



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO DEL EFECTO CONDUCTUAL A LARGO
PLAZO DE LA EXPOSICIÓN PRENATAL A TOLUENO
EN MODELOS DE ANSIEDAD Y DEPRESIÓN EN RATÓN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

DALIA PATRICIA PONCE GARCÍA

TUTORA:
DRA. CAROLINA LÓPEZ RUBALCAVA



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Esta tesis y sus experimentos se realizaron en el Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) - Sede Sur. Para la realización de este trabajo se recibió apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) Proyecto No. 40895-M.

HOJA DE DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno
Ponce
García
Dalia Patricia
56 39 17 20
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
401053843

2. Datos del tutor
Dra
Carolina
López
Rubalcava

3. Datos del sinodal 1
Dra
Silvia Lorenia
Cruz
Martín del Campo

4. Datos de sinodal 2
Dra
Gabriela
Rodríguez
Manzo

5. Datos del sinodal 3
Dra
Erika Monserrat
Estrada
Camarena

6. Datos del sinodal 4
Dra
Nayeli
Paéz
Martínez

7. Datos del trabajo escrito
Estudio del efecto conductual a largo plazo de la exposición prenatal a tolueno en
modelos de ansiedad y depresión en ratón

83 p.

2008

DEDICADO A:

A mi papá por ser mi familia y
mi guía para realizar mis metas académicas

A Iván por estar a mi lado siempre
a pesar de las situaciones difíciles

A mis amigos, en especial a Christian, Pozo, Víctor y Carlos,
por estar en el momento oportuno y escucharme

A Leticia por su apoyo y
paciencia para la realización de esta tesis

AGRADECIMIENTOS:

A la Dra. Carolina López por su guía y
paciencia para la realización de este proyecto

A mis sinodales por el tiempo dedicado, sus útiles comentarios y la
motivación para seguir adelante

A Isaí Méndez, Abraham Contreras e Isabel Beltrán por su
colaboración y apoyo técnico en el laboratorio

RESUMEN	1
CAPÍTULO 1. TOLUENO	4
1.1. Drogas de abuso	4
1.1.1. Generalidades	4
1.1.2. Clasificación.....	6
1.2. Depresores del Sistema Nervioso Central	8
1.2.1. Generalidades	8
1.3. Inhalables.....	8
1.3.1. Generalidades	8
1.4. Disolventes.....	10
1.4.1. Generalidades	10
1.4.2. Clasificación.....	10
1.4.3. Exposición a disolventes	11
1.4.4. Mecanismos de acción	12
1.5. Tolueno	14
1.5.1. Generalidades	14
1.5.2. Mecanismos de acción	15
1.5.3. Efectos como depresor del Sistema Nervioso Central.....	17
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES DE EXPOSICIÓN PRENATAL A DROGAS DE ABUSO 21	
2.1. Generalidades	21
2.2. Exposición prenatal a tolueno	24
CAPÍTULO 3. ANSIEDAD	26
3.1. Definición	26
3.2. Farmacología	26
3.3. Modelos animales	28
3.3.1. Generalidades	28
3.3.1.1. Modelos animales para el estudio de la ansiedad.....	29
CAPÍTULO 4. DEPRESIÓN	30
4.1. Definición	30
4.2. Farmacología	31
4.3. Modelos animales para el estudio de la depresión	32
CAPÍTULO 5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	33
5.1. Hipótesis	33
5.2. Objetivo general	33
5.2.1. Objetivos particulares	33
CAPÍTULO 6. MATERIALES Y MÉTODOS	35
6.1. Animales	35
6.2. Protocolo para la reproducción de ratones.....	35
6.3. Protocolo de exposición a tolueno	36
6.4. Marcaje	37
6.5. Grupos experimentales	38
6.5.1. Crías recién nacidas.....	38
6.5.1.1. Prueba de geotaxia negativa.....	38
6.5.1.2. Prueba de reflejo de enderezamiento	39

RESUMEN	1
CAPÍTULO 1. TOLUENO	4
1.1. Drogas de abuso	4
1.1.1. Generalidades	4
1.1.2. Clasificación.....	6
1.2. Depresores del Sistema Nervioso Central	8
1.2.1. Generalidades	8
1.3. Inhalables.....	8
1.3.1. Generalidades	8
1.4. Disolventes.....	10
1.4.1. Generalidades	10
1.4.2. Clasificación.....	10
1.4.3. Exposición a disolventes	11
1.4.4. Mecanismos de acción	12
1.5. Tolueno	14
1.5.1. Generalidades	14
1.5.2. Mecanismos de acción	15
1.5.3. Efectos como depresor del Sistema Nervioso Central.....	17
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES DE EXPOSICIÓN PRENATAL A DROGAS DE ABUSO 21	
2.1. Generalidades	21
2.2. Exposición prenatal a tolueno	24
CAPÍTULO 3. ANSIEDAD	26
3.1. Definición	26
3.2. Farmacología	26
3.3. Modelos animales	28
3.3.1. Generalidades	28
3.3.1.1. Modelos animales para el estudio de la ansiedad.....	29
CAPÍTULO 4. DEPRESIÓN	30
4.1. Definición	30
4.2. Farmacología	31
4.3. Modelos animales para el estudio de la depresión	32
CAPÍTULO 5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	33
5.1. Hipótesis	33
5.2. Objetivo general	33
5.2.1. Objetivos particulares	33
CAPÍTULO 6. MATERIALES Y MÉTODOS	35
6.1. Animales	35
6.2. Protocolo para la reproducción de ratones.....	35
6.3. Protocolo de exposición a tolueno	36
6.4. Marcaje	37
6.5. Grupos experimentales	38
6.5.1. Crías recién nacidas.....	38
6.5.1.1. Prueba de geotaxia negativa.....	38
6.5.1.2. Prueba de reflejo de enderezamiento	39

RESUMEN

Como parte de los disolventes de abuso, el tolueno es uno de los hidrocarburos aromáticos que se encuentra más ampliamente distribuido en una extensa gama de productos de fácil acceso para la población, como son adhesivos, pinturas acrílicas y adelgazantes de pintura. Estos productos se utilizan como drogas de abuso principalmente por la población masculina, aunque el consumo en la población femenina va en constante aumento, lo cual provoca una mayor posibilidad de que las mujeres voluntaria o involuntariamente expuestas a estas sustancias tengan embarazos riesgosos.

El objetivo de este estudio es conocer los efectos psicomotores y conductuales que provoca la inhalación prenatal de tolueno en diferentes etapas de desarrollo y crecimiento del ratón.

Para ello, se expuso prenatalmente a ratones hembra preñadas del 7^o al 21^o día de gestación, durante una hora diaria (dividida en dos periodos de media hora, uno en la mañana y otro e la tarde), a una concentración de 8000 ppm de tolueno en una cámara de exposición estática. En las primeras etapas del desarrollo (primeros dieciséis días de nacidas), las crías se sometieron a tres pruebas para medir el desarrollo de coordinación motora, reflejos y fuerza muscular. En etapas posteriores del crecimiento (uno, tres y seis meses de edad),

se sometieron a una prueba de actividad locomotora, a dos modelos de ansiedad y a dos modelos de depresión.

Las crías de ratones expuestas prenatalmente a tolueno presentaron una disminución de la coordinación motora respecto al grupo control (crías preexpuestas a aire). No hubo diferencias significativas en las pruebas para medir el desarrollo de reflejos y fuerza muscular.

En el modelo de ansiedad de luz/oscuridad el grupo control mantuvo constante el tiempo acumulado en la zona iluminada y el número de transiciones entre ambas zonas. El tolueno, por su parte, produjo efectos tipo ansiogénico ya que las crías permanecieron mayor tiempo en la zona oscura y presentaron mayor número de transiciones entre ambas áreas al primer, tercer y sexto mes de edad. En el modelo de enterramiento defensivo, segundo modelo de ansiedad probado, la conducta de enterramiento del grupo control disminuyó conforme las crías aumentaron de edad. El número y grado de choque que presentó este grupo disminuyó al tercer mes y posteriormente se igualó con el grupo pretratado con tolueno hacia el sexto mes de edad. Las crías prenatalmente expuestas a tolueno mantuvieron constante su conducta de enterramiento al primer, tercer y sexto mes de edad, presentando en las últimas dos etapas valores superiores al grupo control. Estos datos sugieren que en la etapa adulta (tres y seis meses) los animales expuestos prenatalmente a tolueno presentaron mayores niveles de ansiedad que el grupo control. De igual manera, es importante señalar que el grupo tolueno recibió un mayor número de choques lo cual sugiere la posibilidad

de una afectación del aprendizaje o memoria ante la incapacidad de reconocer objetos y/o situaciones novedosas. Además, este disolvente de abuso produjo una mayor susceptibilidad al dolor ya que aumentó el grado de choque con el electrodo al primer y tercer mes edad. El tolueno no tuvo efecto en los modelos de depresión utilizados.

En conclusión podemos observar que el tolueno afectó de manera negativa el desarrollo motor y provocó efectos tipo ansiogénico en las crías de ratones. Estos resultados se deben tomar en cuenta como parte de la extensa investigación sobre disolventes de abuso que se está llevando a cabo en nuestro país para demostrar los graves problemas de salud que provoca la exposición prenatal a estas drogas de abuso.

CAPÍTULO 1. TOLUENO

1.1. Drogas de abuso

1.1.1. Generalidades

El hombre, de manera accidental o voluntaria, ha estado en contacto con diversas sustancias psicoactivas provenientes de plantas, animales, hongos y minerales que se encuentran en la naturaleza. Algunas de estas sustancias le provocan efectos que se traducen en sensaciones placenteras o desagradables, lo cual lo han llevado a repetir su uso o a evitarlo. Algunas de estas sustancias tienen la capacidad de afectar la mente y pueden, al mismo tiempo, producir alteraciones mentales, físicas y sociales en las personas que las usan y tener repercusiones negativas en la sociedad (Madden, 1986). La dependencia a estas sustancias psicoactivas ocurre cuando, durante al menos 1 año, la persona experimenta un efecto de tolerancia (necesidad de consumir mayor cantidad para lograr el mismo efecto), el efecto de abstinencia (síntomas que siguen a la privación brusca del consumo), intenta disminuir el consumo y no puede, o consume más de lo que quisiera, y deja de hacer actividades importantes debido al consumo. Además, la persona sigue consumiendo a pesar de padecer un problema físico o psicológico persistente que dicha sustancia exacerba.

La dependencia a una sustancia, además, implica:

- Un estado caracterizado por preocupaciones emocionales y mentales relacionadas con los efectos de las drogas, que se manifiesta por una

conducta de búsqueda continua para repetir su consumo, e inducir el placer de sus efectos o evitar el malestar de su abstinencia (Madden, 1986).

