



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas
"Dr. Ignacio Chávez"
División de Estudios de Posgrado



Maestría en Ciencias de la Salud

**Estudio de los efectos de tolueno, xileno o benceno
sobre la reactividad a adrenalina en la preparación de
corazón aislado de rata**

Tesis

Para obtener el grado de:

Maestra en Ciencias de la Salud

Presenta:

Q.F.B Nallely Alvarado Gómez

Directora de Tesis:

D en C Marcia Yvette Gauthereau Torres

Agosto 2013

Agradecimientos

Alfredo Alvarado Zambrano y Ma. Guadalupe Gómez Almanza

Papas, no me alcanzaría la vida para agradecerles todo lo que me han dado y lo que me han enseñado, ustedes dos son mi pilar y ejemplo. Deseo que dios me dé la oportunidad de regresarles algún día todo lo que me han ofrecido, gracias por darme la vida y por hacer de mí la mujer que hoy soy, los amo con todo mi corazón

Luis Fernando Mata Reyna

Gracias por ser mi compañero de vida durante estos años, gracias por ayudarme, por darme fuerzas, por alentarme a seguir adelante cuando sentía que ya no podía, gracias por estar a mi lado soportando lágrimas, desesperaciones, miedos, alegrías, dichas y todos mis cambios de humor, gracias por ser mi mejor amigo y mi esposo y como en algún momento nos dijeron, juntos hasta que la muerte nos separe, te amo amor.

Nancy, Alfredo y Luis

Gracias por ser mis hermanos, mis amigos, mis confidentes, mi consuelo, mi risa, mi compañía, mi paño de lágrimas y mis maestros, dicen que los hermanos mayores somos el ejemplo a seguir de los hermanos menores y si eso es cierto espero no defraudarlos y que en mí tengan un buen ejemplo, tal vez no el mejor, pero sí uno que sea lo que necesiten, los quiero muchísimo y nunca olviden que siempre voy a estar para ustedes

*Francisco Alvarado, Ma. Del Carmen Zambrano, José Gómez y
Angela Almanza*

Aunque dios ya se llevó a 3 de ustedes y físicamente solo tengo a mi tita Angelita, ustedes saben que los extraño mucho y que los necesito mucho, desearía tenerlos aquí y que compartieran conmigo estos momentos pero se que están conmigo a mi lado y espero que estén orgullosos de mí y tita angelita tu si vas a estar conmigo y eres un ejemplo de Fortaleza y lucha para mí, gracias por estar con nosotros

dándonos tantas lecciones de vida, que dios te me cuide mucho y nos permita muchos años más a tu lado, gracias a los cuatro por ser mis titos.

Doctora Marcía Y. Gauthereau y Doctor Daniel Godínez

No solo les agradezco profundamente que hayan sido mis asesores y mi guía por este tiempo, sino que también les agradezco su Amistad, sus consejos y sus llamadas de atención cuando las ocupe y Aunque el Doctor Daniel no fue mi asesor formalmente, siempre estuvo para responder mis dudas, orientarme y aconsejarme como asesor, gracias por todo el apoyo que me brindaron y sobre todo por sus enseñanzas.

Amigos del laboratorio de Farmacodependencia

Doctor Fer, gracias por sus consejos, enseñanzas y sobre todo por el tiempo que invirtió en mí y por ser mi amigo. Angel, Susy, Lupita Carreón, Luis, Lesly y gabo gracias por acompañarme en este camino, gracias por los inolvidables momentos juntos y por esas largas horas que me escucharon en mis exposiciones, por sus consejos y sobre todo por su Amistad.

Amigos del laboratorio de Farmacología del IIQB

En especial quiero agradecerle a la maestra Blanquita por su tiempo, sus consejos y sus palabras de aliento que siempre tuvo para mí, maestra le agradezco de todo corazón el haberme enseñado tantas cosas dentro y fuera de un salón de clases. Areli y Xochitl, gracias por todo el tiempo que invirtieron en mí, ayudándome, enseñándome o simplemente acompañándome en las largas jornadas en el laboratorio, espero haber sido una buena alumna.

Y también quiero agradecer a cada una de las personas que directa o indirectamente formaron parte de este capítulo en mi vida, mi familia, mis amigos, mis compañeros de la maestría, mis maestros.

ÍNDICE GENERAL

Índice general.....	I
Índice de figuras.....	IV
Índice de tablas.....	V
Lista de abreviaturas.....	VI
Resumen.....	VII
Abstract.....	VIII
I. Antecedentes.....	1
1.1 Inhalables.....	1
1.1.1 Definición.....	1
1.2. Generalidades.....	1
1.2.1 Clasificación de los inhalables.....	4
1.2.2 Tolueno.....	6
1.2.2.1 Propiedades fisicoquímicas.....	6
1.2.2.2 Usos.....	7
1.2.2.3 Farmacocinética.....	7
1.2.3 Xileno.....	8
1.2.3.1 Propiedades fisicoquímicas.....	8
1.2.3.2 Usos.....	9
1.2.3.3 Farmacocinética.....	9
1.2.4 Benceno.....	10
1.2.4.1 Propiedades fisicoquímicas.....	10
1.2.4.2 Usos.....	10
1.2.4.3 Farmacocinética.....	11
1.2.5 Tipos de exposición a los disolventes.....	11
1.2.6 Efectos crónicos de los disolventes de abuso.....	12
1.2.6.1 Tolerancia, dependencia y sensibilización.....	12
1.2.7 Mecanismos de acción de los disolventes.....	14
1.2.8 Muerte súbita por inhalación.....	16
1.3 Receptor.....	17
1.3.1 Receptores adrenérgicos.....	18
1.3.1.1 Receptores α_1 -adrenérgicos.....	20
1.3.1.2 Receptores β_1 -adrenérgicos.....	22

1.4	Efectos cardíacos de los disolventes de abuso en modelo animal.....	24
II.	Justificación del proyecto.....	27
III.	Hipótesis.....	29
IV.	Objetivo General.....	30
V.	Objetivos particulares.....	30
VI.	Material y métodos.....	31
	6.1 Animales.....	31
	6.2 Sustancias.....	31
	6.3 Exposición a disolventes.....	31
	6.4 Diseño experimental.....	33
	6.5 Preparación del corazón aislado y perfundido.....	34
	6.6 Western Blot de los receptores α_1 y β_1 adrenérgicos.....	35
VII.	Análisis estadístico.....	38
VIII.	Resultados.....	39
8.1.	Efecto de la exposición subaguda y crónica a tolueno, xileno o benceno sobre la presión de perfusión del corazón.....	39
8.1.1	Curvas concentración-respuesta a la adrenalina en ausencia y en presencia de los antagonistas.....	41
8.2	Efecto de la exposición subaguda y crónica a tolueno, xileno o benceno sobre la frecuencia cardíaca.....	45
8.3	Efecto de la exposición subaguda y crónica a tolueno, xileno o benceno sobre la fuerza de contracción ventricular.....	48
8.4	Análisis molecular de los receptores α_1 y β_1 adrenérgicos en los corazones en la fase crónica.....	50
IX.	Discusión de resultados.....	55
9.1	Efecto de la exposición a disolventes sobre la presión de perfusión del corazón.....	56
9.1.1	Curvas concentración-respuesta a la adrenalina.....	60
9.2	Efecto de la exposición a disolventes sobre la frecuencia cardíaca	61

9.3	Efecto de la exposición a disolventes sobre la fuerza de contracción ventricular.....	63
9.4	Análisis molecular de la expresión de los receptores α_1 y β_1 -adrenérgicos en los corazones expuestos de manera crónica a los disolventes.....	64
X.	Conclusiones.....	68
XI.	Referencias.....	69

ÍNDICE DE FIGURAS

1.	Encuesta nacional sobre el porcentaje de jóvenes que consumen drogas	2
2.	Uso de drogas entre la comunidad escolar en Michoacán	3
3.	Tendencia en el mal uso de los disolventes volátiles en la ciudad de México	3
4.	Estructura química del tolueno	6
5.	Estructura química del xileno	8
6.	Estructura química del benceno	10
7.	Clasificación de los receptores adrenérgicos	19
8.	Estado inactivo y activo de la proteína G	20
9.	Mecanismo de señalización transduccional para los receptores α_1 .adrenérgicos	21
10.	Mecanismo de señalización transduccional para los receptores β_1 .adrenérgicos	24
11.	Cámara de exposición estática	33
12.	Efecto de la adrenalina sobre la presión de perfusión en corazones expuestos a disolvente o a aire	40
13.	Curvas concentración-respuesta a la adrenalina en ausencia y en presencia de antagonistas adrenérgicos en corazones expuestos a aire	41
14.	Curvas concentración-respuesta a la adrenalina en ausencia y en presencia de antagonistas adrenérgicos en corazones expuestos a tolueno	42
15.	Curvas concentración-respuesta a la adrenalina en ausencia y en presencia de antagonistas adrenérgicos en corazones expuestos a xileno	43
16.	Curvas concentración-respuesta a la adrenalina en ausencia y en presencia de antagonistas adrenérgicos en corazones expuestos a benceno	44
17.	Efecto de la adrenalina sobre la frecuencia cardíaca en corazones expuestos a disolvente o a aire	46
18.	Comparación del efecto de la exposición subaguda y crónica a disolventes o aire sobre la frecuencia cardíaca	47
19.	Efecto de la adrenalina la fuerza de contracción ventricular en corazones expuestos a disolvente o a aire	48
20.	Comparación del efecto de la exposición subaguda y crónica a disolventes o a aire sobre la fuerza de contracción ventricular	49
21.	Expresión de los receptores α_{1A} , α_{1B} y α_{1D} adrenérgicos en la aorta de animales expuestos a aire o a disolventes	51
22.	Expresión de los receptores β_1 adrenérgicos en las aurículas de animales expuestos a aire o a disolventes	52
23.	Expresión de los receptores β_1 adrenérgicos en los ventrículos de animales expuestos a aire o a disolventes	53

Índice de Cuadros

1. Clasificación de los disolventes de acuerdo a su estructura química	5
2. Propiedades fisicoquímicas del tolueno	6
3. Propiedades fisicoquímicas del xileno	8
4. Propiedades fisicoquímicas del benceno	10
5. Distribución de los receptores adrenérgicos en el corazón	22

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPC	Adenosín monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de Varianza
β_1 -AR	Receptores β_1 -adrenérgicos
ATP	Adenosín trifosfato
Ca ²⁺	Ion calcio
DAG	Diacilglicerol
e.e.	error estándar
ELISA	Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas
ENA	Encuesta Nacional de Adicciones
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GDP	Guanosina difosfato
GTP	Guanosina trifosfato
GPCRs	Receptores acoplados a proteínas G
5-HT ₃	5-hidroxitriptamina
i.p.	intraperitoneal
IP ₂	Fosfatidilinositol 4,5,-bifosfato
IP ₃	Inositol 1,4,5-trifosfato
kDa	kilodaltones
NIDA	Instituto Nacional de Abuso de Drogas
NMDA	N-metil-D-aspartato
ppm	partes por millón
PKC	Proteína cinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVDF	fluoruro de polivinildieno
rpm	revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SNC	Sistema Nervioso Central
TBS-T	Trizma Base Salina Tween
7TM	7 dominios transmembranales
V	Voltios

Resumen

Los inhalables son sustancias volátiles a temperatura ambiente, que se inhalan con el propósito de alterar el estado de conciencia y rara vez son administrados por otra vía que no sea la de la inhalación. En nuestro país se encuentran en segundo lugar de consumo en niños y jóvenes de 12 a 18 años, y en nuestro estado se encuentran en primer lugar de consumo entre estudiantes de preparatoria. Los inhalables se clasifican en cuatro grupos: disolventes volátiles, aerosoles, gases y nitritos. Se puede entrar en contacto con los disolventes de abuso por exposición ocasional, ocupacional y de abuso. El mayor riesgo asociado al abuso de los inhalables es un proceso conocido como muerte súbita por inhalación, el cual ocurre después de haber estado expuesto a los disolventes y ser sometido a alguna situación de estrés, como ser sorprendido por la policía, los padres, etc.; los reportes epidemiológicos indican que el inhalador corre unos cuantos metros y cae muerto repentinamente, pero los mecanismos por los cuales se produce no se conocen con exactitud. Sin embargo, estudios anteriores reportan que las arritmias cardíacas, debido a una “sensibilización” del corazón a la adrenalina son probablemente la causa más común de muerte. La hipótesis de este estudio fue que la exposición a disolventes de abuso produce una hiperreactividad del corazón a la adrenalina en un modelo animal de rata, lo cual se relaciona con alteraciones en la expresión de los receptores adrenérgicos cardíacos. Se utilizaron ratas macho Wistar, los cuales fueron expuestos previamente a 6000 ppm de tolueno, xileno o benceno dos veces al día por treinta minutos durante 7 días en la fase subaguda y dos veces al día por treinta minutos durante 4 semanas en la fase crónica. Utilizando la técnica de Langendorff se aisló y perfundió el corazón. Se construyeron curvas concentración-respuesta a la adrenalina (1×10^{-9} M - 1×10^{-4} M) en ausencia y en presencia de los antagonistas adrenérgicos propranolol (1×10^{-7} M) y prazosina (1×10^{-7} M). Como control fueron usadas ratas expuestas a aire. Los resultados mostraron que en la exposición subaguda hay un aumento en la presión de perfusión, mientras que la exposición crónica produjo tolerancia a los efectos producidos por los disolventes en la exposición subaguda. La exposición crónica a tolueno y a xileno y la exposición subaguda a tolueno, ocasionaron un aumento en la fuerza de contracción ventricular del corazón aislado de rata y la exposición crónica a tolueno, xileno o benceno generó una disminución en la densidad de los receptores β_1 adrenérgicos en el ventrículo, debido a una desensibilización de estos receptores por la exposición crónica a los disolventes. Los efectos anteriores podrían contribuir, al menos en parte, a la presentación de arritmias cardíacas generadas por la sensibilización a la adrenalina y, en consecuencia, a la muerte súbita por inhalación.

ABSTRACT

Inhalants are volatile substances at room temperature that are inhaled with the purpose of altering the state of consciousness and rarely are abused by routes other than inhalation. In our country, inhalants are the second most-used drug between street children and teenagers and in our state inhalants are the main drugs used between high school students. Inhalants are classified in four categories: volatile solvents, aerosols, gases and nitrites. People can come in contact with solvents through occasional exposure, occupational exposure and exposure during abuse episodes. The biggest risk associated with inhalant abuse is a process known as sudden sniffing death, which occurs after being exposed to solvents and be subjected to any stressful situation, such as being caught by the police, parents, etc.; epidemiologic reports indicate that the inhaler runs few feet and drops dead suddenly, but the mechanisms by which these effects are produced are still unknown. However, early studies report that cardiac arrhythmias due to 'sensitization' of the heart to epinephrine is probably the most common cause of death; based on this evidence, in the present work we tested the hypothesis that exposure to abused solvents produces an increase in the reactivity of the heart to the effect of epinephrine, which is associated with alterations in the expression of cardiac adrenergic receptors. Male Wistar rats were used and previously exposed to 6000 ppm of toluene, xylene or benzene during 30 minutes, twice a day for 7 days in the subacute phase and for 30 minutes, twice a day for 4 weeks in the chronic phase. Concentration-response curves to epinephrine (adrenergic agonist: 1×10^{-9} M - 1×10^{-4} M) were constructed in the absence and presence of antagonist propranolol (1×10^{-7} M) and prazosin (1×10^{-7} M) and were used as control rats exposed to air. The results showed that in the subacute exposure there is an increase perfusion pressure, while chronic exposure produced tolerance to the effects produce by subacute solvents exposure. Chronic exposure to toluene and xylene and the subacute exposure to toluene, caused an increase in the ventricular contraction force of isolated rat heart, and chronic exposure to toluene, xylene or benzene caused a decreased in the density of the β_1 adrenergic receptors in the ventricle due to a desensitization of these receptors by chronic exposure to solvents. These effects may contribute, at least in part, to the production of cardiac arrhythmias generated by sensitization to epinephrine and, consequently, sudden sniffing death.

I. ANTECEDENTES.

1.1 INHALABLES

1.1.1 DEFINICION

Los inhalables son sustancias volátiles a temperatura ambiente, que cuando se inhalan pueden producir un estado alterado de conciencia (Cruz y col., 2003a) y raramente son administrados por otras rutas o vías que no sean la inhalación (Gauthereau y col., 2009).

1.2 GENERALIDADES

En México, el abuso de disolventes inicialmente 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, y este no se consideraba como grupo de alto riesgo (Medina-Mora y col., 1995).

De acuerdo a un estudio realizado en el 2012 que se basa en la encuesta nacional de adicciones del 2011 (ENA), señala que en la población adolescente la marihuana es la droga de mayor consumo (2.4%), le siguen los inhalables (0.9%) y la cocaína (0.7%) son las principales drogas de consumo entre los jóvenes de 12 a 17 años (ENA, 2011; Villatoro, 2012). (Fig. 1)

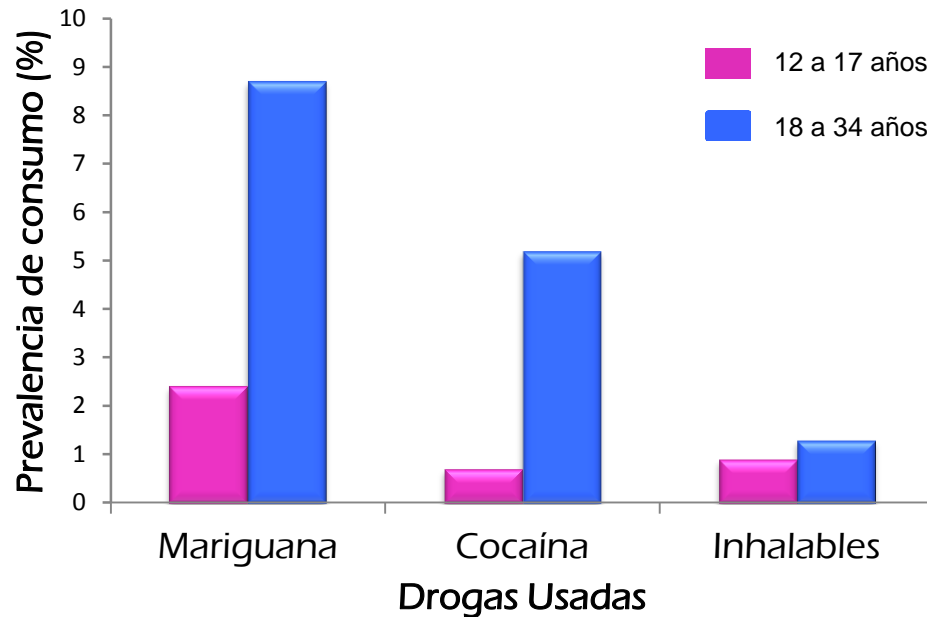


Figura 1. Encuesta Nacional sobre porcentaje de jóvenes de 12 a 25 años que consumen drogas por grupos de edad de inicio para cada tipo de sustancia (Tomado y modificado de Villatoro, 2012).

En el estado de Michoacán, durante el año 2003 se llevó a cabo una encuesta sobre el consumo de drogas ilegales, por lo menos alguna vez en la vida, en la comunidad escolar de menores de 14 años, dando a conocer que los inhalables se encuentran en primer lugar de consumo entre este grupo de población, aproximadamente con un 6.5% de prevalencia de uso (Enc. Nac. Uso de drogas en estudiantes, Mich) (Fig. 2).

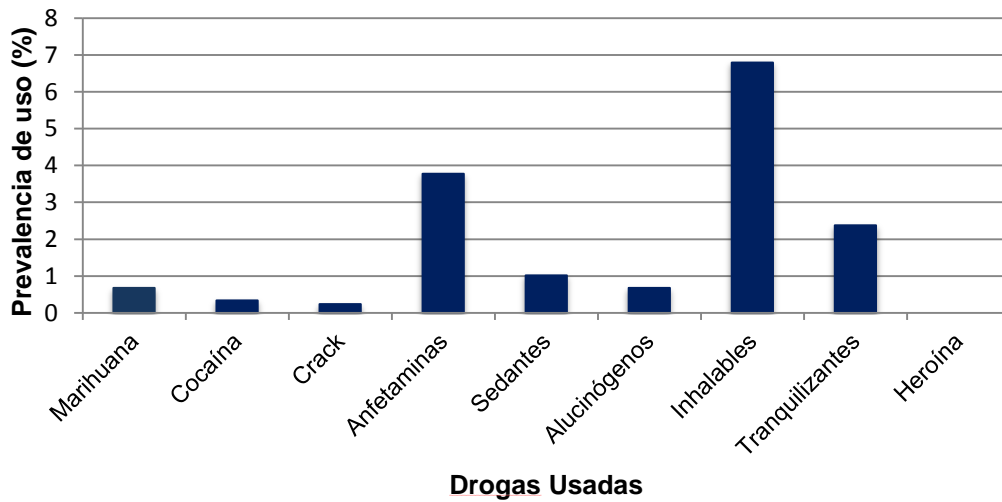


Figura 2. Uso de drogas (alguna vez) entre la comunidad escolar de menores de 14 años en Michoacán (Tomado y modificado de (Enc. Nac. Uso de drogas en estudiantes, Mich).

En un estudio realizado en la ciudad de México en el 2006, los inhalables ocuparon el segundo lugar entre las sustancias de abuso con una prevalencia del 6.7%, por encima de la cocaína, entre los estudiantes de preparatoria (Villatoro y col., 2011) (Fig. 3).

