USO DE INHALABLES**

La mayoría de los inhalantes producen una euforia rápida que se parece a la intoxicación alcohólica seguida por somnolencia y aturdimiento, pudiendo llegar a un estado de inconciencia. Produce efectos neurotóxicos los cuales reflejan daños al control cognitivo, motriz, visual y auditivo .Así mismo, son muy tóxicos para diversos órganos como corazón, pulmones hígado y riñones. Aunque algunos de los daños

producidos pueden ser parcialmente reversibles cuando cesa el abuso de los inhalantes, muchos de los daños son irreversibles [2].

Sabemos que el uso los disolventes de manera aguda ó crónica puede causar daños cardiacos irreversibles como la presencia de necrosis de fibras musculares, bradicardia severa, así como degeneración miocárdica [5].

#### **1.2.5. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS DISOLVENTES: BLANCOS MOLECULARES.**

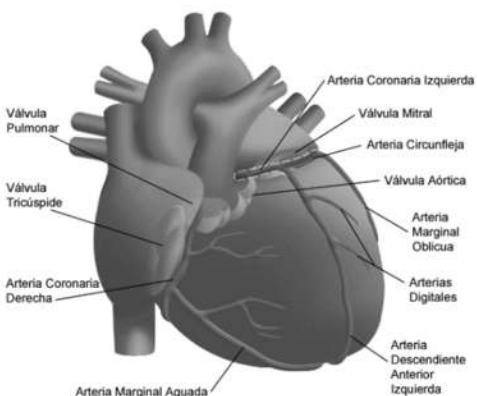
Los blancos moleculares y celulares para los disolventes de abuso, incluido el tolueno, han sido investigados utilizando una variedad de preparaciones in vitro e in vivo. No es de sorprender que muchos de estos estudios se hayan centrado en definir los efectos del tolueno en los canales iónicos que están críticamente implicados en la regulación de la excitabilidad neuronal [1,12]. Se ha observado que el tolueno actúa como antagonista de los receptores NMDA, potencia los receptores GABAA, glicina [13] y 5-HT3 [14], fue entonces cuando se determinó la preferencia de los disolventes hacia canales activados por ligando; sin embargo años más tarde fue que se inició la investigación de dichos efectos sobre canales iónicos activados por voltaje [15]. Tillar y cols estudiaron las acciones del tolueno sobre canales de calcio dependientes de voltaje en células de feocromocitoma y encontraron que este disolvente (0.3 – 3000  $\mu\text{M}$ ) inhibió el aumento de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular inducido por KCl de una manera dependiente de la concentración. ; Posteriormente, se encontró que el tolueno (300  $\mu\text{M}$ ) inhibe de manera reversible las corrientes activadas a través de los canales de sodio cardiacos dependientes de voltaje expresados en ovocitos de

*Xenopus* de una manera dependiente de la concentración. Al estudiar el efecto de este disolvente en receptores nativos expresados en miocitos, se observó un mayor efecto, proponiendo que los receptores constitutivos de los miocitos son más sensibles al efecto del tolueno que los receptores recombinantes expresados en ovocitos [1].

Los resultados hasta el momento indican que tanto los canales iónicos activados por voltaje como por ligandos están afectados por las concentraciones de tolueno asociadas con la inhalación voluntaria de estas sustancias, además de que sugieren que el tolueno y otros disolventes relacionados poseen un sorprendente grado de selectividad dada su estructura química bastante simple. Estos hallazgos sugieren que existen diferentes sitios de acción para el tolueno en las subunidades de los canales individuales y sugieren que las diferencias regionales y anatómicas en la expresión de la subunidad son determinantes importantes de la acción del solvente [3].

### **1.3. ANATOMÍA CARDIACA**

El corazón es el órgano principal del aparato circulatorio, encargado de propulsar la sangre en el interior del organismo. Está compuesto esencialmente por tejido muscular (miocardio) y, en menor proporción, por tejido conectivo y fibroso (tejido de sostén, válvulas y tejido especializado de conducción). Está subdividido en cuatro cavidades, dos derechas y dos izquierdas, separadas por un tabique medial; las dos cavidades superiores son llamadas aurículas; las dos cavidades inferiores se denominan ventrículos. Cada aurícula comunica con el ventrículo mediante una válvula. Las cavidades izquierdas no comunican con las derechas en el corazón (Ver Figura (5)).



**Figura 5 Músculo cardiaco.**

El tejido especializado de conducción es el responsable del origen y conducción de los estímulos eléctricos que provocan las contracciones cardíacas. Este tejido especial no tiene función contráctil, pero por su metabolismo es capaz de producir automáticamente y de transmitir los estímulos eléctricos que van a excitar la contracción del miocardio. Los estímulos se originan normalmente en el nodo sinoauricular; de éste se difunden al miocardio auricular hasta alcanzar el nodo aurículoventricular y después a través del haz de His y de las fibras de Purkinje, llegan a los dos ventrículos. La transmisión de estos estímulos eléctricos produce potenciales de acción que se registran en la superficie de la piel, mediante el electrocardiograma. Cada latido del corazón desencadena una secuencia de eventos llamados ciclos cardíacos, que consiste principalmente en tres etapas: sístole auricular, sístole ventricular y diástole. El ciclo cardíaco hace que el corazón alterne entre una contracción y una relajación aproximadamente 75 veces por minuto. La estimulación del corazón está coordinada por el sistema nervioso autónomo, tanto por el sistema nervioso simpático (aumentando el ritmo y fuerza de contracción) como por el parasimpático (reduce el ritmo y fuerza de contracción) [16].

Para efectuar sus diversas funciones, algunos sistemas del cuerpo humano generan sus propias señales, que a su vez tienen información útil sobre las funciones asociadas. Estas señales son los potenciales bioeléctricos que son producidos como resultado de la actividad electroquímica de ciertas clases de células, conocidas como células excitables, que son componentes del tejido muscular. La actividad eléctrica del corazón es consecuencia del potencial eléctrico que generan las células miocárdicas como resultado de las diferencias en la composición iónica entre los medios intra y extracelular, así como de la naturaleza semipermeable de la membrana celular. Los iones que originan la actividad eléctrica son sodio, potasio, calcio, cloruro así como los aniones no difusibles intracelulares. Los iones difusibles más importantes son sodio ( $\text{Na}^+$ ), calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y potasio ( $\text{K}^+$ ). Los distintos iones intentan un equilibrio entre el interior y el exterior de la célula, de acuerdo con la concentración y la carga eléctrica. El equilibrio se alcanza con una diferencia de potencial a través de la membrana, negativo en el interior respecto al exterior. En este estado de reposo se dice que la célula está polarizada y la diferencia de concentraciones iónicas da como resultado un potencial eléctrico negativo (- 80 mV a -90 mV), que se denomina potencial de reposo. Cuando se excita la membrana celular de forma espontánea o a consecuencia de un estímulo eléctrico externo, la superficie interna pasa a tener un potencial positivo. En este estado se dice que la célula está despolarizada y presenta un potencial cercano a +20 mV. Después de la despolarización celular, comienza el proceso (repolarización) en el que el potencial vuelve al potencial de reposo inicial. Esta variación transitoria del potencial celular se denomina potencial de acción (PA), entre el inicio de la activación y el retorno al estado de reposo se denomina duración del potencial de acción. (APD) [17].

El potencial de acción celular permite al corazón latir y al músculo contraerse, siendo el resultado de una serie de cambios secuenciales reversibles en la conductancia de la membrana a distintos iones.

### **1.3.1 IMPLICACIÓN DE LOS CANALES IÓNICOS DE MEMBRANA EN LA CONTRACCIÓN CARDÍACA**

Los iones son moléculas hidrofílicas que atraviesan la bicapa lipídica-hidrofóbica a través de estructuras especializadas, los canales iónicos. Éstos son proteínas integrales transmembrana oligoméricas que, en respuesta a un estímulo adecuado forman un poro hidrofílico, que comunica los espacios intra y extracelular y permite el rápido paso a su través de determinados iones a favor de gradiente de concentración y de potencial eléctrico (gradiente electroquímico) generando una corriente iónica. La difusión de iones a través de los canales iónicos de la membrana depende, además, de la facilidad con la que los iones pueden pasar a su través, es decir, de la permeabilidad iónica de la membrana. [18].

Además de las proteínas motoras que dirigen activamente el proceso de contracción de los cardiomiocitos que forman el músculo cardíaco, existen otros componentes muy relevantes que aportan la estimulación necesaria para el inicio de los ciclos de contracción y relajación de las fibras musculares. En concreto, los canales iónicos (CI) de membrana cardíacos son los encargados de permitir el flujo de iones necesario para cada ciclo de contracción-relajación. Para el correcto funcionamiento de este proceso, es necesario que exista una coordinación tanto espacial como temporal del tránsito de iones a través de las membranas de las fibras cardíacas [19].

**Estructura de los canales iónicos:** El número y tipos de subunidades proteicas que componen un canal no son los mismos en los diferentes canales iónicos, por lo que no existe una estructura común para todos ellos. No obstante, en general, los canales iónicos son complejos heteromultiméricos formados por diversas subunidades proteicas embebidas total o parcialmente en la membrana con diferentes funciones. Generalmente, poseen una subunidad  $\alpha$  que es la que constituye el poro hidrofílico en la membrana y que comunica los espacios intra y extracelulares permitiendo el flujo de iones. Además de esta subunidad principal, poseen un número variable de subunidades auxiliares denominadas  $\beta$ , que son dominios transmembrana cuyas funciones son regular la apertura y cierre del canal, su unión con otras moléculas de la matriz extracelular, la expresión de la subunidad  $\alpha$  en la superficie de la membrana celular y su localización preferente (Figura 6)[20].

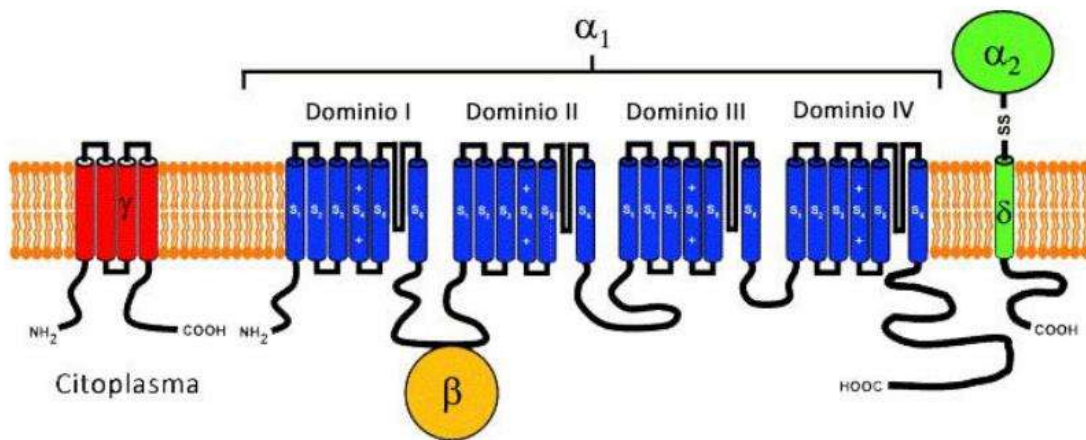
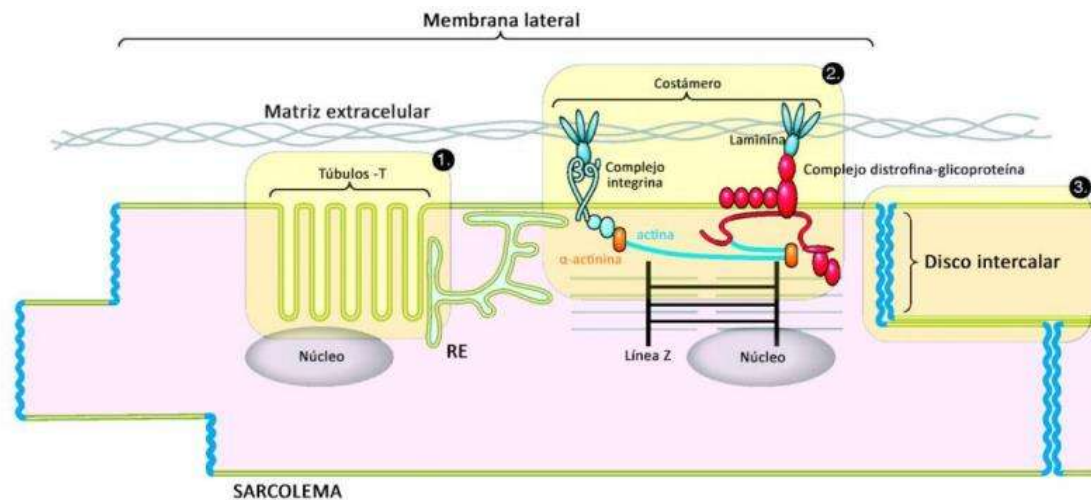


Figura 6. Estructura de un canal iónico de membrana formado por varias subunidades y diversos dominios transmembrana. (Modificada Balse E et al. Dynamic of Ion Channel Expression at the Plasma Membrane of Cardiomyocytes. Physiological Reviews 2012; 92: 1317-1358)

**Localización y función de los canales iónicos** Los canales iónicos en el músculo cardíaco se encuentran localizados en tres entidades estructurales y funcionales principales: los túbulos-T y cisternas terminales del RE, los costámeros y los discos intercalares (Figura 7) [21].



**Figura 7. Principales localizaciones de los canales iónicos en la célula. (1). Túbulos-T y cisternas terminales del RE. (2). Costámeros en la membrana lateral. (3). Discos intercalares. (Modificada de Balse E et al. Dynamic of Ion Channel Expression at the Plasma Membrane of Cardiomyocytes. Physiological Reviews 2012; 92: 1317-1358).**

Los canales iónicos no son simples poros acuosos, sino que desarrollan tres funciones o propiedades fundamentales:

- Permiten el flujo de iones a una velocidad superior a la que permite cualquier otro sistema biológico, de manera que el flujo de iones puede medirse como una corriente eléctrica, que puede producir importantes cambios en el potencial de membrana [22].

- Poseen selectividad iónica, es decir, discriminan entre los diferentes tipos de iones que pasan por su canal, además de proporcionar diferentes sitios de unión para varios iones [22].

- En respuesta a un estímulo, las proteínas del canal son capaces de adoptar diversos estados conformacionales. En general, existe un estado conductor (estado abierto) y dos no conductores (inactivo y de reposo). A nivel de potencial de reposo celular, la probabilidad de apertura de algunos canales es mínima, pero si puede abrirse en respuesta a un estímulo adecuado [23].

### **1.3.2 TIPOS Y CLASIFICACIÓN DE LOS CANALES IÓNICOS**

Los canales iónicos se pueden clasificar en cuatro tipos atendiendo a sus propiedades cinéticas (de activación e inactivación), características farmacológicas y al estímulo que determina el cambio conformacional en:

- Activados por cambios de voltaje (canales voltaje-dependientes).

- Activados tras la interacción de un agonista con su receptor específico localizado en la superficie de la membrana celular (canales receptor-dependientes).

- Activados por mediadores intracelulares ( $\text{Ca}^{2+}$ , ATP, nucleótidos cíclicos, proteín-quinasas, ácido araquidónico y sus derivados).

- Activados tras deformación mecánica celular (distensión o aumento del volumen celular).

Sin embargo, esta división resulta muchas veces artificial, ya que la despolarización de la membrana puede inducir la liberación de neurotransmisores y ligandos endógenos y activar canales activados por receptores/mediadores, mientras que muchos ligandos endógenos pueden también modificar el potencial de membrana celular y activar canales voltaje-dependientes [23]. Otro tipo de clasificación hace referencia a los tipos de iones que dejan pasar a través del poro en la membrana. De este modo, los canales iónicos se clasifican en canales de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , siendo los canales iónicos dependientes de voltaje de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  los principales responsables de generar y dar forma a los potenciales de acción cardíacos, así como las bombas de intercambio iónico que contribuyen a los flujos iónicos [24].

### **1.3.3 CANALES IÓNICOS DE $\text{Na}^+$**

Los canales iónicos de  $\text{Na}^+$  constituyen el arquetipo de canales iónicos dependientes de voltaje. El canal humano cardíaco  $\text{NaV}1.5$  es un miembro de la familia de canales iónicos dependientes de voltaje y es el principal responsable de generar las corrientes de  $\text{Na}^+$ , denominadas  $I_{\text{Na}}$  [24]. Este canal está formado por una subunidad principal  $\alpha$  que constituye el canal funcional y múltiples subunidades secundarias  $\beta$ . Posee cuatro dominios homólogos, DI-DIV [15], dispuestos formando una simetría circular para formar el canal [22]. Se ha visto que las subunidades  $\beta$  codificadas por los genes  $\text{SCN}1-4\text{B}$  tienen un papel relevante en su expresión en la superficie celular, modulan su apertura y cierre y la dependencia de voltaje de la  $I_{\text{Na}}$  [25,26]. El principal factor determinante para que se produzca la despolarización de la membrana de cardiomiocitos tanto auriculares como ventriculares es la  $I_{\text{Na}}$ . La activación de los canales de  $\text{Na}^+$  conduce a una rápida despolarización de las fibras

cardíacas, produciéndose un cambio en el potencial de membrana desde aproximadamente -85 mV hasta -25 mV en un periodo de tiempo de 10 milisegundos (fase 0 del potencial de acción) [27]. Los canales de  $\text{Na}^+$  se inactivan con la misma rapidez, y sólo una pequeña cantidad se encuentran abiertos mientras se propaga el potencial de acción [24].

#### **1.3.4 CANALES IÓNICOS DE $\text{Ca}^{2+}$**

Los iones  $\text{Ca}^{2+}$  son los principales iones de señalización intracelular. Regulan el acople entre excitación-contracción, la secreción y la actividad de un gran número de enzimas y CI. La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  se encuentra altamente regulada a pesar de su marcada fluctuación durante la sístole y diástole [22]. Los CI de  $\text{Ca}^{2+}$  constituyen la principal entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior celular, además de los almacenes intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  y los intercambiadores de  $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$  NCX (91). Después de la rápida despolarización (fase 0) llevada a cabo por la entrada de  $\text{Na}^+$  en el cardiomiocito a través de los canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje, estos canales inducen la apertura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  [24]. En el músculo cardíaco existen dos tipos de CI de  $\text{Ca}^{2+}$ : los de tipo L (de bajo umbral) y los de tipo T (tipo transitorio) que transportan  $\text{Ca}^{2+}$  hacia las células. Los primeros se encuentran en todas las células cardíacas. Los de tipo T se encuentran principalmente en las células marcapasos, las fibras de Purkinje y las auriculares [22]. Se ha descrito que existe expresión de ambos tipos de canales en el corazón. Los de tipo T son canales de  $\text{Ca}^{2+}$  transitorios activados por bajo voltaje que se expresan funcionalmente durante el desarrollo, mientras que en cardiomiocitos adultos su expresión se encuentra muy reducida [28]. Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L poseen elevadas conductancias de canal único y generan

corrientes duraderas, además de activarse por alto voltaje [17]. Se encuentran en abundancia y se expresan de forma ubicua en el corazón [29]. La apertura de los canales iónicos de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L va con retraso y su inactivación ocurre de forma más lenta respecto a los canales de  $\text{Na}^+$  y es dependiente de iones  $\text{Ca}^{2+}$  [30]. Esta inactivación lenta de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  junto con la regulación precisa que ejercen las corrientes de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  constituyen las bases de la fase Plateau (fase 2) del potencial de acción observada en los cardiomiocitos ventriculares. Los canales iónicos de  $\text{Ca}^{2+}$  poseen una estructura similar a la de los canales de  $\text{Na}^+$ , consistente en 4 dominios homólogos, cada uno con 6 segmentos transmembrana [22]. El principal canal de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L cardíaco está formado por la subunidad  $\alpha$ , codificada por el gen CACNA1C, que codifica la proteína Cav1.2. Además de esta subunidad, el complejo funcional del canal consta de las subunidades auxiliares  $\beta$  y  $\alpha 2/\delta$  [29]. Estas dos últimas subunidades se encuentran unidas por puentes disulfuro y están íntimamente asociadas a la subunidad principal [31]. Las cuatro subunidades  $\beta$  codificadas por los genes CACNB1-4 se encargan de modificar las corrientes iónicas de  $\text{Ca}^{2+}$ , y del tráfico de complejos proteicos del canal hacia las membranas celulares, [32, 33,34] siendo la subunidad  $\beta 2$  la predominante en el corazón [35].