- El desarrollo de una circunstancia que se pone de manifiesto como un trastorno físico, cuando la cantidad de droga en el cuerpo disminuye de modo importante. Estos trastornos fisiológicos forman un síndrome de discontinuación o abstinencia a la sustancia, que se compone de síntomas somáticos y mentales característicos para cada sustancia o tipo de droga a que pertenece (Madden, 1986). Por ejemplo, los síntomas característicos al suspender el consumo de estimulantes del Sistema Nervioso Central (SNC), como la cocaína, son fatiga, ausencia de placer, ansiedad, irritabilidad, somnolencia y en ocasiones agitación o paranoia extrema (<http://www.nlm.nih.gov>).

La tolerancia, por su parte, se define como la necesidad de recurrir a cantidades crecientes de la sustancia para alcanzar la intoxicación (o el efecto deseado), o una notable disminución de los efectos de la sustancia con el uso continuo a las mismas dosis (Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales DSM-IV, 1995).

La abstinencia se define como un comportamiento desadaptativo, acompañado de cambios cognoscitivos y fisiológicos, que tiene lugar cuando la concentración de una sustancia en la sangre o los tejidos disminuye en un individuo que ha mantenido un consumo prolongado de grandes cantidades de esa sustancia (DSM-IV, 1995). Es un indicador del grado de dependencia física generado por la

droga. El aspecto clave en esta situación es la imposibilidad de abstenerse del consumo de la sustancia, a pesar de ser consciente de los problemas que ésta causa.

1.1.2. Clasificación

Existen diferentes clasificaciones de las drogas de abuso. Las más utilizadas son:

- ⇒ Clasificación común: drogas blandas o duras
- ⇒ Clasificación sociológica: drogas legales o ilegales
- ⇒ Clasificación según su origen: drogas naturales, sintéticas o semisintéticas

En este trabajo se manejará la clasificación de las drogas de abuso según sus propiedades farmacológicas como se muestra en el cuadro 1:

Cuadro 1 Clasificación de las drogas de abuso

DEPRESORES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL			
Sustancia	Efectos	Tolerancia	Dependencia física
Alcohol	Depresión generalizada, menor coordinación motora, letargo y labilidad emocional	Metabólica y farmacodinámica	Variable, puede ser muy fuerte
Disolventes inhalables	Depresión generalizada, menor coordinación motora, letargo y labilidad emocional	Metabólica y farmacodinámica	Variable
Barbitúricos	Sueño, sedación	Metabólica	Sí, se requiere retiro gradual
Benzodiacepinas	Ansiólisis y sedación	Variable. Tolerancia cruzada	Sí, se requiere retiro gradual
ESTIMULANTES DEL SISTEMA NERVIOSOS CENTRAL			
Sustancia	Efectos	Tolerancia	Dependencia
Cocaína	Mayor energía, menor sueño, aumento de presión arterial y frecuencia cardíaca	A ciertos efectos	Dependencia física leve con manifestaciones conductuales
Anfetaminas	Similares a cocaína, disminución del apetito	Sí	Deben retirarse gradualmente, su suspensión produce sueño y hambre
Metanfetaminas	Similares a anfetaminas con alucinaciones	Sí	Deben retirarse gradualmente, su suspensión produce sueño y hambre
Nicotina	Similares a cocaína pero en menor grado	A ciertos efectos	Sí, en grado variable
OPIÁCEOS			
Sustancia	Efectos	Tolerancia	Dependencia
Morfina	Analgesia, euforia, sedación, disminución de la capacidad de concentración, náuseas, sensación de calor en el cuerpo, pesadez en los miembros y prurito	Sí, importante	Severa
Heroína	Similar a morfina pero más potente	Sí, importante. Tolerancia cruzada con otros opiáceos	Severa. Su suspensión desencadena un síndrome de abstinencia fuerte con sudoración, piloerección, diarrea. Vómito y pérdida de peso
Codeína	Quita la tos	Tolerancia cruzada con otros opiáceos	Sí, bastante menor a la de heroína
Metadona	Analgesia	Tolerancia cruzada con otros opiáceos	Sí, bastante menor a la de heroína
ALUCINÓGENOS			
Sustancia	Efectos	Tolerancia	Dependencia
LSD y similares (psilocibina y mescalina)	Alteraciones emocionales y de comportamiento, alucinaciones, distorsión espacio-tiempo, mezcla de impresiones sensoriales	No	No
Cannabinoides	Distorsión espacio-tiempo, euforia, a veces paranoia	Variable	No se describe dependencia física
PCP	Alucinaciones y efectos impredecibles	Poca	Sí

Fuente: Modificado de Cruz y López-Rubalcava, 2001.

1.2. Depresores del Sistema Nervioso Central

1.2.1. Generalidades

Los depresores del SNC son un grupo de sustancias que disminuyen las funciones normales del cerebro (NIDA, 2004). Esto va acompañado de un deterioro de las funciones motoras como disminución del pulso, de la tasa respiratoria, pérdida de la conciencia, entre otros síntomas. A dosis bajas puede producirse una excitación paradójica que se explica por la depresión de centros inhibitorios (Schuckit, 2000). Dentro de este grupo se incluyen las sustancias también conocidas como sedantes o hipnóticos: alcohol etílico, barbitúricos, benzodiazepinas; inhalables y el ácido gammahidroxibutírico (GHB) o éxtasis líquido (<http://www.drugabuse.gov>).

1.3. Inhalables

1.3.1. Generalidades

Dentro de los depresores del SNC se considera de especial relevancia a los inhalables, mismos que constituyen la parte esencial del presente trabajo por lo que se describen a continuación con mayor detalle.

Según el Instituto Nacional sobre el Abuso de Drogas (NIDA, siglas en inglés), los inhalables son sustancias que producen vapores químicos a temperatura ambiente, que pueden ser inhalados para inducir efectos psicoactivos o alteraciones mentales. Pertenecen a una clase heterogénea de drogas y se les encuentra en compuestos como gasolinas, pinturas, diluyentes, correctores líquidos

y pegamentos, entre otros (NIDA, 2004). Los inhalables se clasifican en tres grandes categorías (Páez-Martínez et al., 2003a):

- a) Disolventes orgánicos industriales (*thinner*, desengrasantes, gasolina, pegamentos, etc.)
- b) Gases (refrigerantes, aerosoles y anestésicos)
- c) Nitritos

La vía de administración de estos productos es la inhalación ya sea en botes, estopas o bolsas de plástico, cubriendo nariz y boca. Esta vía es muy efectiva debido a la extensa área que constituye la superficie capilar de los pulmones. Además, son sustancias que al atravesar las membranas celulares, principalmente la cerebral, provocan un cambio en la conciencia, similar al efecto general de dosis bajas de anestésicos, y se almacenan rápidamente en el tejido adiposo y en órganos ricos en grasas como el hígado y el cerebro (Schuckit, 2000).

Un punto importante que debe señalarse, y que representa uno de los aspectos más importantes del contenido de la presente investigación, es el problema real de salud pública que implica el empleo de estas drogas de abuso.



Imagen 1. Niños de la calle e inhalables
Fuente: www.glue-sniffing.com/

Debido a que estas sustancias son de uso común tanto en lugares de trabajo, sitios públicos, escuelas y hogares, son de bajo costo y de fácil acceso y adquisición, los inhalables constituyen un grave problema del fenómeno de drogadicción en nuestro país.

1.4. Disolventes

1.4.1. Generalidades

Dentro del grupo de los inhalables, el término disolventes se aplica a un gran número de compuestos hidrocarburos que difieren en su estructura química, pero que se agrupan debido a que son líquidos volátiles a temperatura ambiente, son lipofílicos y todos producen inhibición del SNC si se administran en grandes cantidades (Grasso, 1984).

1.4.2. Clasificación

Los disolventes se pueden clasificar en varios grupos de acuerdo a su estructura química, como lo muestra el cuadro 2:

Cuadro 2 Clasificación de los disolventes de acuerdo con su estructura química		
Grupo	Estructura química característica	Ejemplos
Hidrocarburos alifáticos	Cadenas lineales o ramificaciones de carbono e hidrógeno	Hexano, heptano
Hidrocarburos aromáticos	Estructuras que contienen 6 átomos de carbono con un átomo de hidrógeno por carbono. Contiene 3 dobles ligaduras y varias formas resonantes	Benceno, tolueno , xileno
Hidrocarburos halogenados	Hidrocarburos con un átomo de algún halógeno que reemplaza uno o más átomos de hidrógeno	1,1,1-tricloroetano (TCE), cloroformo
Hidrocarburos cíclicos	Anillos de hidrocarburos saturados o insaturados	Ciclohexano
Alcoholes	Estructuras que contienen un solo grupo hidroxilo (-OH)	Etanol, metanol
Éteres	Contienen una ligadura C-O-C	Éter dietílico, éter isopropílico
Esteres	Estructuras que contienen un grupo carboxilo (-COO) en el interior de una cadena de hidrocarburo	Etil acetato
Aldehídos	Son compuestos con un grupo carbonilo (-CO) al final de una cadena de hidrocarburo	Formaldehído, acetaldehído
Cetonas	Contienen un grupo carbonilo entre la estructura del hidrocarburo	Acetona, ciclohexanona

Fuente: Tomado de Páez – Martínez et al., 2003a

1.4.3. Exposición a disolventes

La cuantificación de la exposición a disolventes se fundamenta en dos conceptos básicos: el tiempo de exposición y la concentración o cantidad del disolvente.

Los niveles de exposición pueden ir de unas cuantas partes a varias decenas de miles de partes por millón (ppm: unidad con que se mide la

concentración de sustancias volátiles en el aire). El tiempo de exposición puede variar desde algunos minutos hasta varias horas al día.

El hombre puede entrar en contacto con los disolventes por condiciones laborales o por inhalación voluntaria. Es evidente que las características de cada exposición son diferentes. Así, por condiciones laborales, el ser humano está expuesto a una concentración baja de disolventes durante un periodo de tiempo largo durante el día. Por su parte, en una exposición voluntaria, la persona se pone en contacto con el disolvente a concentraciones muy altas en episodios de poca duración.

Los síntomas que provoca el abuso de los disolventes son euforia, seguida de confusión, zumbido de oídos, secreción nasal y lagrimal y eventualmente alucinaciones y delusiones (alteraciones del pensamiento, creencias inusuales). Además se presenta un estado parecido al de la intoxicación con alcohol, como es la pérdida de control muscular, dificultad para modular palabras, apatía, amnesia, y un estado de abstinencia posterior, parecido a la conocida “cruda” del día siguiente, caracterizado por dolor de cabeza y resequedad bucal, entre otros síntomas (NIDA, 2004).

1.4.4. Mecanismos de acción

En tiempos pasados se postulaba que los disolventes provocaban su efecto al atravesar la membrana celular ya que poseían la capacidad de provocar cambios en su fluidez. Sin embargo, actualmente, se ha avanzado enormemente en la

investigación de su mecanismo de acción celular el cual está mediado por diversos receptores.