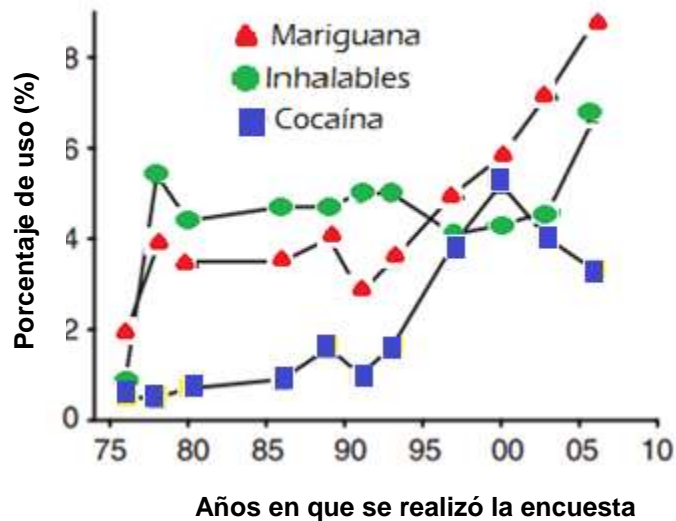


Figura 3. Tendencia en el uso inadecuado de los disolventes volátiles entre estudiantes de preparatoria en la ciudad de México (Tomado y modificado de Villatoro 2011)

Los disolventes se encuentran dentro de un grupo numeroso de componentes usados en la industria y en productos domésticos y tienen la característica de que disuelven la grasa y son usualmente líquidos con presiones de vapor altas, puntos de ebullición relativamente bajos y altamente lipofílicos (Cruz y Bowen, 2008).

Los disolventes, el adelgazador de pinturas (“thinner”) y los pegamentos son las sustancias volátiles que de manera frecuente se usan incorrectamente entre la población en general y por estudiantes. En México, es común el uso del “activo”, el cual es una formulación enriquecida de tolueno distribuida por traficantes de drogas. El “activo”, que a veces es tolueno casi puro, es considerado por los usuarios de drogas menos dañino y que produce “resacas más suaves” que otros disolventes (Cruz, 2011).

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 (Arlien-Søborg, 1992; ATSDR, 1994).

1.2.1 CLASIFICACIÓN DE LOS INHALABLES

De acuerdo a la definición de inhalables, podemos ver que ésta, abarca una amplia gama de sustancias químicas encontradas en cientos de productos diferentes, que pueden tener diversos efectos farmacológicos, por lo que el NIDA proponen cuatro categorías generales para clasificar a los inhalables: disolventes volátiles, aerosoles, gases y nitritos; basándose en la forma en la que éstos a menudo se encuentran en los productos domésticos, industriales y médicos (NIDA, 2004).

1. **Disolventes volátiles:** Son líquidos que se evaporan a temperatura ambiente. Se encuentran en una gran variedad de productos económicos que se pueden obtener fácilmente y que son de uso común en el hogar y en la industria. Esta categoría incluye a los removedores de pinturas, líquidos para lavado en seco, quitagrasas, gasolinas, pegamentos, líquidos correctores y marcadores con punta de fieltro.

2. **Aerosoles:** Son formas comerciales 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.
3. **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 en los encendedores de butano, los tanques con gas propano y los que se usan para enfriamiento como refrigeradores.
4. **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 sobre los vasos sanguíneos al dilatarlos 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 (NIDA, 2004).

De acuerdo con su estructura química, Los disolventes volátiles se clasifican en varios grupos como se resume en el cuadro 1. (Cruz y col., 2003b). (Tabla 1):

Tabla 1. Clasificación de los disolventes de acuerdo a su estructura química

Grupo	Ejemplos
Hidrocarburos alifáticos	Hexano, heptano
Hidrocarburos aromáticos	Benceno, tolueno, xileno, alquilbencenos
Hidrocarburos halogenados	1,1,1-tricloroetano (TCE), cloroformo, fluorotil
Hidrocarburos cíclicos	Ciclohexano
Alcoholes	Etanol, metanol
Éteres	Dietil éter, isopropil éter
Esteres	Etil acetato, isopropil acetato
Aldehídos	Formaldehído, acetaldehído
Cetonas	Acetona, metil,etil-cetona, ciclohexanona

Modificado de Ayres y Taylor, 1989.

Los disolventes se encuentran en productos de uso comercial, 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 cual los convierte en drogas de abuso de fácil acceso (Cruz y col., 2003a).

1.2.2 TOLUENO

1.2.2.1 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

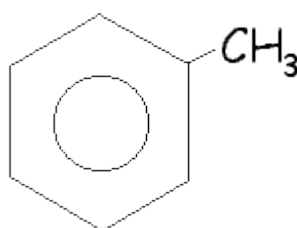


Figura 4. Estructura química del Tolueno

El tolueno, conocido también como metilbenceno, fenilmetano, 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 (ATSDR, 2000) (Fig. 4; Tabla 2)

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas del tolueno (Tomado y modificado de ATSDR, 2000)

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

1.2.2.2 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 (ATSDR, 2000). La gasolina contiene de 5 a 7 % de tolueno, el cual también está presente en el humo del cigarro, pudiendo absorber el fumador de 80 a 100 µg de este solvente por cigarro (Cruz y Bowen, 2008). El tolueno se adiciona a los combustibles como antidetonante, se usa en la fabricación de pinturas, lacas, diluyentes de pinturas, barniz para las uñas, adhesivos, caucho y en algunos procesos de impresión y del cuero curtido y además es el producto de partida en la síntesis del TNT (2, 4,6-trinitrotolueno).

1.2.2.3 FARMACOCINÉTICA

El tolueno se absorbe fácilmente por los pulmones y el tracto gastrointestinal y en menor grado por la piel. La absorción por los pulmones depende del volumen respiratorio, la concentración en el aire del tolueno, el tiempo de exposición, coeficiente de partición (sangre/aire), la transportación en la sangre, la solubilidad en los tejidos y la 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 (Arlie-Søborg, 1992).

Después de ser absorbido, el tolueno es ampliamente distribuido a los diferentes tejidos, dependiendo del coeficiente de partición, la perfusión en el órgano, la duración de la exposición y la velocidad de eliminación (Arlie-Søborg, 1992). El tolueno absorbido es distribuido a la sangre y a los tejidos ricos en lípidos y ampliamente vascularizados como el cerebro, hígado y pulmones (ATSDR, 2000).

En el hígado, el tolueno es oxidado a ácido benzoico (aproximadamente 80%) vía alcohol bencílico y benzaldehído. El ácido benzoico se conjuga casi en su totalidad con la glicina para formar ácido hipúrico y es excretado en la orina (Arlie-Søborg, 1992; Cruz, 2008). Por su parte, sólo una pequeña parte del tolueno se conjuga con el ácido glucurónico y se excreta en la orina como

glucuronato benzoico. (Arlie-Søborg, 1992). El ácido hipúrico es el principal metabolito del tolueno y puede ser usado como un marcador biológico de la exposición a tolueno en sangre y orina (Cruz, 2008). También pueden detectarse en la orina pequeñas cantidades de *o*-cresol (0.1%) y *p*-cresol (1 %).

1.2.3 XILENO

1.2.3.1 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

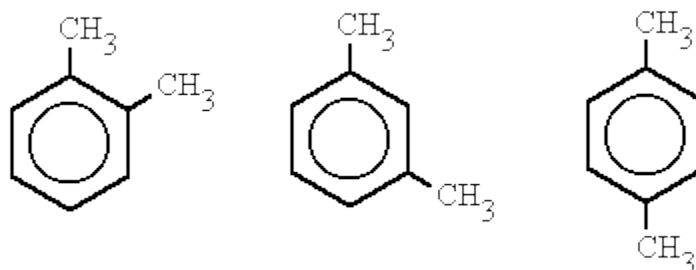


Figura 5. Estructura química del Xileno

El xileno es el nombre con el que se conoce a los dimetilbencenos. Según la posición relativa de los grupos metilo en el anillo de benceno, se diferencia entre orto-, meta- y para-xileno (o con sus nombres sistemáticos 1,2-; 1,3-; y 1,4-dimetilbenceno). Se trata de líquidos incoloros e inflamables con olor dulce. El xileno también se conoce como xilol o dimetilbenceno (ATSDR, 2000) (Fig. 5; Tabla 3).

Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas del xileno (Tomado y modificado del ATSDR, 2000).

Propiedad	Información
Peso Molecular	106.2 g/mol
Color	Incoloro
Estado Físico	Líquido
Punto de Fusión	o-xileno: -25 °C m-xileno: -18 °C p-xileno: 13 °C
Punto de Ebullición	o-xileno: 144 °C m-xileno: 139 °C p-xileno: 138 °C
Densidad	1.02 g/ml

1.2.3.2 USOS

Los xilenos se encuentran en los gases del coque, en los gases obtenidos en la destilación seca de la madera (de allí su nombre: xilol significa madera en griego) y en algunos petróleos. Se utiliza principalmente como disolvente en la impresión, el caucho y las industrias de cuero, también se usa ampliamente como agente de limpieza, como diluyente para pintura y en barnices. En menor medida es usado como materia en industria química, plásticos y fibras sintéticas, y como ingrediente en el revestimiento de telas y papeles. Los isómeros se utilizan en la fabricación de ciertos polímeros, tales como los plásticos y se encuentra en menor cantidad en el combustible de avión y en la gasolina (ATSDR, 2000).

1.2.3.3 FARMACOCINÉTICA

La absorción del xileno ocurre por la inhalación de los vapores y por contacto de la piel con la forma líquida. La retención pulmonar de los vapores del xileno en el hombre alcanza aproximadamente el 60–65% de la cantidad inhalada (Lauwerys, 1984).

En el hombre se ha calculado que se metaboliza aproximadamente el 95% del xileno absorbido y solamente del 3% al 6% se excreta inalterado en el aire espirado (Lauwerys, 1984).

Se pueden detectar vestigios de xileno en todos los órganos y, en especial, en las glándulas suprarrenales, la médula ósea, el bazo y el tejido nervioso. El xileno se oxida en el organismo para formar ácidos toluicos (ácidos *o*-, *m*- y *p*-metilbenzoico), que a su vez reaccionan con la glicina y el ácido glucurónico (Mager y col., 2008).

La ruta metabólica principal es la oxidación del ácido toluico correspondiente (ácido metilbenzoico). En el hombre, estos ácidos se conjugan principalmente con la glicina para formar ácidos *o*-, *m*- y *p*-metilhipúricos (ácidos tolúricos), que se excretan en la orina. También tiene lugar la hidroxilación del anillo aromático *in*

vivo con la formación de los xilenoles, estimándose que en el hombre es inferior al 2% del xileno absorbido (Lauwerys, 1984).

1.2.4 BENCENO

1.2.4.1 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

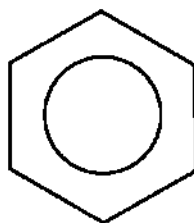


Figura 6. Estructura química del Benceno

El benceno es un líquido incoloro de olor característico y dulce. Se evapora en contacto con el aire rápidamente y es poco soluble en agua. Es altamente inflamable y se forma tanto por procesos naturales como por actividades humanas (ATSDR, 2007). Se conoce con los sinónimos de anuleno, bencina, benzol y ciclohexatrieno (Fig. 6, Tabla 4).

Tabla 4. Propiedades fisicoquímicas del benceno (Tomado y modificado del ATSDR, 2000).

Propiedad	Información
Peso Molecular	78.11 g/mol
Color	Incoloro
Estado Físico	Líquido
Punto de Fusión	5.5 °C
Punto de Ebullición	80.1 °C
Densidad	0.8789 g/ml

1.2.4.2 USOS

El benceno se obtiene a partir del petróleo mediante procesos industriales como la reformación catalítica, entre otros. Es un buen disolvente de lacas,

barnices, ceras, resinas, plásticos, hules y aceites. También es utilizado como aditivo de gasolina (NIDA, 2004).

1.2.4.3 FARMACOCINETICA

La absorción del benceno ocurre principalmente por la inhalación de los vapores y en segundo lugar a través del contacto en su estado líquido con la piel (Lauwerys, 1983).

En un estudio con voluntarios expuestos a benceno se encontró que la absorción del benceno era aproximadamente del 50%, encontrándose los niveles más elevados de benceno en el tejido adiposo y en la médula ósea, debido a su elevada lipofilicidad (Lauwerys, 1983).

Una fracción del benceno absorbido se excreta inalterada en el aire exhalado. Varios autores encontraron que, en el hombre, la fracción eliminada en el aire exhalado varía entre el 10% y el 50%, dependiendo de la actividad metabólica y la cantidad de grasa. La fracción restante se metaboliza (Lauwerys, 1983).

La primer reacción metabólica es la transformación del benceno en epóxido benceno, este compuesto intermediario se puede unir a los constituyentes celulares (p.e.: ADN o proteínas) o se transforma en otros derivados del benceno. El epóxido benceno parece ser el responsable de la acción mielotóxica del benceno. El epóxido puede ser transformado no enzimáticamente en fenol, conjugándose después con ácido glucurónico o con el anión sulfato, los glucurono y sulfoconjugados del fenol se excretan por la orina. El fenol (libre o conjugado) constituye el principal metabolito urinario del benceno (Lauwerys, 1983).

1.2.5. TIPOS DE EXPOSICIÓN A LOS DISOLVENTES

Se puede entrar en contacto con los disolventes de muchas maneras: en el hogar, en el trabajo o por inhalación intencional con el objetivo de alterar el estado de ánimo. Las exposiciones casuales incluyen exposiciones ocasionales, esto quiere decir, episodios breves de 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: limpiadores 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 50 ppm para el caso del tolueno, en el lugar de trabajo y durante tiempos prolongados, aproximadamente 6 o más horas al día, cinco días a la semana (Bowen y col., 2006; Cruz, 2011). 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 (Bowen y col., 2006).

Los niveles de exposición durante los episodios de abuso son muchos más altos que las concentraciones presentadas durante las exposiciones ocasionales o las exposiciones ocupacionales típicas. El abuso típico implica de 15 a 20 inhalaciones de concentraciones muy altas de disolvente, en el rango de 20 mil ppm de tolueno, lo cual, ocurre en periodos muy cortos de tiempo (10 – 15 minutos) (Bowen y col., 2006; Cruz, 2011).

Los disolventes volátiles pueden ser aspirados por la nariz o por la boca de diversas maneras (NIDA, 2004):

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

1.2.6. EFECTOS CRÓNICOS DE LOS DISOLVENTES

1.2.6.1. TOLERANCIA, DEPENDENCIA Y SENSIBILIZACIÓN

La administración repetida de drogas de abuso en animales de laboratorio puede producir tolerancia y dependencia física. Se define como tolerancia a la

disminución del efecto de un fármaco en administraciones repetidas o a la necesidad de usar dosis cada vez mayores para obtener el efecto inicial. Se conoce como sensibilización o tolerancia inversa al fenómeno que se produce cuando la administración repetida de la misma dosis del fármaco no disminuye el efecto, sino que lo intensifica (Goudi y Emmett, 1989). La dependencia física se describe como un estado adaptativo que se produce cuando se deja de administrar la droga y que se caracteriza por la presentación de un síndrome de abstinencia específico (Martínez y col., 2003). En la literatura aparecen sólo algunos reportes de los efectos producidos por la administración repetida de disolventes de abuso en animales de laboratorio. Por ejemplo, en un estudio se comparó el efecto hipnótico del tolueno tras una exposición aguda y una exposición crónica, encontrando que la exposición crónica a tolueno aumentó la latencia de presentación del efecto hipnótico en comparación con la latencia observada tras la exposición aguda (Lorenzana y Salas, 1990). También se han realizado estudios que analizan el efecto de la exposición crónica de diferentes disolventes en los modelos de conducta operante. En general, se ha reportado que el tolueno, el TCE y el tricloroetileno, tras un tratamiento agudo, disminuyen el desempeño de los animales en esta prueba. Sin embargo, cuando se administran con una frecuencia crónica, el desempeño de los animales mejora significativamente (Bushnell y Oshiro, 2000; Moser y col., 1985; Rees y col., 1989). Por otro lado, Arito y col., en 1985 administraron tolueno vía i.p. en forma aguda y crónica y observaron diferentes conductas, tales como la actividad locomotora y la ingesta de líquidos. En todos los casos encontraron que la administración crónica de tolueno producía efectos mayores que la administración aguda.

Sólo se dispone de un par de reportes sobre la dependencia física producida por la administración repetida de disolventes como el TCE y el tolueno. En el primer estudio se expuso a ratones a TCE (500 a 4000 ppm) de manera continua durante cuatro días. La supresión de la administración del disolvente produjo convulsiones inducidas al sujetar a los ratones por la cola. La reexposición de los animales a TCE durante el periodo de abstinencia redujo la frecuencia y la gravedad de las convulsiones. Es importante señalar que la exposición a tolueno,

así como la administración de etanol, pentobarbital y midazolam, suprimió también las convulsiones producidas por la abstinencia a TCE (Evans y Balster, 1993). Posteriormente, en un trabajo similar, Wiley y col., en el 2003 reportaron que la administración repetida a tolueno (250 ppm / 4 días) produce también este síndrome de abstinencia. Sin embargo, se requieren de muchos más estudios en los que se evalúen los efectos de exposiciones breves pero repetidas a concentraciones altas de disolventes, como sucede en los casos de abuso.

1.2.7. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS DISOLVENTES

Desde hace muchos años, se ha observado que los disolventes de abuso muestran similitudes farmacológicas con los depresores clásicos del SNC, como lo son los barbitúricos, las benzodiazepinas y el etanol, por lo que se consideró importante establecer si existían mecanismos celulares en común para estos efectos (Arlie-Søborg, 1992).

En 1998, Cruz y colaboradores estudiaron los efectos del tolueno en los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA: formados por las subunidades NR1/2B, NR1/2A o NR1/2C) expresados en ovocitos de rana del género *Xenopus laevis* y encontraron que el tolueno produce una inhibición rápida, casi completa y reversible de las corrientes a través de estos canales, demostrando que algunos efectos del tolueno pueden ser debidos a la inhibición de estos receptores, acciones tales como: daño motor, efectos anticonvulsivantes, ansiolíticos y euforia, las cuales son similares a las presentadas por el etanol. En el 2000, Cruz y colaboradores probaron otros disolventes además del tolueno: benceno, m-xileno, etil-benceno, propil-benceno, 1,1,1-tricloroetano (TCE) y el 2,2,2-trifluoroetil éter, conocido como fluorotil y observaron también una inhibición de las corrientes a través de los receptores antes mencionados, excepto con el fluorotil; al igual que con el tolueno, esta inhibición es rápida, casi completa y reversible. Además la inhibición de las corrientes inducidas a través de los receptores NMDA fue dependiente de la dosis y de las subunidades que los conforman. La inhibición se produjo en concentraciones micromolares, aproximadamente de 200 μM y el subtipo del receptor NMDA que fue más sensible al efecto de los disolventes fue el

NR1/2B, en comparación con el subtipo NRI/2A. En cuanto a los disolventes utilizados, los resultados mostraron que de los alquilbencenos propuestos, el TCE fue el inhibidor menos potente de los receptores NMDA y el más potente fue el tolueno (Cruz y col., 1998 y 2000).

Cabe mencionar que la perturbación membranal se produce con concentraciones superiores a 200 mM.

En el 2000, Beckstead y colaboradores examinaron los efectos del tolueno, el tricloroetileno y el TCE en los receptores GABA_A y glicina, como posibles blancos moleculares de los disolventes de abuso. Se mostró que estos inhalables actúan como moduladores alostéricos, aumentando de forma reversible las corrientes inhibitorias mediadas por los receptores GABA_A $\alpha_1\beta_1$ y glicina α_1 , expresados en ovocitos de *Xenopus laevis*, en concentraciones de aproximadamente 200 a 900 μ M. En este estudio se observó que las concentraciones probadas no alteraron la integridad de la membrana celular (Beckstead y col., 2000).

El subtipo de receptor 5-HT₃ es el único receptor serotoninérgico ionotrópico y es un blanco de acción del etanol, por lo cual ha sido también foco de interés en la evaluación del mecanismo de acción de los disolventes. En el 2003, Lopreato y colaboradores estudiaron el efecto del tolueno, del tricloroetileno y del TCE sobre los receptores 5-HT₃ expresados en ovocitos de rana y encontraron que los tres disolventes incrementan las corrientes activadas por la serotonina de manera reversible y dependiente de la dosis, en concentraciones entre 0.3 mM y 2 mM (Lopreato, 2003).

En 2002, Bale y colaboradores demostraron que el tolueno produce una inhibición reversible y dependiente de la concentración de las corrientes inducidas por acetilcolina en los receptores colinérgicos nicotínicos expresados en ovocitos de rana. Los receptores formados por las subunidades $\alpha_4\beta_2$ y $\alpha_3\beta_2$ fueron más sensibles a la inhibición por tolueno que los formados por las subunidades $\alpha_4\beta_4$, $\alpha_3\beta_4$ y α_7 (Bale y col., 2002).

En 2003, Cruz y colaboradores mostraron que concentraciones relativamente bajas de tolueno (300 μM) pueden bloquear los canales de sodio cardiacos humanos expresados en ovocitos de *Xenopus laevis* y se propuso que estos efectos podrían ser los responsables, al menos en parte, de las arritmias cardiacas inducidas por tolueno y de la muerte súbita por inhalación (Cruz y col., 2003).

1.2.8 MUERTE SÚBITA POR INHALACIÓN

El mayor riesgo asociado al abuso de los inhalables es la muerte súbita por inhalación, este síndrome se produce por la inhalación de sustancias volátiles en concentraciones muy altas, que puede inducir ritmos cardíacos irregulares y provocar un fallo cardíaco y la muerte en pocos minutos después de una sesión de inhalación prolongada. La muerte súbita por inhalación puede ocurrir durante la exposición o en las siguientes horas después de la exposición (Shepherd, 1989; NIDA, 2004; Mutlu Vural, 2007).

El mecanismo preciso por el cual se produce la muerte súbita por inhalación no se conoce con exactitud (Taylor y Harris, 1970; Shepherd, 1989; Flanagan, 1994; Wilcosky y Simonsen, 1997), pero efectos indirectos como trauma, aspiración de vómito y asfixia se asocian con el uso de bolsas de plástico, donde predominan las muertes relacionadas con disolventes contenidos en los pegamentos (Flanagan, 1994).