#### **1.4 MUERTE SÚBITA POR INHALACIÓN**

La muerte súbita se define como aquel deceso que ocurre antes de una hora a partir de la aparición de los síntomas: esta ocurre de forma repentina, inesperada y además originada por causas que no impliquen episodios violentos (como asesinatos por arma de fuego o contusiones). A partir de esto, podemos atribuir varias causas a la muerte súbita y poner de manifiesto que en la mayoría de las ocasiones se trata de

una enfermedad desconocida por el paciente, aunque puede tratarse de la agudización de un padecimiento crónico y de inicio abrupto [36].

El en caso particular de la muerte súbita por inhalación de disolventes esta puede ocurrir durante la exposición a disolventes o en los minutos u horas subsecuentes sin una causa aparente [37], y puede ser ocasionada directamente por anoxia, reacciones alérgicas extremas, daño severo a los pulmones o depresión del SNC [38].

El mecanismo preciso por el cual se produce la muerte súbita por inhalación no se conoce con exactitud [37, 39,40]. Hoy en día se sabe que cada vez son más los inhaladores que mueren de manera súbita e inesperada sin una sofocación aparente [41]. Sin embargo, efectos indirectos tales como traumas, aspiración de vómito y asfixia asociados con el uso de bolsas de plástico para inhalar, predominan en las muertes ocasionadas por la inhalación de los disolventes contenidos en los pegamentos [42]. Se han propuesto 4 mecanismos para la muerte súbita asociada al abuso de inhalables: anoxia, inhibición vagal, depresión respiratoria y arritmias cardiacas. De éstos, se cree que las arritmias que conllevan a un paro cardiaco o cardiorrespiratorio son la causa principal de muerte [37,42].

Los reportes epidemiológicos existentes indican que durante un proceso llamado sensibilización cardiaca, la exposición a disolventes en presencia de niveles circulantes elevados de adrenalina, puede ocasionar arritmias cardiacas, siendo este mecanismo la causa aparente de muerte entre muchos inhaladores [37,41]. Frecuentemente, la muerte súbita ocurre después de inhalar y haberse sometido a ejercicio o a una situación estresante, tal como pelear o al ser sorprendidos inhalando por los padres o por la policía.

Debido a que la actividad física vigorosa aumenta los niveles circulantes de adrenalina, la combinación de ejercicio y la exposición a disolventes como el tolueno puede producir fibrilación ventricular [43]. En muchos de los casos, hay un pequeño intervalo antes de la muerte en el cual el inhalador súbitamente corre unos cuantos metros y cae al suelo sin vida. Sin embargo, es difícil decir si la causa de ese pánico aparente es el resultado de una arritmia cardíaca severa asociada con edema pulmonar severo; de los efectos subjetivos provocados por el efecto de los disolventes; de una crisis por un exceso de adrenalina o de una combinación de todos estos factores. Está demostrado que la actividad física o el estrés promueven la liberación de grandes cantidades de adrenalina a la circulación y que ésta puede potenciar los efectos cardíacos de los hidrocarburos volátiles. No obstante, en las autopsias realizadas donde la muerte súbita se atribuyó a un exceso de catecolaminas, no se han encontrado endocrinopatías, ni causas anatómicas de muerte [41].

### **1.5 EFECTOS CARDIACOS DE LOS DISOLVENTES DE ABUSO EN MODELOS ANIMALES.**

Desde 1911, [44] observaron que gatos bajo anestesia con cloroformo eran inesperadamente sensibles a la inyección de adrenalina. Cuando los animales inhalaban cloroformo en una concentración de 0.5% o 2.0% en el aire y después recibían una inyección intravenosa en bolo de adrenalina (dosis total hasta 65 µg) presentaban un patrón “heterogénico” en el electrocardiograma, es decir, pausas cortas en el latido cardíaco seguidas por taquicardia. La administración continua de cloroformo resultaba finalmente en fibrilación ventricular. Estudios posteriores

mostraron que las variaciones en la sensibilidad cardiaca dependen de la duración y del grado de anestesia.

En (1970) Meek [45] refinó el protocolo experimental de Levy y usó perros como modelo animal. Estos autores también demostraron que se produce un incremento en la sensibilidad del corazón al hidrocarburo (ciclopropano) cuando la inhalación fue acompañada por una inyección intravenosa de adrenalina. Con base en estos estudios, el peligro potencial asociado a los hidrocarburos como agentes anestésicos, seguido de la administración de adrenalina, se empezó a reconocer claramente.

En 1946, Chenoweth [46] notó por primera vez que el butano, el hexano, el éter de petróleo, la gasolina, el xileno y el tolueno podrían producir efectos cardiotóxicos.

En 1948 Garb y cols [47] realizaron una serie de experimentos en músculos papilares aislados en animales usando diferentes concentraciones de varias sustancias volátiles con y sin la adición de adrenalina u otras aminas simpatomiméticas. Ellos notaron que en presencia de cloroformo o benceno el miocardio fue más irritable cuando se expuso a hormonas simpatomiméticas.

En 1970, Taylor y cols [40] reportaron que, en ratones, la inhalación de pegamento que contiene tolueno produce alteraciones en el electrocardiograma después de la inyección de atropina.

En 1971, Reinhardt y cols [48] y en 1973, Clark y cols [49] trabajaron en la identificación de un modelo animal apropiado para determinar las dosis adecuadas de adrenalina exógena, para simular la circulación sanguínea de adrenalina. y

dedujeron que dosis altas de adrenalina (8 g/kg) producen fibrilación ventricular, por lo que para pruebas de sensibilización cardíaca se deben usar dosis más pequeñas.

En 1986, Vidrio y cols [50] observaron las diferencias del tolueno y benceno en su capacidad para producir efectos en el electrocardiograma y observaron que aunque ambos solventes tienden a incrementar la frecuencia cardíaca, el tolueno disminuye la conducción intraventricular y particularmente la atrioventricular, mientras que el benceno acelera a conducción en la aurícula.

Lefkowitz y cols [51] establecieron una correlación entre receptores adrenérgicos cardíacos y catecolaminas endógenas este grupo reportó que una sobreestimulación del sistema  $\beta$  adrenérgico cardíaco puede contribuir a la presencia de arritmias cardíacas, iniciada por una elevada cantidad de catecolaminas endógenas, marcando una marcada sensibilización adrenérgica cardíaca y finalizando con la muerte.

## **1.6 RECEPTORES**

Un receptor es una proteína funcional que actúa transformando la unión de una sustancia mensajera (en el dominio de unión al ligando de la proteína) en un efecto (mediado a través del dominio de transducción de señales del receptor) [52].

### **1.6.1 RECEPTORES ADRENÉRGICOS**

Son proteínas que pertenecen a un grupo de proteínas transmembranales que atraviesan siete veces la membrana celular, por lo que también son conocidos como receptores 7TM [52], los cuales median acciones centrales y periféricas de la noradrenalina (norepinefrina) y de la adrenalina (epinefrina). Los adrenoreceptores

se encuentran en casi todos los tejidos periféricos y en muchas de las poblaciones neuronales dentro del sistema nervioso central. Tanto la adrenalina como la noradrenalina juegan roles importantes en el control de la presión sanguínea, fuerza y velocidad contráctil del corazón, reactividad de las vías respiratorias y una gran variedad de funciones metabólicas y del sistema nervioso central.

En 1948, los adrenoreceptores fueron primeramente divididos en dos tipos,  $\alpha$  y  $\beta$ , basados en sus características farmacológicas. Basados en evidencia tanto farmacológica como molecular, es más clara un esquema de clasificación basado en tres tipos:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\beta_1$  y cada uno es dividido en al menos tres subtipos [52]

Los receptores adrenérgicos son receptores acoplados a proteínas G o GPCR'S (por G protein-coupled receptors), los cuales son heterotrímeros que poseen un papel esencial en la transducción de señales ya que asocian al receptor con las proteínas efectoras localizadas en el interior celular. Las subunidades que las conforman son  $\alpha$  (39 – 46 KDa),  $\beta$  (37 KDa) y  $\gamma$  (8 KDa), con las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  funcionando como una sola unidad al formar un complejo estrechamente asociado. La subunidad  $\alpha$  de las proteínas G posee un sitio de unión con alta afinidad por nucleótidos de guanina (GTP o GDP), así como actividad de GTPasa que hidroliza el GTP a GDP. Debido a esta característica, las proteínas G pueden encontrarse en dos estados: con la subunidad  $\alpha$  asociada a GDP y unida al complejo  $\beta\gamma$  (estado inactivo), y con la subunidad asociada a GTP y disociada del complejo  $\beta\gamma$  (estado activo) [53] (Fig 8)

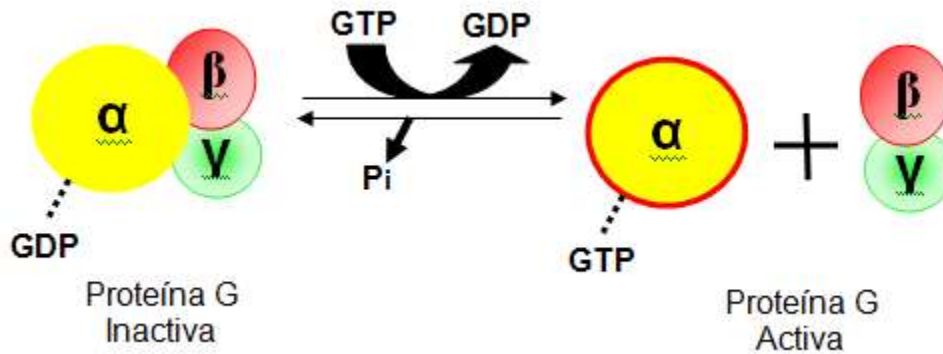


Figura 8. Estado inactivo y activo de la Proteína G (Tomado y modificado de Sánchez-Lemus E. y col., 2004).

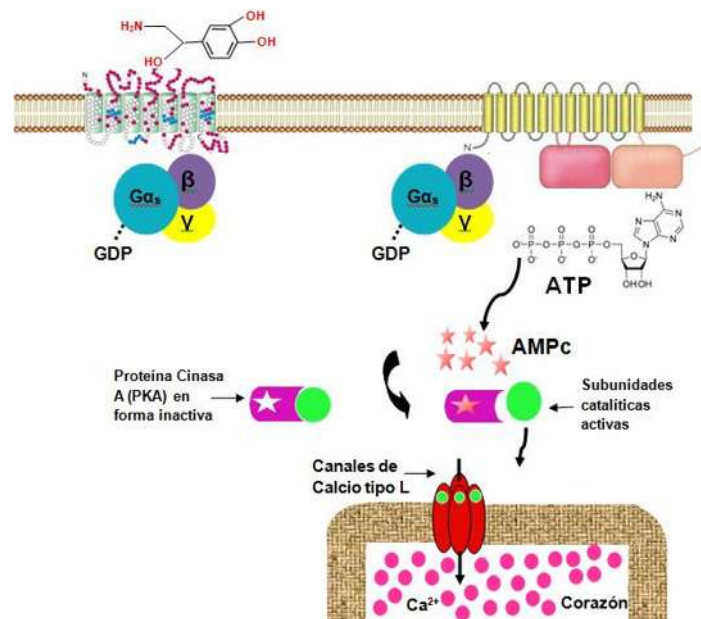
### 1.6.3 RECEPTORES $\beta_1$ ADRENÉRGICOS

Los receptores  $\beta$ -adrenérgicos son proteínas conformadas por 450 a 600 aminoácidos y tienen un peso molecular de 40 a 50 KDa [58]. Hay 3 subtipos de receptores:  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$ . Los receptores  $\beta_1$  y  $\beta_2$  están ampliamente distribuidos, pero el receptor  $\beta_1$  es predominante en el corazón y el receptor  $\beta_2$  se encuentra en músculo liso como vasos sanguíneos y los bronquios [59].

La estimulación simpática del corazón mediante los receptores  $\beta_1$  adrenérgicos ( $\beta$ -AR) induce efectos inotrópicos (fuerza de contracción) y cronotrópicos (frecuencia de contracción) positivos, llamados “respuesta de lucha o huida”, el mecanismo más efectivo del incremento agudo de salida del corazón [60].

Para que se puedan producir estos efectos, los receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos están acoplados a proteínas G de tipos s. Las proteínas de esta familia fueron originalmente identificadas a través de la toxina de *Vibrio cholerae*, agente causante del cólera. La toxina estimula a la subunidad  $\alpha_s$ , de ahí su nombre de “s” (del inglés

stimulating). La enzima efectora activada por las proteínas de esta familia es la adenilato ciclasa, que cataliza la conversión de ATP a AMP cíclico. Esta molécula se une a las regiones reguladores de la Proteína Cinasa A (PKA), también conocida como cinasa dependiente de AMP cíclico (AMPC). La unión libera a las subunidades catalíticas de la PKA que fosforilan sustratos específicos. En el corazón, la PKA fosforila a las regiones citoplasmáticas de los canales de calcio tipo L, lo que incrementa su oportunidad de apertura y en consecuencia aumenta las corrientes entrantes de  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig.9) [60].



**Figura 9. Mecanismo de señalización transduccional para los receptores  $\beta_1$  adrenérgicos.**

Tomado y modificado de Mendoza-Patiño 2008.

## II.JUSTIFICACION

A pesar de que existen diversos reportes epidemiológicos que indican que la inhalación de disolventes de abuso como el tolueno, puede producir muerte súbita, debido a la presentación de arritmias cardiacas 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, estudios *in vitro*, han reportado que el tolueno inhibe el aumento de  $Ca^{+2}$  intracelular inducido por KCl, de una manera dependiente de la concentración, y que inhibe de manera reversible las corrientes activadas a través de los canales de  $Na^{+}$  cardiacos dependientes de voltaje. Adicionalmente, se conoce que tanto el bloqueo de los canales de  $Na^{+}$  como de  $Ca^{+2}$  cardiacos dependientes de voltaje puede conducir al desarrollo de arritmias cardiacas. Hasta el momento se desconoce si el mecanismo responsable de la presentación de arritmias de los disolventes de abuso involucra a los receptores adrenérgicos y a los canales de sodio y de calcio cardiacos dependientes de voltaje. Con base en lo anteriormente expuesto, en este proyecto nos hemos propuesto determinar si la exposición aguda y crónica a tolueno induce a alteraciones en la función de canales cardiacos de sodio y de calcio dependientes de voltaje.

Aunque sin duda todavía falta responder muchas preguntas, los avances logrados hasta el momento nos conducen a nuestra pregunta de investigación, donde con base en el conocimiento generado podremos determinar si la exposición aguda a tolueno induce alteraciones sobre canales de sodio y de calcio cardiacos dependientes de voltaje y sobre la respuesta adrenérgica, pudiendo ser éste el mecanismo responsable, al menos en parte, de la producción de arritmias cardiacas

y muerte súbita por inhalación. Este objetivo, al igual que muchos otros, tales como poder lograr intervenciones en el tratamiento y la prevención del abuso de inhalables, sólo se logrará con un conocimiento más completo de cómo actúan estas sustancias en los seres vivos.

### **III.PREGUNTA DE INVESTIGACION**

De que manera se ve afectado el corazón de las ratas que son expuestas de forma aguda a tolueno.

### **IV. HIPÓTESIS**

La sensibilización adrenérgica cardíaca debida a la exposición a tolueno se relaciona con un cambio en la función y/o en la expresión de los canales de sodio y de calcio dependientes de voltaje

### **V. OBJETIVO GENERAL**

Investigar si la exposición aguda a tolueno provoca cambios cardiovasculares debidos a cambios en la actividad y en la expresión proteica de los canales de sodio y de calcio dependientes de voltaje.

## **VI.OBJETIVOS PARTICULARES**

- Evaluar el efecto de la exposición de manera aguda a tolueno sobre sensibilización a adrenalina en preparación de corazón aislado
- Determinar la expresión proteica de receptores adrenérgicos, canales de sodio y de calcio dependientes de voltaje en corazones tratados de manera aguda a tolueno.

## **VII. MATERIALES Y METODOS**

### **7.1 ANIMALES**

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, con peso entre 250 y 300 g, las cuales se mantendrán bajo ciclo normal de luz oscuridad de 12:12 h con libre acceso a comida y a agua. Todos los procedimientos experimentales estarán de acuerdo a lo que dicta el comité local de ética y seguirán las regulaciones establecidas en la norma oficial Mexicana para el uso y cuidado de animales de laboratorio "NOM-062-ZOO-1999".

### **7.2 FÁRMACOS**

En este proyecto se empleará el tolueno (J.T. Baker) como disolvente de abuso representativo. Los animales se expondrán a 6000 ppm en una cámara de exposición estática, estas concentraciones se eligieron porque se ha visto que producen claros efectos conductuales en los animales pero con una recuperación total posterior [1,61]. Además, se emplearán adrenalina, lidocaína y nifedipina (Sigma-Aldrich). Los anticuerpos necesarios para biología molecular se adquirirán a través de Santa Cruz Biotechnology.

### 7.3 EXPOSICIÓN A DISOLVENTES

Se utilizó una cámara de exposición estática de cristal, con forma cilíndrica y un volumen de 29 l. Esta cámara es una jarra cromatográfica con tapa de acrílico. La tapa tiene puertos de inyección y se conecta, en su parte externa, al motor de un ventilador cuyas aspas proyectan hacia el interior de la cámara. Bajo las aspas hay una malla metálica donde se coloca un papel filtro para administrar allí los disolventes. Para la exposición, se colocó una rata de manera individual en el fondo de la cámara, la tapa se cerró de manera hermética y posteriormente se colocaron 6000 ppm del disolvente, simulando una situación de abuso [62], dicho disolvente se colocó sobre el papel filtro y el ventilador se encendió para permitir la inmediata evaporación y distribución homogénea del disolvente (Fig 10.). Las concentraciones de vapor deseadas se alcanzaron en menos de 1 min y permanecieron constantes durante la exposición (30 min). La cámara se colocó dentro de una campana de extracción [1,10]. El volumen de disolvente que se utilizó se calculó con la ecuación de Nelson (1971):

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

Donde:

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

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

C<sub>ppm</sub> = concentración a utilizar (ppm).

V<sub>s</sub> = volumen de la cámara de exposición estática (l).

$d$  = densidad del disolvente (g/ml).

$P$  = presión atmosférica (atm).

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

$T$  = temperatura absoluta ( $^{\circ}K$ ).



Figura 10. Cámara de exposición estática (Bowen *et al.*, 2006; Cruz *et al.*, 2003).

#### 7.4 PREPARACIÓN DEL CORAZÓN AISLADO Y PERFUNDIDO MEDIANTE LA PREPARACIÓN DE LANGENDORFF

El principio básico de esta preparación radica en la posibilidad de perfundir las arterias coronarias usando una cánula de perfusión retrógrada posicionada en la aorta donde, gracias a una presión de perfusión adecuada del líquido nutriente, se mantiene cerrada la válvula aórtica y el flujo se desvía en su totalidad hacia el orificio de las coronarias, nutriendo la masa ventricular, sin existir llenado ventricular [63].

El sistema de órgano aislado consiste en: una bomba de recirculación, la cual mantiene todo el equipo a una temperatura de  $37^{\circ}C$ , un matraz balón, el cual está

formado por dos camisas que mantienen la solución de Krebs-Henseleit a la temperatura y el pH adecuados gracias a la bomba de recirculación y al carbógeno, la bomba peristáltica mueve el líquido de perfusión a lo largo de todo el equipo, desde el matraz balón hasta el corazón, un serpentín que transporta el líquido de perfusión hasta la cánula en el corazón el cual se encuentra dentro de una cámara compuesta también de dos camisas para mantener el corazón a la temperatura de 37°C.

Las ratas fueron sometidas a anestesia profunda con pentobarbital sódico y se les administro heparina a una concentración de 100ULpor cada 100g de peso del animal. Previo a la extracción del corazón, se realizó una traqueotomía para permitir la respiración asistida con un respirador mecánico (Rodent ventilador 7025) ajustado a 1mm<sup>3</sup> de aire por cada 100 g de peso del animal.

En cada caso, el corazón fue extraído realizando una laparotomía toraco-abdominal que permite la exposición del paquete cardiopulmonar. Se pinzan las venas cava inferior y superior y se cortan para impedir el flujo sanguíneo al corazón y con ello minimizar la aparición de coágulos. Se localiza la arteria aorta a nivel del tórax y se corta para, a partir de ella, extraer el corazón y los pulmones, los cuales se sumerge en un vaso de precipitado conteniendo solución de Krebs-Henseleit a 4°C. Posteriormente, la aorta se corta a la altura del cayado para montar el paquete cardiopulmonar en el equipo de perfusión con ayuda de una cánula de calibre 24, perfundido en el órgano de forma retrograda con un flujo constante de 10±0.5 ml de solución de Krebs-Henseleit a 37°C y pH=7.4 y gasificada con 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>, ya que el paquete cardiopulmonar se perfunde por la solución de krebs-

Henseleit, los pulmones son eliminados de la preparación dejando el corazón aislado.