Los receptores en los que se ha comprobado su mecanismo de acción son el receptor glutamatérgico del subtipo ácido N-metil-D-aspartato (NMDA), el receptor ácido Gamma-amino butírico (GABA_A) para el neurotransmisor inhibidor más abundante en el Sistema Nervioso, el de glicina, el de serotonina (5-HT) específicamente el tipo 5-HT₃, los receptores nicotínicos de acetilcolina (RnACh), los canales iónicos dependientes de voltaje principalmente el de sodio y calcio, y en el circuito mesolímbico del sistema dopaminérgico llamado también “circuito de recompensa” (Bowen, et al., 2006).

El mecanismo de acción de los disolventes sobre algunos de los receptores más importantes del SNC se describe a continuación:

Cuadro 3 Resumen del mecanismo de acción de los disolventes de abuso		
Tipo de receptor o sistema donde actúan	Función del receptor o sistema en el Sistema Nervioso Central (SNC)	Mecanismo de acción de los disolventes
Receptores glutamatérgicos:	Excitadores Se relacionan con procesos de citotoxicidad y con la percepción de dolor.	El benceno, tolueno, m-xileno, etilbenceno, propilbenceno y tricloroetano (TCE) <u>inhiben</u> las corrientes iónicas inducidas por la activación de los receptores NMDA de manera dependiente de la dosis.
Subunidades NMDA: NR1/2B, NR1/2A y NR1/2C		
Subunidades no-NMDA: GluR1, GluR1/GluR2, y GluR6		
Receptores GABA _A (subtipo α ₁ β ₁) y glicina (α ₁)	Inhibidores Dichos receptores están relacionados con conductas como la ansiedad, depresión, adicción, entre otras.	El tolueno, el tricloroetileno y el tricloroetano <u>aumentan</u> de forma reversible las corrientes inhibitorias mediadas por el receptor GABA _A . No actúan como agonistas directos sino como moduladores alostéricos del receptor.

Fuente: Modificado de N. Páez – Martínez et al., 2003a

1.5. Tolueno

1.5.1. Generalidades

Los disolventes son mezclas complejas de las sustancias puras implicadas en la intoxicación por drogas de abuso. El tolueno es una sustancia pura que se encuentra principalmente en adhesivos, pinturas acrílicas y adelgazantes de pintura. Es, junto con el benceno, una de las sustancias más estudiadas en cuanto a sus efectos moleculares y conductuales en el fenómeno de uso de disolventes como drogas de abuso.

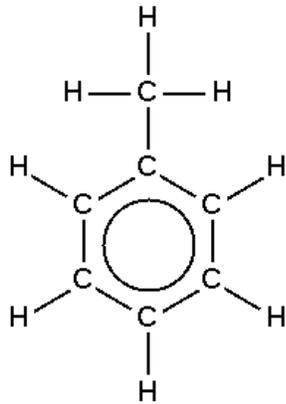


Imagen 2 Estructura química del tolueno



Imagen 3 Pinturas acrílicas

Fuente: http://fr.wikipedia.org/wiki/Hydrocarbure_aromatique y www.bbc.co.uk/homes/diy/paintcalculator.shtml

Después de su inhalación, cierta cantidad de tolueno es eliminada sin cambio a través de los pulmones. Sin embargo, su metabolismo se lleva a cabo en los microsomas del hígado mediante la oxidación a ácido benzoico, que es conjugado con glicina para formar ácido hipúrico, el cual es secretado a través de los riñones en la orina. Si la concentración de tolueno en el aire inhalado permanece constante, la concentración de tolueno en sangre alcanza hasta un máximo de 60% después de 10 a 15 minutos de su exposición (Morton, 1987).

Sus efectos agudos son similares a aquellos de la intoxicación con alcohol al provocar primero, una estimulación y posteriormente, una depresión del SNC. A concentraciones altas se presenta secreción nasal y lagrimal, náusea, vómito, dolores de cabeza, coma, convulsiones, entre otros síntomas. Incluso se ha reportado la muerte debido a una sensibilización del miocardio (Ayres, 1989). Además se ha observado que provoca secuelas neurológicas irreversibles como encefalopatías principalmente del cerebelo, atrofia óptica, desórdenes del equilibrio y atrofia de la corteza cerebral (Grasso, 1984). En estudios realizados en gatos, ratas y ratones se ha visto que una vez expuestos a tolueno, éste se almacena temporalmente en el cerebelo causando atrofia y degeneración de las células de Purkinje. También se han observado infiltrados importantes en la corteza frontal, corteza occipital e hipocampo (Costero et al., 1988).

1.5.2. Mecanismos de acción

Los mecanismos de acción del tolueno tienen relación con receptores NMDA, GABA_A, 5-HT, canales iónicos ligados a voltaje y con el sistema dopaminérgico.

En la última revisión del avance en la investigación de disolventes se encontró que el tolueno en concentraciones micromolares produce una inhibición rápida, casi completa y reversible de las corrientes catiónicas que viajan a través de receptores recombinantes NMDA. La inhibición por parte del tolueno no es competitiva. Los efectos del tolueno sobre receptores NMDA no se deben a perturbaciones generales de la membrana, ya que la integridad de ésta se vio

afectada sólo a concentraciones altas (>20 mM) (Cruz et al., 1998). Estos mismos hallazgos se obtuvieron en investigaciones realizadas en receptores neuronales nativos en células nerviosas en cultivo (Bale et al., 2005). La exposición repetida a tolueno en ratas puede llevar a una autorregulación de receptores NMDA. El tolueno incrementa el número de subunidades NR1 y NR2B de los receptores NMDA en la corteza prefrontal y en el núcleo accumbens (Williams et al., 2005; Bale et al., 2005). La inhibición aguda de los receptores NMDA parece ser un mecanismo de acción común para varios disolventes de abuso, y la exposición prolongada a éstas puede modular la expresión de estas subunidades en los receptores glutamatérgicos dependiendo del modelo experimental, el régimen de la exposición y la región cerebral (Bowen et al., 2006).

Por su parte, una administración aguda de tolueno a concentraciones cercanas a los 0.5 mM incrementa la función de la subunidad $\alpha_1\beta_1$ del receptor GABA_A y de la subunidad α_1 del receptor glicina en ovocitos. Además se ha observado que la exposición de ratas a 8000 ppm de tolueno por 10 días, cambia los niveles de la subunidad α_1 del receptor GABA_A aumentándolos en la corteza media prefrontal y reduciéndolos en la sustancia nigra (Williams et al., 2005).

En cuanto a los efectos de disolventes sobre los receptores serotoninérgicos, se reportó que el tolueno incrementa las corrientes iónicas activadas por serotonina a través de este receptor ionotrópico a concentraciones entre 0.3 y 2 mM (Lopreato et al., 2003).

Esta integración de mecanismos es muy interesante, ya que varios tipos de receptores de diversos sistemas de neurotransmisión actúan de manera conjunta para provocar una inhibición del SNC. Las concentraciones necesarias para provocar dicho efecto son sumamente pequeñas, lo cual demuestra la potencia de los disolventes.

1.5.3. Efectos como depresor del Sistema Nervioso Central

Los efectos conductuales del tolueno estudiados a través de diversos modelos experimentales son los siguientes:

- Efectos anticonvulsivantes

Se ha estudiado el efecto anticonvulsivante de varios disolventes con el fin de ahondar en el conocimiento de su mecanismo de acción. Para ello se ha utilizado un antagonista de los receptores GABA_A llamado pentilentetrazol (PTZ), y se ha encontrado que la inhalación de tolueno (1000 a 6000 ppm) durante 30 minutos, protege contra las convulsiones y la muerte de ratones inducida por el PTZ, de manera dependiente de la concentración (Cruz et al., 2003). Además, una sola inyección de tolueno (100 a 1000 mg/kg, iv) incrementa el umbral de convulsiones y letalidad inducidos por convulsivantes químicos como la nicotina, bicuculina y picrotoxina (Bowen et al., 2006).

- Efectos en el aprendizaje y la memoria

En un estudio reciente se muestra que una exposición a tolueno 4000 ppm, durante 30 minutos, reduce la capacidad de un ratón para identificar un estímulo aversivo. Aparentemente, este efecto está relacionado con un impedimento en el aprendizaje más que con la memoria, ya que otros animales expuestos previamente al estímulo, fueron capaces de reconocerlo como aversivo aún cuando se probaron posteriormente bajo los efectos de tolueno (Páez-Martínez et al., 2003b). Se ha demostrado que algunas conductas operantes seguidas de un reforzamiento (como presionar una palanca para recibir alimento), se modifican después de una exposición a inhalables volviéndolas más difíciles de realizar. Al igual que con la función motora, los efectos agudos de las inhalables parecen ser dependientes de la concentración y reversibles (Bowen et al., 2006). Existen varios estudios acerca del efecto reforzante del tolueno. Se ha logrado entrenar a ratones para auto administrarse tolueno por vía intravenosa, al igual que se ha logrado demostrar que algunos animales pasan más tiempo en un compartimiento que relacionan con la administración de tolueno (preferencia espacial condicionada). Además, se ha logrado establecer que el tolueno y otros disolventes de abuso comparten efectos discriminativos con una gran variedad de depresores del SNC, incluyendo al etanol y pentobarbital. Recientemente se ha sugerido que el tolueno comparte efectos estimulantes discriminativos con anfetaminas, abriendo la posibilidad que los inhalables puedan tener efectos similares a las de una amplia gama de drogas (Bowen et al., 2006).

- Efectos sobre nocicepción

En cuanto a la susceptibilidad al dolor se ha encontrado que el tolueno posee efectos pronociceptivos, es decir, aumenta la sensibilidad al dolor (Páez-Martínez et al., 2003b).

- Tolerancia y dependencia

La información que se tiene respecto al fenómeno de tolerancia y dependencia física es muy variable. Tras emplear un modelo conductual de campo abierto, se reportó el desarrollo de tolerancia en dos conductas específicas: la ataxia (alteración en control muscular) y el número de exploraciones hacia el aire. Por su parte, Cruz y colaboradores (2003) evaluaron por medio de una escala de deterioro neurológico que no existe tolerancia a 4000 ppm de tolueno en exposiciones reiteradas en una cámara estática. También se ha reportado que la exposición crónica a tolueno aumenta la latencia de aparición de su efecto hipnótico, en comparación con la latencia observada tras la exposición aguda (Páez-Martínez et al., 2003b). Finalmente, existen algunos reportes que indican que se genera cierta dependencia física pues se presenta hiperexcitabilidad al suprimir la administración repetida de tolueno (250 ppm/4 días), que se traduce en convulsiones inducidas al sujetar a los ratones por la cola (Wiley et al., 2003).