Se han propuesto 4 mecanismos para la muerte súbita asociada al abuso de inhalables: anoxia, depresión respiratoria, inhibición vagal y arritmias cardíacas, estas últimas conllevan a un paro cardíaco o cardiorrespiratorio y parecen ser la causa más frecuente de muerte por abuso de sustancias volátiles (Shepherd, 1989).

Los reportes epidemiológicos existentes indican que, durante un proceso llamado sensibilización cardíaca, la exposición a disolventes en presencia de niveles circulantes elevados de adrenalina puede ocasionar arritmias cardíacas,

siendo este mecanismo la causa aparente de muerte entre muchos inhaladores (Bass, 1970; Shepherd, 1989; Wilcosky y Simonsen, 1991). Frecuentemente, la muerte súbita ocurre después de inhalar algún disolvente de abuso y haberse sometido a ejercicio o 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 y el TCE pueden producir fibrilación ventricular (Wilcosky y Simonsen, 1991). En muchos 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 (Bass, 1970).

Los canales de sodio dependientes de voltaje son los responsables de la despolarización de la membrana y de la conducción del potencial de acción en el corazón. Evidencias existentes sugieren que la inhibición de estos canales podría provocar arritmias cardíacas (Cruz y col., 2003).

1.3.0 RECEPTOR

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) (Neubig y col., 2003).

Existe una gran cantidad de clasificaciones de los receptores, pero la que nos interesa es la clasificación de los receptores en base a su ligando endógeno, por ejemplo: receptores colinérgicos, receptores serotoninérgicos y receptores adrenérgicos, etc. (Jiménez y Campos, 2008).

1.3.1 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 de siete dominios transmembranales (7TM) (Perez., 2012), los cuales median acciones centrales y periféricas de la noradrenalina (norepinefrina) y de la adrenalina (epinefrina). Los receptores adrenérgicos se encuentran en casi todos los tejidos periféricos y en muchas de las poblaciones neuronales dentro del SNC. Tanto la adrenalina como la noradrenalina desempeñan papeles importantes en el control de la presión sanguínea, la fuerza y la velocidad contráctil del corazón, la reactividad de las vías respiratorias y una gran variedad de funciones metabólicas y del SNC.

En 1948, los receptores adrenérgicos fueron primeramente divididos en dos tipos: α y β , basados en sus características farmacológicas, como por ejemplo, la potencia de los agonistas. Basados en evidencias tanto farmacológicas como moleculares, es más claro un esquema de clasificación basado en tres tipos: α_1 , α_2 y β , cada uno es dividido en al menos tres subtipos (Ahlquist, 1948) (Fig. 7).

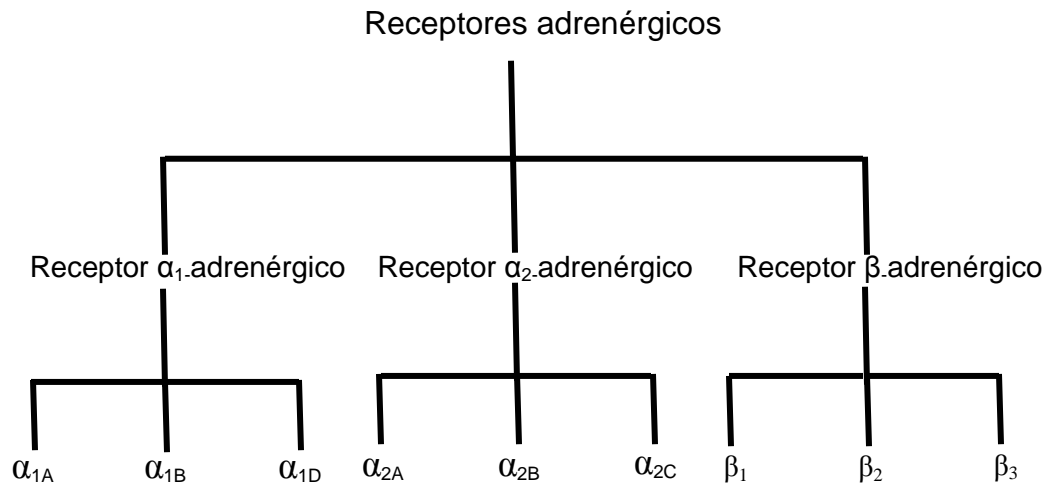


Figura 7. Clasificación de los receptores adrenérgicos (Tomado de Perez y col., 2012)

Los receptores adrenérgicos son receptores acoplados a proteínas G (GPCRs por G protein-coupled receptors), dichas proteínas 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 conforman a las proteínas G son α (39 – 46 kDa), β (37 kDa) y γ (8 kDa), con las subunidades β y γ funcionando como una sola unidad, al formar un complejo estrechamente asociado. La subunidad α 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 α asociada a GDP y unida al complejo $\beta\gamma$ (estado inactivo), y con la subunidad asociada a GTP y dissociada del complejo $\beta\gamma$ (estado activo) (Sánchez-Lemus y col., 2004) (Fig. 8)

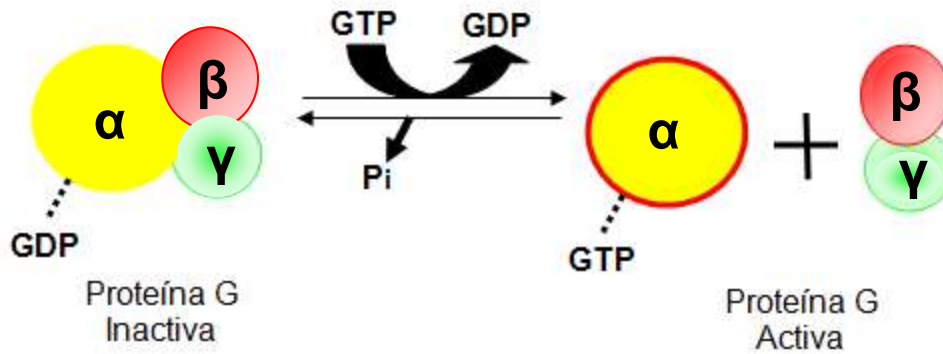


Figura 8. Estado inactivo y activo de la Proteína G (Tomado y modificado de Sánchez-Lemus y col., 2004).

1.3.1.1 RECEPTORES α_1 -ADRENÉRGICOS

Existen tres subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos: α_{1A} , α_{1B} y α_{1D} los cuales han sido caracterizados usando criterios funcionales (farmacológicos), estructurales y transduccionales (Villalobos-Molina e Ibarra, 1996; Villalobos-Molina y col., 1997; Hiraoka y col., 1999; Turnbull y col., 2003; Perez y col., 2012).

Los receptores adrenérgicos α_1 se encuentran en la membrana postsináptica de los órganos efectores y pueden mediar muchos efectos característicos, que se designaron de forma inicial como alfa adrenérgicos, incluida la contracción del músculo liso, principalmente.

Estos receptores están acoplados a proteínas $G_{q/11}$ para estimular la activación de la fosfolipasa C (PLC). Esta enzima cataliza la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (IP_2) y la subsecuente formación de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG) (García-Sáinz y col., 2000). Por su naturaleza hidrofílica, el IP_3 difunde al citosol, mientras que el DAG permanece en la membrana plasmática debido a su naturaleza lipofílica. El IP_3 se une a receptores ionotrópicos localizados en el retículo endoplásmico, induciendo su apertura y, debido al gradiente de concentraciones existente, la salida al citosol de iones de Ca^{2+} . Por su parte, el DAG, por sí mismo o en combinación con iones de Ca^{2+} , activa a la proteína cinasa C (PKC) (Sánchez-Lemus y Arias-Montaño, 2004) (Fig. 9).

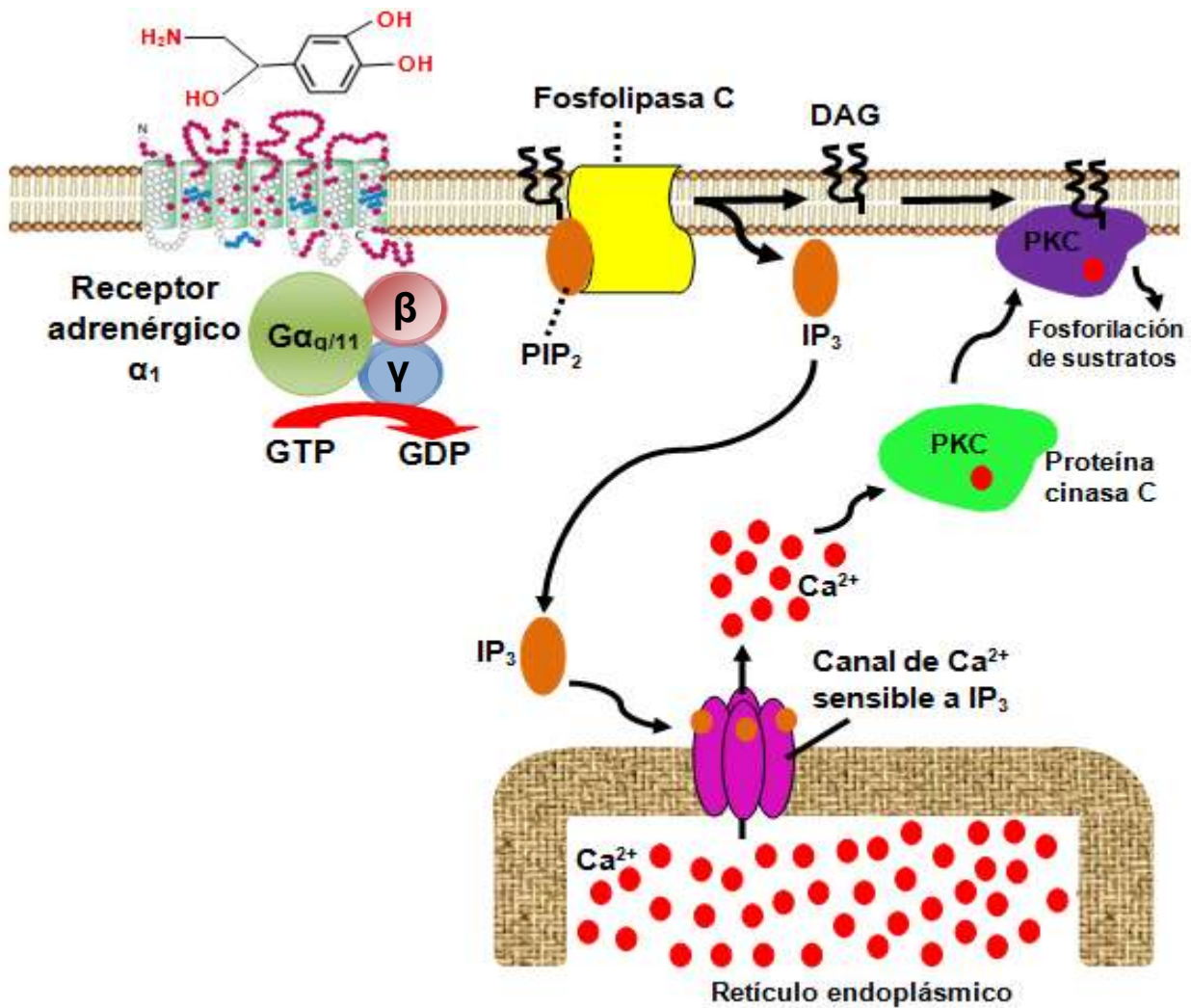


Figura 9. Mecanismo de señalización transduccional para los receptores α_1 -adrenérgicos. (Tomado y modificado de Pérez-Ordaz, 2008).

1.3.1.2 RECEPTORES β_1 ADRENÉRGICOS

Los receptores β -adrenérgicos son proteínas conformadas por 450 a 600 aminoácidos y tienen un peso molecular de 40 a 50 kDa (Domínguez-Vara y col., 2009). Hay 3 subtipos de receptores: β_1 , β_2 y β_3 . Los receptores β_1 y β_2 están ampliamente distribuidos, pero el receptor β_1 es predominante en el corazón y el receptor β_2 se encuentra en músculo liso, como en los vasos sanguíneos y en los bronquios (de Montmollin y col., 2009) (Tabla 5).

Tabla 5. Distribución de los receptores adrenérgicos en el corazón. Modificado de Goodman y Gilman

Órgano o Sistema	Efecto Simpático	Receptor Adrenérgico
Corazón		
Nodo sinoauricular	Aceleración de la frecuencia cardíaca	$\beta_1 > \beta_2$
Aurículas	Incremento en la contractilidad y en la velocidad de conducción	$\beta_1 > \beta_2$
Nodo auriculoventricular	Incremento en la automaticidad y en la velocidad de conducción	$\beta_1 > \beta_2$
Sistema de His-Purkinje	Incremento en la automaticidad y en la velocidad de conducción	$\beta_1 > \beta_2$
Ventrículo	Incremento en la contractilidad y en la velocidad de conducción	$\beta_1 > \beta_2$
Vasos Sanguíneos		
Arterias y arteriolas	Contracción y dilatación	$\alpha_1, \alpha_2; \beta_2$
Coronarias	Contracción y dilatación	$\alpha_1, \alpha_2; \beta_2$

La estimulación simpática del corazón mediante los receptores β_1 adrenérgicos (β -AR) induce efectos inotrópicos (aumento en la fuerza de contracción) y cronotrópicos (aumento en la frecuencia de contracción) positivos, llamados “respuesta de lucha o huida”, el mecanismo más efectivo del incremento agudo de salida del corazón (Grimm y Brown, 2010).

Para que se puedan producir estos efectos, los receptores β_1 -adrenérgicos están acoplados a proteínas G de tipo 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 α_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 (AMPC). Esta molécula se une a las regiones reguladores de la proteína cinasa A (PKA), también conocida como cinasa dependiente de (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 Ca^{2+} (Jiménez y Campos, 2008) (Fig. 10).

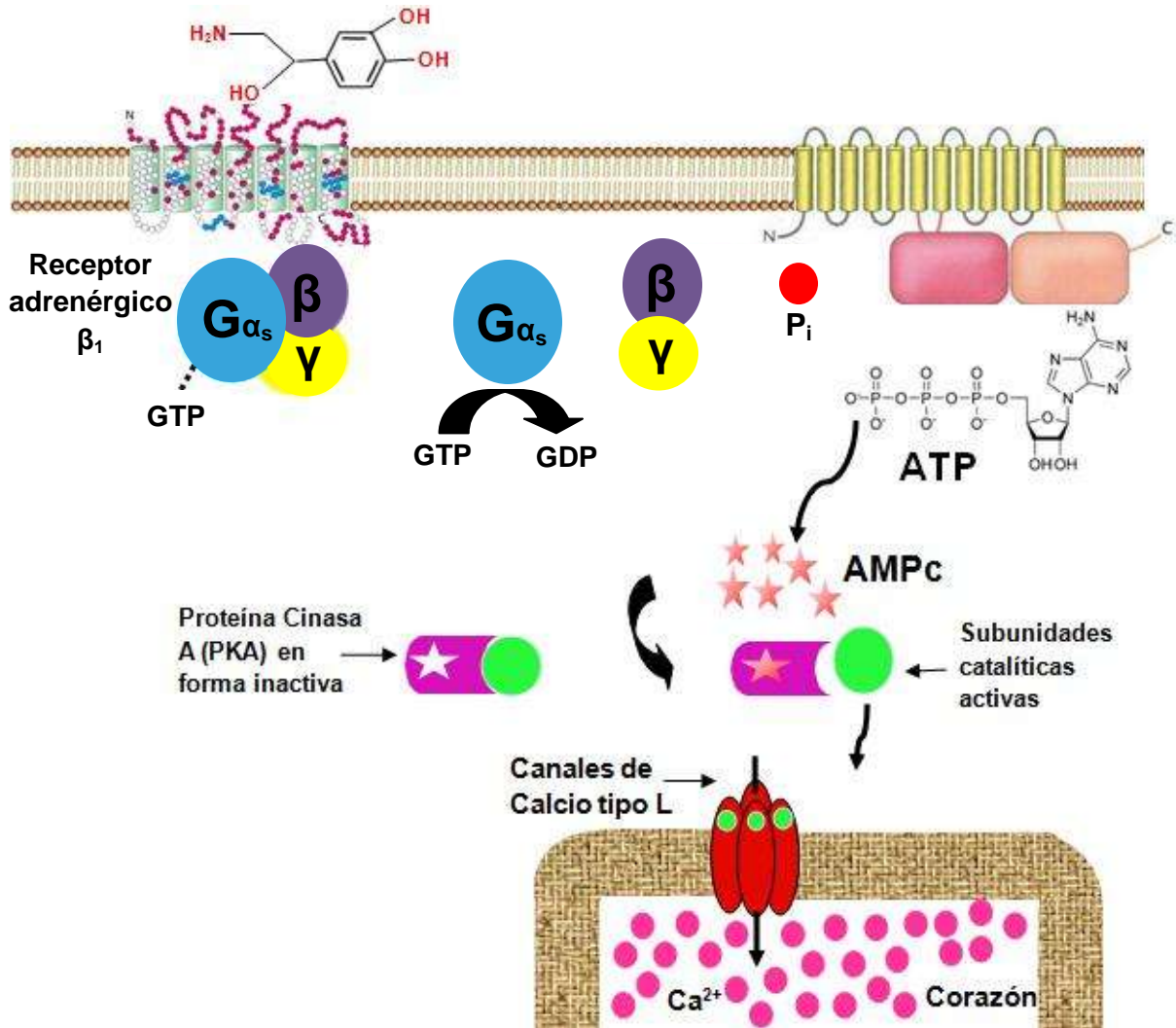


Figura 10. Mecanismo de señalización transduccional para los receptores β_1 -adrenérgicos. Tomado y modificado de Jiménez y Campos, 2008.

1.4.0 EFECTOS CARDÍACOS DE LOS DISOLVENTES DE ABUSO EN MODELOS ANIMALES

Desde 1911, Levy & Lewis 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 microgramos [μ g]), 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 cardíaca dependen de la duración y del grado de anestesia.

En 1937, Meek 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 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 & Chenoweth 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 (pero mucho menos con dietil éter, etanol y acetona) el miocardio fue más irritable cuando se expuso a hormonas simpatomiméticas.

En 1970, Taylor y Harris 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 en 1973, Clark and Tinston, 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 colaboradores 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 la conducción en la aurícula.

II. Justificación

La inhalación de disolventes de abuso representa un problema importante de salud pública en México y, a pesar de los informes epidemiológicos existentes, este grupo de drogas de abuso es el menos estudiado. Otro de los puntos importantes del abuso de disolventes, es que son productos disponibles para cualquier persona, sin importar clase social ni educación, ya que son productos económicos, de fácil acceso a la población y su posesión es legal. Por lo tanto, en la actualidad este problema de salud no sólo es característico de la población de escasos recursos sin la oportunidad de una educación digna, como inicialmente surgió, sino que actualmente cualquier persona en la escuela, en el trabajo, en el hogar o en la calle puede adquirir un producto que contenga en su formulación algún disolvente o una mezcla de disolventes y ser propenso a iniciar el abuso.

Por las evidencias que se tienen hasta el momento, se sabe que los disolventes de abuso, en presencia de catecolaminas endógenas, generan arritmias cardíacas que llevan a la presentación de muerte súbita, pero no se conoce con exactitud el mecanismo preciso por el cual se producen y existe poca información acerca de los efectos cardíacos que pudieran tener los disolventes de abuso.

Además, no se conoce con exactitud el efecto de los disolventes de abuso sobre la respuesta adrenérgica en el corazón en un modelo animal.

Existen limitantes metodológicas y éticas que imposibilitan el estudio, desde el punto de vista farmacológico y molecular, de los receptores adrenérgicos cardíacos en humanos expuestos a disolventes de abuso.

La mayoría de los estudios acerca del efecto de los inhalables se efectúan tratando de simular la exposición ocupacional, es decir, concentraciones bajas de disolventes por tiempos prolongados y se enfocan a las acciones de estas sustancias sobre el sistema nervioso central; sin embargo, los efectos de los inhalables sobre el sistema cardiovascular pueden conducir a la muerte de quienes consumen estas drogas de abuso.

Con base en lo anteriormente expuesto, en el presente proyecto se plantea un esquema experimental que tiene como objetivo imitar el abuso de disolventes en inhaladores, es decir, exposiciones a concentraciones altas de disolventes por lapsos de tiempo cortos, de esta forma se podría abordar el problema desde el punto de vista farmacológico, al estudiar la posible sensibilización a adrenalina en corazones de animales expuestos de manera sub-aguda o crónica a disolventes de abuso, como el tolueno, el xileno y el benceno y desde el punto de vista molecular, por medio del análisis de la expresión proteica de los receptores α_1 y β_1 -adrenérgicos.

Los disolventes que fueron utilizados en el presente proyecto han demostrado ser arritmogénicos y están presentes en gran cantidad en productos comerciales comunes en el hogar, como “thinner”, pegamentos y pinturas en aerosol.

III. Hipótesis

La exposición a disolventes de abuso produce una hiperreactividad del corazón a la adrenalina, lo cual se relaciona con alteraciones en la expresión de receptores adrenérgicos.

IV. Objetivo General

En un modelo animal, investigar el efecto de la exposición sub-aguda y crónica a tolueno, a xileno y a benceno, sobre la reactividad del corazón a la adrenalina y sobre la expresión de receptores adrenérgicos.