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

## **7.5 CURVA CONCENTRACIÓN- RESPUESTA GRADUAL.**

Una vez montado el corazón en el equipo de perfusión, se procedió a correr curvas concentración-respuesta (CCR) graduales: para este propósito se administraron 20µl en orden creciente de concentración, de las soluciones de adrenalina en ausencia y presencia de Lidocaina y Nifedipina, (bloqueadores de canales de sodio y calcio) adicionados en el perfusado 20 minutos antes de la realización de la curva. El registro de presión de perfusión, fuerza de contracción ventricular y frecuencia cardiaca fue monitorizado usando un sistema de transducción de señales Byopac Systems. Los datos fueron almacenados en formato electrónico con ayuda del programa AcqKnowledge 4.2 para su posterior análisis.

## **7.6 MEDICIÓN DE PARÁMETROS CARDIOVASCULARES**

### **7.6.1 PRESIÓN DE PERFUSIÓN**

La presión de perfusión es una medida de la oposición del tejido a llenarse con líquido. Para el caso particular de la preparación de Langendorff de corazón aislado, la presión de perfusión corresponde a la oposición de la vasculatura coronaria del órgano al paso del perfusado, la cual se produce a partir de la perfusión retrograda, entrando por la cánula hacia la aorta, lo que lleva a que se cierre la válvula aortica y

que el perfusado pase hacia las arterias coronarias derecha e izquierda, de ahí hacia las venas coronarias y sea expulsado a través de las arterias pulmonares.

### **7.6.2 FUERZA DE CONTRACCIÓN VENTRICULAR**

El procedimiento más sencillo y mas ampliamente usado para medir la fuerza de contracción ventricular es el método del globo, introducido por Gottlieb y Magnus en 1904. Para medir este parámetro, se introduce un globo lleno de liquido, como puede ser agua destilada y desionizada, o una solución de etanol al 96% y agua destilada y desionizada en una proporción 1:1, la cual permite solo una baja solubilidad de oxígeno y por lo tanto la fácil eliminación de burbujas de aire.[64].

El globo se introduce en el ventrículo izquierdo vía una de las venas pulmonares a través de la válvula mitral. El globo debe de ser tan delgado como sea posible, flexible y compatible con tejidos biológicos [65]. El tamaño será determinado por la especie del animal de estudio, siendo necesario para ratas un diámetro de entre 3 y 4 mm, [64]. Los globos pueden ser fabricados con un trozo de película de látex o plástico para envoltura de alimentos, el cual es atado al extremo de una cánula por la que se llenara el globo de liquido [66].

### **7.6.3. FRECUENCIA CARDIACA.**

Se denomina como frecuencia cardiaca al numero de veces en que se presenta un ciclo cardiaco, el cual consta de un periodo de relajación denominada diástole durante el cual el corazón se llena de sangre seguido de un periodo de contracción llamado sístole, fue un parámetro monitorizado usando un sistema de transducción

de señales Byopac Systems. Los datos fueron almacenados en formato electrónico con ayuda del programa AcqKnowledge 4.2 para su posterior análisis.

## **7.7 ANÁLISIS POR WESTERN BLOT**

*Homogenización:* Los corazones aislados se dividieron en aorta, aurículas y ventrículos para posteriormente hacer un homogeneizado de cada una de las partes divididas aplicando 1 ml de una solución de lisis que está formada por: Trizma-Base 10 mM pH=7.4, NaCl 5 M, Tritón x-100, Duodecil sulfato de sodio (SDS) 10%, Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF: como inhibidor de proteasas). Se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 minutos a 4°C, separando el sobrenadante y congelándolo hasta su posterior uso. Lo decantado se desechó.

*Determinación de la concentración de proteínas:* La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry (1951). Primeramente se realizó una curva de calibración con albúmina sérica bovina (BSA) a volúmenes correspondientes a 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 y 80 µl albúmina a partir de una solución madre de 1.44 mg/ml de albúmina sérica bovina y se complementaron con solución salina 0.9% hasta 100 µl. En el caso de las muestras, se agregaron 10 µl del homogeneizado y se adicionaron 90 µl de solución salina. Tanto a la curva de calibración como a las muestras se les agregaron 1 ml de mezcla de reacción (solución A: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2% y NaOH 0.4%, solución B: CuSO<sub>4</sub> 0.5% y solución C: Tartrato de sodio y potasio 1%) incubando a temperatura ambiente por 10 minutos en obscuridad; posteriormente se adicionaron 100 µl de reactivo de Folin 1N incubando a temperatura ambiente por 30 minutos en obscuridad y leyendo a una absorbancia de 750 nm en una

espectrofotómetro. La curva de calibración se realizó en Microsoft Office Excel 2007 y por extrapolación se calculó la concentración de proteínas de las muestras, empleando la ecuación de la línea recta.

*Electroforesis:* Al volumen de las muestras calculadas por la curva de calibración se le añadió la misma cantidad de buffer de carga Laemlli que contiene SDS 10%, Glicerol, Trizma-Base 1 M pH=6.8, Azul de Bromofenol 0.01% y  $\beta$ -mercaptoetanol 20%, se hirvió ( $\approx 100$  °C durante 5 minutos) para desnaturalizar a las proteínas.

Se prepararon geles SDS-PAGE al 10% y se cargó una cantidad de proteína constante (30  $\mu$ g) de cada una de las muestras en pozos diferentes, en el primer pozo se cargó 5  $\mu$ l de marcador de peso molecular (Bio-Rad). La electroforesis se llevó a cabo durante 2 horas aproximadamente a 100 V, para separar las proteínas en función de su peso molecular por la aplicación de un campo eléctrico.

*Transferencia:* Una vez terminada la electroforesis, las proteínas separadas en el gel se transfirieron a membranas de PVDF (fluoruro de polivinildieno; Bio-Rad), utilizando buffer de transferencia (Trizma-Base 25 mM, Glicina 192 mM y Metanol). La transferencia se llevó a cabo en un equipo de transferencia en semiseco (Trans-Blot; Bio-Rad) a 15 V por 40 minutos.

*Bloqueo de membranas e incubación con anticuerpos:* Después de la transferencia, las membranas fueron bloqueadas con buffer de lavado TBS-T + 5% de leche baja en grasas (Trizma-Base 20 Mm, NaCl 137 mM, Tween 20 0.05% y leche baja en grasas 5%), durante 1 h a temperatura ambiente. Después, las membranas se incubaron con anticuerpo policlonal de cabra contra el receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico o contra  $\alpha$ -actina y con el anticuerpo policlonal de conejo contra el receptor  $\beta_1$ -

adrenérgico (Santa Cruz), diluidos 1:1000, en TBST-leche 5% a 4°C durante toda la noche, con agitación continua.

Las membranas se lavaron 3 veces con TBS-T durante 5 minutos y se incubaron con el anticuerpo secundario (anti-cabra o anti-conejo; Santa Cruz) conjugado con peroxidasa de rábano, diluido 1:1000 con TBS-T-leche 5%, durante 2 h a temperatura ambiente y se lavaron 5 veces: 2 veces con TBS-T 0.15 M, una con TBS-T 1 M y dos más con TBS-T 0.15 M durante 5 min en cada lavado con agitación constante.

*Reacción quimioluminiscente* : Las membranas se incubaron con luminol (invitrogen) como sustrato quimioluminiscente, siguiendo las recomendaciones del fabricante, posteriormente se expusieron a una placa fotográfica para captar la luz emitida por la reacción. Las membranas incubadas con los anticuerpos contra los receptores  $\beta_1$ - y  $\alpha_1$ - adrenérgicos, se expusieron durante 20 seg y las del anticuerpo contra  $\beta$ -actina se expusieron 10 seg. Las películas se digitalizaron con ayuda de un escáner ScanJet 3200C (Hewlett Packard) y la intensidad de las bandas se determinó con un software de análisis de imágenes (Quantity One 1-D Image Analysis Software: Bior Rad) y se normalizaron con la intensidad de la  $\beta$ -actina (proteína control).

## **VIII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados de los experimentos funcionales se expresarán como la media  $\pm$  error estándar (e.e.) de 5 experimentos (n=5). Las diferencias entre los datos se analizarán por medio de un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de la prueba de Dunnet usando el programa SigmaPlot (versión 11.0; SPSS Inc.). Para los

experimentos de biología molecular, los resultados se expresarán como la media  $\pm$  error estándar (e.e.) de 3-4 experimentos ( $n=3-4$ ). Para el análisis densitométrico se empleará el programa Quantity One 1-D Image Analysis Software (Bio-Rad). La elaboración del material gráfico se hará con el programa SigmaPlot (versión 11.0, SPSS Inc.). En todos los casos, se considerará que las diferencias entre los grupos son estadísticamente significativas con un valor de  $P < 0.05$ .

## IX.ARTICULO



### Toxicology Mechanisms and Methods



ISSN: 1537-6516 (Print) 1537-6524 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/itxm20>

## Participation of Voltage-Gated Sodium and Calcium Channels in the Acute Cardiac Effects of Toluene

M. Carreón-Garcidueñas, D. Godínez-Hernández, N. Alvarado-Gómez, L.F. Ortega-Varela, C. Cervantes-Durán & M.Y. Gauthereau-Torres

To cite this article: M. Carreón-Garcidueñas, D. Godínez-Hernández, N. Alvarado-Gómez, L.F. Ortega-Varela, C. Cervantes-Durán & M.Y. Gauthereau-Torres (2018): Participation of Voltage-Gated Sodium and Calcium Channels in the Acute Cardiac Effects of Toluene, Toxicology Mechanisms and Methods, DOI: [10.1080/15376516.2018.1491664](https://doi.org/10.1080/15376516.2018.1491664)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/15376516.2018.1491664>



Accepted author version posted online: 21 Jun 2018.



[Submit your article to this journal](#)



[View related articles](#)



[View Crossmark data](#)



### **Participation of Voltage-Gated Sodium and Calcium Channels in the Acute Cardiac Effects of Toluene**

M. Carreón-Garcidueñas<sup>1,\*</sup>, D. Godínez-Hernández<sup>2</sup>, N. Alvarado-Gómez<sup>3</sup>, L.F. Ortega-Varela<sup>4</sup>, C. Cervantes-Durán<sup>5</sup>, M.Y. Gauthereau-Torres<sup>6,\*</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Francisco J. Mújica s/n, Edif. B-3, Ciudad Universitaria. C.P. 58030. Morelia, Michoacán, México. Phone (52) 443 322 3500 ext. 4215.

mgcarreon3012@gmail.com

<sup>2</sup> Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Francisco J. Mújica s/n, Edif. B-3, Ciudad Universitaria. C.P. 58030. Morelia, Michoacán, México. Phone (52) 443 322 3500 ext. 4215.

dgodinez@umich.mx

<sup>3</sup> Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Francisco J. Mújica s/n, Edif. B-3, Ciudad Universitaria. C.P. 58030. Morelia, Michoacán, México. Phone (52) 443 322 3500 ext. 4215.

yleyan\_004@hotmail.com

<sup>4</sup> Escuela de Enfermería y Salud Pública, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Gertrudis Bocanegra 330, Col. Cuauhtémoc. C.P. 58020. Morelia, Michoacán, México.

<sup>5</sup> Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Dr. Rafael Carrillo esquina Dr. Salvador González Herrejón, Col. Bosque Cuauhtémoc, C.P. 58020. Morelia, Michoacán, México.

espparmex@hotmail.com

<sup>6</sup> Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Dr. Rafael Carrillo esquina Dr. Salvador González

Herrejón, Col. Bosque Cuauhtémoc, C.P. 58020. Morelia, Michoacán, México. Phone (52) 443 312 0510 ext. 232.

mgtorres@umich.mx

**\*Corresponding authors:** Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Francisco J. Mújica s/n, Edif. B-3, Ciudad Universitaria. C.P. 58030. Morelia, Michoacán, México. Phone (52) 443 322 3500 ext. 4215. mgcarreon3012@gmail.com

Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Dr. Rafael Carrillo esquina Dr. Salvador González Herrejón, Col. Bosque Cuauhtémoc, C.P. 58020. Morelia, Michoacán, México. Phone (52) 443 312 0510 ext. 232.

Accepted Manuscript

### **Abstract**

Inhaling solvents can lead to occurrence of cardiac arrhythmias and sudden sniffing death. Mechanisms related to this phenomenon are not fully understood. The purpose of this study was to investigate the effect of acute toluene exposure on heart reactivity to epinephrine and the participation of voltage-gated sodium and calcium channels. We found that acute toluene exposure increased perfusion pressure, left ventricular developed pressure, and heart rate. These actions were inhibited by lidocaine and nifedipine. Our results suggest that acute toluene exposure modify voltage-gated sodium and calcium channel function and expression likely due to a cardiac adrenergic mechanism and these effects could be participating, at least in part, in the presence of cardiac arrhythmias. To our best knowledge, this is the first report to establish a direct participation of voltage gated  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  channels, toluene and epinephrine on cardiac function in rats.

**Keywords:** toluene, sodium channels, calcium channels, epinephrine, arrhythmias.

### **Introduction**

Toluene is the most commonly misused solvent and one of the most studied in terms of behavioral effects and mechanisms of action (Evans et al., 1991). Toluene displays similarities in its pharmacological effects and modes of action with other abused drugs, such as alcohol and other central nervous system depressants (Bowen et al., 2006). The intentional exposure to volatile organic solvents, such as toluene, to achieve a state of intoxication constitutes a serious health problem, which mainly affects children and

adolescents (Degenhardt et al., 2016). The molecular and cellular targets of toluene have been investigated using a variety of in vitro preparations (Cruz et al., 1998). Not surprisingly, many of these studies have focused on defining the effects of toluene on ion channels that are critically involved in regulating neuronal excitability (Cruz et al., 2003). It has been observed, that toluene acts as an antagonist of NMDA receptors, potentiates the GABA<sub>A</sub>, glycine (Beckstead et al., 2000) and 5-HT<sub>3</sub> receptors (Lopreato et al., 2003), and inhibits the activated currents through voltage-gated sodium and calcium channels (Gauthereau et al., 2005; Tillar et al., 2002). These studies indicate that both voltage-gated and ligand-gated ion channels are affected by concentrations of toluene associated with voluntary inhalation of these substances. It is well known that, in the heart, the adrenergic stimulation through adrenergic receptors induces positive inotropic (contraction force) and chronotropic (contraction frequency) effects, providing the best conditions to perform necessary requirements. In addition, it is important to highlight that adrenergic receptors are involved in the modulation of voltage-dependent cardiac sodium and calcium channels (Tilley et al., 2011). Also, it is well known that voltage-gated channels are molecular targets of toluene, and therefore it is important to elucidate the possible interaction between toluene and voltage-gated channels and their relationship with the production of sudden sniffing death.

Previous reports (Anderson, 1990; Bass, 1970; Bowen et al., 1990; Sheperd, 1989) indicate that toluene inhalation can lead to cardiac arrhythmias and sudden sniffing death, but the mechanisms by which these effects are produced are still unclear. Some studies suggest that cardiac sensitization to epinephrine is the most probable cause of death (Sheperd, 1989). This overstimulation involves a mechanism of activation of many structures including

participation of voltage-gated sodium and calcium channels (Cruz et al., 2003; Tillar et al., 2002). In this respect, it is well known that  $\beta$ -adrenergic stimulation leads to contractility involving voltage-gated channels (Billman 1990, Knuepfer 2003, Lange et al., 2004) and that elevated circulating catecholamines could act as vasoconstrictors of coronary vasculature leading to ischemia and myocardial damage, causing in many cases death by arrhythmias (Lange et al., 2004; Beckman et al., 1991; Isner et al., 1991; Temesy et al., 1992).

Voltage-dependent  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  channels constitute pores located on the cell membrane and are considered as fundamental elements in the contractile process of the cardiac muscle (Tillar et al., 2002; Shafer et al., 2005). It has been shown that toluene reversibly inhibits cardiac voltage-activated  $\text{Na}^+$  channels ( $\text{Na}_v1.5$ ) expressed in *Xenopus laevis* oocytes (Cruz et al., 2003). Since  $\text{Na}^+$  channels are responsible for the initial phase of the action potential, it has been suggested that this effect can be related to the occurrence of cardiac arrhythmias and sudden sniffing death (Cruz et al., 2003). Furthermore, it has been reported that toluene inhibits voltage-gated calcium channels expressed in pheochromocytoma (PC12) cells (Tillar et al., 2002). In addition to these reports, it is known that the electrophysiological changes are generally attributed to the direct effects of the drugs on cardiac L-type  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^+$  channels (Bauman et al., 1994; Clarkson et al., 1996). The combination of enhanced sympathetic stimulation disturbances in cardiac electrophysiology and increased susceptibility to arrhythmias may act in concert to produce the potent cardiotoxic effects of drugs in humans.

The purpose of our study was to determine the effect of acute toluene exposure on reactivity of the heart to epinephrine as well as the possible participation of voltage-gated  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  channels.

### **Materials and Methods**

**Animals.** Male Wistar rats (250 - 300 g) were used in this study. Animals were kept under controlled conditions of temperature ( $22 \pm 2$  °C) and light (12 h: 12 h) with ad libitum access to food and water. Independent groups of rats were used for each experimental condition. All experimental procedures followed the regulations established in the Mexican official norm for the use and care of laboratory animals “NOM-062-ZOO-1999”, and they were approved by The Committee of Ethics on Animal Experimentation of the Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, UMSNH (Protocol 02/2017).

**Drugs.** Toluene (JT Baker Chemical Co., Phillipsburg, NJ, USA) was chosen as the main representative abused solvent. In addition, epinephrine, lidocaine and nifedipine (Sigma-Aldrich; St. Louis MO, USA) were used as reagents. The specific antibodies to determine density of voltage-dependent sodium and calcium- channels were purchased through Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, USA.).

### **Methodology**

**Toluene exposure.** Animals were exposed during 30 min to toluene vapors in a static exposure chamber that consisted in a 29-l cylindrical glass jar covered with an acrylic lid that has an injection port and a fan that projects into the chamber above a stainless-steel mesh platform. Rats were individually placed into the bottom of the chamber. The chamber

lid was closed and a pre-determined amount of toluene (6000 ppm) simulating what happens in a situation of drug abuse (Marjot, 1989) was injected onto a filter paper located on the wire mesh (Nelson, 1971). Control group was exposed to air. The fan was turned on within 1 min after solvent injection to volatilize it and to achieve the desired concentration (Cruz et al., 2009). It is important to mention that we used pre-established protocols that confirm that animals have the needed oxygen and do not show signs of hypoxia (Cruz et al., 2009).

**Functional and molecular experiments.** After the exposure, rats were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg) and their hearts were isolated and perfused according to Langendorff technique (Motayaghani, 2017). After hearts were isolated, a stabilization time was left before increasing concentration-response curves to epinephrine (adrenergic agonist), ( $1 \times 10^{-9}$  M to  $1 \times 10^{-4}$  M) were made in absence and presence of lidocaine ( $1 \times 10^{-5}$  M) and nifedipine ( $1 \times 10^{-8}$  M) (voltage-gated  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  channel blocker, respectively). Perfusion pressure, left ventricular developed pressure and heart rate recording were monitored using a Byopac signal transduction system (Biopac Systems, Goleta, CA, USA). Data were stored in electronic format using the AcqKnowledge 4.2 program (BIOPAC, La Grange, GE, USA), for further analysis. Isolated heart ventricles were taken to make later a homogenate, and then perform western blot technique to detect adrenergic receptors and voltage-gated cardiac calcium ( $\text{Ca}_v1.2$ ) and sodium ( $\text{Na}_v1.5$ ) channels, under the conditions prescribed in literature.

#### **Western blot analysis**

After functional experiments were made, left ventricle tissue were excised, placed in ice-cold isotonic saline solution and cleaned from surrounding tissue. Left ventricle tissue was

homogenized in ice-cold lysis buffer (150 mmol/L NaCl, 50 mM Tris, 1 mmol/L ethylenediamine-tetraacetic acid, 1% NP40, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 2 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, 6.8 mg/mL aprotinin, 4 mg/mL leupeptin, 4 mg/mL pepstatin A, 4 mg/mL soybean trypsin inhibitor and 2 mmol/L  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ). Then, the treated tissue was centrifuged and the supernatant fraction was used to measure protein concentration. Protein (50 mg) was resolved by 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to PVDF membranes. Membranes were blocked with 5% non-fat milk in phosphate-buffered saline at pH 7.4 (137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 10 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  and 2 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) with Tween 0.05% and then were incubated with rabbit anti  $\beta$  1 adrenergic receptor antibody (1:1000), followed by donkey antirabbit IgGHRp (1:3000); goat anti- $\text{Na}^+$  channel (1:200), followed by donkey antigoat IgGHRp sc-2020 (1:5000) and rabbit anti- $\text{Ca}^{2+}$  channel (1:1000), followed by goat anti-rabbit IgGHRp sc-2004 (1:3000) all of them from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA). The signal of primary antibodies was detected using an enhanced chemi-luminescence detection system according to the manufacturer's instructions (Western Lightning Ultra, Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA). Blots were stripped and incubated with a monoclonal antibody directed against  $\alpha$ -actin (1:10,000; Millipore, Billerica, MA, USA).  $\alpha$ -actin was used as a loading control to normalize protein expression levels. Data analysis was carried out with Labworks Version 4.5.0 (UVP BioImaging Systems Inc., Upland, CA, USA).