- Efectos ansiolíticos

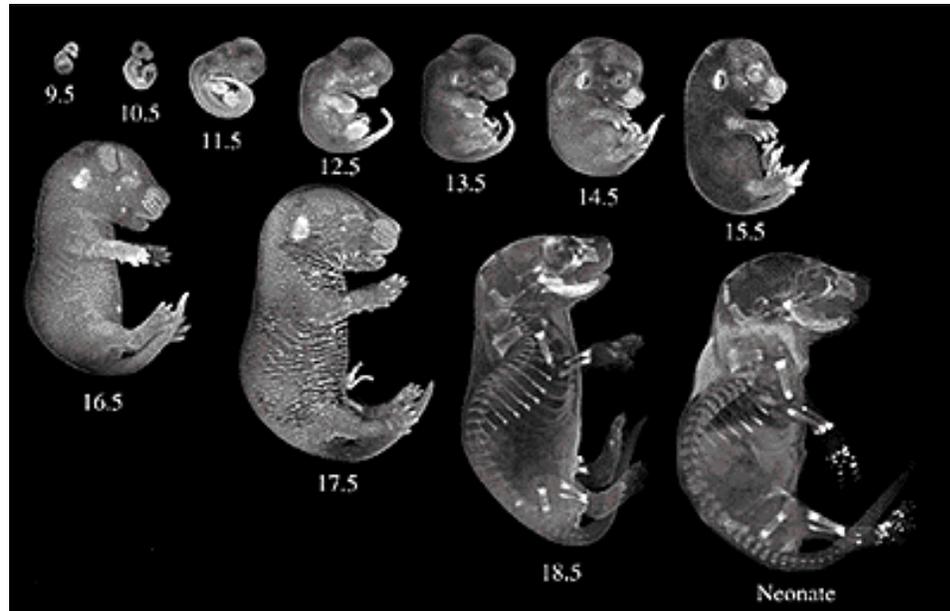
Se ha encontrado que el tolueno produce efectos tipo ansiolítico en la prueba del laberinto elevado en cruz o “plus maze” (2000 a 6000 ppm), ya que incrementa el número de entradas y el tiempo que pasan los roedores en los brazos abiertos de la cruz. En el modelo de enterramiento defensivo, el tolueno (4000 a 6000 ppm) también produce un efecto tipo ansiolítico, ya que los ratones expuestos entierran menos el electrodo que representa el estímulo aversivo en comparación con animales control (Bowen et al., 2006).

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES DE EXPOSICIÓN PRENATAL A DROGAS DE ABUSO

2.1. Generalidades

El estudio de la exposición prenatal a drogas de abuso, exceptuando los inhalables, es muy extenso. Gracias a esto se conocen los periodos de mayor susceptibilidad del feto, el mecanismo por el cual las drogas atraviesan la membrana placentaria, las alteraciones que provocan, las estructuras dañadas y algunos efectos en el desarrollo y el comportamiento de las crías. Actualmente, gracias a diversos modelos animales, su estudio se ha facilitado y se ha abierto una amplia gama de investigaciones donde las variables se pueden controlar de una manera más precisa, como lo es el periodo y la forma de exposición, y la identificación de malformaciones o cambios conductuales a largo plazo.

Para comprender la forma en que actúan las drogas de abuso en una exposición prenatal, se debe tomar en cuenta que cualquier mamífero es particularmente susceptible a sufrir alteraciones estructurales en el SNC, en los periodos más tempranos de su desarrollo. El periodo de mayor susceptibilidad prenatal en el ratón es alrededor del décimo día de gestación de la madre, ya que se ha completado la organogénesis y comienza la formación y desarrollo del sistema nervioso, además del crecimiento y desarrollo fetal (Nagy, 2003).

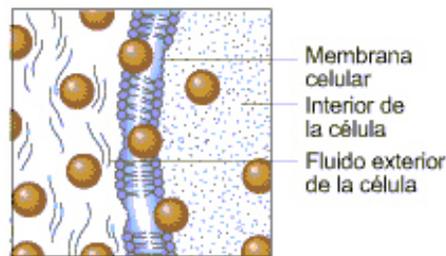


Esquema 1 Etapas del desarrollo gestacional del ratón en días
Fuente: <http://embryo.soad.umich.edu/animal/cdAtlas/cdAtlas.html>

En el ser humano, los órganos y el sistema esquelético están en su etapa de máximo desarrollo durante los tres primeros meses de gestación de la madre. En contraste, el SNC tiene un periodo de desarrollo más prolongado, que se inicia inmediatamente después de la concepción y perdura hasta los 18 meses después del nacimiento (Brackbill, 1988).

En los mamíferos, la placenta es el sitio principal de intercambio de nutrientes y gases entre la madre y el feto. La placenta y el cordón umbilical funcionan como un sistema de transporte para el uso de sustancias entre la madre y el feto. Los nutrientes y el oxígeno pasan de la sangre materna a la fetal, y los materiales de desecho y el dióxido de carbono, de la sangre fetal a la materna a través de la placenta (Moore, 1998; Hafez, 1970). El transporte de sustancias entre la placenta y la sangre materna, en ambas direcciones, se facilita por la gran superficie de la membrana placentaria.

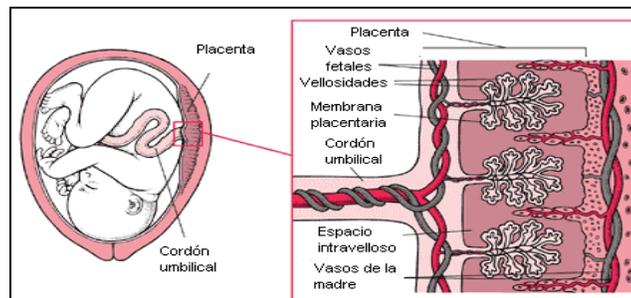
En los mamíferos la mayor parte de los fármacos y sus metabolitos atraviesan la barrera placentaria y se incorporan a la circulación fetal. Casi todos los fármacos y metabolitos cruzan la placenta por difusión simple, al igual que las sustancias en estado gaseoso (como es el caso de los inhalables), que pasan de áreas de mayor a áreas de menor concentración hasta que se establece el equilibrio (Moore, 1998).



Esquema 2 Difusión simple

Fuente: Imagen modificada de ar.geocities.com/biolcito/mem2.htm

Una vez en el torrente sanguíneo del feto, las sustancias son transportadas a órganos de alta perfusión (cerebro, hígado, riñones), en donde tienden a alcanzar concentraciones mucho mayores que las que alcanzarían en un organismo maduro. La barrera hematoencefálica inmadura, permite el paso y el alojamiento de los medicamentos y metabolitos en el cerebro (Brackbill, 1988).



La sangre materna se encuentra en el espacio que rodea las vellosidades. Sólo una membrana delgada (membrana placentaria) separa la sangre materna que se encuentra en dicho espacio de la sangre fetal que se encuentra en las vellosidades. Las drogas en la sangre materna pueden cruzar esta membrana y penetrar a la sangre contenida en los vasos a través de las vellosidades y finalmente alcanzar al feto por el cordón umbilical.

Esquema 3 Paso de fármacos o drogas de abuso de la sangre materna a la fetal

Fuente: Imagen y texto modificado de www.merck.com/mmhe/sec22/ch259/ch259a.html

La depuración de sustancias tóxicas en el tejido cerebral y en otros órganos, toma mucho más tiempo que el que tomaría en organismos maduros, debido a que en el feto, el metabolismo de los fármacos y su excreción están alterados por inmadurez hepática y renal. La vulnerabilidad del SNC en rápido desarrollo, aunado a la “inmadurez” funcional del feto al momento del nacimiento, crea una situación que facilita la aparición de alteraciones, incluso con una sola administración de algún fármaco (esto no significa que la administración crónica repetida no dé lugar a un daño más marcado o extenso que la administración aguda) (Brackbil, 1988). Además, se requiere de sólo 30 minutos, o un poco más, para que una droga se distribuya en el feto y alcance el equilibrio (NIDA, 1995). Los efectos de los fármacos dependen de la concentración y frecuencia de la dosis, la vía de administración, el estado de embarazo o preñez, la salud materna y el estado nutricional, el estado genético de la madre y su hijo, entre otros factores (NIDA, 1995).

2.2. Exposición prenatal a tolueno

En la exposición prenatal, el tolueno atraviesa la placenta por difusión simple afectando la formación de varias zonas cerebrales, principalmente el cerebelo, el hipocampo, la corteza frontal y la occipital (Chen, 2004). Una vez alteradas estas estructuras y conforme el desarrollo continúa, el tolueno provoca una vulnerabilidad del sistema nervioso que se expresa a largo plazo. Elderfors menciona que esta vulnerabilidad se debe, entre otras causas, a un aumento en el nivel de estrés oxidativo desencadenado por un desequilibrio en los niveles de calcio (Edelfors et al., 2001).

Existen pocos estudios acerca de los efectos de la exposición prenatal a tolueno. Sin embargo, se sabe que la inhalación de tolueno por parte de ratas madres afecta la citoarquitectura de su corteza somatosensorial al reducir el número de neuronas presentes y retrasar el tiempo de migración de éstas. Estos cambios se pueden deber a una reducción en la generación neuronal y/o a un aumento en la apoptosis neuronal, la cual se considera que comienza, en parte, por estrés oxidativo (Gospe et al., 1999; Edelfors et al., 2002).

El efecto de la exposición a tolueno se refleja en nacimientos prematuros, disminución del peso al nacer y una embriopatía que, actualmente, se ha comenzado a describir en humanos. A la embriopatía provocada por disolventes de abuso se le ha llamado Síndrome Fetal por Disolventes, y se considera similar al Síndrome Alcohólico Fetal. Se caracteriza por ciertos rasgos fenotípicos como son microcefalia, malformación cerebral, diámetro bifrontal angosto, fisuras palpebrales cortas, puente nasal ancho, puntas de los dedos desafiladas, retardo en el crecimiento y desarrollo del SNC, así como problemas del lenguaje, hiperactividad, disfunción cerebelar, incapacidad motora e intelectual (Arnold et al., 1994; Pearson et al., 1994; Gospe, 1999; Lee et al., 2004).

CAPÍTULO 3. ANSIEDAD

3.1. Definición

La ansiedad se define como un estado conductual no placentero caracterizado por intranquilidad y expectación aprehensiva, que se acompaña de una serie de reacciones vegetativas como son sudoración, temor y taquicardia, entre otros. (Rosenbaun, 1982)

Se ha reportado una clara comorbilidad entre la aparición de un trastorno de ansiedad y el consumo de drogas de abuso, entre las que se incluyen el alcohol, las anfetaminas, algunos alucinógenos, cafeína, cannabinoides, cocaína, fenciclidina e inhalables (DSM-IV, 1995).