V. Objetivos Particulares

1. Estudiar el efecto de la exposición sub-aguda (1 semana) a una concentración de 6000 ppm de tolueno, xileno o benceno sobre la presión de perfusión, la frecuencia cardíaca y la fuerza de contracción ventricular en el corazón aislado de rata.
2. Examinar el efecto de la exposición crónica (4 semanas) a una concentración de 6000 ppm de tolueno, xileno o benceno sobre la presión de perfusión, la frecuencia cardíaca y la fuerza de contracción ventricular en el corazón aislado de rata.
3. Evaluar la expresión proteica de los receptores α_1 y β_1 -adrenérgicos en el corazón de ratas tratadas de manera crónica con los disolventes de abuso (tolueno, xileno y benceno).

VI. Material y Métodos

1. Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, con un peso entre 250 y 300 g, las cuales se mantuvieron bajo ciclo normal de luz-oscuridad de 12:12 h con libre acceso a comida y a agua. Todos los procedimientos experimentales estuvieron de acuerdo a lo que dicta el comité local de ética y siguieron las regulaciones establecidas en la Norma Oficial Mexicana de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio “NOM-062-ZOO-1999”.

2. Disolventes y fármacos

En este proyecto se emplearon: tolueno, benceno y xileno (Reactivos Meyer) como disolventes representativos. Los animales se expusieron a una concentración del disolvente de 6000 ppm, la cual produce claros efectos conductuales en los animales con una recuperación total posterior. Además, se utilizaron adrenalina, propranolol y prazosina (Sigma-Aldrich), cuyas soluciones se prepararon en el momento de ser utilizadas. La adrenalina se preparó mediante una disolución en solución salina al 0.9% y se utilizó en un rango de 1×10^{-9} M – 1×10^{-4} M, el propranolol se utilizó en una disolución en solución salina a una concentración 1×10^{-7} M, la prazosina se utilizó en una concentración de 1×10^{-7} M y como anestésico se utilizó pentobarbital sódico (Pet's Pharma) a una dosis de 55 mg/kg. Los anticuerpos necesarios para biología molecular se adquirieron de Santa Cruz Biotechnology.

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 inyectó una cantidad conocida de disolvente sobre el papel filtro y el ventilador se encendió para permitir la inmediata evaporación y distribución homogénea del disolvente (Fig. 11). 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 (Cruz y col., 2003b; Bowen y col., 2006). 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_{ppm} = concentración a utilizar (ppm).

V_s = 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 * atm * mol⁻¹ * K⁻¹).

T = temperatura absoluta (K).



Figura 11. Cámara de exposición estática

4. Diseño experimental

Este estudio se desarrolló en tres fases experimentales. En la primera, se evaluó el efecto de la exposición subaguda (30 min, 2 veces al día durante 7 días) a la concentración escogida (6000 ppm) de tolueno, benceno o xileno sobre la sensibilización a adrenalina en la preparación de corazón aislado de rata, tipo Langendorff; los grupos ($n=5$) estuvieron integrados como sigue: grupo expuesto a tolueno, grupo expuesto a benceno, grupo expuesto a xileno y un grupo expuesto solamente a aire, tomado como grupo control.

En la segunda fase, se estudió el efecto de la exposición crónica (30 min, 2 veces al día durante 4 semanas) a la concentración escogida (6000 ppm) de tolueno, benceno o xileno sobre la sensibilización a adrenalina en la preparación de corazón aislado de rata, tipo Langendorff. Los grupos son similares a los de la primera fase.

En la tercera fase, al término de los experimentos funcionales, se determinó la expresión proteica de los receptores α_1 y β_1 -adrenérgicos, en el corazón de ratas tratadas de manera crónica (por 4 semanas) por medio de la técnica de Western Blot.

5. 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 (Riascos y col., 2004).

Bajo anestesia profunda, se administró una dosis de heparina (100 UI/Kg) vía i.p., para prevenir la formación de coágulos o trombos en el corazón aislado (Sutherland y col., 2000), una vez que la rata estuvo completamente anestesiada el corazón fue aislado y puesto en una solución de perfusión fría alrededor de 30 s hasta que se colocó en un sistema de órgano aislado tipo Langendorff. El corazón se perfundió con solución de Krebs-Henseleit, el cual imita el contenido iónico de la sangre o el plasma y se mantuvo a un pH de 7.4, burbujeado con 95% de O_2 – 5% de CO_2 a 37 °C. Esta solución tiene la siguiente composición (en mM): NaCl 118.0, KCl 4.70, KH_2PO_4 1.18, $MgSO_4$ 1.66, $CaCl_2$ 2.52, $NaHCO_3$ 24.88, glucosa 24.88 y Ca-EDTA-Na 2.0 (Doring y col., 1988). Se trabajó con un flujo coronario constante de 10 ml/min del perfusado para obtener una presión basal de perfusión. El incremento en la presión de perfusión se midió utilizando un transductor de presión (Grass), adaptado a un sistema de adquisición de datos (Biopac). Los cambios en la presión de perfusión indicaron cambio en la resistencia ventricular y, a la par, se midió la frecuencia cardíaca y la fuerza de contracción ventricular.

El sistema de órgano aislado consiste en: una bomba de recirculación, la cual mantiene todo el equipo a una temperatura de 37°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.

Se obtuvieron curvas concentración-respuesta a la adrenalina, al administrar diferentes bolos crecientes de adrenalina (1×10^{-9} M hasta 1×10^{-4} M), a través de un puerto de inyección en el equipo que llega hasta la cánula insertada en la aorta. Posteriormente, se corrió una segunda curva a la adrenalina, pero ahora en presencia de los antagonistas respectivos propanolol (antagonista de los receptores β adrenérgicos: 1×10^{-7} M) y prazosina (antagonista de los receptores α_1 adrenérgicos: 1×10^{-7} M) contenido en la solución de Krebs-Henseleit, 20 minutos antes y durante la realización de la curva.

6. Análisis por Western Blot de los receptores α_1 y β_1 adrenérgicos en el corazón

a) Homogenización

Los corazones aislados se dividieron en aorta, aurículas y ventrículos, para posteriormente hacer un homogenado 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, dodecil 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. El líquido decantado se desechó.

b) 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 homogenado 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_2CO_3 2% y NaOH 0.4%, solución B: CuSO_4 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.

c) 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 β -mercaptoetanol 20%, y se hirvió (≈ 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 μg) de cada una de las muestras en pozos diferentes, en el primer pozo se cargó 5 μl 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.

d) 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.

e) 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 α_1 -adrenérgico o contra α -actina y con el anticuerpo policlonal de conejo contra el receptor β_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.

f) 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 β_1 - y α_1 -adrenérgicos se expusieron durante 20 seg y las del anticuerpo contra β -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 β -actina (proteína control).

VII. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm error estándar (e.e.) de 5 experimentos (n=5). Las diferencias entre los datos se analizaron por medio de 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 expresaron como la media \pm e.e. de 3 experimentos (n=3). Para el análisis densitométrico se empleó el programa Quantity One. Las gráficas se elaboraron con el programa SigmaPlot (versión 11.0, SPSS Inc.). En todos los casos, se consideró que las diferencias entre los grupos son estadísticamente significativas con un valor de $p < 0.05$.

VIII. RESULTADOS

8.1 EFECTO DE LA EXPOSICIÓN SUBAGUDA Y CRÓNICA A TOLUENO, XILENO O BENCENO SOBRE LA PRESIÓN DE PERFUSIÓN DEL CORAZÓN

La fase subaguda consistió en exposiciones a tolueno, xileno o benceno en una concentración de 6000 ppm 30 minutos, 2 veces al día durante 7 días, mientras que la fase crónica consistió en exposiciones a tolueno, xileno o benceno a 6000 ppm, 30 minutos, 2 veces al día durante 4 semanas consecutivas. En la figura 12 se observan las curvas concentración-respuesta a la adrenalina, donde se hace la comparación entre los resultados de la fase subaguda y la fase crónica; asimismo, en cada fase se hace una comparación de los disolventes probados (tolueno, xileno y benceno) contra el grupo control.

Se muestra que en la fase subaguda (fig. 12a) los corazones de las ratas expuestas a los disolventes tuvieron una presión de perfusión basal mayor en comparación con el grupo control, a diferencia de la fase crónica (fig. 12b) donde los corazones expuestos a disolventes presentaron una presión de perfusión basal similar o menor a la que presentaron los corazones del grupo control (Fig. 12).

El incremento presentado en la presión de perfusión tanto para los corazones expuestos a los disolventes como para los corazones control, fue dependiente de la concentración de adrenalina, es decir, a mayor concentración de adrenalina, mayor el incremento en la presión de perfusión, dicho efecto se observó tanto en la exposición subaguda (fig. 12a) como en la exposición crónica (fig. 12b).

En la fase subaguda (fig. 12a) el tolueno ($p=0.004$) y el benceno ($p=0.016$) fueron diferentes estadísticamente del grupo control y entre los tres disolventes el tolueno ($p=0.031$) mostró una diferencia estadísticamente significativa con respecto al xileno, en cuanto a los efectos que se observaron sobre la presión de perfusión después de la administración de adrenalina. En cambio, en la fase crónica (fig. 12b) el tolueno ($p=0.029$), el xileno ($p<0.001$) y el benceno ($p<0.001$)

mostraron ser diferentes estadísticamente del control, mientras que entre los disolventes no hubo diferencia estadísticamente significativa.

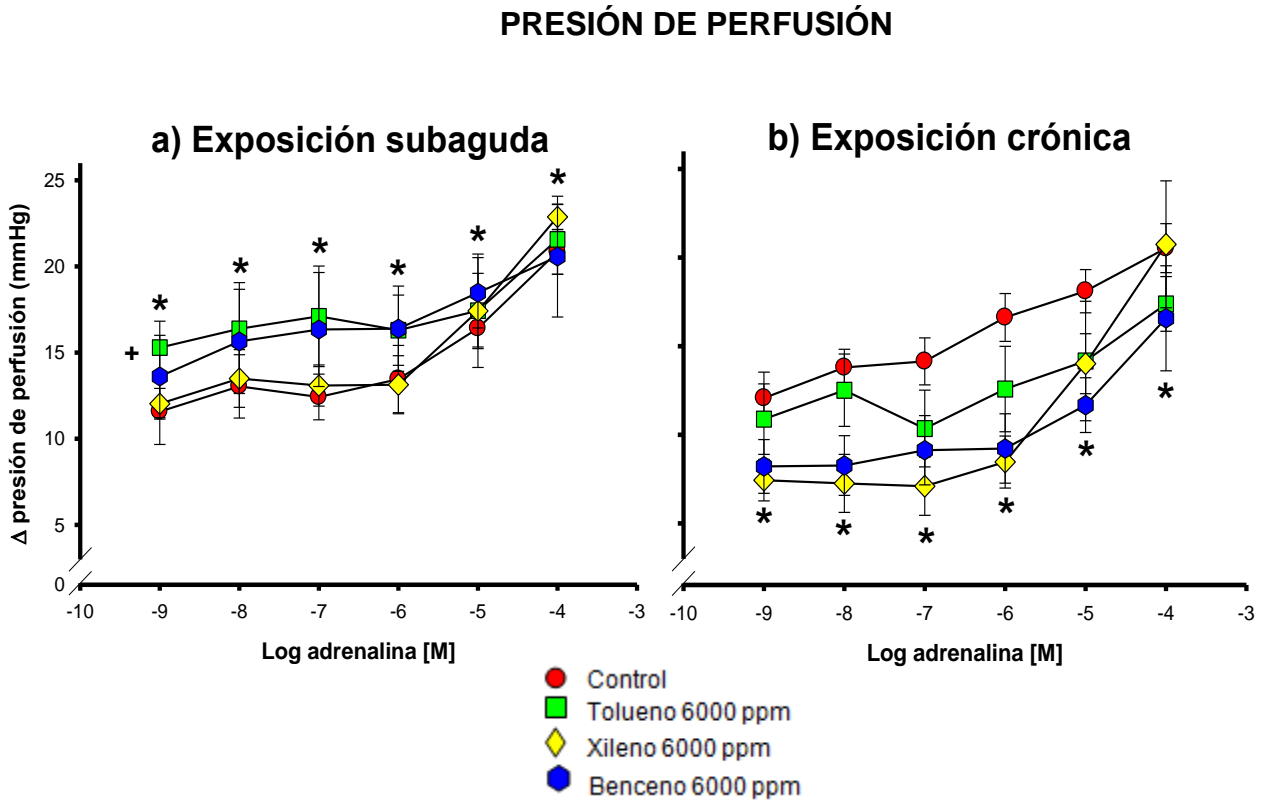


Figura 12. Efecto de las diferentes concentraciones de adrenalina [M] sobre el incremento en la presión máxima de perfusión (mmHg) en corazones expuestos a disolvente (tolueno, xileno o benceno, 6000 ppm) o a aire, en forma subaguda (a) y crónica (b). Los datos se expresan como la media \pm e.e. de 5 experimentos. a): * $p < 0.05$ corazones expuestos a tolueno y benceno vs corazones control, + $p < 0.05$ corazones expuestos a tolueno vs corazones expuestos a xileno; b) * $p < 0.05$ corazones expuestos a los disolventes (tolueno, xileno y benceno) vs corazones control. Prueba de Tukey.

8.1.1. CURVAS CONCENTRACIÓN-RESPUESTA A LA ADRENALINA EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE LOS ANTAGONISTAS

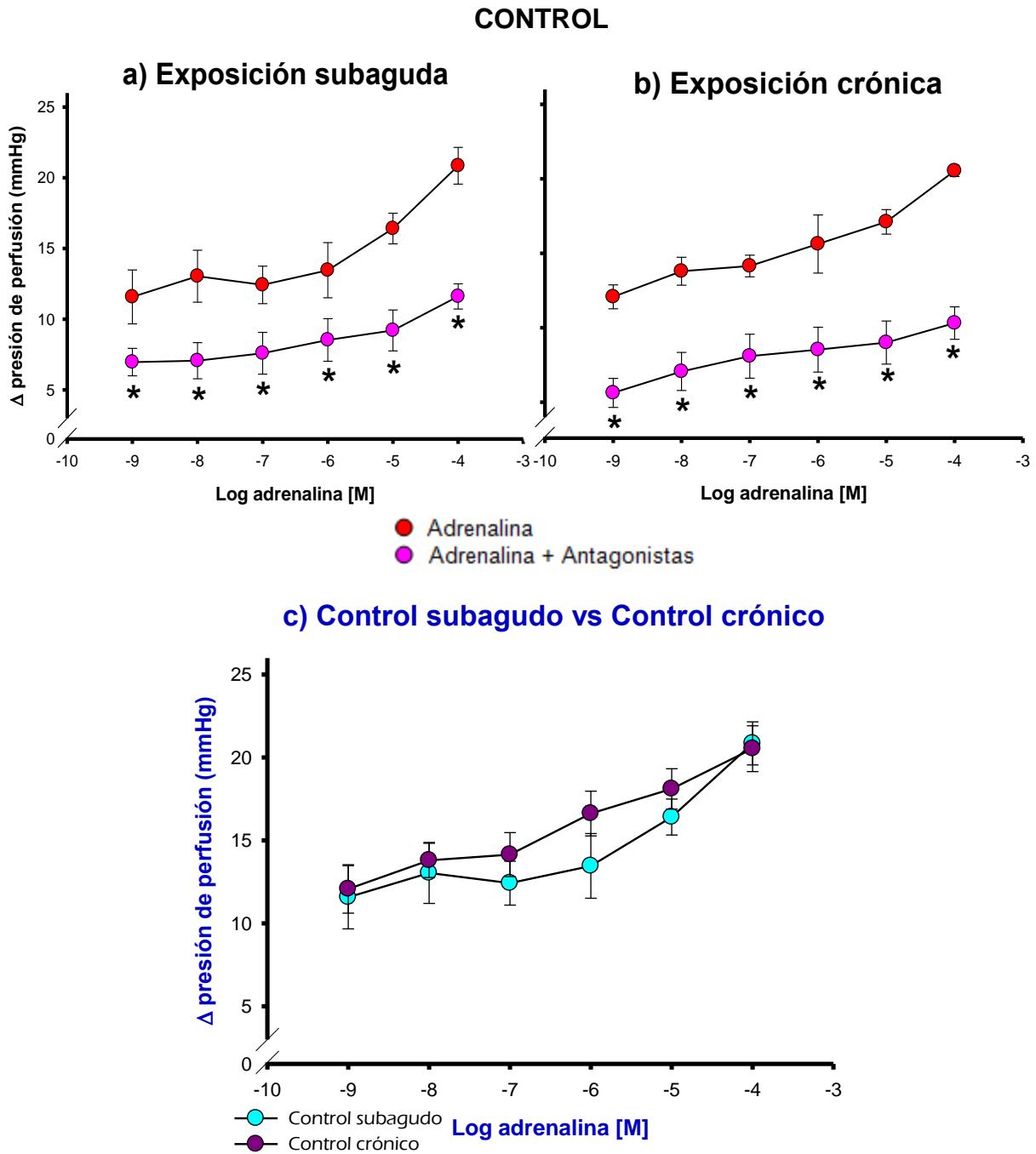
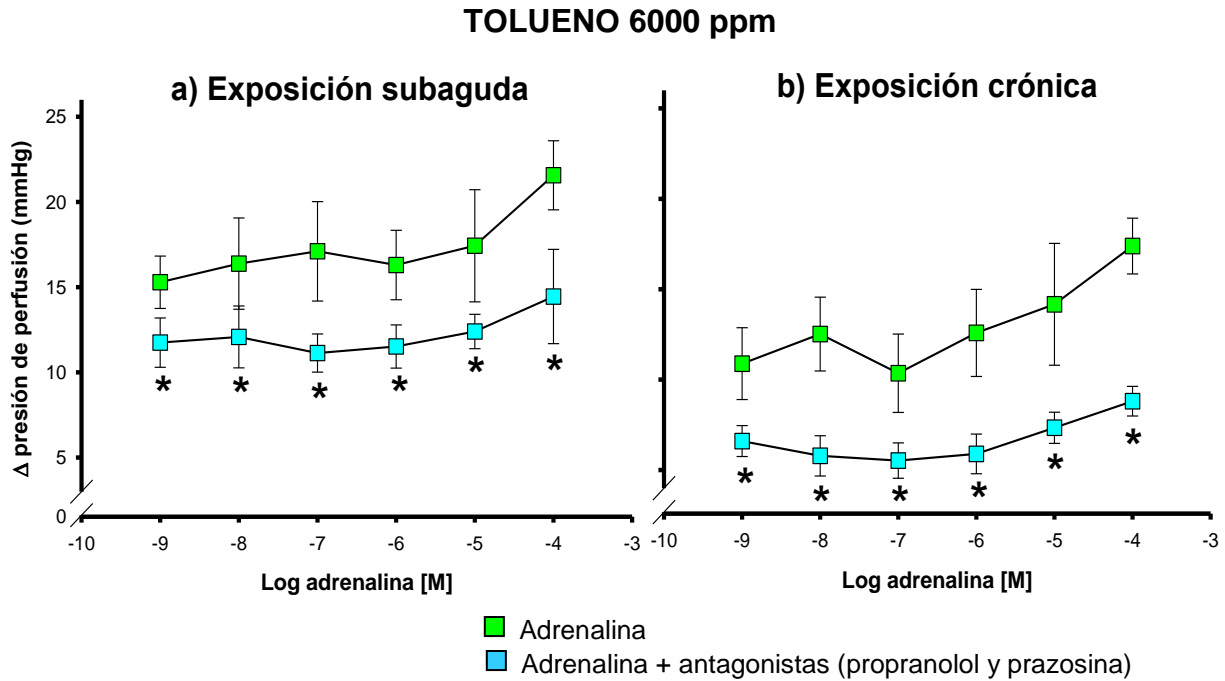


Figura 13. Curvas concentración-respuesta a la adrenalina en ausencia y en presencia de antagonistas adrenérgicos (propranolol [1×10^{-7} M] y prazosina [1×10^{-7} M]) en corazones expuestos a aire de manera subaguda a) y crónica b). Los datos se expresan como la media \pm e.e. de 5 experimentos. * $p < 0.05$ adrenalina vs adrenalina + antagonistas (propranolol y prazosina). c) Comparación entre el efecto producido por la adrenalina tanto en la exposición subaguda como en la crónica, en corazones de animales control (expuestos a aire).



c) Tolueno subagudo vs Tolueno crónico

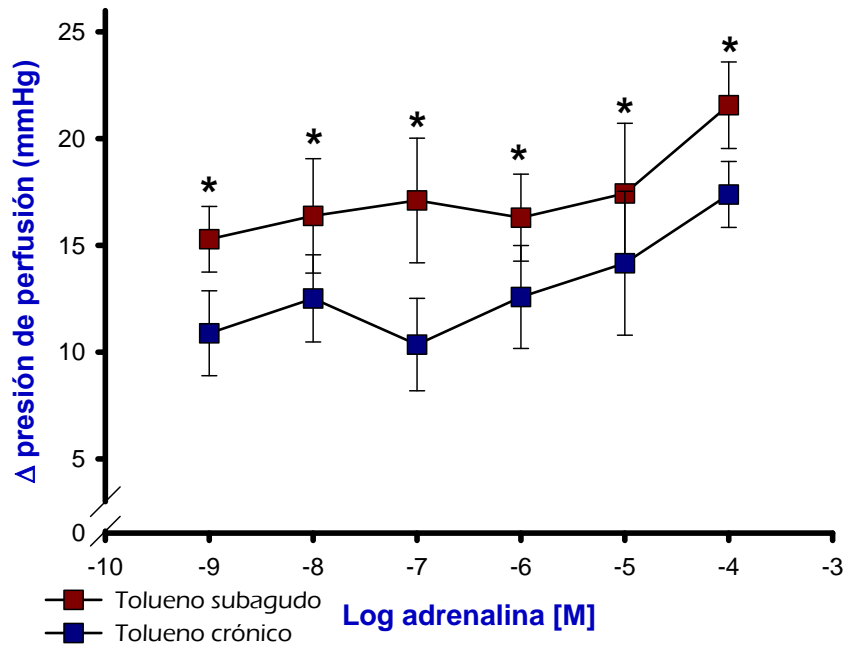
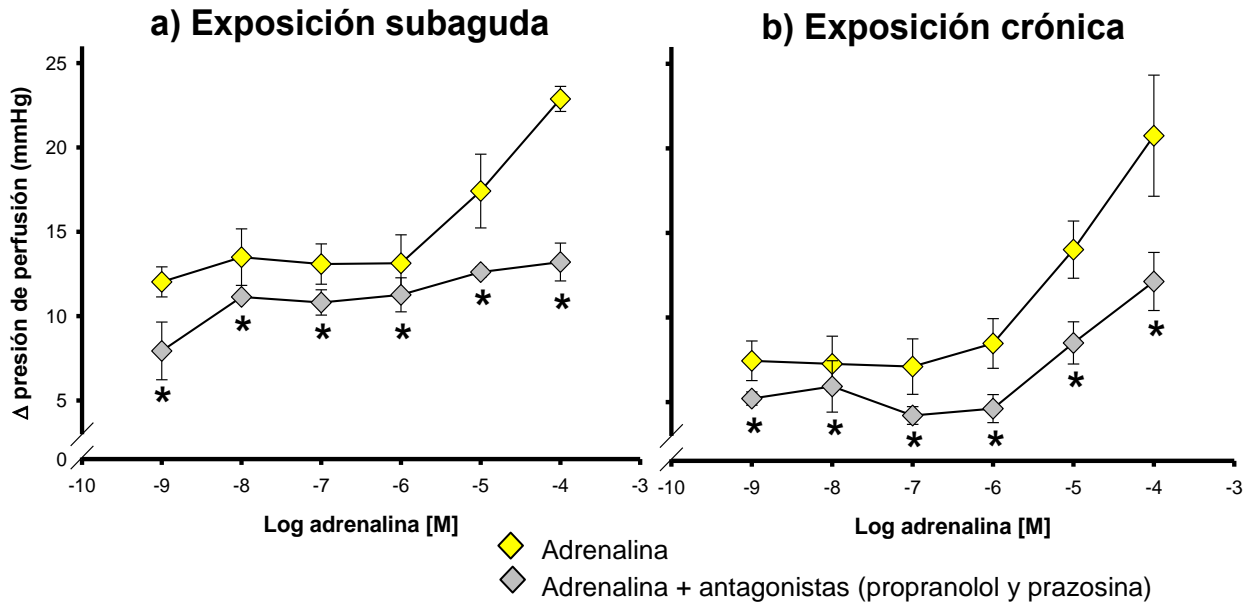


Figura 14. Curvas concentración-respuesta a la adrenalina en ausencia y en presencia de antagonistas adrenérgicos (propranolol [1×10^{-7} M] y prazosina [1×10^{-7} M]) en corazones expuestos a tolueno 6000 ppm manera aguda a) y crónica b). Los resultados se expresan como la media \pm e.e. de 5 experimentos. * $p < 0.05$ adrenalina vs adrenalina + antagonistas (propranolol y prazosina). c) Comparación entre el efecto producido por la adrenalina tanto en la fase subaguda como en la crónica en corazones de animales expuestos a tolueno 6000 ppm. * $p < 0.05$ tolueno subagudo vs tolueno crónico. Prueba de Tukey).