The entire experimental protocol is summarized in the following figure:



**Statistical analysis.** The results of the functional experiments are expressed as mean  $\pm$  standard error of mean (S.E.M) of 5 experiments (n = 5). Differences were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Dunnet's test. For concentration-response curves the differences were analyzed by two-way ANOVA followed by Dunnet's test. In all cases, a  $P < 0.05$  was considered statistically significant. The software used to perform statistical procedures was Sigma plot® (version 11.0, SPSS Inc. San José, CA, USA). Western blot data were determined by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Dunnet's test. In all cases, a  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

## **Results**

### **Effect of toluene on perfusion pressure**

Acute exposure to toluene (6000 ppm) increased perfusion pressure of the hearts at baseline conditions as shown in Figure 1A. The adrenergic receptor agonist epinephrine enhanced perfusion pressure in a dose-related manner in the hearts of animals acutely-exposed to air (control). Interestingly, epinephrine further increased perfusion pressure in the hearts of animals acutely-exposed to toluene as shown in Figure 1B. Concentration-response curves to epinephrine were collected in the presence of the Na<sup>+</sup> channel (lidocaine) and Ca<sup>2+</sup> channel (nifedipine) blockers, represented as AUC (Area under the curve). Lidocaine ( $1 \times 10^{-5}$  M) and nifedipine ( $1 \times 10^{-8}$  M) partially reduced ( $P < 0.05$ ) perfusion pressure induced by epinephrine in hearts of rats exposed to air (control) and toluene as shown in Figure 1C. In the presence of blockers, it can be observed a lower increase in perfusion pressure than the increase shown in the concentration-response curve to epinephrine in the absence of the blockers, corroborating the participation of both channels in this parameter. Also, we compared the effect of the blockers on perfusion pressure with perfusion pressure

in the absence of epinephrine; where we observed that there is a significant difference both in toluene- and in air-exposed animals compared with epinephrine-free groups (fig. 1C) to . This suggests the direct participation of the Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> channels on this parameter.

#### **Effect of toluene on left ventricular developed pressure.**

The second evaluated parameter was the left ventricular developed pressure, which refers to the contractile process in the ventricle. As in the perfusion pressure, acute exposure to toluene (6000 ppm) increased left ventricular pressure of the hearts at baseline conditions, as illustrated in Figure 2A. Epinephrine enhanced in a dose-dependent fashion left ventricular pressure in the hearts of animals acutely-exposed to air (control group). Remarkably, epinephrine further increased in a dose-related way left ventricular pressure in the hearts of animals acutely-exposed to toluene in comparison with the control group, as shown in Figure 2B. Finally, lidocaine (1x10<sup>-5</sup> M) and nifedipine (1x10<sup>-8</sup> M) significantly reduced ( $P < 0.05$ ) left ventricular pressure induced by epinephrine in hearts of rats exposed to air (control) and toluene, when compared to the epinephrine-free group and also versus the vehicle group, as shown in Figure 2C. This suggests the participation of Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> channels in this parameter both in control and in toluene-exposed animals.

#### **Effect of toluene on heart rate**

Acute exposure to toluene (6000 ppm) increased heart rate (BPM: beats per minute) at baseline conditions, as shown in Figure 3A. Epinephrine enhanced in a dose-dependent manner heart rate in the hearts of animals acutely-exposed to air. Figure 3B shows that epinephrine further increased heart rate in a dose-dependent fashion (positive chronotropic effect) in the hearts of animals acutely-exposed to toluene. Figure 3C shows that lidocaine (1x10<sup>-5</sup> M) and nifedipine (1x10<sup>-8</sup> M) partially reduced ( $P < 0.05$ ) heart rate induced by

epinephrine in hearts of rats exposed to air (control) and toluene. A significant decrease of heart rate was also observed in the presence of  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  channel blockers with respect to the epinephrine-free bars, indicating the participation of these channels in the absence of adrenergic influence.

#### **Expression of $\beta 1$ adrenergic receptors, $\text{Na}^+$ Channels and $\text{Ca}^{2+}$ Channels in left ventricular tissue.**

After the functional experiments, we determine the density in the expression of  $\beta 1$  adrenergic receptors, as well as  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  channels in left ventricular tissue. Data obtained by western blotting showed that  $\beta 1$  adrenergic receptors,  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  channels are expressed in left ventricular tissue of control rats and in rats exposed to toluene, as illustrated in Figure 4. Exposure to toluene enhanced ( $p < 0.05$ ) protein expression of the  $\beta 1$  adrenergic receptors. Finally, toluene exposure diminished ( $p < 0.05$ )  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  channel protein expression in left ventricular tissue.

#### **Discussion**

The experimental results in this study demonstrate that, in rats acutely-exposed to toluene:

1. Perfusion pressure increased in rats acutely-exposed to toluene, likely due to a vasoconstrictor effect of the solvent by adrenergic overstimulation.
2. Left ventricular developed pressure was elevated in rats acutely-exposed to toluene, as a result of the increase in perfusion pressure.
3. Heart rate increased in the rats exposed to solvent, likely due to a sensitization to catecholamines.
4. To our best knowledge, this is the first study where the parameters mentioned above, evaluated in rat hearts exposed to toluene, decreased in the presence of  $\text{Na}^+$

and Ca<sup>2+</sup> channel blockers, suggesting the participation of these channels in the cardiac effects of acute exposure to 6000 ppm of toluene.

5. - Acute exposure to toluene produced an increase in the density of  $\beta$ 1 adrenergic receptors and a decrease in the expression Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> channels.

It is well known that toluene may induce arrhythmias by mechanisms that are independent of heart damage or alterations on coronary vascular structures (Bass, 1970). Although toluene effects are well documented, the mechanism by which this drug promotes arrhythmias remains controversial. The main cause of the production of cardiac arrhythmias due to solvent misuse is due to the adrenergic sensitization to catecholamines, as well as a systematic increase of them (Bass, 1970). We found that toluene enhances perfusion pressure at baseline conditions, indicating a direct effect of toluene on this parameter. It has been reported that sympathetic action of solvents induce vasoconstriction of coronary arteries, reducing the supply of oxygenated blood to the heart, thereby promoting cardiac arrhythmias (Lange et al., 2004; Balster et al., 2009). It is known that the main route which mediates contraction in aorta is via adrenoceptors which mediates contraction in aorta in response to epinephrine (Karch 2005). Turnbull et al., (2003) found a strong positive inotropic effect with the stimulation of adrenergic receptors in isolated perfused hearts, suggesting that after overstimulation of them these receptors act as coronary vasoconstrictors. In toluene-exposed animals, we observed vasoconstriction in basal conditions, which we attribute probably to the participation of adrenergic receptors. Also, Matoba et al. (1987) mention that myocardial sensitization to catecholamines could be related to vasospasm by a mechanism unknown and this phenomenon plays an important

role in the development of arrhythmias. However, the fact that we have observed a significant difference between the effects on perfusion pressure of control animals and those exposed to 6000 ppm of toluene is consistent with that reported by Tas et al. (2013). In this study, the authors demonstrated that toluene causes elevated levels of troponin (protein essential for the process of contraction) causing vasoconstriction of arteries in brain. Under our experimental conditions, we suggest that toluene probably causes vasoconstriction via adrenergic receptors. However, more studies are needed to fully elucidate this point. We found that, as epinephrine concentration increases, perfusion pressure also increased in rat hearts exposed to toluene. This observation is consistent with that reported by Clark and Tinston (1973). These authors found that substances used in the field of anesthesia such as halothane and trichloroethane were able to cause cardiac sensitization when administered in combination with epinephrine.

On the other hand, our results provide evidence that during adrenergic stimulation, cardiac function (left ventricular developed pressure) may increase as a result of two factors: a) direct  $\beta_1$ -adrenergic stimulation of the myocardium and b) increased coronary perfusion pressure produced in response to high blood pressure as a consequence of vasoconstriction. We found in literature a report that describe a positive inotropic effect produced by an increase in coronary perfusion pressure (Lange et al., 2004). The results of this study indicates that the mechanisms responsible for this positive inotropic effect could be an increase in flow over the necessary demands the stretching of cardiac fibers as a result of distended vessels, and/or a direct effect of the pressure that increases intracellular calcium (Lange et al., 2004). Therefore, the increase in myocardial contraction can be observed not only by the direct adrenergic action in the myocardium, but also by the increase in coronary

perfusion pressure and the resulting flow of a higher blood pressure that, according to our findings, begins with coronary vasoconstriction, that is significantly higher in the hearts of animals exposed to toluene.

As we previously mentioned, in this phenomenon, endogenous catecholamines are found resulting in an increase in cardiac function, which we could corroborate when we determine the heart rate in rat hearts exposed to toluene. We found that toluene enhances heart rate at baseline conditions. This result is consistent with previous studies in which toluene exposure produced a tachycardic response (Lorenzana et al., 1990; Gordon et al., 2007). Specifically, the authors attributed these effects primarily to the systemic concentration of circulating catecholamines. Authors found that, in the presence of epinephrine, similar to our results, heart rate increased in a statistically significant manner (Lorenzana et al., 1990; Gordon et al., 2007).

On the other hand, it has been shown that toluene has affinity towards ionotropic receptors but also towards voltage-gated channels (Cruz et al., 2003; Lopreato et al., 2003; Cervantes-Durán et al.; 2017). In addition, it has been reported that toluene blocks skeletal muscle sodium channels, showing a minimal inhibition in mutant channels lacking the local anesthetic binding site, suggesting that this site is critical not only for local anesthetics, but also for abused solvents like toluene (Gauthereau et al., 2005). In our study, after stimulation with epinephrine alone, we performed the adrenergic stimulation in the presence of Na<sup>+</sup> channel (lidocaine) and Ca<sup>2+</sup> channel (nifedipine) blockers to investigate a possible interaction between toluene and voltage-gated cardiac channels and their participation in cardiac function. In the three functional parameters that we measured, we observed a function decrease, confirming the participation of both sodium and calcium

channels in cardiac function of control rat hearts and, interestingly, also in hearts of toluene-exposed rats. In this respect, it is reported that exposure to drugs, like cocaine, is associated with cardiovascular damage due to the profound influence of these substances on adrenergic function (Nye et al., 1991). It is important to mention that after having cardiac damage there is an elevation of catecholamines. In this sense, it has been reported that cocaine reduced epinephrine release, via sodium channels blockade in the neonatal rats (Nye et al., 1991). Clarkson et al., (1996) observed an inhibitory effect of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels and a prolongation in ECG in guinea pig ventricular myocytes treated with cocaine. Schoming et al., (1992) found that, in rat hearts, using the Langendorff technique and after placing a calcium channel blocker (nifedipine), the effects produced by epinephrine release from cardiac damage were suppressed, consistent with our work, since our data suggest that epinephrine produces cardio-accelerating effects mediated by voltage-gated sodium and calcium channels, as we could corroborate when we blocked with lidocaine and nifedipine and we observed an adrenergic function inhibition.

Functionally, it is known that heart alterations modify the ECG (Isner et al., 1991). These electrical disturbances result from the direct effect of alterations on cardiac channels mainly by  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  channels. It has been reported (Cruz et al., 2003) that relatively low concentrations of toluene (in the micromolar range) block human cardiac voltage-gated  $\text{Na}^+$  channels, implying that this solvent could cause an increase in the time that sodium channels remain in the refractory period, producing an increase in the duration of the cardiac action potential and therefore probably increase various parameters in the heart, such as left ventricular developed pressure and heart rate. From our experimental evidence, we found that toluene enhances left ventricular developed pressure at baseline conditions,

indicating a direct effect of toluene on cardiac function. These effects were significantly reversed with the administration of  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  channel blockers, suggesting the participation of these channels in the increase of cardiac effects induced by toluene in presence of epinephrine.

Another report shows the relationship between epinephrine and left ventricular developed pressure. The authors reported that this parameter significantly increased in the presence of epinephrine, causing disturbances in heart rhythm, ending in the production of cardiac arrhythmias (Van Stigt, 2016). Therefore, according to the results obtained in this work, we suggest that likely cardiac arrhythmia production due to toluene abuse could occur in response to a voltage-gated  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  channel blockade at a specific site, modifying it via cardiac adrenergic overstimulation.

At molecular level, heart damage is characterized by an increase in extracellular potassium, producing an ischemic zone (Fan et al., 2013); resulting in a depolarization of cardiomyocyte resting membrane potential (20-25 mV) (Morena et al., 1980; Kleber 1983). This depolarization occurs over a voltage range where cardiac  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  channels are inactivated (-100 to -60 mV), resulting in an increase in the fraction of inactivated  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  channels under resting conditions. High affinity of toluene for these inactivated channels alters the electrical conduction and increases heart beat and risk of arrhythmias (Clark et al., 1973; Morena et al., 1980).

Finally, our pharmacological results suggest an important participation of  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  channels and  $\beta_1$ -adrenergic receptors in left ventricular tissue function, which has been widely described (Tilley et al., 2011). However, toluene exposure makes us suggest that possibly the proteins of these receptors and channels are affected and present changes in

their expression. Accordingly, we found that proteins of these channels and receptors are expressed in left ventricular tissue. We also found that acute toluene exposure generated an increase in the density of  $\beta_1$  adrenergic receptors and a decrease in the expression  $\text{Na}^+$  ( $\text{Na}_v1.5$ ) and  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}_v1.2$ ) channels. It is not surprising the fact that these types of changes occur in heart in such a little time. In this sense, Xue et al. (2017) found that after 45 minutes of causing ischemia in cardiomyocytes, an alteration in protein expression occurs, which is consistent with our data, where molecular changes can be observed after a single exposure to toluene.

The fact that we observed an increase in the density of  $\beta_1$  adrenergic receptors in animals treated with toluene is consistent with the literature. Capote et al. (2015) suggested that after cardiac damage occurs there is an increase in the transcription process and therefore an increase in the number of receptors. An independent report (Tilley, 2011) concluded that after a hypertrophy of heart occurs, it decreases cardiac apoptosis probably due to an increase in protein synthesis, and therefore in receptor number. We suggest that likely this is the mechanism that occurs at molecular level. Fan et al. (2013) reported that adrenergic stimulation promotes the function of adrenergic  $\beta_1$  receptors and the signaling pathway of PKA, which implies the activation of transcription mechanisms that increase the expression of  $\beta_1$ -adrenergic receptors. Therefore, we can assume that Langendorff preparation and toluene exposure damage the heart tissue and stimulate the synthesis of new proteins and  $\beta_1$  adrenergic receptors.

The expression of  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  channels in cardiac ventricular tissue has been widely studied (Tilley, 2011), because these channels determine cardiac function. However, this is the first report indicating a decrease in the expression of these channels due to acute

exposure to toluene. The close relationship in the functioning of both channels is demonstrated in this study and in that carried out by Hennessey et al. (2013), in which it is demonstrated that a fibroblast growth factor (FGF) induces cardiac arrhythmias as a result of the modulation in the expression of the  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  ion channels. It has been shown that in both humans and rodents, acute exposure to toluene has cardiotoxic effects capable of producing arrhythmias (Tas et al., 2013; Yasar et al., 2016). This fact, together with our results obtained with Western blot method, suggest that toluene effects on cardiac tissue could cause arrhythmias and in turn a decrease in the expression of  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  channels, as a result of activating other routes as a compensatory effect upon toluene administration and the environment rich in epinephrine.

### **Conclusions**

In summary, we investigated the effect of acute toluene exposure on rat heart reactivity to epinephrine and the participation of voltage-gated sodium and calcium channels. Our findings show that epinephrine increased perfusion pressure, left ventricular developed pressure, heart rate and causes alterations in  $\beta_1$  adrenergic receptors and voltage-gated  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  channels in toluene-exposed rat hearts by a mechanism not fully understood. Currently, it is well known that toluene acts on ligand-activated and voltage-gated channels. Our work further support the functional participation of voltage-gated  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  channels in the cardiac effects produced by toluene misuse. This phenomenon could be responsible of the cardiac arrhythmias generated by epinephrine sensitization and sudden sniffing death. More studies are needed to completely elucidate this point.

### **Acknowledgments**

This study was supported by Conacyt (grant 182208 to MYG-T and scholarship 238982 to MGC-G) and by CIC-UMSNH (grant 2.36 to DG-H).

### **Disclosure of interest**

The authors confirm that they have no conflict of interest with the content of this article.

### **References**

- [1] Anderson, H.R.,1990. Increase in deaths from deliberate inhalation of fuel gases and pressurised aerosols. *BMJ*; 301(6742):41.
- [2] Balster, R.L., Cruz, S.L., Howard MO, et al., 2009. Classification of abused inhalants. *Addiction*; 104(6):878-882.
- [3] Bass, M.,1970. Sudden sniffing death. *JAMA*; 212(12):2075-2079.
- [4] Bauman, J.L., Grawe, J.J., Winecoff, A.P.,et al.,1994. Cocaine-related sudden cardiac death: a hypothesis correlating basic science and clinical observations. *J Clin Pharmacol*; 34(9):902-911.
- [5] Beckman, K.J., Parker, R.B., Hariman, R.J.,et al., 1991. Hemodynamic and electrophysiological actions of cocaine. Effects of sodium bicarbonate as an antidote in dogs. *Circulation*; 83(5):1799-1807.
- [6] Beckstead, M.J., Weiner, J.L., Eger, E.I., et al., 2000. Glycine and g-aminobutyric acid A receptor function is enhanced by inhaled drugs of abuse. *Mol. Pharmacol*; 1199–1205.

- [7] Billman, G.E., 1990. Mechanisms responsible for the cardiotoxic effects of cocaine. *Faseb J*; 4(8):2469-2475.
- [8] Bowen, S.E., Daniel, J. &, Balster, R.L., 1999. Deaths associated with inhalant abuse in Virginia from 1987 to 1996. *Drug Alcohol Depend.*; 53(3):239-245.
- [9] Bowen, S.E., Batis, J.C., Paez-Martinez, N., et al., 2006. The last decade of solvent research in animal models of abuse: mechanistic and behavioral studies. *Neurotoxicol Teratol*; 28(6):636-647.
- [10] Capote, L.A., Mendez Perez, R., Lymperopoulos, A., 2015. GPCR signaling and cardiac function. *European journal of pharmacology*; 763(Pt B): 143-148.
- [11] Cervantes-Durán, C., Ortega-Varela, L.F., Godínez-Hernández, D., et al., 2017. Toluene exposure enhances acute and chronic formalin-induced nociception in rats: Participation of 5-HT<sub>3</sub> receptors. *Neurotoxicology*; 63:97-105.
- [12] Clark, D.G., Tinston, D.J., 1973. Correlation of the cardiac sensitizing potential of halogenated hydrocarbons with their physicochemical properties. *Br J Pharmacol*; 49(2):355-357.
- [13] Clarkson, C.W., Xu, Y.Q., Chang, C., et al., 1996. Analysis of the ionic basis for cocaine's biphasic effect on action potential duration in guinea-pig ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol*; 28(4):667-678.
- [14] Cruz, S.L., Mirshahi, T., Thomas, B., et al., 1998. 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*; 286(1):334-340.