3.2. Farmacología

Con base en diversos estudios conductuales y farmacológicos se ha identificado que el sistema GABAérgico, en particular el receptor GABA_A – benzodiazepinas, está involucrado en la patofisiología de los desórdenes de ansiedad. Los agonistas del sitio de unión a las benzodiazepinas (BZ), por ejemplo el clordiazepóxido y el diazepam, tienen propiedades ansiolíticas y un amplio margen de seguridad, especialmente cuando se comparan con los barbitúricos. Además, cada vez se presentan más evidencias que muestran que los efectos de los ligandos a BZ difieren de acuerdo a la composición por subunidades del receptor GABA_A, abriendo la posibilidad de que diferentes composiciones puedan

ser responsables de la diversidad de sus efectos conductuales (Clement y col., 1998).

Por otro lado, modelos clínicos y animales han contribuido con mayor evidencia a demostrar que la neurotransmisión serotoninérgica está involucrada en la etiología, la expresión y el tratamiento de la ansiedad. La ansiedad está usualmente asociada con el incremento de 5-HT endógena, mientras que la ansiólisis está asociada con su disminución. Actualmente se han encontrado 14 subtipos de receptores de 5-HT, de los cuales los subtipos 5-HT_{1A}, 5-HT₂ y 5-HT₃ juegan un papel importante en la ansiedad. La estimulación del subtipo 5-HT_{1A} mostró tener efectos ansiolíticos en el ratón (López-Rubalcava, 1992), mientras que la del subtipo 5-HT₂ tuvo efectos ansiogénicos (Curzon et al., 1991) y finalmente la estimulación del subtipo 5-HT₃ tiene efectos ansiolíticos (Olivier et al., 2000).

Además de estos dos sistemas de neurotransmisión, se han identificado diversos antagonistas del receptor NMDA con efectos ansiolíticos (Wiley y col., 1992). La administración repetida de antagonistas NMDA produjo efectos ansiolíticos en varios modelos animales (Jessa et al., 1996), por lo que el sistema glutamatérgico también se ha implicado en la regulación de la ansiedad. Por su parte, varios antagonistas de receptores glutamatérgicos no-NMDA han demostrado tener efectos ansiogénicos en la prueba del laberinto elevado de cruz (Karez et al., 1995).

3.3. Modelos animales

3.3.1. Generalidades

Los modelos animales se utilizan como preparaciones experimentales desarrolladas en una especie, con la finalidad de estudiar fenómenos que ocurren en otra especie, por lo que su propósito es el de imitar las condiciones humanas incluyendo las patológicas, como es el caso de algunos desórdenes mentales con sus signos y síntomas característicos (Geyer y Markou, 1995).

El uso actual de modelos animales cuenta con los siguientes criterios de validación propuestos por Willner en 1986:

1. Correlación o validez predictiva → Todas aquellas manipulaciones que influyen en el estado patológico de los humanos deben tener efectos similares en el modelo animal. Esto se determina a través de la respuesta a los tratamientos farmacológicos cuyas características son:
 - a) Sensibilidad: El modelo debe ser sensible al fármaco de una forma dosis – dependiente, análoga a aquellos compuestos cuya actividad sea conocida.
 - b) Selectividad: Los efectos de los compuestos que carecen de actividad no deben imitar los efectos de los compuestos que sí la poseen.
 - c) Potencia relativa: La potencia de los agentes en el modelo debe ser comparable a su potencia observada en la clínica.

2. Isomorfismo o validez de apariencia → Se refiere a la similitud fenomenológica entre el modelo y el trastorno. Al menos, el modelo debe mostrar las características más representativas.
3. Homología o validez hipotética → El modelo se construye tomando como base las hipótesis teóricas subyacentes a los trastornos o desórdenes psiquiátricos.

3.3.1.1. Modelos animales para el estudio de la ansiedad

Para el estudio del efecto de la exposición prenatal al tolueno sobre la ansiedad, se utilizaron dos pruebas: el modelo de enterramiento defensivo y la caja de luz/oscuridad. Estos modelos se seleccionaron ya que ambas pruebas son rápidas, sencillas, son sensibles a fármacos ansiolíticos y ansiogénicos, se construyeron a partir de bases teóricas sobre la biología de la ansiedad, los animales no necesitan de un entrenamiento previo y se utilizan estímulos naturales (Bourin y Hascoët, 2003).

CAPÍTULO 4. DEPRESIÓN

4.1. Definición

El DSM –IV define el trastorno de depresión por la presencia de cinco o más de los siguientes síntomas de manera casi cotidiana:

- ❖ Estado de ánimo deprimido la mayor parte del día
- ❖ Disminución acusada del interés o de la capacidad para el placer en todas o casi todas las actividades
- ❖ Pérdida o aumento importante de peso o pérdida o aumento del apetito
- ❖ Insomnio o hipersomnia
- ❖ Agitación o lentitud psicomotoras
- ❖ Fatiga o pérdida de energía
- ❖ Sentimientos de inutilidad o de culpa excesivos o inapropiados
- ❖ Disminución de la capacidad para pensar o concentrarse o indecisión
- ❖ Pensamientos recurrentes de muerte, ideación suicida o tentativa de suicidio.

Estos síntomas deben ser ajenos a la presencia de un duelo causado por una incapacidad funcional, una pérdida de vida cercana, un medicamento, una droga o una condición clínica.

Hay ciertas sustancias que pueden desencadenar el trastorno de depresión como es la intoxicación por alcohol, alucinógenos, anfetaminas, cocaína, fenciclidina, sedantes, inhalables, opiáceos, hipnóticos y ansiolíticos.

4.2. Farmacología

Diversos reportes señalan que los sistemas noradrenérgico y serotoninérgico se encuentran alterados en la depresión.

En cuanto al sistema noradrenérgico se propone que en la depresión hay una deficiencia importante de catecolaminas. Dentro de este grupo de neurotransmisores se encuentra la noradrenalina (NA), la dopamina (DA) y la adrenalina (A). La hipótesis catecolaminérgica de la depresión menciona, entre otras cosas, que “el estado depresivo puede estar asociado a una deficiencia de la actividad noradrenérgica en sitios cerebrales importantes, mientras que la manía puede estar asociada a un exceso del neurotransmisor”. Una de las tantas evidencias de esta hipótesis, es la del reporte de que pacientes deprimidos tienen niveles más bajos del metabolito de noradrenalina, en comparación con individuos no deprimidos (Schildkraut, 1995).

Por otra parte, también se ha postulado la hipótesis serotoninérgica, la cual señala que un mal funcionamiento de dicho sistema está relacionado con el trastorno depresivo, y que la interacción con este sistema, es parte del mecanismo de acción de varios antidepresivos. Al igual que en el caso anterior, una de las evidencias que apoyan esta hipótesis es el reporte de niveles bajos del

principal metabolito del la 5-HT en individuos que intentaron o cometieron suicidio a través de medios violentos (Gibbons y Davis, 1986). Los receptores serotoninérgicos involucrados en este fenómeno y más ampliamente estudiados son los 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A} (Strüder et al., 2001).

Recientemente se ha postulado que receptores glutamatérgicos del subtipo NMDA se encuentran involucrados en la patofisiología de la depresión mayor y en los mecanismos de acción de tratamiento antidepresivos. Varios estudios preclínicos han mostrado que algunos antagonistas del receptor NMDA son efectivos en modelos animales de depresión que pueden predecir actividad antidepresiva en humanos (Pittenger et al., 2007).

4.3. Modelos animales para el estudio de la depresión

En el presente estudio se utilizaron dos modelos de depresión: el modelo de nado forzado y el modelo de suspensión de cola. Ambos modelos fueron seleccionados debido a que: son sensibles y selectivos para fármacos antidepresivos, se construyeron a partir de las bases teóricas que subyacen a la depresión (situaciones estresantes), son económicos y no son complicados metodológicamente (Estrada-Camarena, 2004, Cryan, et al., 2005).

CAPÍTULO 5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

5.1. Hipótesis

Dado que el tolueno es un disolvente de abuso que pasa libremente por la membrana placentaria y afecta la formación de varias zonas cerebrales, las crías de hembras expuestas presentarán alteraciones en las funciones reguladas por dichas zonas cerebrales (coordinación motora, reflejos y/o fuerza muscular).

De la misma manera, dado que el tolueno actúa sobre algunos sistemas de neurotransmisión que participan en la regulación de la ansiedad y la depresión, la exposición prenatal a este disolvente de abuso inducirá cambios en las crías en las conductas asociadas a la ansiedad y la depresión experimental.

5.2. Objetivo general

Analizar los efectos de la exposición prenatal a tolueno en el desarrollo motor durante los primeros 16 días postnatales, y los efectos conductuales del primer al sexto mes de edad en crías de ratones de la cepa Swiss Webster.

5.2.1. Objetivos particulares

Analizar los efectos de la exposición prenatal a tolueno en el desarrollo de la coordinación motora, la fuerza muscular y los reflejos de las crías recién nacidas.

Evaluar y comparar los efectos conductuales de la exposición prenatal a tolueno en dos modelos de ansiedad y dos modelos de depresión en las crías de ratón al primer, tercer y sexto mes de edad.

CAPÍTULO 6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Animales

Para la obtención de las crías que se expusieron a tolueno, se utilizaron ratones macho y hembra de la cepa Swiss-Webster (20-30 g). Se formaron grupos de 5 individuos del mismo sexo y se colocaron en cajas con libre acceso a comida y agua. Se mantuvieron en condiciones de un ciclo invertido de luz/oscuridad de 12 h/12 h y a una temperatura de 22 ± 2 ° C.

6.2. Protocolo para la reproducción de ratones

El protocolo para la reproducción de ratones se adaptó de los lineamientos publicados por el Instituto para la Investigación de Animales de Laboratorio (ILAR, siglas en inglés) en 1993 y de estudios previos que analizan la conducta sexual del ratón. A las hembras se les inyectó por vía subcutánea una solución de estrógenos (20 mg / 0.05 ml) y progesterona (5 mg / 0.05 ml) 48 y 4 horas antes de colocarlas junto con los machos para hacerlas receptivas (Rodríguez-Manzo et al., 2002). Se tomó como base el protocolo de apareamiento en harem por lo que se colocaron 5 hembras y un macho adulto por caja y se mantuvieron juntos durante tres días. Se convino considerar como día de inicio de la preñez el segundo día posterior a colocarlos a las hembras con el macho. Se le dio seguimiento permanente al peso diario de las hembras. Un aumento significativo en este parámetro en un lapso de dos semanas corroboró su estado de preñez. A

continuación se separaron las hembras gestantes, poniéndose cada una en cajas individuales con libre acceso a agua y alimento (ILAR, 1993).

6.3. Protocolo de exposición a tolueno

El protocolo de exposición a tolueno (99.8%, Sigma) se realizó con base en investigaciones anteriores incluidas en la literatura del tema (Bowen et al., 2005). Las hembras se expusieron a tolueno o aire, del séptimo al vigésimoprimer día de gestación (GD7-GD21).

La concentración de tolueno utilizada fue de 8000 ppm (Bowen et al., 2005) equivalentes en volumen a 0.74 ml. para las condiciones de presión atmosférica de la Ciudad de México.