XILENO 6000 ppm



Xileno subagudo vs Xileno crónico

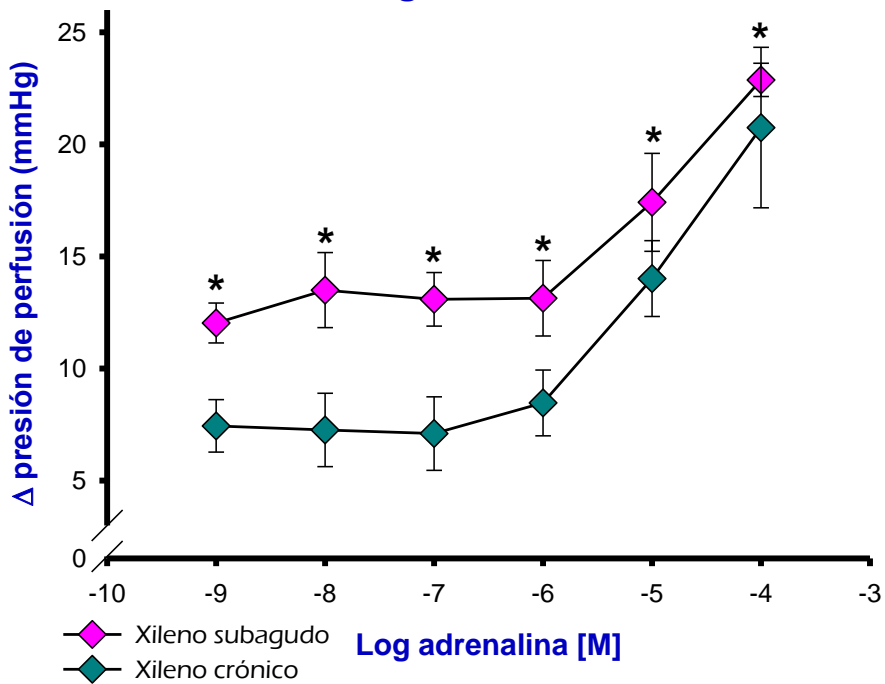


Figura 15. Curvas concentración-respuesta a la adrenalina en ausencia y en presencia de antagonistas adrenérgicos (propranolol [1×10^{-7} M] y prazosina [1×10^{-7} M]) en corazones expuestos a xileno 6000 ppm de manera subaguda a) y crónica b). Los resultados se expresan como la media \pm e.e. de 5 experimentos. * $p < 0.05$ adrenalina vs adrenalina + antagonistas (propranolol y prazosina). c) Comparación entre el efecto producido por la adrenalina tanto en la fase subaguda como en la crónica en corazones de animales expuestos a xileno 6000 ppm. * $p < 0.05$ xileno subagudo vs xileno crónico. Prueba de Tukey).

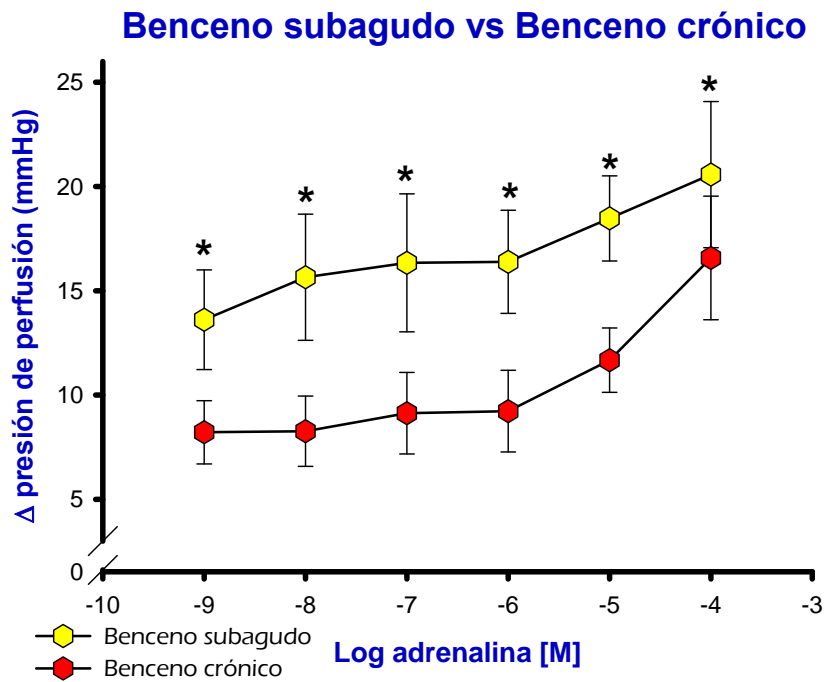
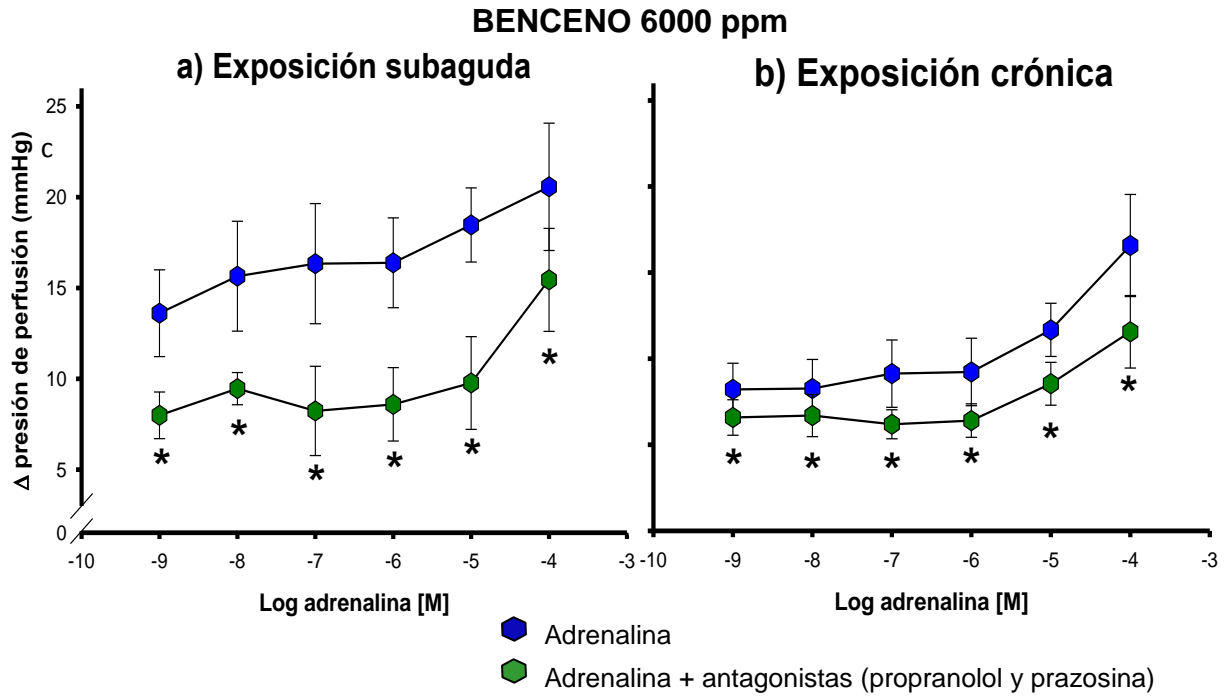


Figura 16. Curvas concentración-respuesta a la adrenalina en ausencia y en presencia de antagonistas adrenérgicos (propranolol [1×10^{-7} M] y prazosina [1×10^{-7} M]) en corazones expuestos a benceno 6000 ppm de manera subaguda a) y crónica b). Los resultados se expresan como la media \pm e.e. de 5 experimentos. * $p < 0.05$ adrenalina vs adrenalina + antagonistas (propranolol y prazosina). c) Comparación entre el efecto producido por la adrenalina tanto en la fase subaguda como en la crónica en corazones de animales expuestos a benceno 6000 ppm. * $p < 0.05$ benceno subagudo vs benceno crónico. Prueba de Tukey).

En las curvas concentración-respuesta a la adrenalina (fig. 13 - 16) se puede apreciar un incremento en la presión de perfusión, dependiente de la concentración de adrenalina, tanto en los grupos expuestos a disolventes como en los grupos control. En presencia de los antagonistas adrenérgicos se puede observar que éstos fueron capaces de bloquear el incremento en la presión de perfusión en respuesta a la administración de adrenalina en los corazones expuestos a los disolventes y en los corazones control.

Por su parte, al comparar los resultados de la exposición subaguda con la exposición crónica, se puede observar que los corazones de las ratas expuestas a los disolventes de manera subaguda mostraron un incremento en la presión de perfusión mayor al que presentaron los corazones expuestos a disolventes en la fase crónica (fig. 14 - 16). Además, hubo una disminución estadísticamente significativa en el incremento en la presión de perfusión de los corazones expuestos de manera crónica a los disolventes, con respecto a los corazones de la exposición subaguda: tolueno ($p<0.001$), xileno ($p=0.001$) y benceno ($p<0.001$).

8.2 EFECTO DE LA EXPOSICIÓN SUBAGUDA Y CRÓNICA A TOLUENO, XILENO O BENCENO SOBRE LA FRECUENCIA CARDÍACA

La figura 17 muestra la frecuencia cardíaca en corazones de animales expuestos a disolventes o a aire de manera subaguda (a) y crónica (b), donde se puede observar que hay un aumento, dependiente de la concentración de adrenalina, en la frecuencia cardíaca de todos los grupos experimentales.

FRECUENCIA CARDÍACA

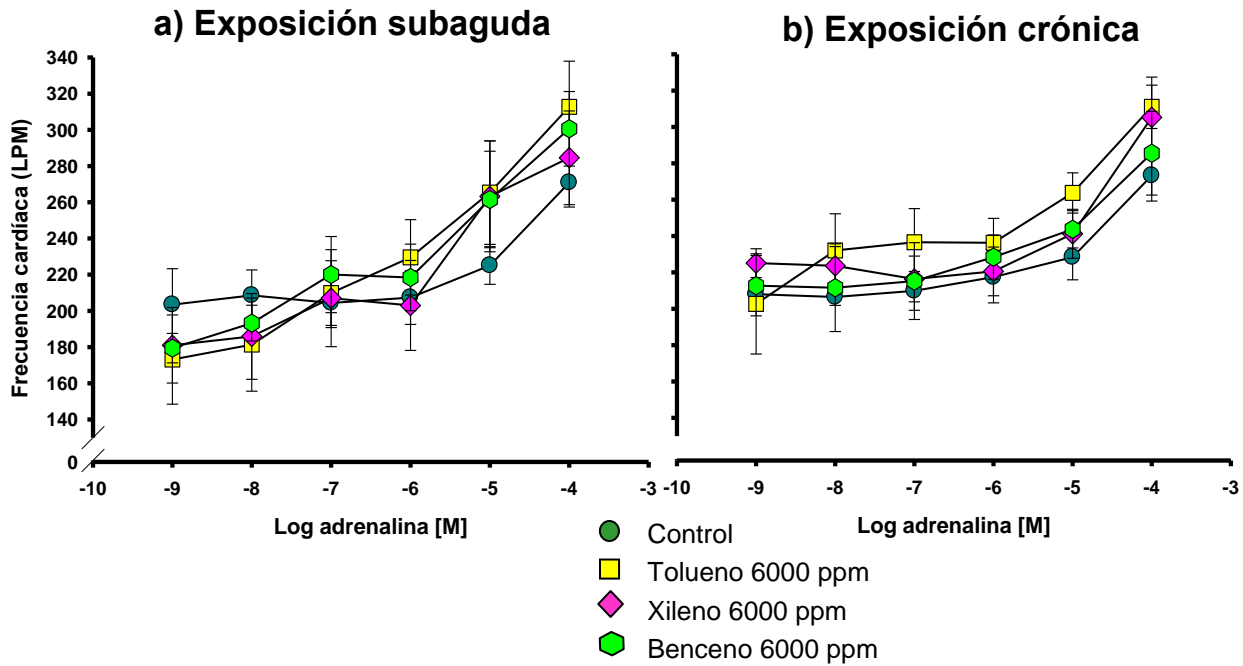


Figura 17. Efecto de las diferentes concentraciones de adrenalina [M] sobre la frecuencia cardíaca (LPM: latidos por minuto) en corazones expuestos a disolvente (tolueno, xileno o benceno, 6000 ppm) o a aire, en forma subaguda (a) y crónica (b). Los datos se expresan como la media \pm e.e. de 5 experimentos.

Al comparar el efecto de la exposición subaguda y crónica (fig. 18) para cada disolvente sobre la frecuencia cardíaca, se puede apreciar que, aunque la frecuencia cardíaca basal es menor para los corazones de animales expuestos de manera subaguda a los disolventes, no se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas.

FRECUENCIA CARDÍACA

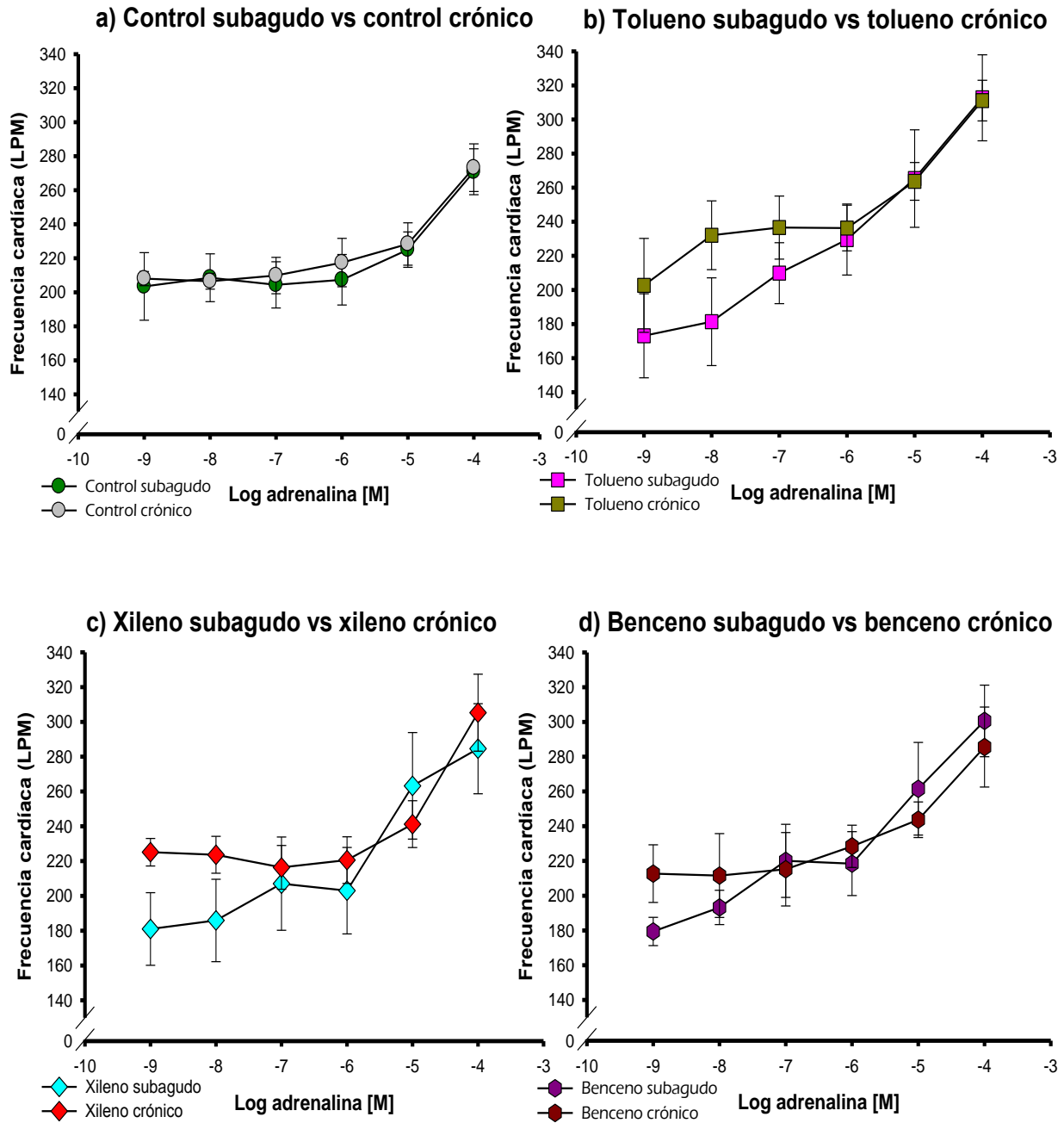


Figura 18. Comparación del efecto de la exposición subaguda y crónica a disolventes (tolueno, xileno o benceno) o aire sobre la frecuencia cardíaca. Los datos se expresan como la media ± e.e. de 5 experimentos.

8.3 EFECTO DE LA EXPOSICIÓN SUBAGUDA Y CRÓNICA A TOLUENO, XILENO O BENCENO SOBRE LA FUERZA DE CONTRACCIÓN VENTRICULAR

En la figura 19 se muestra la fuerza de contracción ventricular en corazones de animales expuestos de manera subaguda o crónica a disolventes o a aire.