- [15] Cruz, S.L., Orta-Salazar, G., Gauthereau, M.Y., et al., 2003. Inhibition of cardiac sodium currents by toluene exposure. *Br J Pharmacol*; 140(4):653-660.
- [16] Cruz, S.L., Soberanes-Chavez, P., Paez-Martinez, N., et al., 2009. Toluene has antidepressant-like actions in two animal models used for the screening of antidepressant drugs. *Psychopharmacology*; 204(2):279-286.
- [17] Degenhardt, L., Stockings, E., Strang, J., et al., 2016. Illicit Drug Dependence. in: Patel V, Chisholm D, Dua T, Laxminarayan R, Medina-Mora ME (ed): *Mental, Neurological, and Substance Use Disorders: Disease Control Priorities, Third edition, Volume 4*. Washington, DC: World Bank Group, 109-126.
- [18] Evans, E.B., Balster, R.L., 1991. CNS depressant effects of volatile organic solvents. *Neurosci Biobehav Rev*; 15(2):233-241.
- [19] Fan, Y., Wang, C., Zhang, Y., 2013. Genistein ameliorates adverse cardiac effects induced by arsenic trioxide through preventing cardiomyocytes apoptosis. *Cell Physiol Biochem*; 31(1):80-91.
- [20] Gauthereau, M.Y., Salinas-Stefanon, E.M., Cruz, S.L., 2005. A mutation in the local anaesthetic binding site abolishes toluene effects in sodium channels. *Eur J Pharmacol*; 528(1-3):17-26.
- [21] Gordon, C.J., Samsam, T.E., Oshiro, W.M., et al., 2007. Cardiovascular effects of oral toluene exposure in the rat monitored by radiotelemetry. *Neurotoxicol Teratol*; 29(2):228-235.
- [22] Hennessey, J.A., Wei, E.Q., Pitt, G.S., 2013. Fibroblast growth factor homologous factors modulate cardiac calcium channels. *Circ Res*; 113(4):381-8.

- [23] Isner, J.M., Chokshi, S.K.,1991. Cardiovascular complications of cocaine. *Curr Probl Cardiol*; 16(2):89-123.
- [24] Karch, S.B.,2005. Cocaine cardiovascular toxicity. *South Med J*; 98(8):794-799.
- [25] Kleber, A.G.,1983. Resting membrane potential, extracellular potassium activity, and intracellular sodium activity during acute global ischemia in isolated perfused guinea pig hearts. *Circ Res*; 52(4):442-450.
- [26] Knuepfer, M.M.,2003. Cardiovascular disorders associated with cocaine use: myths and truths. *Pharmacol Ther*; 97(3):181-222.
- [27] Lange, R.A., Cigarroa, J.E., Hillis, L.D.,et al.,2004. Woodward award: cardiovascular complications of cocaine abuse. *Trans Am Clin Climatol Assoc*; 115:99-111; discussion 112-114.
- [28] Lopreato, G.F., Phelan, R., Borghese, C.M., et al., 2003. Inhaled drugs of abuse enhance serotonin-3 receptor function. *Drug Alcohol Depend*; 70, 11–15.
- [29] Lorenzana-Jimenez, M., Salas, M., 1990. Behavioral effects of chronic toluene exposure in the developing rat. *Neurotoxicol Teratol*; 12(4):353-357.
- [30] Marjot, R., McLeod, A., 1989. Chronic non-neurological toxicity from volatile substance abuse. *Hum. Toxicol*; 8, 301–306.
- [31] Morena, H., Janse, M.J., Fiolet, J.W., et al.,1980. Comparison of the effects of regional ischemia, hypoxia, hyperkalemia, and acidosis on intracellular and extracellular potentials and metabolism in the isolated porcine heart. *Circ Res*; 46(5), 634-646.

- [32] Matoba, R., Funahashi, M., Fujitani, N., et al., 1987. An autopsy case of sudden death after toluene sniffing. *Nihon Hoigaku Zasshi*; 41:438-441
- [33] Motayaghani, N., 2017. Modified Langendorff technique for mouse heart cannulation: Improved heart quality and decreased risk of ischemia. *Methods X*; 4: 508-512.
- [34] Nelson, G.A., 1971. *Controlled Test Atmospheres*. University of California Press; pp. 247.
- [35] Nye, H.E., Seidler, F.J., Slotkin, T.A., 1991. Developmental shift from local to central control of norepinephrine release in the cardiac-sympathetic axis: effects of cocaine and related drugs. *J Pharmacol Exp Ther*; 259(3):976-981.
- [36] Schomig, A., Rehmert, G., Kurz, T., et al., 1992. Calcium antagonism and norepinephrine release in myocardial ischemia. *Journal of cardiovascular pharmacology*; 20 Suppl 7:S16-20.
- [37] Shafer, T.J., Bushnell, P.J., Benignus, V.A., 2005. Woodward JJ: Perturbation of voltage sensitive  $Ca^{2+}$  channel function by volatile organic solvents. *J Pharmacol Exp Ther*; 315(3):1109-1118.
- [38] Shepherd, R.T.; 1989. Mechanism of sudden death associated with volatile substance abuse. *Hum Toxicol*; 8(4):287-291.
- [39] Tas, U., Ekici, F., Koc, F., 2013. Acute cardiotoxic effects of high dose toluene: an experimental study. *Anadolu Kardiyol Derg*; 13(1): 3-8.
- [40] Temesy-Armos, P.N., Fraker, T.D. Jr., Brewster, P.S., et al., 1992. The effects of cocaine on cardiac electrophysiology in conscious, unsedated dogs. *J Cardiovasc Pharmacol*; 19(6):883-891.

- [41] Tillar, R, Shafer, T.J., Woodward, J.J.,2002. Toluene inhibits voltage-sensitive calcium channels expressed in pheochromocytoma cells. *Neurochem Int*; 41(6):391-397.
- [42] Tilley, D.G.,2011. G protein-dependent and G protein-independent signaling pathways and their impact on cardiac function. *Circulation research*; 109(2): 217-230.
- [43] Turnbull, L., McCloskey, D.T., O'Connell, T.D., et al.,2003. Alpha 1-adrenergic receptor responses in alpha 1AB-AR knockout mouse hearts suggest the presence of alpha 1D-AR. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 284(4):H1104-1109.
- [44] Van Stigt, A.H., Overduin, R.J., Staats, L.C., et al., 2016. A Heart too Drunk to Drive; AV Block following Acute Alcohol Intoxication. *Chin J Physiol*; 29; 59(1):1-8.
- [45] Xue, M., Chen, X., Guo, Z., et al., 2017. L-Carnitine Attenuates Cardiac Dysfunction by Ischemic Insults Through Akt Signaling Pathway. *Toxicol Sci.*; 160(2):341-350.
- [46] Yasar, S., Yildirim, E., Koklu, M., et al., 2016. A case of reversible cardiomyopathy associated with acute toluene exposure. *Turk J Emerg Med*; 16(3):123-125.

**List of figures.**

*Figure 1.*

**A.** Perfusion pressure basal values (mm Hg) in hearts of animals acutely exposed to toluene (6000 ppm) or air (1 exposure). Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M (standard error of mean) of 5 experiments. \*  $P < 0.05$  vs. control.

**B.** Concentration-response curves for the effect of epinephrine on perfusion pressure (mm Hg) in hearts of animals acutely-exposed to toluene (T) (6000 ppm) or air (C) (control)

group), 1 exposure. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M (standard error of mean) of 5 experiments. \*  $P < 0.05$  vs. control.

**C.** Area under the curve (AUC) for epinephrine effect on perfusion pressure in hearts of animals exposed to air (left panel) or to toluene (1 exposure, 6000 ppm) (right panel). Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M (standard error of mean) of 5 experiments. \*  $P < 0.05$  vs. Vehicle. #  $P < 0.05$  vs epinephrine free. EF = Epinephrine free; V = Vehicle; L = Lidocaine; N = Nifedipine.

*Figure 2.*

**A.** Left ventricular developed pressure basal values (mm Hg/s) in hearts of animals acutely-exposed to toluene (6000 ppm) or to air (control), 1 exposure. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M (standard error of mean) of 5 experiments. \*  $P < 0.05$  vs. control.

**B.** Concentration-response curves for epinephrine effect on left ventricular developed pressure (LVDP) (mm Hg/s) in hearts of animals acutely-exposed to toluene (6000 ppm) or air (control group) 1 exposure. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M (standard error of mean) of 5 experiments. \*  $P < 0.05$  vs. control.

**C.** Area under the curve (AUC) for epinephrine effect on left ventricular developed pressure in hearts of animals exposed to air (left panel) or to toluene (acute exposure, 6000 ppm) (right panel). Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M (standard error of mean) of 5 experiments. \*  $P < 0.05$  vs. Vehicle. #  $P < 0.05$  vs epinephrine free. EF = Epinephrine free; V = Vehicle; L = Lidocaine; N = Nifedipine.

*Figure 3.*

**A.** Heart rate basal values (BPM: beats per minute) in hearts of animals acutely-exposed to toluene (6000 ppm) or to air (1 exposure). Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M (standard error of mean) of 5 experiments. \*  $P < 0.05$  vs. control.

**B.** Concentration-response curves for epinephrine effect on heart rate (BPM) in hearts of animals acutely-exposed to toluene (6000 ppm) or air (control group), 1 exposure. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M (standard error of mean) of 5 experiments. \*  $P < 0.05$  vs. control.

**C.** Area under the curve (AUC) for epinephrine effect on heart rate in hearts of animals exposed to air (left panel) or to toluene (1 exposure, 6000 ppm) (right panel). Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M (standard error of mean) of 5 experiments. \*  $P < 0.05$  vs. Vehicle. #  $P < 0.05$  vs epinephrine free. EF = Epinephrine free; V = Vehicle; L = Lidocaine; N = Nifedipine.

*Figure 4 .*

Expression of  $\beta$ -1 adrenergic receptors,  $\text{Na}^+$  ( $\text{Na}_v1.5$ ) and  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}_v1.2$ ) channels. Data were normalized against  $\alpha$ -actin and are expressed as mean  $\pm$  SEM of 3 rats. \*  $P < 0.05$  vs. control group (C). Full representative images of blots obtained with antibodies anti- $\beta$ -1 adrenergic receptors, anti- $\text{Na}^+$  and anti- $\text{Ca}^{2+}$  channels and anti- $\alpha$ -actin. Index of optical density (IOD). (T) = 6000 ppm of toluene. The samples of the shown images were taken 3 times.

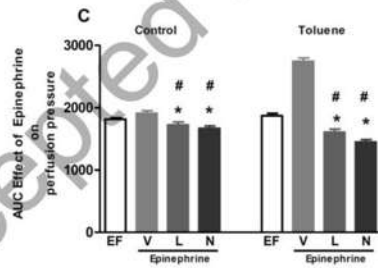
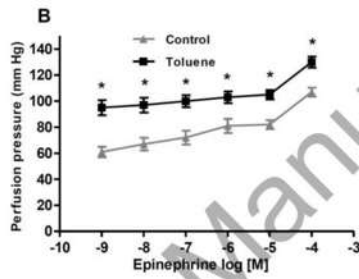
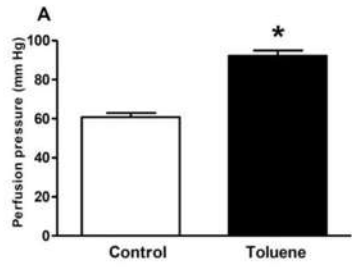


Fig. 1. Carreón-Garcidueñas et al., 2018.

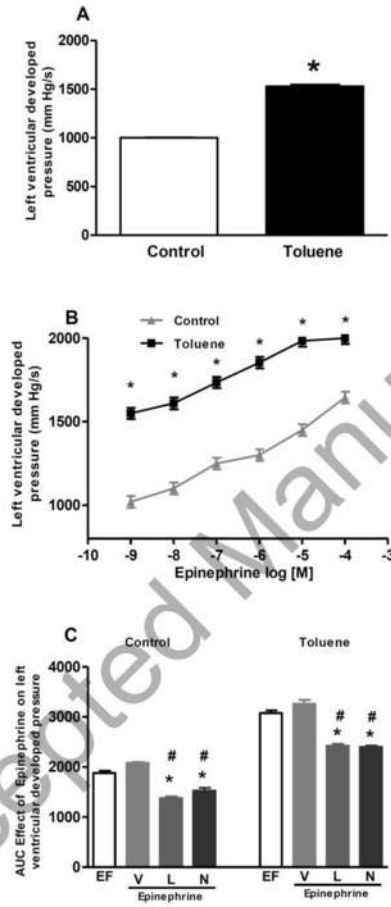


Fig. 2. Carreón-Garcidueñas et al., 2018.

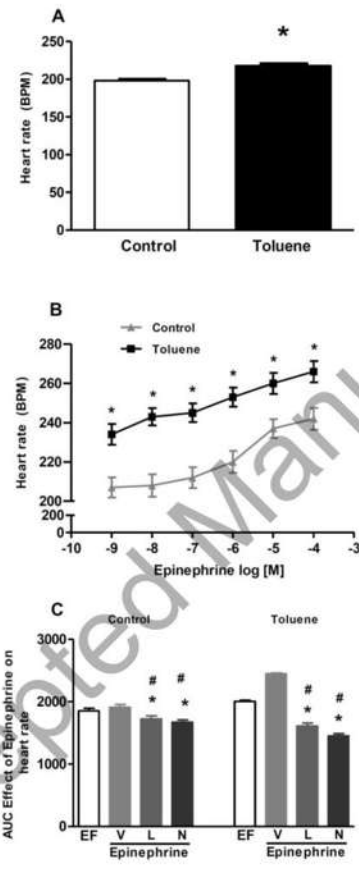


Fig. 3. Carreón-Garcidueñas et al., 2018.

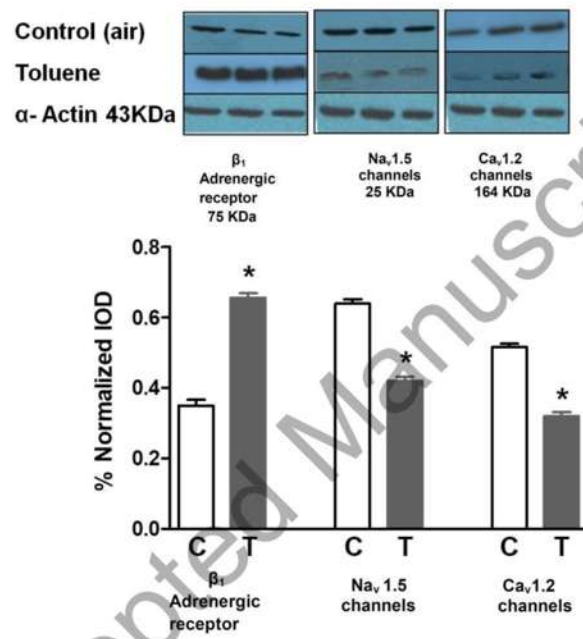


Fig. 4. Carreón-Garcidueñas et al., 2018.

## X. DISCUSIÓN

Los resultados experimentales en este estudio demuestran que, en ratas expuestas de forma aguda al tolueno:

1.- La presión de perfusión aumentó en ratas expuestas de forma aguda al tolueno, probablemente debido a un efecto vasoconstrictor del disolvente por sobreestimulación adrenérgica.

2.- La fuerza de contracción ventricular izquierda fue elevada en ratas expuestas de forma aguda al tolueno, como resultado del aumento en la presión de perfusión.

3.- La frecuencia cardíaca aumentó en las ratas expuestas a los solventes, probablemente debido a una sensibilización a la adrenalina.

4.- Hasta donde sabemos, este es el primer estudio donde los parámetros mencionados anteriormente, evaluados en corazones de ratas expuestos al tolueno, disminuyeron en presencia de bloqueantes de los canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que sugiere la participación de estos canales en los efectos cardíacos agudos tras una exposición a 6000 ppm de tolueno.

5.- La exposición aguda al tolueno generó un aumento en la densidad de los receptores adrenérgicos y una disminución en la expresión de los canales  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ .

Es bien sabido que el tolueno puede producir arritmias por mecanismos que son independientes de daños cardíaco o alteraciones en las estructuras vasculares coronarias [41]. Aunque los efectos del tolueno están bien documentados, el mecanismo por el cual este fármaco promueve las arritmias sigue siendo

controvertido. La principal causa de la producción de arritmias cardíacas por abuso de disolventes se debe a la sensibilización adrenérgica cardíaca a catecolaminas, así como a un aumento sistemático de las mismas. En nuestro trabajo encontramos que el tolueno aumentó la presión de perfusión en las condiciones basales, lo que indica un efecto directo del tolueno en este parámetro. Se ha informado que la acción simpática de los disolventes induce vasoconstricción de arterias coronarias, reduciendo el suministro de sangre oxigenada al corazón, promoviendo así arritmias cardíacas [67].

Sabemos que la ruta principal que media la contracción en la aorta en respuesta a la adrenalina es a través de adrenoreceptores [69]. Turnbull y colaboradores [54] encontraron un fuerte efecto inotrópico positivo con la estimulación de los receptores adrenérgicos en corazones aislados perfundidos, lo que sugiere que después de una sobreestimulación adrenérgica estos receptores pudieran actuar como vasoconstrictores coronarios. En animales expuestos a tolueno, en nuestro trabajo observamos vasoconstricción en condiciones basales que atribuimos probablemente a la participación de receptores adrenérgicos. Matoba y colaboradores [70] mencionan que la sensibilización del miocardio a las catecolaminas podría relacionarse con la producción de vasoespasmos por un mecanismo desconocido, jugando este fenómeno un papel importante en el desarrollo de arritmias cardíacas. El hecho de que hayamos observado una diferencia significativa entre los efectos sobre la presión de perfusión de los animales control y aquellos expuestos a 6000 ppm de tolueno es consistente con lo informado por Tas y colaboradores [71]; en este estudio [71], los autores demostraron que el tolueno causa niveles elevados de troponina (proteína esencial para el proceso de contracción) la cual causa

vasoconstricción de las arterias en el cerebro. Aunque nuestro estudio se realizó en corazones, sugerimos que un fenómeno similar podría estar sucediendo en nuestras condiciones experimentales. Por lo tanto, sugerimos que el tolueno causa probablemente vasoconstricción a través de receptores adrenérgicos, sin embargo, se necesitan más estudios para dilucidar por completo este punto. Además encontramos que a medida que aumentaba la concentración de adrenalina, la presión de perfusión también aumentó en los corazones de ratas expuestos al tolueno, lo que muestra un fenómeno transitorio que depende de la interacción entre el tolueno y la adrenalina. Esta observación es consistente con lo informado por Clark y Tinston [49]. Estos autores encontraron que las sustancias utilizadas en el campo de la anestesia, como el halotano y el tricloroetano, podían causar sensibilización cardíaca cuando se administraban en combinación con adrenalina.

Por otro lado, nuestros resultados proporcionan evidencia de que durante la estimulación adrenérgica la función cardíaca (fuerza de contracción ventricular izquierda específicamente), puede aumentar como resultado de dos factores: a) estimulación  $\beta_1$ -adrenérgica directa del miocardio ó b) aumento de la presión de perfusión coronaria producida por un aumento en la presión arterial como consecuencia de la vasoconstricción. Encontramos un reporte en la literatura que describe un efecto inotrópico positivo producido por un aumento en la presión de perfusión coronaria [67]. Este reporte indica que los mecanismos responsables de este efecto inotrópico positivo podrían ser: un aumento en el flujo sobre las demandas necesarias, el estiramiento de las fibras cardíacas como resultado del proceso de vasoconstricción, y / o un efecto directo sobre la presión que aumenta el

calcio intracelular, este efecto podría deberse a cambios en la composición iónica ó en el volumen del intersticio ó bien a un factor inotrópico producido por el endotelio ó por las neuronas intramiocárdicas [67]. Por lo tanto, el aumento en la contracción del miocardio puede ser observado no solo por la acción adrenérgica directa en el miocardio, sino también por el aumento en la presión de perfusión coronaria y el flujo resultante de una presión sanguínea más alta que, de acuerdo con nuestros hallazgos, comienza con una vasoconstricción coronaria que es significativamente mayor en los corazones de los animales expuesto a tolueno.

Como mencionamos anteriormente, este fenómeno se caracteriza por la presencia de catecolaminas endógenas elevadas que dan como resultado un aumento de la función cardíaca lo cual pudimos corroborar cuando determinamos la frecuencia cardíaca en corazones de ratas expuestos a tolueno. Encontramos que el tolueno aumenta la frecuencia cardíaca en condiciones basales. Este resultado es consistente con estudios previos. Específicamente, uno donde la exposición al tolueno produjo una respuesta taquicárdica [73,75]. Los autores atribuyeron estos efectos principalmente a la concentración sistémica de catecolaminas circulantes, dichos autores encontraron que, en presencia de adrenalina, de forma similar a nuestros resultados, la frecuencia cardíaca aumentó de manera estadísticamente significativa [72,75]. Por otro lado, se ha demostrado que el tolueno tiene preferencia por los receptores ionotrópicos, pero también por los canales dependientes de voltaje [14, 72,76]. Además, se ha informado que el tolueno bloquea los canales de sodio del músculo esquelético, mostrando una inhibición mínima en los canales mutantes que carecen del sitio de unión del anestésico local, sugiriendo que este sitio es crítico no solo para anestésicos locales, sino también para los disolventes de abuso como el

tolueno [77]. En nuestro estudio, después de la estimulación solamente con adrenalina, continuamos con la estimulación adrenérgica pero ahora en presencia de bloqueadores de los canales de  $\text{Na}^+$  (lidocaína) y canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (nifedipina), para investigar una posible interacción entre el tolueno y los canales cardíacos dependientes del voltaje y su participación en la función cardíaca. En los tres parámetros funcionales que medimos, observamos una disminución en la función, confirmando la participación de ambos canales en la función cardíaca en corazones de control de ratas y, curiosamente, también en corazones de ratas expuestas al tolueno. Al respecto, de acuerdo a lo reportado en la literatura sabemos que la exposición a drogas (cocaína) está asociada con el daño cardiovascular debido a la profunda influencia de estas sustancias en la función adrenérgica [78].