Para la exposición al disolvente se utilizó una cámara estática de inhalación, consistente de un cilindro de vidrio de 29 litros con una tapa que se cierra herméticamente. En el centro de esta tapa se encuentran 3 puertos de inyección, los cuales se pueden abrir y cerrar herméticamente, y un pequeño ventilador. Cercano a la tapa, se encuentra un soporte con malla donde se coloca el papel filtro en el que se vierte el disolvente utilizado, en este caso, el tolueno.



Imagen 1 Cámara estática utilizada para la exposición a disolventes de abuso

Se colocaron 5 hembras gestantes dentro de la cámara (Moser et al., 1985) y una vez cerrada la tapa se inyectó el volumen requerido de tolueno. La exposición se realizó dos veces por día, a las 7:00 y 14:00 hrs., con una duración de 30 minutos en cada exposición.

6.4. Marcaje

Las crías recién nacidas se marcaron con pequeños tatuajes en la cola realizados con azul de metileno 0.4%, utilizando una aguja, tratando de evitar lo más posible su manipulación para evitar una agresión hacia las crías por parte de su madre. Posteriormente, al crecer, se marcaron con rayas de plumón indeleble en la base de la cola. Finalmente, se realizaron perforaciones definitivas en las orejas para su identificación y seguimiento durante el resto del experimento.

6.5. Grupos experimentales

Las crías de madres expuestas a aire se consideraron el grupo control, mientras que las crías de madres expuestas a 8000 ppm tolueno se consideraron el grupo pretratado.

Las pruebas realizadas abarcaron desde el cuarto día después del nacimiento hasta el sexto mes de edad de las crías. Se registró el peso, malformaciones y mortandad de las crías en los días que se aplicaron las pruebas.

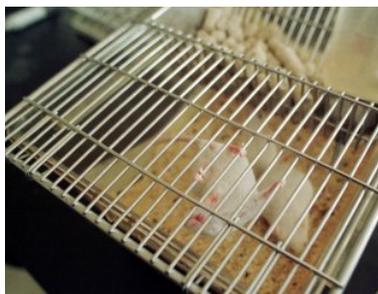
6.5.1. Crías recién nacidas

Se realizó un registro del número y sexo de las crías por camada después de su nacimiento.

Las pruebas aplicadas durante este periodo (cuarto a décimocuarto día postnatal, PN4-PN16) se emplearon con la finalidad de medir el desarrollo de los reflejos, coordinación motora y fuerza muscular de las crías y se adaptaron del trabajo realizado por Bowen en 2005.

6.5.1.1. Prueba de geotaxia negativa

Esta prueba se utiliza para evaluar el desarrollo de la coordinación motora de las crías al colocarlas sobre una malla que gira 180°. Consistió en medir el



tiempo que lograban sostenerse y girar junto con la malla sin caerse de ella. El tiempo máximo otorgado fue de 60 segundos.

Imagen 2 Geotaxia negativa
Fuente: <http://www.ninds.nih.gov/img/mice.jpg>

6.5.1.2. Prueba de reflejo de enderezamiento

Esta prueba se utiliza para evaluar el desarrollo de reflejos en las crías. Consistió en colocar a cada una de ellas sobre su dorso y medir, en segundos, la



latencia para voltearse. El criterio utilizado fue que el animal se volteara y que sus cuatro patas tocaran la superficie donde se encontraba siendo capaz de desplazarse. Se les dio como tiempo máximo para lograrlo 60 segundos.

Imagen 3 Reflejo de enderezamiento
Fuente: http://www.adn.es/clipping/ADNIMA20071022_2356/10.jpg

6.5.1.3. Prueba de capacidad de asimiento

Esta prueba se utiliza para evaluar el desarrollo de la fuerza muscular de las crías. Consistió en colocar a las crías sobre una varilla con un diámetro aproximado de 0.5 cm. y medir el tiempo que lograban aferrarse a ésta sin caerse. Si alguna de las crías se había colocado erróneamente sobre la varilla y ésta



había sido la causa de su caída, se colocaba nuevamente dándole como máximo de tiempo a cada una 60 s.

Imagen 4 Capacidad de asimiento
Fuente: http://news-service.stanford.edu/news/2005/august24/gifs/mice_smooth.jpg

6.5.2. Crías al primer, tercer y sexto mes de edad

A partir del primer mes de edad, las crías se sometieron a una prueba de actividad locomotora, a dos modelos de ansiedad y a dos modelos de depresión.

Las hembras sólo se probaron al primer mes ya que posteriormente comenzaron sus ciclos estrales y las respuestas en los modelos se hubieran visto influidas por esta variable. Los machos se probaron durante las tres etapas.

Las pruebas se realizaron en estos tres periodos ya que representan etapas importantes en el desarrollo de los mamíferos: juvenil (primer mes), adulto (tres meses) y adulto mayor (seis meses).

6.5.2.1. Actividad locomotora

Esta prueba permite conocer el estado general de los animales al observar sus movimientos y desplazamiento. Consistió en colocar al ratón en una de las esquinas de una caja con el piso cuadriculado y contar la cantidad de líneas cruzadas en un lapso de 5 minutos. Esta prueba se realizó antes de cada sesión de los modelos animales.



Imagen 5 Actividad locomotora
Fuente: jaxmice.jax.org/services/locomotor_activity.html

6.5.2.2. Modelos de ansiedad

6.5.2.2.1. Modelos de enterramiento defensivo

El modelo de enterramiento defensivo se basa en la conducta natural de los roedores de esconder aquellos estímulos que le son aversivos como puede ser una luz brillante, un olor desagradable o en este caso un electrodo que produce una pequeña descarga al hacer contacto con él, por lo que el parámetro registrado que se relaciona directamente con la ansiedad es la conducta de enterramiento (Pinel y Treit, 1983).

En este modelo el ratón se colocó en una caja tapada con 3 ó 4 centímetros de aserrín en el piso. De una pared de la caja sobresale un electrodo, conectado a una fuente de poder, el cual emite un pequeño choque eléctrico de 0.3 mA cada vez que el animal hace contacto con él. La sesión es videograbada para observar su comportamiento de enterramiento y medir las siguientes variables:

- Latencia de enterramiento: tiempo que el animal tarda en comenzar a enterrar el electrodo después de recibir el primer choque → Variable inversamente

relacionada con la reactividad (capacidad de respuesta), ya que a mayor latencia de enterramiento, menor reactividad.

- Tiempo de enterramiento: tiempo total que el animal pasa cubriendo el electrodo con el aserrín del suelo → Variable directamente relacionada con el nivel de ansiedad, ya que a mayor tiempo total de enterramiento, mayores niveles de conductas tipo ansiedad.
- Número de choques con el electrodo → Variable relacionada con las respuestas a ansiedad. Este parámetro mide principalmente la capacidad de identificación de un estímulo aversivo.
- Número de exploraciones hacia el electrodo → Variable relacionada con las respuestas tipo ansiedad. Este parámetro mide principalmente la capacidad de identificación de un estímulo aversivo.
- Intensidad de cada choque recibido → Variable directamente relacionada con la percepción al dolor, ya que a mayor intensidad del choque, mayor susceptibilidad al dolor.
- Número de exploraciones hacia el aire → Variable relacionada con la actividad motora del roedor ya que permite observar la coordinación de éste al apoyarse sobre sus patas traseras para olfatear su entorno.

El tiempo de esta prueba fue de 10 minutos por cada ratón.



Imagen 6 Modelo de enterramiento defensivo
Fuente: Foto personal

6.5.2.2.2. . Modelo de luz/oscuridad

Este modelo se basa en la aversión innata de los roedores a las áreas iluminadas y la exploración espontánea como respuesta a estímulos o situaciones estresantes, como lo es un ambiente nuevo y la luz (Cyran et al., 2005).

Los ratones se colocaron en una caja que está dividida en dos zonas de iluminación diferente. Una de estas zonas es completamente oscura (paredes, suelo y techo) y la otra está iluminada intensamente con una lámpara de luz artificial. Ambas zonas están comunicadas por una puerta por la cual el ratón puede pasar libremente.

Las variables medidas en esta prueba son:

- Tiempo acumulado de estancia en la zona iluminada → Variable inversamente proporcional al nivel de ansiedad ya que a mayor tiempo acumulado en la zona iluminada, menor nivel de ansiedad.
- Número de entradas y salidas a través de la puerta entre ambas zonas
→ Variable directamente relacionada con el nivel de estrés ya que a mayor número de transiciones, mayor respuesta a conductas similares a estrés.

El tiempo de esta prueba fue de 10 minutos para cada ratón.



Imagen 7 Modelo de luz/oscuridad
Fuente: Foto personal

6.5.2.3. Modelos de depresión

6.5.2.3.1. Modelo de nado forzado

En este modelo los ratones se colocaron dentro de cilindros plásticos de 30 cm de altura y 10 cm de diámetro llenos con agua a temperatura ambiente ($20 \pm 2^{\circ}$ C). El agua debe alcanzar un nivel que no le permita al roedor tocar el fondo ni alcanzar la orilla para escapar. La variable medida es el tiempo de inmovilidad que es la reducción de los movimientos hasta que el ratón realiza sólo aquellos que le permiten mantener la nariz fuera del agua y respirar. Esta conducta se considera

un estado de “desesperanza” y se propone que es análogo al estado de desesperanza o abandono que muestra un individuo deprimido (Cyran et al., 2005). Se considera que un mayor tiempo acumulado de inmovilidad refleja un mayor nivel de conducta tipo depresiva. La prueba tiene una duración total de 10 minutos.



Imagen 8 Modelo de nado forzado
Fuente: Foto personal

6.5.2.3.2. Modelo de suspensión de cola

Los ratones se suspenden por la cola y se sujetan a la orilla de una mesa experimental mediante una cinta adhesiva. Bajo ellos y a poca distancia, se coloca su caja con aserrín para evitar que se lastimen si llegasen a soltarse. La variable medida es el tiempo total acumulado de inmovilidad que es la reducción de movimientos como resultado de esta situación estresante y sin escape. Se propone que es una inhabilidad o desgano a mantener un esfuerzo, más que a una hipoactividad generalizada, análogo a lo que sucede en pacientes deprimidos

(Cyran et al., 2005). A mayor tiempo acumulado de inmovilidad, mayor la conducta tipo depresiva. Esta prueba dura 6 minutos.