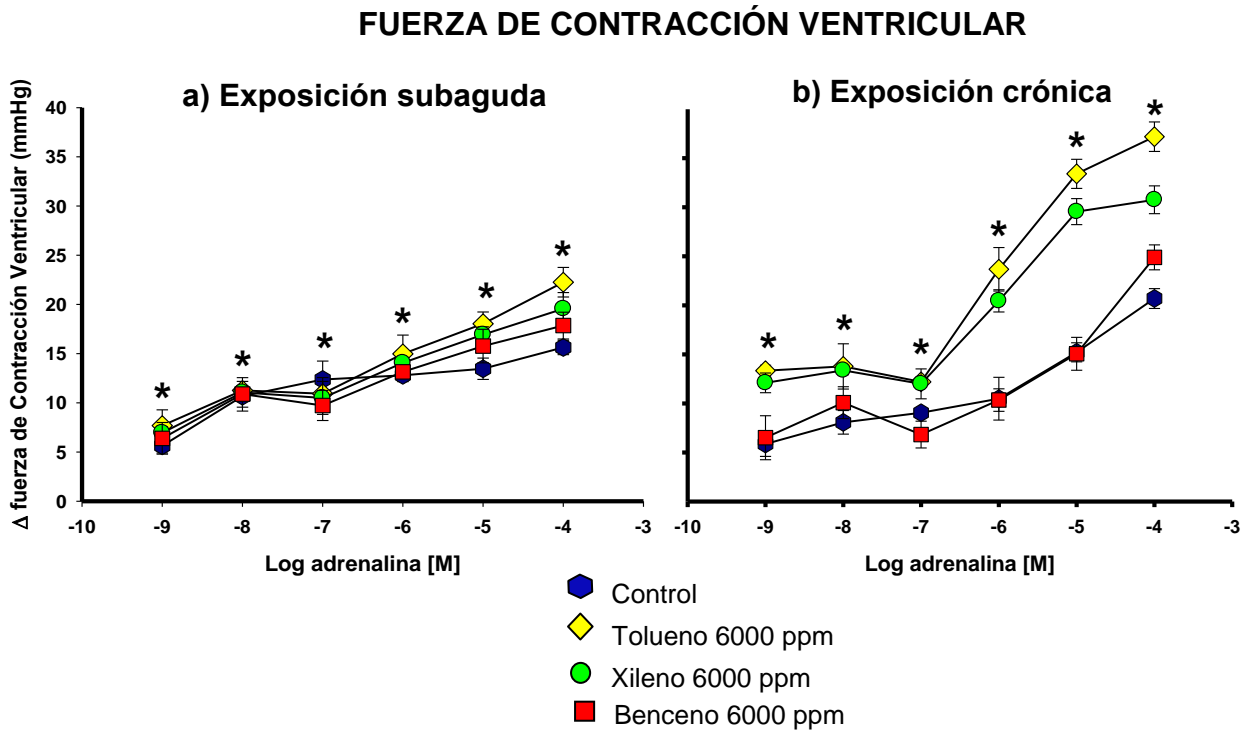


Figura 19. Efecto de las diferentes concentraciones de adrenalina [M] sobre el incremento en la fuerza de contracción ventricular (mmHg) en corazones expuestos a disolvente (tolueno, xileno o benceno, 6000 ppm) o a aire, en forma subaguda (a) y crónica (b). Los datos se expresan como la media \pm e.e. de 5 experimentos. a): $*p < 0.05$ corazones expuestos a tolueno vs corazones control; b) $*p < 0.05$ corazones expuestos a tolueno y a xileno vs corazones expuestos a benceno. Prueba de Tukey.

En esta figura se puede observar que tanto en los corazones de animales expuestos 1 semana (subagudo), como 4 semanas (crónico) a disolventes o a aire, se produjo un aumento de la fuerza de contracción ventricular dependiente de la concentración de adrenalina. En la exposición subaguda (fig. 19a), el grupo de tolueno fue diferente estadísticamente al grupo control, mientras que en el caso de la exposición crónica, los corazones expuestos a disolventes (tolueno y xileno) mostraron un incremento mayor en la fuerza de contracción ventricular en

comparación con el incremento presentado por el grupo control. Además, el tolueno y el xileno fueron diferentes estadísticamente del benceno.

FUERZA DE CONTRACCIÓN VENTRICULAR

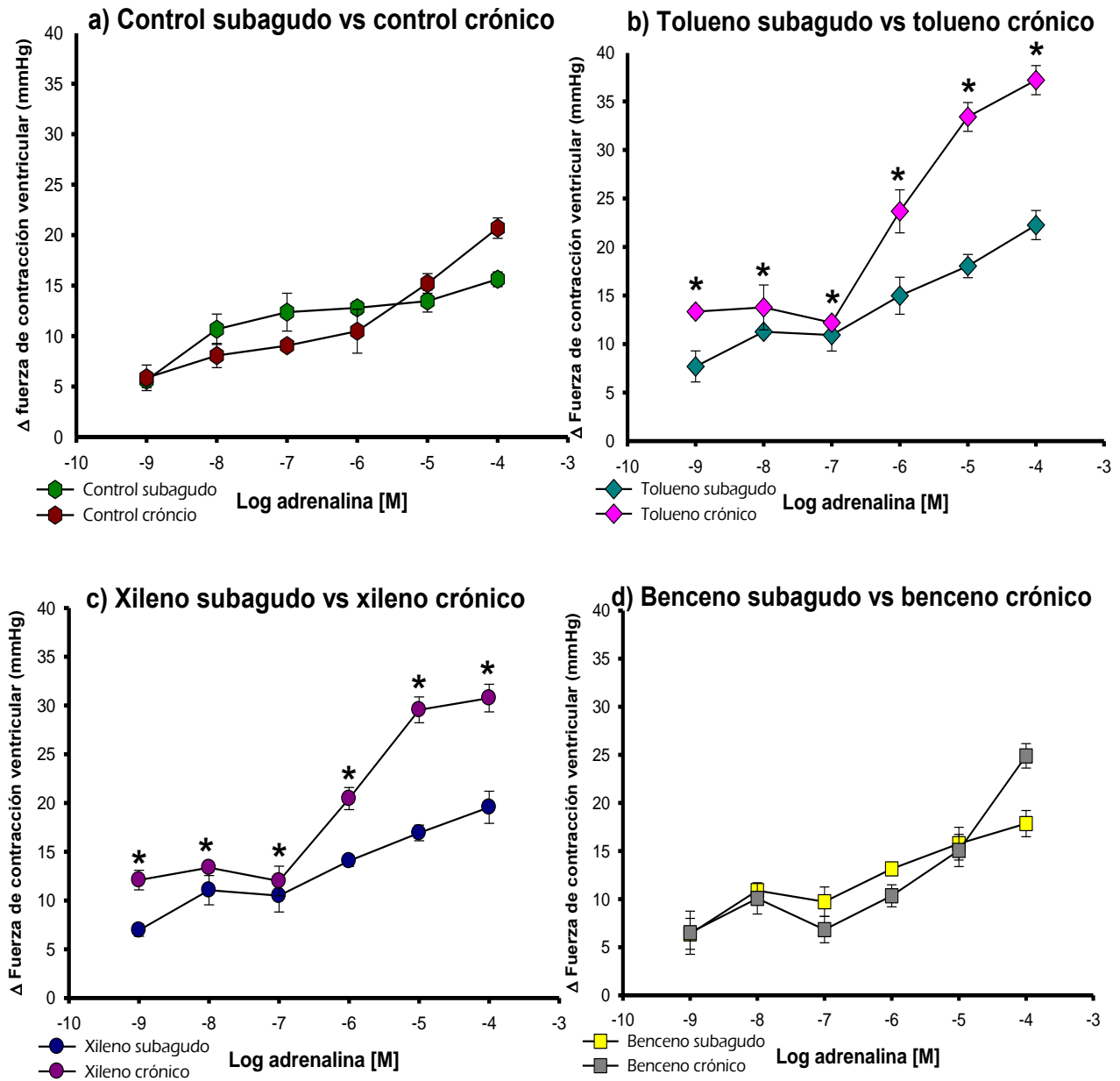


Figura 20. Comparación del efecto de la exposición subaguda y crónica a disolventes (tolueno, xileno y benceno) o a aire sobre la fuerza de contracción ventricular. Los datos se expresan como la media \pm e.e de 5 experimentos. b) $p < 0.05$ tolueno crónico vs tolueno subagudo, c) $p < 0.05$ xileno crónico vs xileno subagudo. Prueba de Tukey.

En la figura 20 se muestra la comparación de la exposición subaguda y crónica para cada disolvente, sobre la fuerza de contracción ventricular y se puede observar que la exposición crónica a tolueno y a xileno produjo un aumento estadísticamente significativo en la fuerza de contracción ventricular ($p=0.023$ y $p=0.017$, respectivamente) con respecto a los corazones de animales expuestos de manera subaguda a estos disolventes. Por su parte, con la exposición a benceno no se presentaron diferencias estadísticamente significativas.

8.4 ANÁLISIS MOLECULAR DE LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES α_1 y β_1 ADRENÉRGICOS EN LOS CORAZONES EXPUESTOS DE MANERA CRÓNICA A DISOLVENTES

Para determinar la expresión proteica de los receptores α_1 y β_1 adrenérgicos en los corazones de las ratas expuestas crónicamente a los disolventes o a aire de cada uno de los grupos experimentales, se obtuvieron muestras de aorta, aurícula y ventrículo, que posteriormente se sometieron a separación de proteínas por medio de la técnica de Western Blot.

Con las bandas obtenidas en cada placa fotográfica se realizó un análisis densitométrico y se calculó el cociente de la densidad de la proteína de cada receptor adrenérgico entre la densidad de la proteína usada como control interno (α -actina).

La figura 21 muestra la densidad de los receptores adrenérgicos α_{1A} (fig. 21a), α_{1B} (fig. 21b) y α_{1D} (fig. 21c) expresados en la aorta de los corazones de las ratas expuestas a aire, tolueno, xileno o benceno, junto con las bandas representativas obtenidas de cada subtipo de receptor adrenérgico.

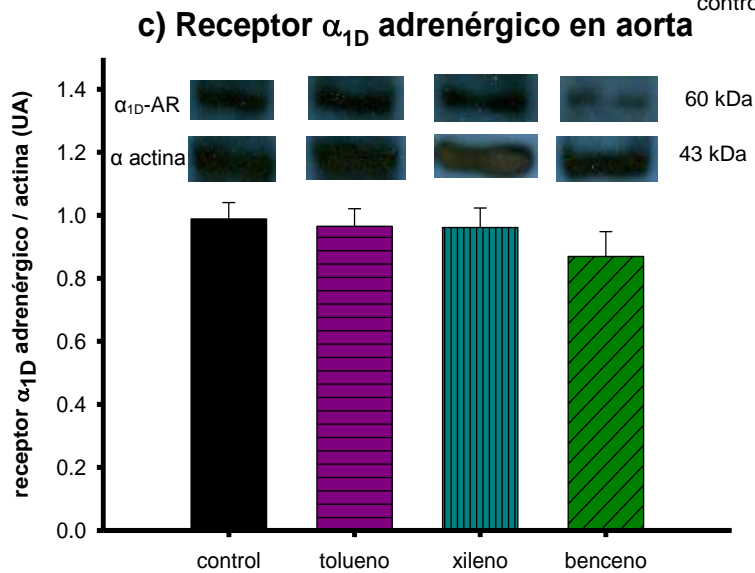
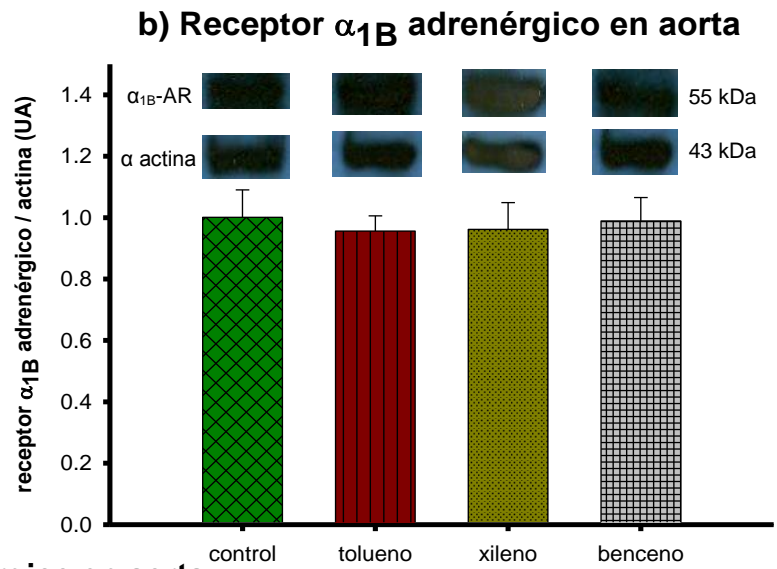
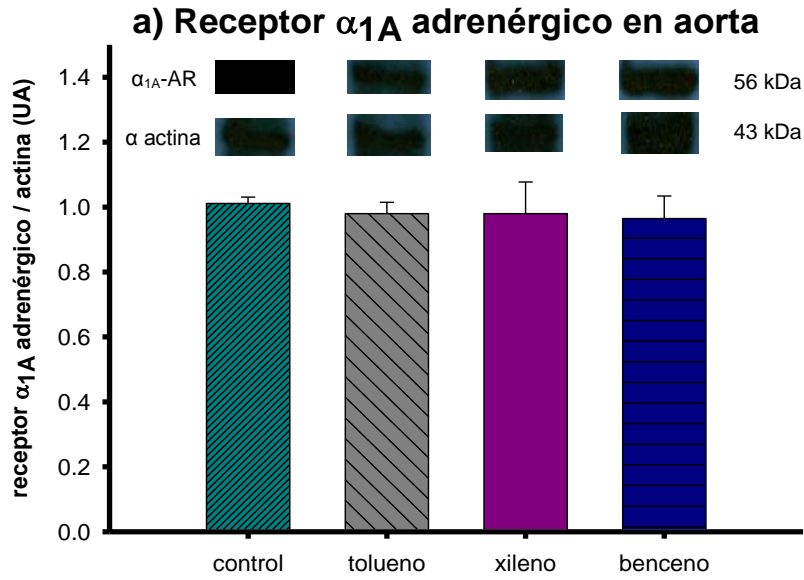


Figura 21. Expresión de los receptores α_{1A} (a), α_{1B} (b) y α_{1D} (c) adrenérgicos en la aorta de animales expuestos de manera crónica (4 semanas) a aire (control), tolueno, xileno o benceno. Los datos fueron normalizados con la expresión de una proteína de referencia (α -actina). Las barras representan el promedio \pm e.e de 3 animales por grupo y se expresan en unidades arbitrarias (U.A.).

Se puede observar que, para los 3 subtipos del receptor α_1 adrenérgico (α_{1A} , α_{1B} y α_{1D}), se logró la detección de la expresión de los receptores; sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos.

Además, se realizó el análisis de la expresión de los subtipos de los receptores α_1 adrenérgicos en los tejidos de la aurícula y del ventrículo; no obstante, no se detectaron los subtipos de los receptores α_1 adrenérgicos en los tejidos antes mencionados (datos no mostrados).

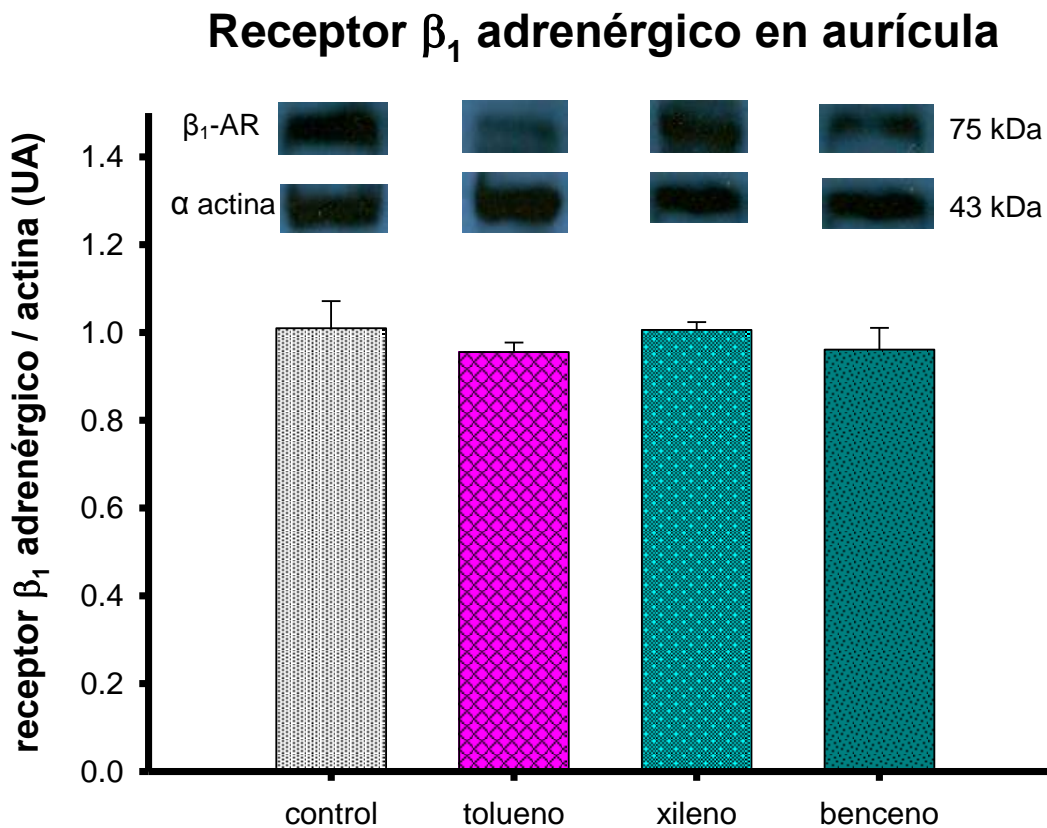


Figura 22. Expresión de los receptores β_1 adrenérgicos en las aurículas de animales expuestos de manera crónica (4 semanas) a aire (control), tolueno, xileno o benceno. Los datos fueron normalizados con la expresión de una proteína de referencia (α -actina). Las barras representan el promedio \pm e.e de 3 animales por grupo y se expresan en unidades arbitrarias (U.A.).

Receptor β_1 adrenérgico en ventrículo

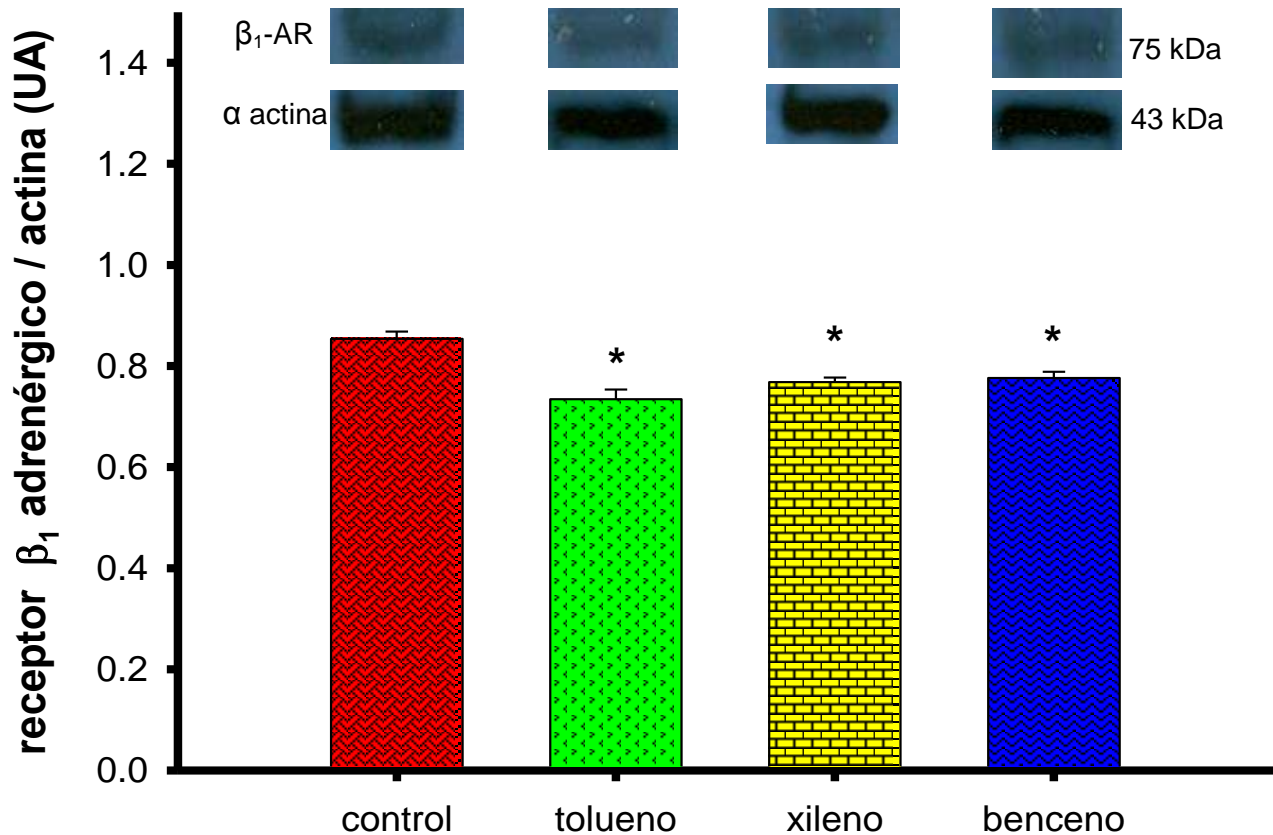


Figura 23. Expresión de los receptores β_1 adrenérgicos en los ventrículos de animales expuestos de manera crónica (4 semanas) a aire (control), tolueno, xileno o benceno. Los datos fueron normalizados con la expresión de una proteína de referencia (α -actina). Las barras representan el promedio \pm e.e de 3 animales por grupo y se expresan en unidades arbitrarias (U.A.). * $p < 0.05$ corazones expuestos a disolventes (tolueno, xileno y benceno) vs corazones control.

En las figuras 22 y 23 se muestra la expresión de los receptores β_1 en las aurículas y en los ventrículos, respectivamente, de ratas expuestas a disolventes (tolueno, xileno o benceno) o a aire. En el caso de las aurículas (fig. 22), se puede observar una tendencia a disminuir la densidad de receptores β_1 en los corazones de las ratas expuestas a tolueno y a benceno en comparación con los corazones control; sin embargo, esta diferencia en la densidad de receptores no fue estadísticamente significativa.

Por su parte, en los ventrículos (fig. 23) se observó una disminución en la densidad de los receptores β_1 adrenérgicos en los corazones de las ratas expuestas a los disolventes. Sin embargo, a diferencia de las aurículas, la disminución en la expresión de receptores β_1 fue estadísticamente significativa para los corazones de las ratas expuestas a los disolventes, comparados con los corazones control.

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La mayoría de los reportes que existen sobre los efectos de los disolventes de abuso se han enfocado a sus acciones sobre el SNC; sin embargo, los estudios acerca de los efectos sobre el corazón son escasos.