Es importante mencionar que después de tener algún daño cardíaco hay una elevación de las catecolaminas. Sabemos que la cocaína reduce la liberación de adrenalina, a través del bloqueo de los canales de sodio en las ratas neonatales [78]. Schoming y cols. [79] encontraron que, en corazones de rata, usando la técnica de Langendorff y después de colocar un bloqueador de canales de calcio (nifedipina), los efectos producidos por la liberación de adrenalina del daño cardíaco se suprimieron, lo cual concuerda con nuestro trabajo, ya que nuestros datos sugieren que la adrenalina produce efectos cardio-aceleradores mediados por los canales de sodio y calcio dependientes de voltaje, como pudimos corroborar cuando bloqueamos con lidocaína y nifedipina y observamos una inhibición de la función adrenérgica.

Funcionalmente, se sabe que las alteraciones cardíacas modifican el electrocardiograma [80]. Estas alteraciones eléctricas son el resultado del efecto

directo en los canales cardíacos principalmente por los canales  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ . Se ha informado [72] que concentraciones relativamente bajas de tolueno (en el rango micromolar) bloquean los canales de  $\text{Na}^+$  cardíacos dependientes de voltaje, lo cual implica que este disolvente podría causar un aumento en el tiempo que los canales de sodio permanecen en el período refractario, produciendo un aumento en la duración del potencial de acción cardíaco y por lo tanto, el aumento de diversos parámetros en el corazón, como la fuerza de contracción ventricular izquierda y la frecuencia cardíaca. Nuestros resultados demuestran que el tolueno aumenta la fuerza de contracción ventricular izquierda en condiciones basales, lo que indica un efecto directo del tolueno en la función cardíaca. Estos efectos se revirtieron significativamente con la administración de los bloqueadores de los canales  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que sugiere la participación de estos canales en el aumento de los efectos cardíacos producidos por tolueno en presencia de la adrenalina.

Clarkson y cols. [81] observaron un efecto inhibitorio de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L y una prolongación en el electrocardiograma en los miocitos ventriculares de cobaya tratados con cocaína. Otro informe muestra la relación entre la adrenalina y la fuerza de contracción ventricular izquierda. Dichos autores informaron que este parámetro aumentó significativamente en presencia de adrenalina, causando alteraciones en el ritmo cardíaco, terminando en la producción de arritmias cardíacas [82]. Por lo tanto, de acuerdo con lo reportado en la literatura lo cual concuerda con nuestros resultados obtenidos, podríamos deducir que es probable que la producción de arritmias cardíacas debido al abuso de tolueno pudiera ocurrir debido a un bloqueo de canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje en un sitio específico, tras una sobreestimulación adrenérgica cardíaca.

A nivel molecular, el daño cardíaco se caracteriza por un aumento en el potasio extracelular, produciendo una zona isquémica [83]; resultando en una despolarización del potencial de membrana en reposo de los cardiomiocitos de 20-25 mV [84,85]. Esta despolarización ocurre en un rango de voltaje donde los canales cardiacos de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  se inactivan (-100 a -60 mV), lo que resulta en un aumento en la fracción de los canales  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  inactivados en condiciones de reposo. La alta afinidad del tolueno por estos canales inactivados altera la conducción eléctrica y aumenta el latido del corazón y por tanto el riesgo de arritmias [49,84].

Nuestros resultados farmacológicos sugieren una importante participación de los canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  y de receptores  $\beta$ 1-adrenérgicos en el tejido del ventrículo izquierdo, el cual ha sido ampliamente descrito; sin embargo, la exposición al tolueno nos hace sugerir que posiblemente las proteínas de este tejido presente daños y por lo tanto cambios en su expresión. Sabemos que las proteínas de estos canales y receptores se expresan en el tejido del ventrículo izquierdo. También encontramos que la exposición aguda al tolueno generó un aumento en la densidad de los receptores  $\beta$  adrenérgicos y una disminución en la expresión de los canales  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje.

El hecho de que hayamos encontrado un aumento en la densidad de receptores  $\beta$ 1 adrenérgicos en animales tratados con tolueno es consistente con la literatura. Capote y cols. [86] sugirió que después de que ocurre un daño cardíaco hay un aumento en el proceso de transcripción y, por lo tanto, un aumento en el número de receptores. Un informe independiente [87] menciona que después de una hipertrofia cardíaca hay una, disminución en la apoptosis cardíaca, probablemente debido a un aumento en la síntesis de proteínas y, por lo tanto, a la cantidad de receptores.

Sugerimos que probablemente este es el mecanismo que ocurre en nivel molecular. Fan y cols. [88] informaron que la estimulación adrenérgica estimula la función de los receptores  $\beta_1$  adrenérgicos y por tanto la vía de señalización de la PKA, lo que implica la activación de los mecanismos de transcripción que aumentan la expresión de los receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos. Por lo tanto, podemos suponer que la preparación de Langendorff y la exposición al tolueno dañan el tejido cardíaco y favorecen la síntesis de nuevas proteínas y de receptores  $\beta_1$  adrenérgicos.

La expresión de los canales  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje en el tejido ventricular cardíaco está ampliamente estudiada [87], porque estos canales determinan la función cardíaca, sin embargo, este es el primer informe que reporta una disminución en la expresión de estos canales debido a la exposición aguda al tolueno. La estrecha relación del funcionamiento de ambos canales se demuestra en este estudio y en el llevado a cabo por Hennessey y cols [89] en el que se demuestra que un factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) induce arritmias cardíacas como resultado de la modulación en la expresión de los canales iónicos  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje. Se ha demostrado que tanto en humanos como en roedores, la exposición aguda al tolueno tiene efectos cardiotóxicos capaces de producir arritmias [90,91]. Este hecho, junto con nuestros resultados en western blot, sugiere que los efectos del tolueno en el tejido cardíaco causan arritmias y a su vez una disminución en la expresión de los canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  como resultado de la activación de otras rutas como efecto compensador sobre la administración de tolueno y el ambiente rico en adrenalina.

## **XI. CONCLUSIONES**

Hasta donde sabemos, este es el primer informe en el que es posible establecer una participación directa de los canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  regulados por voltaje, tolueno y adrenalina, en la función cardíaca en ratas. Los hallazgos en nuestro estudio muestran que la adrenalina aumentó la presión de perfusión, la fuerza de contracción ventricular izquierda y que causa alteraciones en receptores  $\beta_1$  adrenérgicos y en canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje en corazones de rata expuestos a tolueno por un mecanismo que aún no ha sido completamente comprendido. Actualmente, es bien sabido que el tolueno actúa sobre canales activados por ligando y regulados por voltaje, sin embargo, nuestro trabajo respalda aún más la participación funcional de los canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje en los efectos cardíacos producidos por el uso indebido de tolueno. Este fenómeno podría ser responsable de las arritmias cardíacas generadas por la sensibilización con adrenalina y la muerte súbita por inhalación; Sin embargo, se necesitan más estudios para dilucidar por completo este punto.

## XII.ANEXO. ARTÍCULOS DE DIVULGACIÓN

• Recibido: Octubre 14, 2014. • Aceptado: Noviembre 27, 2014.

# Marihuana: ángel o demonio

**María Guadalupe Carreón Garcidueñas**

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, UMSNH.

**Marcia Yvette Gauthereau Torres**

Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas «Dr. Ignacio Chávez».

Contacto: mgcarreon3012@gmail.com

**Resumen:** El término «marihuana» se refiere a las hojas secas, flores, tallos y semillas de la planta de cáñamo *Cannabis sativa*, que contiene el compuesto químico psicoactivo (que altera la mente) llamado delta-9-tetrahidrocannabinol (THC), así como otros compuestos relacionados. Este material vegetal también se puede concentrar en una resina llamada hachís. Independientemente de cómo se ingiera, el THC actúa sobre puntos moleculares específicos en las células cerebrales, llamados receptores cannabinoides. Por lo general, estos receptores se activan mediante sustancias químicas similares al THC que se producen de forma natural en el cuerpo. Este sistema desempeña un papel importante en el desarrollo del cerebro y su funcionamiento normal. Los científicos continúan investigando las propiedades medicinales de otras sustancias químicas que se encuentran en la planta de cannabis, como el cannabidiol, compuesto cannabinoide no psicoactivo que se está estudiando por sus efectos en el tratamiento del dolor, la epilepsia y otros trastornos. Desde pequeños, siempre nos han enseñado a separar el mundo en dos categorías, es decir, que hay cosas buenas y hay cosas malas, lo cual es comprensible: las decisiones son más fáciles cuando todo es blanco o todo es negro; sin embargo, el mundo sigue teniendo un colorido amplio y ello hace que la toma de decisiones en ciertas etapas de nuestras vidas sea frustrante. Forzar las cosas a dos categorías puede resultar deprimente: el agua apaga la sed pero ahoga, la aspirina quita el dolor y también causa efectos adversos, por lo que el etiquetar todo lo anterior como bueno o malo requiere muchas consideraciones y puede no llevar a nada. Es posible que con la marihuana ocurra lo mismo, pero nadie debe decidir sin la información apropiada.

**Palabras Clave:** Marihuana, cannabidiol, adicciones.

**S**abemos que la marihuana (figura 1) es la droga ilegal más consumida, ya que cuenta con alrededor de 200 a 300 millones de consumidores en todo el mundo (Woody et al., 1995); de acuerdo a la última Encuesta Nacional de Adicciones en México (ENA, 2011), la marihuana ocupa el

primer lugar de prevalencia en una población que va desde los 12 hasta los 25 años (figura 2).

Hasta la fecha, algunos aspectos sobre la marihuana aún siguen siendo indiscutibles, la planta se conoce por lo menos hace 8,000 años, sus aplicaciones medicinales comenzaron hace al menos 4,500 años y su consumo lúdico se realiza desde hace miles de años pero ¿sabemos realmente qué es y cómo funciona?



Figura 1. Hoja de marihuana

La marihuana es una combinación de hojas, tallos, semillas y flores de la planta conocida como cáñamo (*Cannabis sativa*), pudiendo ser de color verde, café o gris. El término cannabis describe a la marihuana y otras drogas derivadas de la misma planta. Las formas potentes incluyen la marihuana (hojas y flores secas de la planta), el hachís (resina de la planta) y el aceite de hachís. En todas sus formas, el cannabis es una mezcla de sustancias que altera la función mental porque contiene THC (delta-9-tetrahidrocannabinol), identificado como principio activo en la planta de la marihuana, pero además cuenta con más de 400 compuestos adicionales. Independientemente de cómo se ingiera, el THC actúa sobre puntos moleculares específicos en las células cerebrales, llamados receptores cannabinoides. Por lo general, estos receptores se activan mediante sustancias químicas similares

año 4, no. 6 julio-diciembre del 2014

*Milenaria, Ciencia y Arte 11*

### Prevalencia de consumo (%)

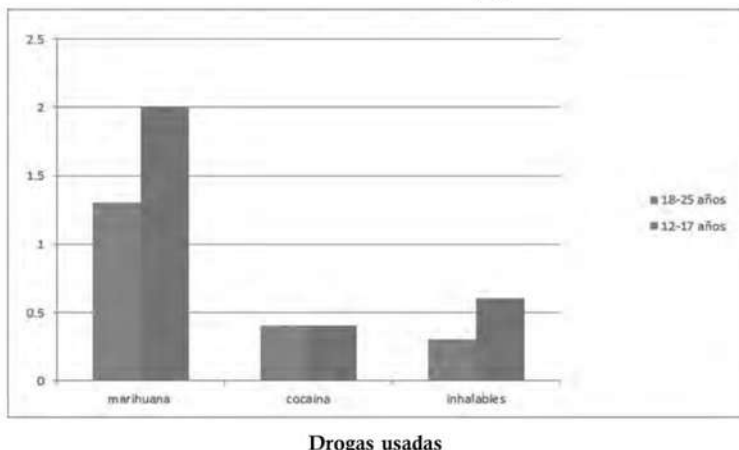


Figura 2. Encuesta Nacional de Adicciones 2011. Principales drogas de abuso utilizadas en la población general de 12-25 años.

al THC que se producen de forma natural en el cuerpo (anandamida y el 2-AG (2-araquidonil glicerol)) (Figura 3) y forman parte de una red de comunicación neuronal llamada sistema endocannabinoide. Este sistema desempeña un papel importante en el desarrollo del cerebro y en su funcionamiento normal (Devane et al., 1992).

La mayor densidad de receptores de cannabinoides se encuentra en las partes del cerebro que influyen en el placer, la memoria, el pensamiento, la concentración, la percepción sensorial y del tiempo y el movimiento coordinado. La marihuana sobreactiva el sistema endocannabinoide, que provoca los efectos psicoactivos y otros efectos que experimentan los consumidores. Estos efectos incluyen la alteración de las percepciones y los estados de ánimo, la pérdida de la coordinación, dificultad para pensar y resolver problemas, y deterioro en el aprendizaje y en la memoria (NIDA, 2014).

Los estudios acerca de los receptores cannabinoides han comprobado que éstos son de las proteínas receptoras más abundantes en las células cerebrales, siendo muy abundantes en la membrana de las células del hipocampo, del hipotálamo, del cerebelo, del ganglio basal, de la amígdala, del tronco cerebral

y de la médula espinal. Esta abundancia y amplia distribución explican la variedad de síntomas cerebrales que produce la administración de marihuana. Así, por ejemplo, al estar en la membrana de las células del hipocampo, no es raro que altere la formación de la memoria. Del mismo modo, la droga puede producir alteraciones motoras por su acción en el cerebelo, el centro de control motor del cerebro. Al actuar en el tronco cerebral y en la médula se explica su acción analgésica, en el hipotálamo su acción de aumentar el apetito, mientras que en la amígdala cerebral su efecto relajante.

Pero, ¿qué trae consigo el abuso de esta sustancia? De acuerdo a lo reportado por Iversen en el año 2000, no hay manera de que puedan presentarse casos de sobredosis por marihuana, debido a que se necesitarían cantidades enormes para alcanzar este estado; sin embargo, sabemos que el consumo crónico de marihuana puede acentuar los síntomas de algunas enfermedades mentales, sobre todo trastornos psicóticos, como la esquizofrenia, pero no parece que sea el uso de la marihuana la causa de estos problemas de salud mental (Indian Hemp Drugs Commission, IHDC, 1894). Algunos padecimientos respiratorios, como bronquitis, se presentan con más frecuencia en consumidores habituales, los cuales

también han llegado a presentar transformaciones de células bronquiales comparables a las que se observan en las primeras fases del cáncer de pulmón (Roth et al., 1996; IOM, 1999).

Probablemente las personas con trastornos psicóticos deberían evitarla, ya que el consumo crónico puede llegar a deteriorar de manera obvia la capacidad de desarrollar tareas complejas, y fumar cada día supone una amenaza para los pulmones; no obstante, no se ha demostrado que su consumo ocasional cause problemas mentales o físicos importantes sobre la salud en adultos sanos.

De lo anterior surge las preguntas ¿es dañina sólo si se consume de manera crónica? y ¿qué pasaría si la utilizamos de manera terapéutica? En este sentido, la tendencia actual es la legalización de la marihuana para tratar afecciones como el dolor y las náuseas causadas por el VIH/SIDA; el cáncer y otras afecciones. En estudios controlados se ha mostrado que los cannabinoides pueden ayudar a tratar diversos padecimientos, tales como disminuir la presión intraocular en pacientes con glaucoma (Hepler, 1971); aliviar el dolor; reducir los vómitos (Grinspoon, 1997); incrementar el apetito y favorecer el aumento de peso (Mattes, 1994); así como minimizar los espasmos y los movimientos involuntarios (Sanudo-Pena, 1997), pero la evidencia clínica no ha demostrado que los beneficios terapéuticos de la planta de marihuana sean mayores que sus riesgos para la salud.

Para ser considerada un medicamento legítimo, una sustancia debe tener ingredientes bien definidos y medibles, que sean consistentes de un lote a otro (como una píldora o inyección). Debido a que la planta de la marihuana contiene cientos de compuestos químicos que pueden tener efectos diferentes y que varían de una planta a la otra, y debido a que la planta por lo general se fuma, la dosificación es difícil de evaluar. Sin embargo, los fármacos que utilizan el THC como base para tratar el dolor y las náuseas ya están aprobados por la FDA y se prescriben.

Por otro lado, los científicos continúan investigando las propiedades medicinales de otras sustancias químicas que se encuentran en la planta de cannabis, como el cannabidiol, un compuesto cannabinoide no psicoactivo que se está estudiando por sus efectos en el tratamiento del dolor, la epilepsia pediátrica y otros trastornos (FDA, 2006).

Todos tenemos estereotipos sobre las diferentes maneras en que se pueden alterar los pensamientos y el estado de conciencia. Las acciones para alterar el estado de conciencia pueden facilitarnos algunos ejemplos: basta en fijarse en actividades comunes como la meditación, la oración y la hipnosis, de las cuales, es posible que las personas que no se involucran o no están familiarizadas con estas prácticas las consideren malas, sin embargo, éstas son legales, tal vez porque no ocasionan daños.

La actividad física también altera el estado de conciencia, por ejemplo: el paracaidismo es legal aunque es una actividad muy peligrosa, pero no resulta lo suficientemente riesgosa como para prohibirla; encontramos en nuestra vida diaria sustancias químicas que alteran el estado de conciencia y que si son aceptadas por la sociedad, como la cafeína, la nicotina y el alcohol, las cuales ejercen efectos sobre el pensamiento y el estado de ánimo, y cuya toxicidad es superior a la de la marihuana, pero mientras se consumen de forma que no causen daño a los demás, son legales y son tan familiares y populares que simplemente se descarta su prohibición.

Las personas consideran que estas sustancias pueden consumirse de forma responsable y sin que generen daños, pero ¿podríamos extrapolar esta confianza a la marihuana?. Las tendencias mundiales son hacia la legalización, argumentando la seguridad del uso de la marihuana, el respeto a la decisión individual de su consumo y la disminución del problema del narcotráfico con todas sus aristas. Pero

hay que tomar en cuenta que una característica de los usuarios de marihuana y otras sustancias de abuso es que están expuestos a más de una droga, y que el consumo de una en particular es un factor de riesgo para que el usuario pueda experimentar los efectos de otras. Adicionalmente, los menudistas de drogas no sólo venden marihuana, con lo que un usuario podría tener fácil acceso a otras drogas. Con todo lo anterior queda la pregunta en el aire: ¿es seguro el consumo controlado de la marihuana?

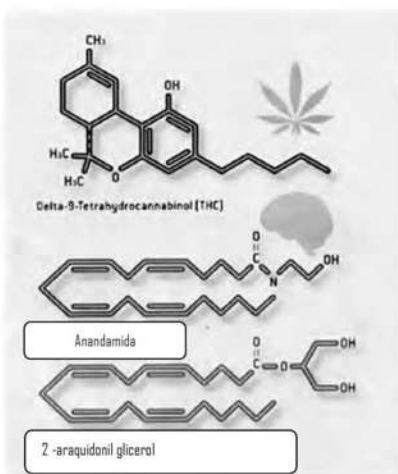


Figura 3. Estructura química de los cannabinoides (delta-9-tetrahidrocannabinol) y endocannabinoides (anandamida y 2-araquidoniol glicerol) capaces de activar a los receptores cannabinoides.

El futuro le depara a la marihuana muchas posibilidades, los estudios sobre los cannabinoides y sus receptores, sin duda, ofrecerán información adicional sobre los efectos de estas sustancias sobre la mente y el cuerpo humano y podrían proporcionar información complementaria sobre el cerebro y el sistema inmunitario, pudiéndose analizar la eficacia de la marihuana y los cannabinoides como medicamentos. Las técnicas podrían evolucionar para limitar los efectos negativos de esta sustancia, haciendo su uso más seguro en un futuro

no muy lejano e incluso pudiéramos esperar además modificaciones en las leyes relacionadas con el consumo de esta sustancia.

## Referencias

Biduat-Russell, M., Devane, W.A., and Howlett, A.C. (1990). Cannabinoid receptors and modulation of cyclic AMP accumulation in the rat brain. *Journal of Neurochemistry*, 55, 21-55.