Imagen 9 Modelo de suspensión de la cola
Fuente: Foto personal

6.6. Análisis de datos

Todos los datos se sometieron a una prueba estadística no paramétrica, ya que se asume que los resultados obtenidos de experimentos conductuales no se distribuyen normalmente ya que los sujetos presentan o no determinada conducta. Se utilizó la prueba U de Mann – Whitney para comparar las medianas del grupo control contra las del grupo tolueno. Se consideró significativa una diferencia de $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$. Posteriormente, se utilizó un análisis de varianza de rangos no paramétrica para determinar las diferencias dentro de cada grupo, es decir se analizó las diferencias dentro del grupo control y posteriormente las diferencias dentro del grupo tolueno. Esta prueba se llama Kruskal Wallis y es la

prueba no paramétrica similar al ANOVA. Finalmente se utilizó un ANOVA de dos vías para comparar más de dos grupos y para determinar la influencia de dos factores involucrados, tratamiento y edad (variables independientes) sobre la respuesta conductual expresada numéricamente (variable dependiente).

CAPÍTULO 7. RESULTADOS

7.1 Características de los grupos experimentales

La tabla 1 muestra el número y las características de las camadas que se obtuvieron de las hembras preñadas expuestas a aire durante el periodo de gestación. Como se puede observar, las crías del grupo control no presentaron ninguna malformación al nacimiento ni a largo plazo. Sin embargo, este grupo fue el que presentó la mayor mortandad de crías del tercer al sexto mes de edad.

	AIRE				
	NÚMERO TOTAL DE CRÍAS	HEMBRAS	MACHOS	MALFORMACIONES	MORTANDAD
RECIÉN NACIDAS	27	14	13	X	0
1 MES	27	14	13	X	0
3 MESES	13	0	13	X	9
6 MESES	4	0	9	X	0

Tabla 1 Características de las camadas del grupo control a lo largo del experimento

Por su parte, las crías del grupo expuesto prenatalmente a tolueno 8000 ppm no presentaron ninguna malformación a lo largo del experimento y su mortandad fue muy baja.

	TOLUENO				
	NÚMERO TOTAL DE CRÍAS	HEMBRAS	MACHOS	MALFORMACIONES	MORTANDAD
RECIÉN NACIDAS	32	18	14	X	1
1 MES	31	18	13	X	0
3 MESES	13	0	13	X	1
6 MESES	12	0	12	X	1

Tabla 2 Características de las camadas del grupo tolueno 8000 ppm a lo largo del experimento

7.2 Peso

La figura 1 muestra el efecto de la exposición prenatal a aire o tolueno 8000 ppm sobre el peso de las crías a los 11 días de nacidas y al primero, tercero y sexto mes de edad. Ambos grupos incrementaron de peso conforme aumentó la edad de las crías. Es importante señalar que el grupo de tolueno tiene un promedio menor de peso que el grupo control, siendo la diferencia estadísticamente significativa en los primeros 11 días y a los tres meses de edad. El ANOVA de dos vías muestra que el tratamiento (exposición prenatal) y la edad influyeron por separado en el peso de los animales, sin que hubiera interacción entre las dos variables (ver tabla en Fig. 1). Esto indica que el tolueno y la edad provocaron una variación en el peso pero cada uno de manera independiente.

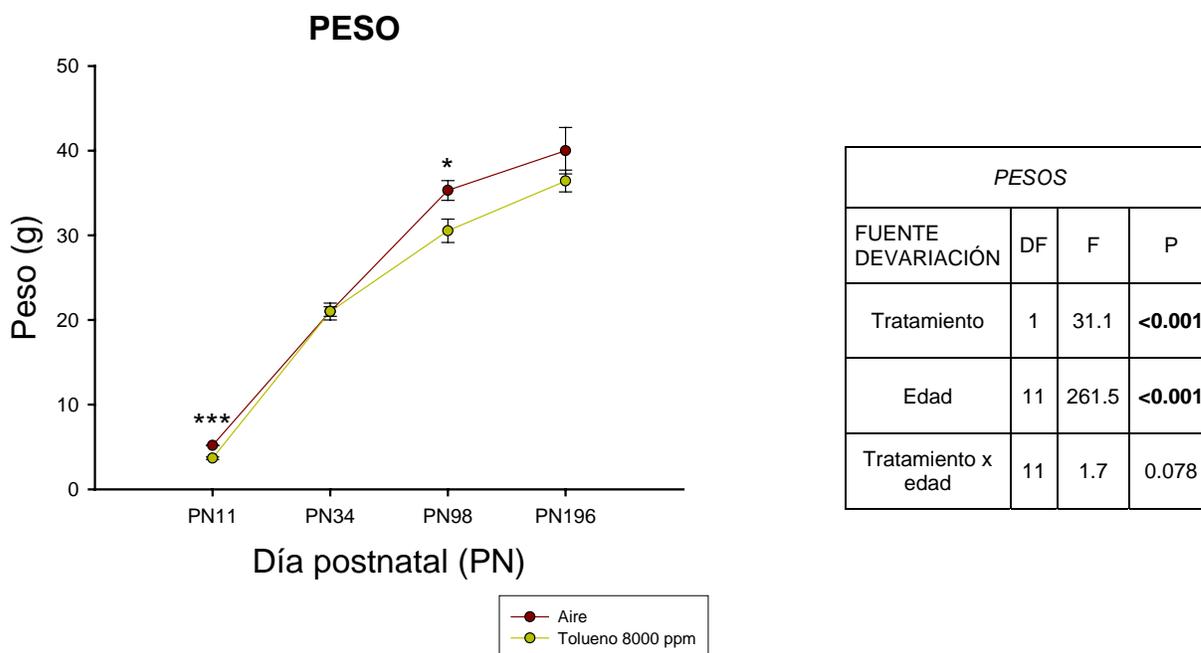


Figura 1. Efecto de la exposición prenatal a aire o tolueno 8000 ppm en el peso de las crías a los 11 días de nacidas, primero, tercero y sexto mes de edad. Los valores muestran la media \pm e.e. prueba U de Mann-Whitney * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. La tabla muestra los valores de la prueba estadística ANOVA de dos vías aplicada al peso de las crías.

7.3 Pruebas realizadas a las crías de ratón

7.3.1 Prueba de reflejo de enderezamiento

La figura 2 muestra el efecto de la exposición prenatal a aire o tolueno sobre el reflejo de enderezamiento de las crías. En este caso, se observa que conforme aumenta la edad, el reflejo de enderezamiento es más rápido y en este parámetro el tolueno no tiene efecto.

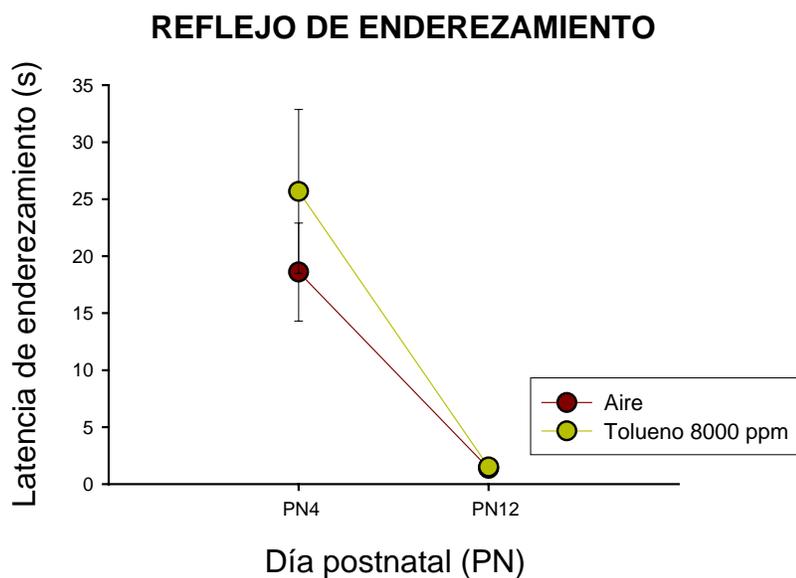


Figura 2 Efecto de la exposición prenatal a aire o tolueno 8000 ppm en el reflejo de enderezamiento de las crías a los 4 y 12 días de nacidas. Los valores muestran la media \pm e.e. prueba U de Mann-Whitney no significativa.

7.3.2 Prueba de geotaxia negativa

La figura 3 muestra el efecto de la exposición prenatal a aire o tolueno en la prueba de geotaxia negativa. En este caso ambos grupos muestran una tendencia a incrementar el tiempo total que permanecen los ratones sobre la malla, siendo significativa sólo para el grupo pretratado con tolueno. Cabe señalar que el grupo de tolueno siempre permanece menos tiempo sobre la malla que el grupo control. La tabla de la figura 3 muestra los valores de la ANOVA de dos vías y señala que, de manera independiente, el tratamiento y la edad provocaron una variación en esta prueba de desarrollo, sin que hubiera interacción entre las dos variables.

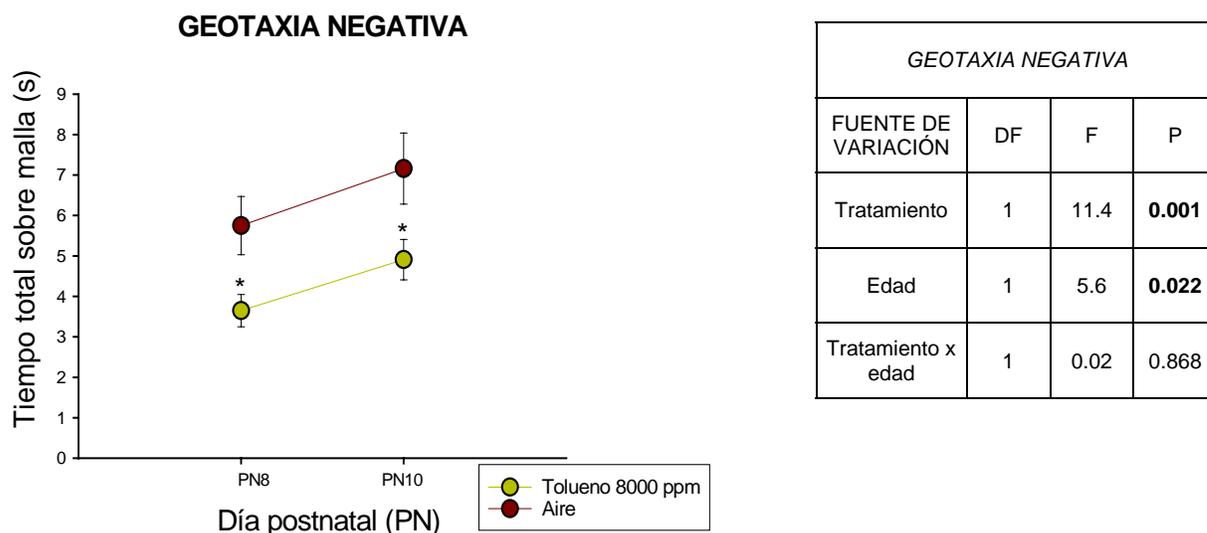
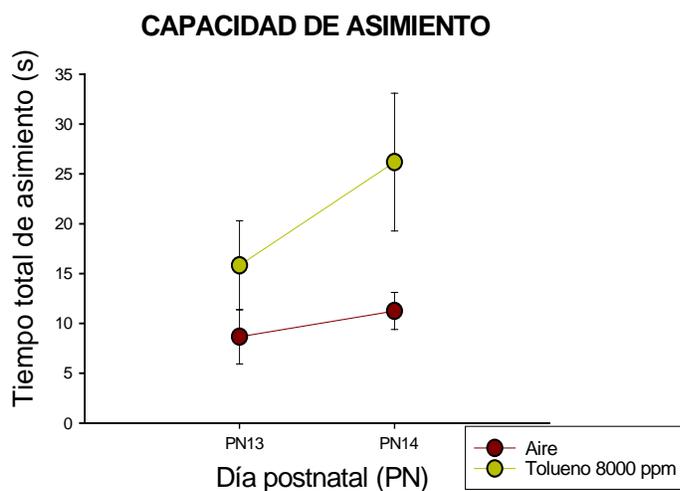


Figura 3 Fig 3. Efecto de la exposición prenatal a aire o tolueno 8000 ppm en la prueba de geotaxia negativa de las crías a los 8 y 10 días de nacidas. Los valores muestran la media \pm e.e. prueba U de Mann-Whitney * $p < 0.05$. La tabla muestra los valores de la prueba estadística ANOVA de dos vías.