Para este proyecto se empleó un modelo experimental de corazón aislado y perfundido de rata utilizando la técnica descrita por Oscar Langendorff en 1895 (Riascos-Bernal y col., 2004), la cual tiene como principales ventajas:

1. Es una preparación altamente reproducible, en la cual el corazón aislado puede ser estudiado rápidamente y en grandes cantidades a un bajo costo.
2. Pueden ser medidos índices bioquímicos, fisiológicos, morfológicos y farmacológicos. Estas mediciones pueden ser en ausencia de los efectos de otros órganos, el propio sistema circulatorio y una amplia gama de complicaciones periféricas como la circulación de factores neurohormonales.
3. Al haber denervación y ausencia de otros factores periféricos, se pueden estudiar de manera aislada los efectos de las catecolaminas y otros neurotransmisores que se adicionan al perfusado.

La primera especie de la cual se aisló el corazón con éxito fue la rana; no obstante, en el presente trabajo se decidió utilizar el corazón de rata, ya que es sin duda el más frecuentemente estudiado y es por mucho el mejor caracterizado. Además, es el corazón más empleado en preparaciones de perfusión más complejas.

El modelo de Langendorff posee dos tipos de preparación que pueden ser usadas dependiendo de los requerimientos del experimento: a flujo constante o presión de perfusión constante; y para este proyecto se utilizó el modelo de flujo constante, el cual se mantuvo a 10 ml/min.

Los disolventes empleados en este proyecto: tolueno, xileno y benceno, son disolventes que han mostrado afectar seriamente la salud, llegando incluso a

provocar la muerte, ya que se ha visto que poseen efectos cardiovasculares, dentro de los cuales las arritmias cardíacas son una de las causas de muerte que han sido asociadas con el abuso de estas sustancias. Se sabe que la inhalación de tolueno puede provocar anomalías cardíacas, específicamente arritmias y producir muerte súbita por inhalación (ASTDR, 2000).

9.1 EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A DISOLVENTES SOBRE LA PRESIÓN DE PERFUSIÓN DEL CORAZÓN

Como se mostró en la figura 12, los efectos del tolueno, el xileno y el benceno indicaron que a medida que se fue aumentando la concentración de adrenalina se fue observando una mayor presión de perfusión en los corazones de las ratas que previamente se expusieron con los disolventes de manera subaguda; esto concuerda con los estudios que realizaron en 1973 Clark y Tinston donde hicieron experimentos en perros, los cuales fueron expuestos a sustancias químicas ampliamente utilizadas en el campo de la anestesia, por ejemplo, halotano, ciclopropano y tricloroetano, usando una mascarilla. Los periodos de exposición fueron de 5 minutos y en los últimos 10 segundos de la exposición se inyectó un bolo de adrenalina (5 µg/kg) vía vena cefálica y se capturaron los cambios presentados en el electrocardiograma. Además se volvió a inyectar adrenalina 10 minutos después de haber concluido la exposición. En los animales control se inyectó adrenalina pero el animal estuvo expuesto a aire. Las concentraciones de los hidrocarburos a las cuales el 50% de los animales podrían ser sensibilizados (CE₅₀ de sensibilización cardíaca) fueron desde 0.12% hasta 80% en el aire inspirado y se encontró que todas las sustancias químicas probadas fueron capaces de causar sensibilización cardíaca cuando se les inyectó adrenalina durante la exposición. La inyección de adrenalina post exposición, sin embargo, no resultó en arritmias, esto se debió a que los hidrocarburos se eliminan rápidamente del cuerpo después de una breve exposición, por lo tanto, la sensibilización cardíaca pudo ser sólo un fenómeno transitorio que depende de la interacción entre las sustancias químicas y la adrenalina, pero no depende de un

daño estructural en las células cardíacas. Las concentraciones de fármacos que se probaron en ese estudio (0.12% a 80%) concuerdan con lo reportado en 1937 por Meek, donde después de realizar varios experimentos descubrió que las concentraciones de hidrocarburos necesarias para producir sensibilización cardíaca se encuentran entre el rango de 0.5% a 90% en el aire (Meek, 1997). En nuestro estudio se observó que los incrementos presentados en la presión de perfusión, tanto en la exposición subaguda como en la exposición crónica, fueron dependientes de la concentración de adrenalina.

El hecho de haber una mayor presión de perfusión nos podría indicar que hay una mayor resistencia del paso del líquido perfusado a través de los vasos coronarios del corazón. De acuerdo a lo citado en la literatura, en los vasos sanguíneos existe una mayor población de receptores α_1 adrenérgicos, en este sentido, en un artículo publicado en el 2003 por Turnbull y col., se utilizaron ratones adultos knockout de los receptores α_{1A} y α_{1B} adrenérgicos para detectar la presencia de los receptores α_{1D} adrenérgicos en el corazón, está descrito que en las ratas los receptores α_{1D} median la contracción de los vasos sanguíneos, incluyendo la aorta, la arteria mesentérica y la arteria femoral y están involucrados en la regulación de la presión en respuesta a la adrenalina, mientras que en los ratones los receptores α_{1D} también median la contracción en la aorta torácica, la aorta abdominal y la arteria mesentérica. Basado en lo anterior, el objetivo del estudio de Turnbull y col. fue determinar si había receptores α_{1D} adrenérgicos en el corazón de los ratones. Los corazones de los ratones knockout fueron aislados y perfundidos utilizando la metodología de Langendorff, fueron preincubados con timolol y estimulados con adrenalina a una velocidad de 1% con una bomba de infusión y algunos corazones fueron preincubados con prazosina (5 μ M), como antagonista de los receptores α_1 adrenérgicos y con BMY-7378 (500 nM) como antagonista de los receptores α_{1D} adrenérgicos, concluyendo que los corazones de los ratones knockout contienen receptores α_1 adrenérgicos que median la reducción en el flujo coronario y el desarrollo de la presión; también se encontró que la respuesta de los receptores α_1 adrenérgicos en los corazones knockout podría ser abolida por el antagonista específico de subtipo BMY-7378, sugiriendo

que este efecto podría ser causado por los receptores α_{1D} adrenérgicos y por último se encontró una marcada inotropía positiva con la estimulación de los receptores α_1 adrenérgicos de los corazones de los ratones aislados y perfundidos por la metodología de Langendorff, por lo que los autores sugieren que los receptores α_{1D} adrenérgicos actúan como vasoconstrictores coronarios. En nuestro estudio, esta vasoconstricción posiblemente causada por los receptores α_1 adrenérgicos podría explicar por qué hay una mayor resistencia del flujo perfusado en el corazón y por consiguiente hay un aumento en la presión de perfusión.

En nuestros resultados, los corazones de las ratas expuestas a los disolventes de manera crónica presentaron un incremento en la presión de perfusión menor al incremento mostrado por los corazones de las ratas expuestas a disolventes de manera subaguda, lo cual sugiere que se está presentando tolerancia a los efectos de los disolventes durante la exposición crónica; esta disminución en el efecto puede deberse a que, cuando un receptor está sometido a estímulos repetidos por un agonista, la respuesta del receptor va disminuyendo, probablemente en un intento de compensar la sobreestimulación. La tolerancia es un proceso complejo en el que se produce la fosforilación del receptor, posteriormente el receptor se disocia de la proteína G (desacoplamiento), de manera que es incapaz de responder a más estímulos. El receptor fosforilado es secuestrado de la superficie celular a un compartimiento intracelular (internalización), donde es defosforilado por fosfatasas. Posteriormente, el receptor puede ser reciclado a la superficie para de nuevo acoplarse a la proteína G. Si la exposición al agonista, en este caso a la adrenalina, es prolongada, el receptor se degrada por proteasas cuando está internalizado, fenómeno conocido por “down-regulation” o regulación a la baja (Martínez y col., 1997). Se sugiere que la tolerancia trae consigo (Pazos, 2008):

- a) Una disminución en la afinidad, como consecuencia de modificaciones conformacionales del receptor.

- b) Una reducción en el número de receptores, ya sea por inactivación, secuestro hacia el interior de la célula, degradación metabólica o reducción en la síntesis de nuevas moléculas receptoras.
- c) Incapacidad para el acoplamiento con la proteína G por fosforilación de la región citoplásmica del receptor por la cinasa A de proteínas o la cinasa beta de receptores adrenérgicos.

En este proyecto, el mecanismo responsable de la tolerancia podría ser una disminución en el número de receptores adrenérgicos, lo cual se confirmó con el análisis molecular de la expresión de los receptores α_1 y β_1 adrenérgicos.

De acuerdo a estudios hechos en diferentes modelos animales, se sabe que la elevación de catecolaminas en la sangre conduce, vía varios mecanismos compensatorios, a la disminución de niveles y actividad funcionales de los receptores β_1 adrenérgicos y, por lo tanto, a una marcada desensibilización o tolerancia del corazón a la estimulación inotrópica β -adrenérgica (Lefkowitz y col., 2000); por su parte, al haber una alteración en la respuesta a las catecolaminas parece producirse una disminución en la densidad de receptores β adrenérgicos y alteraciones en la composición de los subtipos de receptores adrenérgicos (Ho y col., 2010).

Lo anterior se confirma también con lo reportado en 1999 por Post y colaboradores, donde publican que el tratamiento de células con agonistas de los receptores adrenérgicos por 30 minutos produce un desacoplamiento entre el receptor adrenérgico y la proteína G inducido por el agonista y la regulación a la baja de los receptores celulares es demostrable sólo después de 4 a 12 horas (Hadcock y Malbon, 1988). Las células tratadas con agonistas por varias horas muestran una pérdida de receptores en la superficie celular y un incremento en la degradación de los receptores proteínicos, lo que reduce la expresión celular.

9.1.1 CURVAS CONCENTRACIÓN-RESPUESTA A LA ADRENALINA

En el presente proyecto se realizaron curvas concentración-respuesta a la adrenalina, la cual, como ya se mencionó anteriormente, es una sustancia que actúa como agonista de los receptores β -adrenérgicos presentes en el corazón; las curvas se llevaron a cabo en ausencia y en presencia de los antagonistas adrenérgicos propranolol y prazosina, obteniéndose una inhibición del efecto de la adrenalina sobre la presión de perfusión. Este bloqueo en presencia de los antagonistas adrenérgicos se observó como un incremento menor en la presión de perfusión que el incremento mostrado en la curva concentración respuesta a la adrenalina en ausencia de los antagonistas.

La disminución en la respuesta adrenérgica observada en nuestros resultados se parece a lo reportado en un estudio realizado en el 2006 por Yawar y col., donde se utilizaron corazones aislados y perfundidos de conejo y se vio la comparación del efecto de la adrenalina como agonista simpático en diluciones simples y seriadas que fueron desde 1×10^{-3} M hasta 1×10^{-36} M, como antagonista se utilizó el atenolol y se midió la frecuencia cardíaca, observándose que la adrenalina en concentraciones altas (1×10^{-3} M y 1×10^{-4} M) produjo un efecto cronotrópico positivo, característico de la adrenalina, mientras que, en diluciones desde 1×10^{-7} M hasta 1×10^{-36} M se observó un efecto cronotrópico negativo. Por su parte, el atenolol produjo una disminución en la frecuencia cardíaca a concentraciones que van desde 1×10^{-5} M hasta 1×10^{-9} M de adrenalina, lo que confirma el bloqueo del efecto de la adrenalina después de añadir el antagonista (Yawar y col., 2006).

Las observaciones del estudio de Yawar y col., al igual que lo obtenido en nuestros resultados, nos confirman el bloqueo del efecto de la adrenalina por acción de los antagonistas adrenérgicos, con la diferencia de que en el trabajo de Yawar y colaboradores, en el 2006, utilizaron atenolol y en nuestro proyecto se emplearon propranolol y prazosina administrados conjuntamente. La adición del

antagonista de los receptores α_1 adrenérgicos: prazosina, fue basándonos en los experimentos realizados por Turnbull y col., en el 2003 descritos anteriormente.

Existe otro estudio realizado en 1992 por Moalic y col., donde utilizaron la preparación de corazón aislado de rata adulta para explorar la expresión de c-fos y de un gen de shock térmico (HSP), que son de gran interés ya que son señales de crecimiento transitorio presentes en la incidencia de hipertrofia cardíaca en los humanos. La infusión de adrenalina en esta preparación induce la expresión de c-fos si el corazón está latiendo y mediante análisis slot blot se mostró que en ambos casos el efecto adrenérgico tiene un doble origen, ya que se inhibe tanto por el propranolol, antagonista β adrenérgico y por la terazosina, un antagonista α_1 adrenérgico; por lo que se concluyó que el corazón aislado es una herramienta útil para explorar los cambios tempranos en la expresión genética que se producen en este tejido en respuesta a varios estímulos fisiológicos.

Nuestros resultados concuerdan con el trabajo de Moalic y col., ya que en nuestro estudio también fue necesaria la administración de un antagonista α_1 adrenérgico (prazosina) y un antagonista β adrenérgico (propranolol) para producir la inhibición de la respuesta adrenérgica.

9.2 EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A DISOLVENTES SOBRE LA FRECUENCIA CARDÍACA

Se denomina como frecuencia cardíaca al número de veces en que se presenta un ciclo cardíaco, 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.

La estimulación de los receptores adrenérgicos β por activación neuronal simpática, por circulación de catecolaminas, o por agonistas adrenérgicos incrementa la frecuencia cardíaca (cronotropismo), la fuerza de contracción

(inotropismo), la frecuencia de relajación cardíaca (lusitropismo) y la automaticidad (Berridge y col., 2000, Post y col., 1999, van der Heyden, 2004).

El grupo de estudio de Garb & Chenoweth en 1946 y Clark y Tinston en 1973, reportaron que en el caso del grupo control para ambas exposiciones, la administración de adrenalina a los corazones de las ratas expuestas a aire resulta en una elevación de la frecuencia cardíaca, además, los autores antes mencionados reportan la presencia de latidos ectópicos unifocales ventriculares, es decir, no se presenta evidencia de sensibilización cardíaca como lo son la aparición de latidos ectópicos multifocales ventriculares o la presencia de fibrilación ventricular; en nuestros resultados, los corazones de las ratas control mostraron un incremento en los latidos por minuto en las concentraciones más altas de adrenalina como lo fueron 1×10^{-5} M y 1×10^{-4} M, lo cual fue debido a la acción de la adrenalina, tal como lo reportan los grupos de investigación antes citados.

Como se pudo observar en la gráfica 14, la adrenalina produjo un efecto cronotrópico positivo por estimulación de los receptores β adrenérgicos, tanto en los corazones provenientes de la exposición subaguda, como de la exposición crónica. Sin embargo, en nuestros resultados no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los corazones de las ratas expuestas a disolventes en comparación con los corazones de las ratas control y tampoco observamos una diferencia estadísticamente significativa al comparar los resultados de la exposición subaguda con la exposición crónica. Nuestros resultados contrastan con el estudio realizado por Lorenzana y col., en 1986, en el cual se utilizaron ratas macho anestesiadas con cloralosa y puestas en un desecador, a las que se les colocaron electrodos en las extremidades y en la pata trasera izquierda, los cuales posteriormente fueron conectados a un polígrafo para medir los parámetros del ECG. Se depositaron 0.8 ml (66,276 ppm) de tolueno ó 0.2 ml (19,860 ppm) de benceno con una jeringa en medio del desecador, el cual fue recubierto y sellado con silicona, exponiendo a las ratas durante 35 minutos, el ECG se obtuvo por intervalos de 5 minutos, 30 minutos después de la aplicación

de los disolventes, el grupo control estuvo bajo las mismas condiciones pero no se expuso a disolventes. En una segunda serie de experimentos un grupo de animales fueron sujetos a procedimientos de inhalación similares, pero además, se les inyectaron 10 µg/kg de adrenalina en la vena femoral mediante una cánula antes y 25 minutos después de la aplicación de los disolventes. El ECG fue registrado 1 minuto después de la administración de catecolaminas y los autores encontraron en este estudio que el grupo control, es decir, los animales que inhalaban aire, no mostraron cambios significativos en la frecuencia cardíaca durante los 30 minutos de observación; mientras que frecuencia cardíaca en los animales que fueron expuestos a tolueno mostró una tendencia a incrementar, aunque estos cambios no alcanzaron a ser estadísticamente significativos. Por su parte, en las ratas que inhalaban benceno se presentó un incremento en la frecuencia cardíaca cercano a los 10 minutos y se mantuvo elevada. En las ratas sometidas a la administración de adrenalina, las variaciones fueron similares a las mencionadas anteriormente: taquicardia con benceno y cambios no significativos con la exposición al aire o a tolueno. Este estudio difiere del nuestro, ya que está reportado que la taquicardia es la manifestación clásica de la cardiotoxicidad por tolueno (Tsao y col., 2011) y en nuestros resultados no hubo cambios significativos en ninguno de los grupos expuestos a disolventes.

9.3 EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A DISOLVENTES SOBRE LA FUERZA DE CONTRACCIÓN VENTRICULAR

En la figura 15 se muestra el proceso contráctil en el ventrículo, donde claramente se observa un aumento en la fuerza contráctil de los corazones de las ratas expuestas a los disolventes y este incremento es más marcado en los corazones expuestos de manera crónica a los disolventes.

Este incremento podría deberse a que, como se sabe, en el músculo cardíaco el potencial de acción que se registra en el ventrículo se produce por la apertura de dos tipos de canales: los canales rápidos de sodio y los canales lentos

de calcio. Esta segunda población difiere de los canales rápidos de sodio en que se abre más lentamente y, lo que es más importante, en que permanece abierta durante varias décimas de segundo. Basándonos en los mecanismos de acción de acción conocidos para los disolventes de abuso (Tillar y col., 2002), sugerimos que estos disolventes podrían estar bloqueando los canales de calcio y que, como efecto compensatorio, se pudiera estar produciendo una “up-regulation” o regulación a la alta de los canales de calcio, lo que llevaría a una mayor fuerza de contracción.

Estos iones calcio son los encargados de estimular el proceso contráctil, ya que difunden a las miofibrillas y catalizan las reacciones químicas que promueven el deslizamiento de los filamentos de miosina sobre los de actina; esto, a su vez produce la contracción muscular (Bers, 1996).

Los efectos anteriores podrían contribuir, al menos en parte, a la presentación de arritmias cardíacas generadas por la sensibilización a adrenalina y, en consecuencia, a la muerte súbita por inhalación.

9.4 ANÁLISIS MOLECULAR DE LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES α_1 Y β_1 -ADRENÉRGICOS EN LOS CORAZONES EXPUESTOS DE MANERA CRÓNICA A LOS DISOLVENTES

De acuerdo a lo mostrado en la figura 16, donde se ve una disminución en la población de receptores β_1 adrenérgicos en los ventrículos de corazones de ratas expuestas de manera crónica a disolventes, se sugiere que esto podría ser debido a que se estuviera produciendo un secuestro de receptores o que estos se estuvieran degradando por la estimulación constante derivada de la exposición a los disolventes. En este sentido, hay reportes de que la exposición a tolueno induce cambios en la unión característica de agonistas a los receptores serotoninérgicos y dopaminérgicos acoplados a proteínas G en cerebro de rata (Tsuga y col., 1999) y en lo que respecta al corazón, existe otro estudio realizado por Koga y col., en 1992, donde se investigó si la administración crónica de alcohol podría inducir alteraciones en el sistema adenilato-ciclase de los

receptores β adrenérgicos; lo anterior se probó utilizando ratas macho, las cuales recibieron etanol al 33% en el agua para beber durante 3 meses; este estudio dio como resultado que el etanol crónico incrementó el contenido de noradrenalina y adrenalina en el corazón, posiblemente como resultado de la activación simpática; además se observó una disminución en la densidad de los receptores β adrenérgicos de la membrana del miocardio en las ratas tratadas con etanol. Estas observaciones indican que la administración crónica de etanol deprime la función del sistema adenilato-ciclasa de los receptores β adrenérgicos y la disminución en la densidad de estos receptores fue particularmente atribuida a una regulación a la baja debido al incremento en la estimulación simpática. Este deterioro de la función puede contribuir a la disfunción contráctil cardiaca observada en los alcohólicos crónicos.

La desensibilización de la señalización de los receptores β_1 adrenérgicos resulta de la necesidad de aumentar las dosis de un agonista para lograr incrementos efectivos en la contracción del miocardio; debido a esto, se pensó que esta desensibilización de la estimulación adrenérgica de manera crónica podría ser superada con sobreexpresión de estos receptores (Cross y col., 199). Sin embargo, en contraste con ese estudio, en nuestro proyecto observamos que la exposición crónica a disolventes no produce sobreexpresión de receptores adrenérgicos, ya que por el contrario disminuye la expresión de los receptores β_1 adrenérgicos en el ventrículo.

En un estudio realizado por Sarin y colaboradores en el 2011, probaron la hipótesis de que la práctica de ejercicio podría mejorar la generación de fuerza en el miocardio posterior a la oclusión de la arteria coronaria, a través de la alteración de las concentraciones de Ca^{2+} intracelulares en animales sedentarios y en animales con ejercicio entrenado, para lo cual se aislaron miocitos de la pared ventricular y varios segmentos del miocardio de un modelo animal de cerdos miniatura, a los que se les ocluyó la arteria coronaria izquierda utilizando ketamina e isoflurano como inductores de la anestesia. Los animales fueron divididos en dos grupos: sedentarios y con ejercicio entrenado (caminadora, 5 días a la semana por

14 semanas), este último grupo, tuvo un entrenamiento de esfuerzo progresivo y se observó, al igual que en nuestros resultados, una disminución en la densidad de receptores β_1 adrenérgicos en la pared ventricular de los cerdos que estuvieron bajo ejercicio, demostrando que el ejercicio está asociado al aumento de Ca^{2+} transitorio, el incremento en la sensibilización del Ca^{2+} en los filamentos miocárdicos y a una disminución en los niveles de expresión de receptores β_1 cardíacos y troponina T cardíaca (Sarin, 2011). Aunque en este estudio se trabajó con un modelo animal diferente y en nuestro estudio no se realizó una oclusión de las arterias coronarias, al contrario, el líquido perfusado que nutría al corazón era conducido por estas arterias para permitir que el corazón latiera en vacío, además de que no medimos las concentraciones de Ca^{2+} , es probable que un mecanismo similar al propuesto por estos autores esté contribuyendo a los cambios en la expresión de receptores β_1 adrenérgicos observados en este proyecto.