Devane, W.A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R.G., Stevenson, L.A., Griffin, G., ET AL. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, 258, 1946-1949.

Encuesta Nacional de adicciones (ENA, 2011). CONADIC/SSA, IMP, INEGI. Informe ejecutivo, México 2011.

Federal Drug Administration (FDA) DMF Regulation: 21 C.F.R. Section 314.420. 2006. Grinspoon, L. and Bakalar, J.B. (1997). *Marijuana, the forbidden medicine*. New Haven: Yale university Press.

Hepler, R.S and Petrus, R. (1971). Experiences with administrations of marijuana to glaucoma patients. In S. Cohen and R. Stillman (eds), *the therapeutic potential of marijuana* (pp.63-76). New York :Plenum.

Indian Hemp Drugs Commission (IHDC). (1894). *Report of the Indian Hemp drugs commission*. Simla, India: Government Central Printing Office Institute of Medicine (IOM). (1999). *Marijuana and medicine: Assessing the science base*. Washington, DC: National Academy.

Iversen, L.L. (2000). *The science of marijuana*. New York: Oxford University Press.

Jenkins AJ, Cone EJ. Pharmacokinetics: Drug Absorption, Distribution and Elimination. En: Karch SB. *Drug Abuse Handbook*, CRC Press, Florida, 1998; 190.

Mattes R.D., Engelman, K, Shaw, L.M. (1994) Cannabinoids and appetite stimulation. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 49, 187-195.

National Institute on Drug Abuse, National Institutes of health, U.S. Department of Health and Human Services. NIDA infofacts. *Marihuana*. www.drugabuse.gov.2014.

Roth, M.D., Kleerup, E.C., Arora, A., Barsky, S.H. ad Tashkin, D.P. (1996). Endobronchial injury in young tobacco and marijuana smokers as evaluated by visual, pathologic and molecular criteria. *American Journal of respiratory and critical care medicine*, 153, 100A.

B.J.Sadock (Eds.), *Comprehensive textbook of psychiatry* (6<sup>th</sup> Ed.) (pp.810-817). Baltimore; Williams and Wilkins.

# El consumo de café: en el pecado puedes llevar la penitencia

**María Guadalupe Carreón Garcidueñas**  
Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, UMSNH.

**Marcia Yvette Gauthereau Torres.**  
Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez".  
Contacto: marcia\_yvette@yahoo.com

*"Es mejor tomarse un café malo que no tomar café"* - David Lynch.

**Resumen:** El café es la bebida que se obtiene a partir de las semillas tostadas y molidas de los frutos de la planta del café, altamente estimulante por su contenido de cafeína, es la bebida sin alcohol más consumida en el mundo generalmente se sirve caliente. Recientemente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó que la ingesta de café podía causar cáncer de esófago (CE), de ser así, el riesgo de CE podría ser grande en poblaciones en las que esta bebida es ingerida comúnmente, tales como países europeos y Sudamérica.

**Palabras clave:** Cáncer de esófago (CE), bebidas calientes, café.



Figura 1. Bebidas cuya ingesta supera los 70 grados centígrados.

Son muchas las personas que no pueden dar por comenzado su día sin una, dos o tres tazas de café. A esta bebida se le han atribuido muchas bondades para la salud, ya que

se ha reportado que disminuye la probabilidad de desarrollar la enfermedad de Parkinson, disminuye las alergias, reduce el riesgo a desarrollar diabetes y Alzheimer, disminuye la

• Enviado: octubre 24, 2016 • Aceptado: diciembre 30, 2016

depresión, combate el dolor de cabeza, aporta antioxidantes, por mencionar algunas.

El café es posiblemente la bebida más popular y consumida del mundo, la historia de cómo se extendió su cultivo y su consumo es una de las más atractivas que pueda haber. Esa historia empieza en África, en Etiopía, donde el cafeto tuvo su origen probablemente en la provincia de Kaffa (de ahí el origen de la palabra café). Hay varios relatos, imaginativos pero poco probables, acerca de cómo se descubrieron los atributos del grano tostado de café. Cuenta uno de ellos que a un pastor de cabras etiope le asombró el animado comportamiento que tenían las cabras después de haber mascado cerezas rojas de café, esto lo indujo a llevar las bayas a un venerado musulmán en un monasterio cercano; ahí desaprobó su uso y lo echó al fuego, de donde emergió un aroma atrayente. Los granos tostados fueron rápidamente extraídos de las brasas y disueltos en agua caliente con sal, produciendo así la primera taza de café en el mundo (Burn, 1869).

El hecho de que se haya reportado recientemente que la ingesta de café aumenta la incidencia de cáncer de esófago (CE) conmocionó a muchos. En 2016, un grupo de trabajo de 23 científicos internacionales convocado por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC, de sus siglas en inglés), de la Organización Mundial de la Salud (OMS), evaluó la carcinogenicidad del consumo de café y otras bebidas muy calientes.

El grupo de trabajo no encontró evidencia concluyente de un efecto carcinogénico por beber café. Sin embargo, los expertos hallaron que el consumo de bebidas muy calientes probablemente cause CE en los seres humanos, lo cual se basó en la evidencia limitada de estudios epidemiológicos que revelaron relaciones positivas entre el cáncer del esófago y el consumo de bebidas muy calientes. Estudios realizados en lugares tales como China, la República Islámica de Irán, Turquía o América del Sur, donde se acostumbra beber muy caliente el café, el té o el mate (a unos 70°C), mostraron que el riesgo de CE aumentaba con la temperatura a la que la bebida es

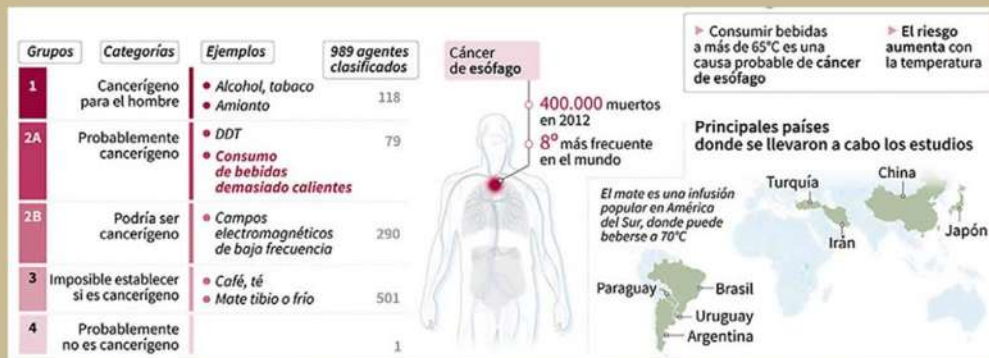


Figura 2. Las bebidas demasiado calientes podrían causar cáncer de esófago. Centro Internacional de la investigación del cáncer (IARC)

consumida. En experimentos con animales se obtuvo también evidencia limitada de la carcinogenicidad del agua muy caliente (Loomis et al., 2016).

A pesar de que el tabaco y el consumo de alcohol son las principales causas de CE, la mayoría de los cánceres esofágicos ocurren en partes de Asia, América del Sur y el este de África, donde el consumo regular de bebidas muy calientes es común y donde las causas de la alta incidencia de este cáncer aún no se conocen bien (IARC, 2016).

Al concluir que era la temperatura elevada la que estaba produciendo este efecto, era necesario saber ¿qué es muy caliente?, por poner un ejemplo, en el caso del café, éste es una infusión, el cual ocupa un proceso fisicoquímico, que para extraer sus aromas y sabores implica que el agua debe estar a 90°C, la cual es la temperatura a la que sale de la máquina (no está hirviendo), al salir de ésta baja su temperatura a 75°C aproximadamente, y si lo dejamos en una taza por cuatro minutos descendiendo la temperatura a 55°C, la cual es la temperatura óptima para su ingesta (IARC, 2016).

La OMS tiene una lista de agentes clasificados de acuerdo a su asociación probada con el cáncer, en la categoría 1 encontramos 118 sustancias que está comprobado que son carcinógenas en humanos, la categoría 2A cuenta con 80 sustancias "probablemente" carcinógenas en humanos, y la 2B con 289 sustancias "posiblemente" carcinógenas; de esta manera y de

acuerdo a los hallazgos encontrados, la OMS recomendó subir de categoría las bebidas calientes de agentes 2B a 2A, en donde cualquier líquido a más de 70°C se recomienda dejarlo enfriar a 55°C (Loomis, 2016).

El CE es la octava causa más común de cáncer en todo el mundo y una de las principales causas de muerte por cáncer, con 400,000 muertes registradas en el 2012, aproximadamente 5% de las muertes por cáncer. Sin embargo, no se conoce la proporción de casos de CE que pueden estar vinculados al consumo de bebidas muy calientes. ¿Pero cómo es que la temperatura de las bebidas conduce al desarrollo de CE? Encontramos numerosos reportes en la literatura, donde se determina que las lesiones térmicas recurrentes en la mucosa esofágica por el consumo de grandes cantidades de bebidas calientes durante mucho tiempo pueden ser un factor de riesgo para el desarrollo de CE (Yang et al., 2009), a través de procesos inflamatorios asociados a la irritación crónica de la mucosa esofágica con aumento de la temperatura local, estimulando la formación endógena de especies reactivas de nitrógeno, y posteriormente el desarrollo de CE (Ambs et al., 1999; Mirvish, 1995).

Los resultados hasta el momento sugieren fuertemente que las altas temperaturas de las bebidas son las responsables de incrementar el riesgo de CE; sin embargo, se necesitarán más estudios para poder corroborar estos datos, el hecho de que existan reportes que relacionan el consumo de bebidas

muy calientes con cáncer significa que no hay que pasar por alto estos datos y que la probable relación que estas dos variables han demostrado se presenta con mayor frecuencia cuando la ingesta es en muy altas temperaturas y a elevadas dosis de su consumo, por lo que mientras moderemos estas variantes, todos podremos seguir disfrutando de nuestras bebidas calientes favoritas.

#### Referencias

- Ambs S, Harris CC (1999). Relationship Between p53 Mutations and Inducible Nitric Oxide Synthase Expression in Human Colorectal Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 91 (17): 1509-1511.
- Burn, Jacob Henry, d. (1869). A descriptive catalogue of the London traders, tavern, and coffee-house toke. 2nd ed. London.
- [http://www.iarc.fr/en/mediacentre/iarcnews/pdf/Monographs-Q&A\\_Vol116.pdf](http://www.iarc.fr/en/mediacentre/iarcnews/pdf/Monographs-Q&A_Vol116.pdf)
- Islami F, Pourshams A, Nasrollahzadeh D, Kamangar F, Fahimi S, Shakeri R, et al. (2009). Tea drinking habits and oesophageal cancer in a high risk area in northern Iran: population based case-control study. *BMJ* 338: b929.
- Loomis D, Guyton Z, (2016) Carcinogenicity of drinking coffee, mate, very hot beverages. *Lancet Oncol*. Jul;17 (7):877-8.
- Mirvish SS (1995). Role of N-nitroso compounds (NOC) and N-nitrosation in etiology of gastric, esophageal, nasopharyngeal and bladder cancer and contribution to cancer of known exposures to NOC. *Cancer letters*. 93 (1): 17-48.
- Pourshams A, Saadatian-Elahi M, Nouraei M, Malekshah AF, Rakhshani N, Salahi R, et al. (2005). Golestan cohort study of oesophageal cancer: feasibility and first results. *British Journal of Cancer*. 92 (1): 176-181.
- Yang CS, Wang X, Lu G, Picinich SC (2009). Cancer prevention by tea: animal studies, molecular mechanisms and human relevance. *Nature reviews. Cancer*. 9(6): 429-439.



Figura 1. Planta de *Salvia divinorum* (Cruz et al., 2017).

## Salvia: Hierba antigua, droga nueva

María Guadalupe Carreón Garcidueñas

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, UMSNH.

Marcia Yvette Gauthereau Torres

Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez".

Contacto: mgcarreon3012@gmail.com

**Resumen.** La salvia (*Salvia divinorum*) es una hierba de la familia de la menta, ampliamente utilizada en nuestro país, a la que se le han atribuido usos medicinales y religiosos. Hasta hace pocos años se inició el estudio de esta hierba como droga de abuso, ya que llamó la atención el hecho de que los adolescentes comenzaran a utilizarla desde edades muy tempranas, para remplazar el uso de la marihuana. Debido a que la salvia es legal en muchos lugares y es una planta muy fácil y accesible de conseguir, son muy pocos los reportes encontrados en la literatura sobre cómo es que actúa esta hierba en el organismo, por lo cual es necesario ampliar los conocimientos sobre esta área; sin embargo, debemos de tener en claro que hay que catalogar a la *Salvia divinorum* como una droga peligrosa, la cual hoy en día representa un problema importante de salud pública en nuestro país.

**Palabras clave:** *Salvia divinorum*, salvinorina A, receptores kappa opioides.

La salvia (*Salvia divinorum*) es una hierba de la familia de la menta, nativa del sureste de México, específicamente de Oaxaca y que también se puede encontrar en Sudamérica; esta planta tiene grandes hojas de color verde, ovals (a menudo también dentadas), con un tono amarillo que alcanza de 10 a 30 cm de largo y, cuando florece en su hábitat nativo, lo hace desde septiembre hasta mayo. No se debe confundir este tipo de salvia con otra denominación que es la *Salvia officinalis*, que se utiliza como aromatizante en las comidas, de manera similar al tomillo y el orégano, que proviene del mediterráneo y a la cual se le han atribuido propiedades medicinales (Cruz et al., 2017).

Esta hierba fue utilizada por las tribus de los mazatecos para usos medicinales y religiosos, ha sido llamada "magic mint" (menta mágica), yerba de la pastora, yerba de la virgen, hierba de los dioses; además, esta hierba ha sido usada por los chamanes para la adivinación en la mayoría de los pueblos mayas en México. El uso tradicional de la salvia comprende dos facetas: una terapéutica y otra adivinatoria. Como fármaco ha sido usada como tónico general, laxante, diurético, para el dolor de cabeza, por mencionar algunos usos (Siebert, 1994).

Hasta hace pocos años es que se inició el estudio de esta hierba, ya que comenzó a llamar la atención de los investigadores debido a que los adolescentes comenzaron a utilizarla como droga de abuso. Se cree que comenzó su uso para remplazar a la marihuana, ya que la salvia es legal en muchos lugares y por eso más fácil y accesible de conseguir. Aunque la información sobre la salvia es limitada, su consumo en parte puede estar siendo impulsado por información publicada en diversos sitios de internet relacionados con las drogas. Debido a la naturaleza de los efectos de esta droga, entre ellos, breves experiencias alucinógenas, es más probable

que se utilice más como experimentación individual que como una droga social (Gonzalez, Riba, Bouso, Gomez-Jarabo, & Barbanjo, 2006)

La salvia no aparece en las listas de los convenios de la ONU sobre drogas; sin embargo, recientemente se inició el control del uso de esta hierba en varios países, por ejemplo: en España han colocado a la planta bajo control, en Noruega cae bajo la legislación de fármacos, en Canadá su venta es ilegal, y en Chile se encuentra prohibida su siembra, plantación, cultivo o cosecha desde febrero de 2008. No obstante, su consumo para el uso estrictamente personal no se encuentra penalizado, como sucede con el resto de las drogas. En el año 2003 la DEA colocó a la *Salvia divinorum* en su "Lista de narcóticos y drogas peligrosas", aunque no en la Lista Federal de Sustancias Controladas (Gowing et al., 2015).

De acuerdo al último informe "Monitoring the Future" (Monitoreando el futuro) del Instituto Nacional sobre el Abuso de Drogas de EUA (National Institute on Drug Abuse), en 2009 la prevalencia de consumo de *Salvia divinorum* a nivel mundial fue de 6.0% en jóvenes de 12 a 18 años (siendo este porcentaje mayor al del uso del éxtasis y cocaína) lo cual nos habla de la importancia del estudio de esta hierba debido a las edades tan tempranas a las cuales se inicia su uso (Gowing et al., 2015).

En México, al ser una sustancia legal, las encuestas y sistemas de información no reportan datos significativos sobre la incidencia y prevalencia del consumo de la salvia; sin embargo, la Comisión Nacional contra las Adicciones ha levantado una alerta epidemiológica, empezando el monitoreo del consumo de esta sustancia a nivel nacional, ya que ésta se puede adquirir

con facilidad en diversos sitios en internet, en los cuales se ofrece la venta de extracto de salvia, hoja deshidratada y plantas de salvia.

El principal ingrediente activo de la salvia es la salvinorina A (Harding et al., 2005), se sabe que ésta produce fuertes alucinaciones, pero a diferencia de los alucinógenos, no es un alcaloide, es decir, su molécula no contiene nitrógeno, por lo que es considerado como el primer agonista opioide no nitrogenado de origen natural (Chavkin et al., 2004). De acuerdo a estudios recientes, se descubrió que su molécula no es alucinógena, sino onírógena, es decir, que dispara el mecanismo cerebral que cambia el estado de vigilia por el estado de sueño, pero reteniendo la conciencia (el llamado "sueño consciente") (Prisinzano, 2005).

Recientemente se ha descubrió que la salvia es un potente activador de los receptores opioides kappa en el cerebro (los cuales producen analgesia espinal, miosis y sedación) y que no actúa sobre los receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>2A</sub>, lo cual suele ser el principal mecanismo molecular responsable de las acciones de los alucinógenos clásicos (Chavkin et al., 2004).

El método tradicional para consumir la salvia ha sido masticando las hojas frescas, tomando el jugo extraído de ellas, fumando en cigarrillo o en pipas de agua o también se puede vaporizar e inhalar. Los efectos que produce se han descrito como intensos pero de corta duración, que aparecen en menos de un minuto y duran menos de media hora (Siebert, 1994). Dichos efectos incluyen experiencias de tipo psicodélico en la percepción visual, cambios en el estado de ánimo y en las sensaciones corporales, además de altibajos emocionales, sentimientos de aislamiento o separación

*Milenaria, Ciencia y Arte 21*

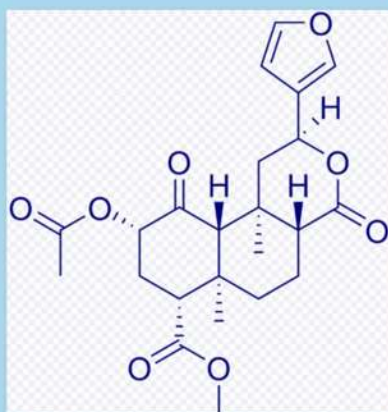


Figura 2. Salvinorina A. Principal ingrediente activo de la *Salvia divinorum* (Prisinzano, 2005)

(Gonzalez et al., 2006), y una percepción altamente modificada de la realidad externa y de uno mismo, que lleva a una disminución en la habilidad para interactuar con el entorno (Roth et al., 2002) (tabla 1), dichos efectos son muy parecidos a los de otras drogas de abuso. Son pocos los reportes encontrados realizados en modelos experimentales animales, sin embargo, un estudio nos habla de que, en roedores, se mostraron efectos nocivos de la salvinorina A sobre el aprendizaje y la memoria, pero hay poca evidencia de que la salvia cause dependencia o problemas psiquiátricos a largo plazo en los seres humanos. Debido a este último efecto, existe preocupación sobre los peligros que resultan tras estar expuesto a la salvia (Prisinzano, 2005).

Aunque sin duda la investigación hasta el momento sobre esta área es escasa y todavía faltan por resolver muchas preguntas, los reportes encontrados hasta el momento sugieren un papel importante de los receptores opioides kappa en el efecto de la salvia sobre la modulación de la percepción humana y quizá esta premisa abra paso a una nueva vía terapéutica para el tratamiento de las patologías relacionadas con distorsiones de la percepción, tales como la esquizofrenia, la demencia y los desórdenes bipolares; sin embargo, esto sólo se logrará con un conocimiento más completo de cómo actúa la *Salvia divinorum* en los seres vivos, para

lo cual es necesario la realización de más estudios; no obstante, también es necesario monitorear su consumo debido a que es una droga peligrosa, de fácil acceso entre los jóvenes, los cuales se ha visto que inician su consumo a edades muy tempranas, lo que representa un problema importante de salud en nuestro país que es necesario abordar.

#### Referencias

- Cruz, A., Domingos, S., Gallardo, E., & Martinho, A. (2017). A unique natural selective kappa-opioid receptor agonist, salvinorin A, and its roles in human therapeutics. *Phytochemistry*, 137, 9-14. doi: 10.1016/j.phytochem.2017.02.001
- Chavkin, C., Sud, S., Jin, W., Stewart, J., Zjawiony, J. K., Siebert, D. J., . . . Roth, B. L. (2004). Salvinorin A, an active component of the hallucinogenic sage salvia *divinorum* is a highly efficacious kappa-opioid receptor agonist: structural and functional considerations. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *J Pharmacol Exp Ther*, 308(3), 1197-1203. doi: 10.1124/jpet.103.059394
- Gonzalez, D., Riba, J., Bouso, J. C., Gomez-Jarabo, G., & Barbanoj, M. J. (2006). Pattern of use and subjective effects of *Salvia divinorum* among recreational users. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Drug Alcohol Depend*, 85(2), 157-162. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2006.04.001
- Gowing, L. R., Ali, R. L., Allsop, S., Marsden, J., Turf, E. E., West, R., & Witton, J. (2015). Global statistics on addictive behaviours: 2014 status report. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Addiction*, 110(6), 904-919. doi: 10.1111/add.12899
- Harding, W. W., Tidgewell, K., Schmidt, M., Shah, K., Dersch, C. M., Snyder, J., . . . Prisinzano, T. E. (2005). Salvinicins A and B, new neoclerodane diterpenes from *Salvia divinorum*. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Org Lett*, 7(14), 3017-3020. doi: 10.1021/ol0510522
- Prisinzano, T. E. (2005). Psychopharmacology of the hallucinogenic sage *Salvia divinorum*. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Life Sci*, 78(5), 527-531. doi: 10.1016/j.lfs.2005.09.008
- Roth, B. L., Baner, K., Westkaemper, R., Siebert, D., Rice, K. C., Steinberg, S., . . . Rothman, R. B. (2002). Salvinorin A: a potent naturally occurring nonnitrogenous kappa opioid selective agonist. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(18), 11934-11939. doi: 10.1073/pnas.182234399
- Siebert, D. J. (1994). *Salvia divinorum* and salvinorin A: new pharmacologic findings. [Clinical Trial Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *J Ethnopharmacol*, 43(1), 53-56.

Tabla 1. Principales efectos producidos por las drogas de abuso más comunes

Marihuana	Heroína	Cocaína	Éxtasis	Anfetaminas	Salvia D.
Alucinaciones	Analgésia	Alucinaciones	Alucinaciones	Cefaleas	Alucinaciones
Pánico	Euforia	Euforia	Euforia	Euforia	Cambios estado de ánimo
Ansiedad	Somnolencia	Ansiedad	Visión borrosa	Dificultad para respirar	Visión borrosa
Incoordinación	Daño hepático	Daño hepático	Daño hepático	Daño hepático y renal	Incoordinación
Taquicardia	Paro respiratorio	Taquicardia	Taquicardia	Taquicardia	Taquicardia

Tomado de UNODC, respuestas al cuestionario para los informes anuales, y C. Carpentier, L. Royuela y L. (2015).

### **XIII.REFERENCIAS**

- [1] Cruz, S.L., Orta-Salazar, G., Gauthereau, M.Y., et al., 2003. Inhibition of cardiac sodium currents by toluene exposure. *British journal of pharmacology*; 140(4): 653-660.
- [2] National Institute on Drug Abuse, National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services. NIDA. Infofacts. Inhalants. [www.drugabuse.gov](http://www.drugabuse.gov) 2010.
- [3] Cruz, S.L., Soberanes-Chavez, P., Paez-Martinez N., et al., 2009. Toluene has antidepressant-like actions in two animal models used for the screening of antidepressant drugs. *Psychopharmacology* ;204(2): 279-286.
- [4] Arlien-Soborg, P., Hansen, L., Ladefoged, O., et al., 1992. Report on a conference on organic solvents and the nervous system. *Neurotoxicology and teratology*; 14(1): 81-82.
- [5] ATSDR. Agency for toxic substances and disease registry. U.S. Department of health and human services. Toxicological profile for toluene. Atlanta, Georgia. pp. 1-111, (2011).
- [6] Balster, R.L., Cruz, S.L., Howard, M.O., et al., 2009. Classification of abused inhalants. *Addiction*; 104(6): 878-882.
- [7] Lauwerys, R., 1984. Indicadores Biológicos para la valoración de la exposición humana a compuestos químicos industriales (EUR 9803 EN); Comunidades Europeas, Bruselas, Luxemburgo. pp, 1-13.
- [8] Villatoro, J.A., Cruz, S.L., Ortiz, A., et al., 2011. Volatile substance misuse in Mexico: correlates and trends. *Substance use & misuse*; 46 Suppl 1: 40-45.
- [9] Encuesta Nacional de Adicciones (ENA 2011). CONADIC/SSA, IMP, INEGI. Informe Ejecutivo, México, 2011
- [10] Bowen, S.E., Batis, J.C., Paez-Martinez, N., et al., 2006. The last decade of solvent research in animal models of abuse: mechanistic and behavioral studies. *Neurotoxicology and teratology*; 28(6): 636-647.

- [11] Marjot, R., McLeod, A.A., 1989. Chronic non-neurological toxicity from volatile substance abuse. *Human toxicology* ;8(4): 301-306.
- [12] Cruz, S.L., Mirshahi, T., Thomas, B., et al., 1998. 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* ;286(1):334-340.
- [13] Beckstead, M.J., Weiner, J.L., Eger I.I., et al., 2000. Glicine and yaminobutyric Acid<sub>A</sub> receptor function is enhanced by inhalated drugs of abuse. *Molecular pharmacology*;57:1199-1205.
- [14] Lopreato, G.F., Phelan, R., Borghese, C.M., et al., 2003. Inhaled drugs of abuse enhance serotonin-3 receptor function. *Drug Alcohol Depend*; 70, 11–15.
- [15] Tillar, R., Shafer, T.J., Woodward, J.J., 2002. Toluene inhibits voltage-sensitive calcium channels expressed in pheochromocytoma cells. *Neurochemistry international*; 41(6): 391-397.
- [16] Guyton, A., 2016. *Fisiología Médica*. 13 edición. p.101-153.
- [17] Hille, B., 2001. *Ion channels of excitable membranes*. Third edition. P.22-26.
- [18] Payandeh, J., Scheuer, T., Zheng, N., et al., 2011. The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature*.; 475:353-358.
- [19] Kessler, M., Just, S., Rottbauer, W., 2012 Ion flux dependent and independent functions of ion channels in the vertebrate heart: lessons learned from zebrafish. *Stem Cells Int*; 46:21-61.
- [20] Catterall, W.A., 2001. A 3D view of sodium channels. *Nature*; 409(6823): 988-989, 991.
- [21] Balse, E., Steele, D.F., Abriel, H., et al., 2012. Dynamic of ion channel expression at the plasma membrane of cardiomyocytes. *Physiol Rev*; 92(3):1317-58.

- [22] Grant, A.O., 2009. Cardiac ion channels. *Circ Arrhythm Electrophysiol*; 2(2):185-94.
- [23] Tamargo-Menéndez, J.L., 2004. Los poros y los canales iónicos regulan la actividad celular. *Real Academia Nacional de Farmacia*.
- [24] Jespersen, T., 2012. *The Cardiac Ion Channels*. INTECH Open Access Publisher.
- [25] Meadows, L.S., Isom, L.L., 2005. Sodium channels as macromolecular complexes: implications for inherited arrhythmia syndromes. *Cardiovasc Res*; 67(3):448-58
- [26] Gaborit, N., Le Bouter, S., Szuts, V., et al., 2007. Regional and tissue specific transcript signatures of ion channel genes in the non-diseased human heart. *J Physiol*; 582(2):675-93
- [27] Petitprez, S., Jespersen, T., Pruvot, E., et al., 2008. Analyses of a novel SCN5A mutation (C1850S): conduction vs. repolarization disorder hypotheses in the Brugada syndrome. *Cardiovasc Res*; 78(3):494-504.
- [28] Ono, K., Iijima, T., 2010. Cardiac T-type  $\text{Ca}^{(2+)}$  channels in the heart. *J Mol Cell Cardiol*; 48(1):65-70.
- [29] Bodi, I., Mikala, G., Koch, S.E., et al., 2005. The L-type calcium channel in the heart: the beat goes on. *The Journal of clinical investigation* 115(12): 3306-3317.
- [30] Bean, B.P., 1985. Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. Differences in kinetics, selectivity, and pharmacology. *J Gen Physiol*; 86(1):1-30.
- [31] Ivanov, S.V., Ward, J.M., Tessarollo, L., et al., 2004. Cerebellar ataxia, seizures, premature death, and cardiac abnormalities in mice with targeted disruption of the *Cacna2d2* gene. *Am J Pathol*; 165(3):1007-18.

- [32] Bichet, D., Cornet, V., Geib, S., et al., 2000. The I-II loop of the Ca<sup>2+</sup> channel alpha1 subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit. *Neuron*; 25(1):177- 90.
- [33] Chen, Y.H., Li, M.H., Zhang, Y., et al., 2004. Structural basis of the alpha1-beta subunit interaction of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Nature*; 429(6992):675-80.
- [34] Van Petegem, F., Clark, K.A., Chatelain, F.C., et al., 2004. Structure of a complex between a voltage-gated calcium channel beta-subunit and an alpha-subunit domain. *Nature*; 429(6992):671-5.
- [35] Colecraft, H.M., Alseikhan, B., Takahashi, S.X., et al., 2002. Novel functional properties of Ca (<sup>2+</sup>) channel beta subunits revealed by their expression in adult rat heart cells. *J Physiol*; 541(2):435-52.
- [36] Jayanth, S.H., Hugar, B.S., Praveen, S., et al., 2017. Glue sniffing. *The Medico-legal journal*; 85(1): 38-42.
- [37] Shepherd, R.T., 1989. Mechanism of sudden death associated with volatile substance abuse. *Human toxicology*; 8(4): 287-291.
- [38] Bowen, S.E., 2011. Two serious and challenging medical complications associated with volatile substance misuse: sudden sniffing death and fetal solvent syndrome. *Substance use & misuse* ;46 Suppl 1: 68-72.
- [39] Einav, S., Amitai, Y., Reichman J., et al., 1997. Bradycardia in toluene poisoning. *Journal of toxicology. Clinical toxicology* ;35(3): 295-298.
- [40] Taylor, G.J., Harris, W.S., 1970. Glue sniffing causes heart block in mice. *Science*; 170(3960): 866-868.
- [41] Bass, M., 1970. Sudden sniffing death. *Jama*; 212(12): 2075-2079.
- [42] Flanagan, R.J., Fisher, D.S., 2008. Volatile substance abuse and crime: data from U.K. press cuttings 1996-2007. *Medicine, science, and the law*; 48(4): 295-306.

- [43] Wilcosky, T.C., Simonsen, N.R., 1991. Solvent exposure and cardiovascular disease. *American journal of industrial medicine*; 19(5): 569-586.
- [44] Levy, A.G., 1911. Asphyxia under Chloroform. *Proceedings of the Royal Society of Medicine* ;4(Pathol Sect): 205-224.
- [45] Meek, W.J., Hathaway, H.R., Orth, O.S., 1937. The effects of ether, chloroform and cyclopropane on cardiac automaticity. *J Pharmacol*; 61:240-252.
- [46] Chenoweth M.B., 1946. Ventricular fibrillation induced by hydrocarbons and epinephrine. *Journal of Industrial Hygiene and Toxicology*; 28:151-158.
- [47] Garb, S., Chenoweth, M.B., 1948. Studies on hydrocarbon-epinephrine induced ventricular fibrillation. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*; 94(1): 12-18.
- [48] Reinhardt, C.F., Azar, A., Maxfield, M.E., et al., 1971. Cardiac arrhythmias and aerosol "sniffing". *Archives of environmental health*; 22(2): 265-279.
- [49] Clark, D.G., Tinston, D.J., 1973. Correlation of the cardiac sensitizing potential of halogenated hydrocarbons with their physicochemical properties. *British journal of pharmacology* ;49(2): 355-357.
- [50] Vidrio, H., Magos, G.A., Lorenzana-Jimenez, M., 1986. Electrocardiographic effects of toluene in the anesthetized rat. *Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie*; 279(1): 121-129.
- [51] Lefkowitz, R.J., Rockman, H.A., Koch, W.J., 2000. Catecholamines, cardiac beta-adrenergic receptors, and heart failure. *Circulation*; 101(14): 1634-1637.
- [52] Hamann, J., Aust, G., Arac, D., et al., 2015. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCIV. Adhesion G protein-coupled receptors. *Pharmacological reviews*; 67(2): 338-367.

- [53] Sanchez-lemus, E., Arias-Montaña, J.A., 2004. Transactivación de receptores con actividad cinasa de tirosina (RTKS) por receptores acoplados a proteínas G. *Rev Biomed.* 15:33-48.
- [54] Turnbull, L., McCloskey, D.T., O'Connell, T.D., et al., 2003. Alpha 1-adrenergic receptor responses in alpha 1AB-AR knockout mouse hearts suggest the presence of alpha 1D-AR. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* ;284(4): H1104-1109.
- [55] Villalobos-Molina, R., Vazquez-Prado, J., Garcia-Sainz, J.A., 1997. Chloroethylclonidine is a partial alpha1A-adrenoceptor agonist in cells expressing recombinant alpha1-adrenoceptor subtypes. *Life sciences*; 61(25): PL 391-395.
- [56] Vazquez-Prado, J., Medina, L.C., Romero-Avila, M.T., et al., 2000. Norepinephrine- and phorbol ester-induced phosphorylation of alpha(1a)-adrenergic receptors. Functional aspects. *The Journal of biological chemistry*; 275(9): 6553-6559.
- [57] Jensen, B.C., O'Connell, T.D., Simpson, P.C., 2014. Alpha-1-adrenergic receptors in heart failure: the adaptive arm of the cardiac response to chronic catecholamine stimulation. *J Cardiovasc Pharmacol*; 63(4):291-301
- [58] Dominguez-Vara, I.A., Mondragón, J.M., Gonzalez, M., et al., 2009. Los  $\beta$  agonistas adrenérgicos como modificadores metabólicos y su efecto en la producción, calidad e inocuidad de la carne de bovinos y ovinos: una revisión. *Ciencia ergo sum*; 16-3:278-284.
- [59] De Montmollin, E., Aboab, J., Mansart, A., et al., 2009. Bench-to-bedside review: Beta-adrenergic modulation in sepsis. *Crit Care*; 13(5): 230.
- [60] Grimm, M., Brown, J.H., 2010. Beta-adrenergic receptor signaling in the heart: role of CaMKII. *Journal of molecular and cellular cardiology*; 48(2): 322-330.
- [61] Evans, E.B., Balster, R.L., 1991. CNS depressant effects of volatile organic solvents. *Neuroscience and biobehavioral reviews*; 15(2): 233-241.

- [62] Margot, R., Nuclead, A.A., 1989. Crónica non-neurológica toxicate Fromm volátiles substance abuse. *Han. Toxicol*; 8, 301–306.
- [63] Riscos- Bernal, D., Faltase, E., Pascual, G., 2004. La preparación de Langendorff: corazón de mamífero aislado y perfundido. *Universitas Médica*. 45(3):111-117.
- [64] Doring, H.J., 1990. The isolated perfused heart according to Langendorff technique--function--application. *Physiologia Bohemoslovaca*; 39(6): 481-504.
- [65] Skrzypiec-Spring, M., Grotthus, B., Szelag, A., et al., 2007. Isolated heart perfusion according to Langendorff---still viable in the new millennium. *Journal of pharmacological and toxicological methods*: 55(2): 113-126.
- [66] Sutherland, F.J., Shattock, M.J., Baker, K.E., et al., 2003. Mouse isolated perfused heart: characteristics and cautions. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*; 30(11): 867-878.
- [67] Lange, R.A., Cigarroa, J.E., Hillis, L.D., et al., 2004. Woodward award: cardiovascular complications of cocaine abuse. *Trans Am Clin Climatol Assoc* ;115:99-111; discussion 112-114.
- [68] Balster, R.L., Cruz, S.L., Howard MO, et al., 2009. Classification of abused inhalants. *Addiction* ;104(6):878-882
- [69] Karch, S.B., 2005. Cocaine cardiovascular toxicity. *South Med J* ;98(8):794-799.
- [70] Matoba, R., Funahashi, M., Fujitani, N., et al., 1987. An autopsy case of sudden death after toluene sniffing. *Nihon Hoigaku Zasshi* 1987; 41:438-441
- [71] Tas, U., Ekici, F., Koc, F., 2013. Acute cardiotoxic effects of high dose toluene: an experimental study. *Anadolu Kardiyol Derg* ;13(1): 3-8.
- [72] Cruz, S.L., Orta-Salazar, G., Gauthereau, M.Y., et al., 2004. Inhibition of cardiac sodium currents by toluene exposure. *Br J Pharmacol* ;140(4):653-660.
- [73] Lorenzana-Jimenez, M., Salas, M., 1990. Behavioral effects of chronic toluene exposure in the developing rat. *Neurotoxicol Teratol* ;12(4):353-357.

- [74] Shafer, T.J., Bushnell, p.j., Benignus, V.A., et al., 2005. Perturbation of voltage-sensitive  $\text{Ca}^{+2}$  channel function by volatile organic solvents. *The journal of pharmacology and experiemntal therapeutics*; 315 (3):11009-1118.
- [75] Gordon, C.J., Samsam, T.E., Oshiro, W.M., et al., 2007. Cardiovascular effects of oral toluene exposure in the rat monitored by radiotelemetry. *Neurotoxicol Teratol* ;29(2):228-235.
- [76] Cervantes-Durán, C., Ortega-Varela, L.F., Godínez-Hernández, D., et al., 2017. Toluene exposure enhances acute and chronic formalin-induced nociception in rats: Participation of 5-HT<sub>3</sub> receptors. *Neurotoxicology*.; 63:97-105.
- [77] Gauthereau, M.Y., Salinas-Stefanon, E.M., Cruz, S.L., 2005. A mutation in the local anaesthetic binding site abolishes toluene effects in sodium channels. *European Journal of Pharmacology* ;528,17.
- [78] Nye, H.E., Seidler, F.J., Slotkin, T.A., 1991. Developmental shift from local to central control of norepinephrine release in the cardiac-sympathetic axis: effects of cocaine and related drugs. *J Pharmacol Exp Ther* ;259(3):976-981.
- [79] Schomig, A., Rehmert, G., Kurz, T., et al., 1992. Calcium antagonism and norepinephrine release in myocardial ischemia. *Journal of cardiovascular pharmacology* ;20 Suppl 7:S16-20.
- [80] Isner, J.M., Chokshi, S.K., 1991. Cardiovascular complications of cocaine. *Curr Probl Cardiol* ;16(2):89-123.
- [81] Clarkson, C.W., Xu, Y.Q., Chang, C., et al., 1996. Analysis of the ionic basis for cocaine's biphasic effect on action potential duration in guinea-pig ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* ;28(4):667-678.
- [82] Van Stigt, A.H., Overduin, R.J., Staats, L.C., et al., 2016. A Heart too drunk to Drive; AV Block following Acute Alcohol Intoxication. *Chin J Physiol* ; 29; 59(1):1-8.

- [83] Fan, Y., Wang, C., Zhang, Y.,2013. Genistein ameliorates adverse cardiac effects induced by arsenic trioxide through preventing cardiomyocytes apoptosis. *Cell Physiol Biochem* ;31(1):80-91.
- [84] Morena, H., Janse, M.J., Fiolet, J.W., et al.,1980. Comparison of the effects of regional ischemia, hypoxia, hyperkalemia, and acidosis on intracellular and extracellular potentials and metabolism in the isolated porcine heart. *Circ Res* ; 46(5), 634-646.
- [85] Kleber, A.G.,1983. Resting membrane potential, extracellular potassium activity, and intracellular sodium activity during acute global ischemia in isolated perfused guinea pig hearts. *Circ Res* ;52(4):442-450.
- [86] Capote, L.A., Mendez Perez, R., Lympelopoulou, A.,2015. GPCR signaling and cardiac function. *European journal of pharmacology* ;763(Pt B): 143-148.
- [87] Tilley, D.G.,2011. G protein-dependent and G protein-independent signaling pathways and their impact on cardiac function ; *Circulation research*; 109(2): 217-230.
- [88] Fan, I.Q., Chen, B., Marsh, J.D., 2000. Transcriptional regulation of L-type calcium channel expression in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* ; 32(10):1841-9.
- [89] Hennessey, J.A., Wei, E.Q., Pitt, G.S., 2013. Fibroblast growth factor homologous factors modulate cardiac calcium channels. *Circ Res*; 113(4):381-8.
- [90] Tas, U., Ekici, F., Koc, F.,2013. Acute cardiotoxic effects of high dose toluene: an experimental study. *Anadolu Kardiyol Derg* ;13(1): 3-8.
- [91] Yasar, S., Yildirim, E., Koklu, M., et al., 2016.A case of reversible cardiomyopathy associated with acute toluene exposure. *Turk J Emerg Med* ; 16(3):123-125.