Se sabe que en la insuficiencia cardíaca, la regulación a la baja de los receptores β adrenérgicos contribuye a problemas de la respuesta adrenérgica del miocardio, por lo tanto, un grupo de estudio en 1997 evaluó los receptores α_1 adrenérgicos en aorta y en pequeñas arterias mesentéricas en un modelo experimental de disfunción ventricular izquierda después de un infarto agudo al miocardio, para lo cual, se emplearon ratas macho, las cuales se dividieron en dos grupos, a un grupo se les realizó una cirugía simulada, es decir, se les practicó una sutura superficial en el ventrículo izquierdo y al otro grupo se les ligó la arteria coronaria izquierda y fueron aislados los ventrículos, la aorta torácica y la mesentérica de las ratas que sobrevivieron 5 semanas después de la cirugía. Varios segmentos de las arterias fueron incubadas con un buffer que contenía 30 – 800 pM de prazosina durante 1 hora para determinar la densidad de los receptores α_1 adrenérgicos mediante binding y se encontró que en ambos tipos de vasos la densidad de los receptores α_1 adrenérgicos tendía a estar incrementada, como se puede observar en este estudio, no se exponen a las ratas a disolventes y nuestro estudio, no se utilizaba un modelo de insuficiencia cardíaca, esto contrasta con nuestros resultados, ya que en la aorta de los corazones de las ratas expuestas a los disolventes no se observaron diferencias significativas en la

expresión de los receptores α_1 adrenérgicos y en la aurícula y el ventrículo no se detectó la presencia de receptores α_1 adrenérgicos, ya que se sabe que en el corazón, específicamente en aurículas y en ventrículos predominan los receptores β_1 adrenérgicos y en vasos sanguíneos, es decir, en aorta y en arterias coronarias hay una mayor población de receptores α_1 adrenérgicos (Stassen y col., 1997).

De acuerdo a nuestros resultados la alteración en la densidad de los receptores β_1 -adrenérgicos se observó en el ventrículo, lo anterior, puede ser la causa de la presentación de fibrilaciones ventriculares que conllevan a la presentación de muerte súbita por inhalación.

X. CONCLUSIONES

1. La exposición subaguda a los disolventes (tolueno, xileno y benceno) produjo un aumento en la presión de perfusión en el corazón aislado de rata, mientras que la exposición crónica produjo tolerancia a los efectos producidos por los disolventes en la exposición subaguda, presentándose una disminución en la presión de perfusión.
2. La exposición crónica de ratas a tolueno y a xileno y la exposición subaguda a tolueno, ocasionaron un aumento en la fuerza de contracción ventricular del corazón aislado de rata, es decir, se produjo un efecto inotrópico positivo.
3. La exposición crónica a tolueno, xileno o benceno generó una disminución en la densidad de los receptores β_1 adrenérgicos en el ventrículo, lo cual podría ser debido a una desensibilización de estos receptores ocasionada por la exposición crónica a los disolventes.

XI. Referencias

- Ahlquist RP. A study of adrenotropic receptors. *Am. J. Physiol.*, 1948. 153:586-600.
- Arito H, Tsuruta H, Nakagaki K, Tanaka S. Partial insomnia, Hyperactivity and hyperdipsia induced by repeated administration of toluene in rats: their relation to brain monoamine metabolism. *Toxicology*. 1985. 37:99-110.
- Arlieen-Søborg, P. *Solvent Neurotoxicity*. CRC Press, INC, Boca Raton, Florida. pp. 61-106, 1992.
- ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for toluene. Available from ATSDR, Atlanta, Georgia, GA, and <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/>. 1994.
- 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, 2000.
- Ayres PH., Taylor DW. *Solvents: Principles and Methods of Toxicology*. Segunda Edición. Hayes W (ed). Raven Pres, Ltd, Nueva York. 1989.
- Bale AS, Smothers CT y Woodward JJ. Inhibition of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by the abused solvent, toluene. *British Journal of Pharmacology*. 2002.137: 375-383,
- Bass M. Sudden sniffing death. *The Journal of the American Medical Association*. 1970. 212 (12): 2075-2079.
- Beckstead MJ, Weiner JL, Eger II EI, Gong DH y Mihic J. Glicine and γ -Aminobutyric Acid_A Receptor Function Is Enhanced by Inhaled Drugs of Abuse. *Molecular Pharmacology*. 2000.57: 1199-1205.
- Bers DM y Perez-Reyes. Ca channels in cardiac myocytes: structure and function in Ca influx and intracellular Ca release. *Cardiovascular Research*. 1999; 42:339-360.
- Berridge MJ, Lipp P y Bootman MD. The versatility and universality of calcium signaling. *Nature Reviews*. 2000; 1:10-21

Bowen SE, Batis JC, Paez-Martínez N y Cruz SL. The last decade of solvent research in animal models of abuse: Mechanistic and behavioral studies. *Neurotoxicology and Teratology*. 2006.28: 636-647.

Brailowsky S. Las sustancias de los sueños: Neuropsicofarmacología. 1ª ed. Fondo de Cultura de México. Vol. 3. 1995.

Brodde OE y Michel M. Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacological Reviews*. 1999; 51(4):651-689.

Bushnell PJ y Oshorio WM. Behavioral components of tolerance to repeated inhalation of trichloethylene (TCE) in rat. *Neurotoxicol Teratol*. 2000. 22:221-229.

Catterall WA. Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 2000; 16:521-555.

Chenoweth MB. Ventricular fibrillation induced by hydrocarbons and epinephrine. *Journal of Industrial Hygiene and Toxicology*. 1946. 28:151-158.

Clark DG y Tinston DJ. Correlation of the cardiac sensitizing potential of halogenated hydrocarbons with their physicochemical properties. *Br. J. Pharmacol*. 1973. 49(2):355-357.

Clark DG y Tinston DJ. Correlation of cardiac sensitizing potential of halogenated hydrocarbons. *Br J Pharmacol*. 1973 October; 49 (2): 355-357.

Consejería de Sanidad y Dirección General de Salud Pública. Riesgo Químico-accidentes graves TOLUENO. Murcia: Servicio de Sanidad Ambiental; 2007. Serie de informes técnicos: 939.

Cruz SL, Mirshai T, Thomas B, Balster RL, Woodward JJ. Effects of the abused solvent toluene on recombinant N-Methyl-D-Aspartate and non-N-Methyl-D-Aspartate receptors expressed in *Xenopus oocytes*. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1998.286(1): 334-340.

Cruz SL, Balster RL, Woodward JJ. Effects of volatile solvents on recombinant N-Methyl-D-Aspartate receptors expressed in *Xenopus oocytes*. *British Journal of Pharmacology*. 2000.131: 1303-1308.

Cruz SL, Orta-Salazar G, Gauthereau MY, Millan-Perez Peña L y Salinas-Stefanón EM. Inhibition of cardiac sodium currents by toluene exposure. *British Journal of Pharmacology*. 2003.140: 653-660.

Cruz SL, Páez-Martínez N, López-Rubalcava C. Avances en la investigación básica de los efectos *in vivo* de los disolventes de abuso. *Salud Mental*. 2003a. 26(6): 8-16.

Cruz SL, Páez-Martínez N, López-Rubalcava C. Avances recientes en la investigación de los mecanismos celulares de acción de los disolventes de abuso. *Salud Mental*. 2003b. 26(5): 43-50.

Cruz SL., Bowen SE. Inhalant abuse. *Research Signpost*. 2008.37/661(2). 61-87.

Cruz Silvia L. The last evidence in the neuroscience of solvent misuse: an article written for service providers. *Substance Use & Misuse*, 2011. 46:62-67.

Dianne Perez, Terry Hébert, Sussana Cotecchia, Van A. Doze, Robert M. Graham, Katrin Altosaar, Dominic Devost, Sarah Gora, Eugénie Goupil, Shahriar Kan, Gayane Machkalyan, Rory Sleno, Peter Zylbergold, Richard A. Bond, David B. Bylund, Douglas C. Eikenburg, J. Paul Hieble, Rebecca Hills, Kenneth P. Minneman, Sergio Parra. Adrenoceptors, introductory chapter. Last modified on 08/02/2012. Consultado 22/05/2013. IUPHAR database (IUPHAR-DB), Disponible en: <http://www.iuphar-db.org/DATABASE/FamilyIntroductionForward?familyId=4>.

Domínguez-Vara IA, Mondragón-Ancelmo JM, González-Ronquillo M, Salazar-García F, Bórquez-Gastelum JL y Aragón-Martínez A. Los β -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*. 2009;16-3:278-284.

Dresel PB, MacCannell KL y Nickerson M. Cardiac arrhythmias induced by minimal doses of epinephrine in cyclopropane-anesthetized dogs. *Circ Res*. 1960; 8:948-955.

Einav S, Amitai Y, Reichman J y Geber D. Bradycardia in toluene poisoning. *Clinical Toxicology*. 1997. 35(3): 295-298.

Encuesta Nacional de Adicciones (ENA, 2008). CONADIC/SSA, IMP, INEGI. Informe Ejecutivo, México, 2009.

Encuesta Nacional de Adicciones (ENA, 2008). CONADIC/SSA, IMP, INEGI. Informe Ejecutivo, México, 2011.

Encuesta Nacional de Adicciones por entidad Federativa: Michoacán (ENA, 2008). CONADIC/SSA, IMP, INEGI. Informe Ejecutivo, México, 2009.

Evans EB y Balster RL. CNS depressant effects of volatile organic solvents. *Neurosc Biobehav Rev*. 1991.15: 233-241.

Flanagan RJ, Streete PJ y Ramsey JD. Volatile Substance Abuse. *Bulletin on Narcotics*. 1994.46 (2): 49-78.

Garb S y Chenoweth MB. Studies of hydrocarbon epinephrine induced ventricular fibrillation. *Journal of Pharmacology*. 1948. 94:12-18.

Garcia-Sáinz JA, Vazquez-Prado J. y Medina LC. α_1 -adrenoceptors: function and phosphorylation. *Eur J Pharmacol*. 2000. 389:1-12.

Gauthereau-Torres MY, Godínez-Hernández D, Manzo-Avalos S y Saavedra-Molina A. Alcohol and inhalants: Mechanisms of actions similarities. *Recent Advances in the Neurophysiologic Basis of Disease and Addiction*.2009:59-82.

Grimm M y Brown JH. β -Adrenergic receptor signaling in the heart: Role of CaMKII. *J Moll Cell Cardiol*. 2010 February. 48(2):322-330.

Goudi AJ y Emmett MW. *Psychoactive Drugs: Tolerance and sensitization*. Humana Press. 1989 Nueva Jersey.

Hadcock JR y Malbon CC. Down-regulation of β adrenergic receptors: Agonist-induced reduction in receptor mRNA levels. *Proc. Natl. Acad. Sci*. July 1988. 85: 5021-5025.

Heyden M, Wijnhoven T y Opthof T. Molecular aspects of adrenergic modulation of cardiac L-type Ca^{2+} channels. *Cardiovascular Research*. 2005; 65:28-39.

Hiraoka Y, Ohmura T, Oshita M, Watanabe Y, Morikawa K, Nagata O, Kato H, Taniguchi T, Muramatsu I. Binding and functional characterization of α_1 -adrenoceptor subtypes in the rat prostate. *European Journal of Pharmacology*. 1999. 366:119-126.

Ho D, Yan L, Iwatsubo K, Vatner DE y Vatner SF. Modulation of β -adrenergic receptor signaling in heart failure and longevity: targeting adenylyl cyclase type 5. *Heart Fail Rev*. 2010; 15:495-512.

Jiménez Orozco FA y Campos Sepúlveda AE. Receptores y señales químicas. En: *Farmacología Médica de Nicandro Mendoza Patiño*. Editorial Médica Panamericana. Edición: 2008. pp. 63-70, 2008.

Kamp TJ y Hell JW. Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C. *Circ Res*. 2000; 87:1095-1102.

Kubalova Z. Inactivation of L-type Calcium channels in cardiomyocytes. Experimental and theoretical approaches. *Gen. Physiol. Biosphys*. 2003;22:441-454.

Kubej RK, Iwase M, Uechi M, Vatner DE, Oka N, Ishikawa Y, Shannon RP, Bishop SP y Vatner SF. Effects of chronic beta-adrenergic receptor stimulation in mice. *J Moll Cell Cardiol.* 1997; 29(10):2735-2746.

Lauwerys, R. Control biológico humano de una serie de compuestos químicos industriales: Benceno (EUR 8476 EN). Comunidades Europeas, Bruselas, Luxemburgo. 1983. pp. 1-21.

Lauwerys, R. Indicadores biológicos para la valoración de la exposición humana a compuestos químicos industriales: Xileno (EUR 8903 EN). Comunidades Europeas, Bruselas, Luxemburgo. 1984. pp. 1-13.

Lefkowitz RJ, Rockman HA y Koch WJ. Catecholamines, cardiac β -adrenergic receptors and heart failure. *Circulation.* 2000; 101:1634-1637.

Levy AG y Lewis T. Heart irregularities resulting from the inhalation of low percentages of chloroform vapour and their relationship to ventricular fibrillation. *Heart.* 1911. 3:99-111.

Liu W, Yasui K, Arai A, Kamiya K, Cheng J, Kodama I y Toyama J. β -adrenergic modulation of L-type Ca^{2+} channel currents in early-stage embryonic mouse heart. *Am. J. Physiol.* 1999;276(45):608-613.

Lopreato GF, Phelan R, Borghese CM, Beckstead MJ, Mihic SJ. Inhaled drugs of abuse enhance serotonin-3-receptor function. *Drug Alcohol Depend.* 2003 (70): 11-15.

Lorenzana Jimenez M y Salas M. Behavioral effects of chronic toluene exposure in the development of the rat. *Neurobehavioral Toxicol Teratol.* 1983. 5:295-9.

Mager J, Osinsky D y Markkanen P. Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo. Edición 2008, Madrid. Chantal Dufresne. pp. 282-296.

Martínez D, Iglesias I, Díaz C, García I, Alegría E, Barba J, Herreros J y Gil O. Receptores β e isquemia miocárdica. *Navarra.* 1997.2:1-5.

Maki T, Gruver J, Davidoff AJ, Izzo N, Toupin D, Colucci W, Marks A y Marsh JD. Regulation of calcium channel expression in neonatal myocytes by catecholamines. *J. Clin. Invest.* 1996; 97(3):656-663.

Medina-Mora ME, Cravioto P., Ortiz A., Kuri P., Villatoro J. México: systems for the epidemiological diagnosis of drug abuse. *Bulletin on Narcotics,* 2003. LV(1-2):105-119.

Meek WJ, Hathaway HR y Orth OS. The effects of ether, chloroform and cyclopropane on cardiac automaticity. *J Pharmacol. Exp.* 1937. 61:240-252.

Moalic JM, Moazami-Goudarzi K, Thiem NV, Delcayre C, Bercovici J, Mouas C. y Swynghedauw B. Hormonal induction of c-fos and HSP68 mRNAs on an isolated coronary perfused adult rat heart. *Arch Int Physiol Biochim Biophys.* 1992 Mar-Apr; 100(2): 165-170.

Montmollin E, Aboab J, Mansart A, Annane D. Bench to bedside review: β -adrenergic modulation in sepsis. *Critical Care* 2009. 13:230.

Moser VC, Scimeca JA, Balster RL. Minimal tolerance to the effects of 1,1,1-trichlorethane on fixed-radio responding in mice. *Neurotoxicol.* 1985. 6:35-42.

Murphree SS y Saffitz JE. Distribution of beta-adrenergic receptors in failing human myocardium. Implications for mechanisms of down-regulation. *Circulation.* 1989; 79(6):1214-1225.

Nanoff C, Freissmuth M y Schutz W. A different desensitization pattern of cardiac beta-adrenoceptor subtypes by prolonged in vivo infusion of isoprenaline. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1989; 13(2):198-203.

National Institute on Drug Abuse, National Institutes of Health, U.S. Department of Health & Human Services. NIDA Infofacts. Inhalants. www.drugabuse.gov 2004.

National Institute on Drug Abuse, National Institutes of Health, U.S. Department of Health & Human Services. NIDA Infofacts. Inhalants. www.drugabuse.gov 2010.

Neubig RR, Spedding M, Kenakin T, Christopoulos A. International union of pharmacology committee on receptor nomenclature and drug classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. *Pharmacology Rev.* 2003. 55:597-606.

Perez L. Hipertensión y embarazo: un estudio vascular de los receptores α_1 -adrenérgicos [Tesis]. Morelia: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez" División de estudios de posgrado; 2008.

Post SR, Hammond HK e Insel PA. β -adrenergic receptors and receptor signaling in heart failure. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1999; 39:343-360.

Rees DC, Wood RW, Laties VG. Evidence of tolerance following repeated exposure to toluene in the rat. *Pharmacol Biochem Behav.* 1989. 32:283-291.

Reinhardt CF, Ayar A, Maxfield ME, Smith PC y Mullin LS. Cardiac arrhythmias and aerosol sniffing. *Archives of Environmental Health*. 1971.22 (2):265-279.

Riascos-Bernal D, Baltaxe E y Pascual G. La preparación de Langendorff: corazón de mamífero aislado y perfundido. *Universitas Médica*; 2004. 45(3):111-117.

Sánchez-Lemus E., Arias-Montañó JA, Transactivación de receptores con actividad de cinasa de tirosina (RTK's) por receptores acoplados a proteínas G, *Rev Biomed*. 2004.15:33-48.

Sarin V, Muthuchamy M y Heaps CL. Ca^{2+} sensitization of cardiac myofilament proteins contributes to exercise training-enhanced myocardial function in a porcine model of chronic occlusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011; 301(4):1579-1587.

Shepherd RT. Mechanisms of sudden death associated with volatile substance abuse. *Human Toxic*. 1989.8: 287-292.

Sutherland F y Hearse DJ. The isolated blood and perfusion fluid perfused heart. *Pharmacological Research*. 2000; 41(6):613-627.

Taylor GJ y Harris WS. Glue sniffing causes heart block in mice. *Science*. 1970.170: 866-868.

Tillar R, Shafer TJ, Woodward JJ. Toluene inhibits voltage-sensitive calcium channels expressed in pheocromocytoma cells. *Neurochemistry International*. 2002.41: 391-397.

Tsao JH, Hu YH, How CK, Chern CH, Hung-Tsang Yen D, Huang CI. Atrioventricular conduction abnormality and hyperchloremic metabolic acidosis in toluene sniffing. *J. Formos Med Assoc*. 2011 Oct: 110(10):652-654.

Tsuga H, Sheng R y Honma T. Effects of toluene on regulation of adenylyl ciclase by stimulation of G-protein-coupled receptors expressed in CHO cells. *Jpn. J. Pharmacol*. 1999; 81:305-308.

Turnbull L, McCloskey DT, O'Connell TD, Simpson PC y Baker AJ. α_1 -adrenergic receptor responses in α_{1AB} -AR knockout mouse hearts suggest the presence of α_{1D} -AR. *Am. J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003. 284:H1104-H1109.

Vallejo NE. Los riesgos de los solventes volátiles. Secretaría de Programación para la Prevención de la Drogadicción y la Lucha contra el Narcotráfico. Buenos Aires. Consultado el día 10 de octubre del 2011.

Vidrio H, Magos GA, Lorenzana-Jiménez M. Electrocardiographic effects of toluene in the anesthetized rat. *Arch int. Pharmacodyn.* 1986.279: 121-129.

Villalobos-Molina R e Ibarra M. α_1 -adrenoceptors mediating contraction in arteries of normotensive and spontaneously hypertensive rats of the α_{1D} or α_{1A} subtypes. *European Journal of Pharmacology.*1996.298:257-263.

Villalobos-Molina R, Vázquez-Prado J, García-Sáinz. Chloroethylclonidine is a partial α_{1A} -adrenoceptor agonist in cells expressing recombinant α_1 -adrenoceptor subtypes. *Life Sciences.* 1997.61(25):391-395.

Villatoro J., Cruz SL., Ortiz A., Medina-Mora ME. Volatile Substance Misuse in Mexico: Correlates and Trends. *Substance Use & Misuse.* 2011.46:40-45.

Villatoro J., Medina-Mora ME., Fleiz-Bautista C., Moreno-López M., Oliva-Robles., Bustos-Gamiño M., Fregoso-Ito D., Gutiérrez-López ML., Amador-Buenabad N. El consumo de drogas en México: Resultados de la Encuesta Nacional de Adicciones, 2011. *Salud mental.* noviembre-diciembre 2012.Vol. 35, No. 6.

Vinogradova TM, Bogdanov KY y Lakatta EG. β -adrenergic stimulation modulates ryanodine receptor Ca^{2+} release during diastolic depolarization to accelerate pacemaker activity in rabbit sinoatrial nodal cells. *Circ Res.* 2002;90:73-79.

Vural M y Ogel Kultegin. Possible biological mechanisms of sudden sniffing death syndrome due to toluene exposure. *Journal of Dependence.* 2007.8: 141-145.

WangMC, Dolphin A y Kitmitto A. L-type voltage-gated calcium channels: understanding function through structure. *FEBS Letters.* 2004; 54:245-250.

Westfall TC y Westfall DP. Neurotransmisión: Sistemas nerviosos autónomo y motor somático. En: Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Bruton LL, Lazo JS y Parker KL. 11 ava. Edición. México. pp. 133-145. 2006.

Wilcosky TC y Simonsen NR. Solvent exposure and cardiovascular disease. *American Journal of Industrial Medicine.* 1991.19:569-586.

Yawar E, Azeem MA y Savanur A. comparison of the effect of sympathetic agonist and antagonist on rabbits perfused heart: a study on simple and succussed dilutions. *Pak. J. Physiol.* 2006;2(1):1-5.