7.3.3 Prueba de capacidad de asimiento

La figura 4 muestra el efecto de la exposición prenatal a aire o tolueno en la prueba de asimiento. En este caso no se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo tolueno. Sin embargo, hay una tendencia del grupo tolueno a mantenerse más tiempo sobre la varilla que el grupo control. El ANOVA de dos vías indica que sólo el tratamiento influye sobre el tiempo de asimiento (ver Figura 4).



ASIMIENTO			
FUENTE DE VARIACIÓN	DF	F	P
Tratamiento	1	7.4	0.009
Edad	1	2.5	0.117
Tratamiento x edad	1	0.9	0.343

Figura 4. Efecto de la exposición prenatal a aire o tolueno 8000 ppm en la prueba de capacidad de asimiento de las crías a los 13 y 14 días de nacidas. Los valores muestran la media \pm e.e. prueba U de Mann-Whitney no significativa. La tabla muestra los valores de la prueba estadística ANOVA de dos vías.

7.4 Prueba en crías al primer, tercer y sexto mes de edad

7.4.1 Actividad locomotora

La figura 5 muestra el efecto de la exposición a aire o tolueno sobre la actividad locomotora de las crías. Se observa que en el grupo control la actividad locomotora va disminuyendo conforme pasa el tiempo. Por su parte, el grupo tratado con tolueno mantiene constante su actividad locomotora a pesar del paso del tiempo. Al comparar los dos grupos se puede observar que hay diferencias significativas entre ambos grupos, presentándose la mayor diferencia al primer mes de edad. Por su parte, el ANOVA de dos vías muestra que la edad y la interacción de ambos factores sí influyeron sobre la actividad de los animales.

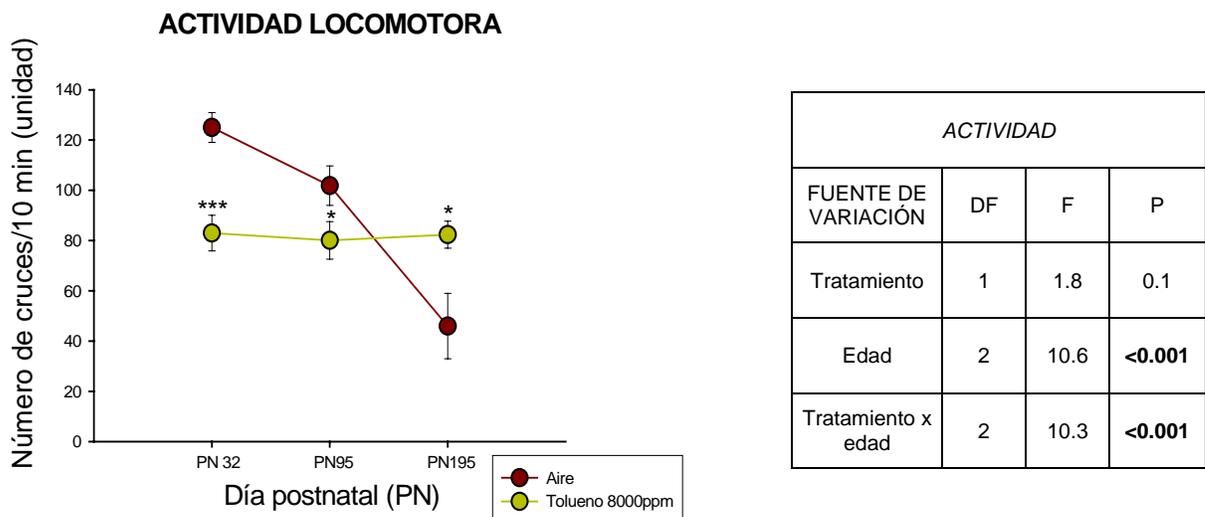


Figura 5 Efecto de la exposición prenatal a aire o tolueno 8000 ppm en la actividad locomotora de las crías al primer, tercer y sexto mes de edad. Los valores muestran la media \pm e.e. prueba U de Mann-Whitney * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. La tabla muestra los valores de la prueba estadística ANOVA de dos vías.

7.4.2 Modelos de ansiedad

7.4.2.1 Modelo de enterramiento defensivo

La figura 6 muestra el efecto de la exposición prenatal a aire o tolueno 8000 ppm sobre la conducta de los ratones que fueron sometidos al modelo de enterramiento defensivo

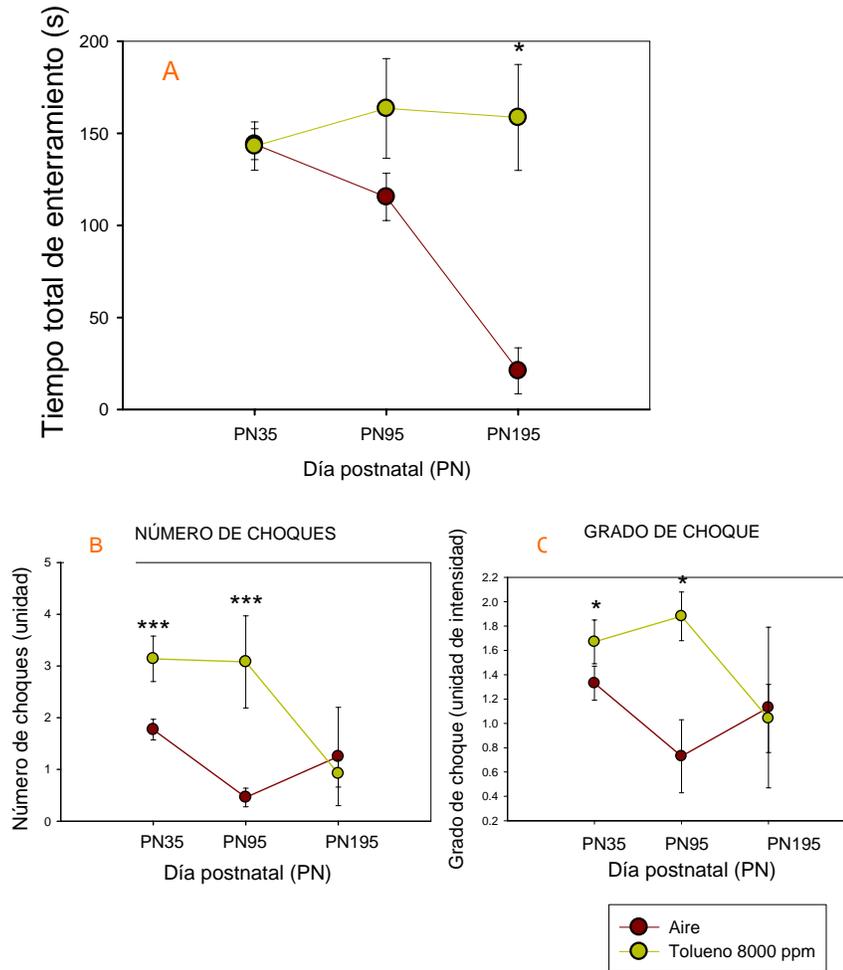
En el panel A se observa el tiempo total de enterramiento. El grupo control presentó una disminución en el tiempo total de enterramiento dependiente de la edad. Por su parte, el grupo expuesto a tolueno prenatalmente se mantuvo constante en el tiempo total de enterramiento a las diferentes edades. Al comparar ambos grupos, se puede observar que la mayor diferencia entre grupos se presentó al sexto mes de edad. El ANOVA de dos vías muestra que sólo la edad influyó de manera independiente en el tiempo total de enterramiento.

En el panel B se muestra el número de choques. El grupo control muestra un número de choques constante que no varía con la edad. A diferencia del grupo control, el grupo tolueno recibe mayor número de choques en los primeros meses de edad, pero esto se reduce hacia el sexto mes de edad. Al comparar ambos grupos, se puede observar que la mayor diferencia entre ambos se presentó en el primer y tercer mes de edad, siendo el grupo expuesto prenatalmente a tolueno el que presentó el mayor número de choques. El ANOVA de dos vías señala que sólo el tratamiento, de manera independiente, provocó variaciones significativas en este parámetro.

En el panel C se observa el grado de los choques recibidos por parte de las crías. El grupo control presentó una tendencia a disminuir el grado de choque recibido por parte de los ratones. El grupo expuesto a tolueno tuvo un leve incremento en el grado de choque, pero éste se redujo hacia al sexto mes de edad. Al comparar los dos grupos, se puede observar que el grupo tolueno presentó mayor grado de choque que el grupo control al primer y al tercer mes de edad.

Los parámetros de latencia de enterramiento, número de exploraciones hacia el electrodo y número de exploraciones hacia el aire no mostraron diferencias significativas en la prueba U de Mann - Whitney por lo que se convino no incluirlos en los resultados.

MODELO ENTERRAMIENTO DEFENSIVO



ENTERRAMIENTO DEFENSIVO				
CONDUCTA	FUENTE DE VARIACIÓN	DF	F	P
Tiempo total	Tratamiento	1	1.4	0.226
	Edad	3	2.9	0.040
Número choques	Tratamiento	1	6.9	0.010
	edad	2	2.7	0.070
	Tratamiento x edad	2	3.02	0.059

Figura 6 Efecto de la exposición prenatal a aire o tolueno 8000 ppm sobre (A) el tiempo total de enterramiento, (B) número y (C) grado de choques en el modelo de enterramiento defensivo de las crías al primer, tercer y sexto mes de edad. Los valores muestran la media \pm e.e. prueba U de Mann-Whitney * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. La tabla muestra los valores de la prueba estadística ANOVA de dos vías aplicada al tiempo total de enterramiento y número de choque en el modelo de enterramiento defensivo.

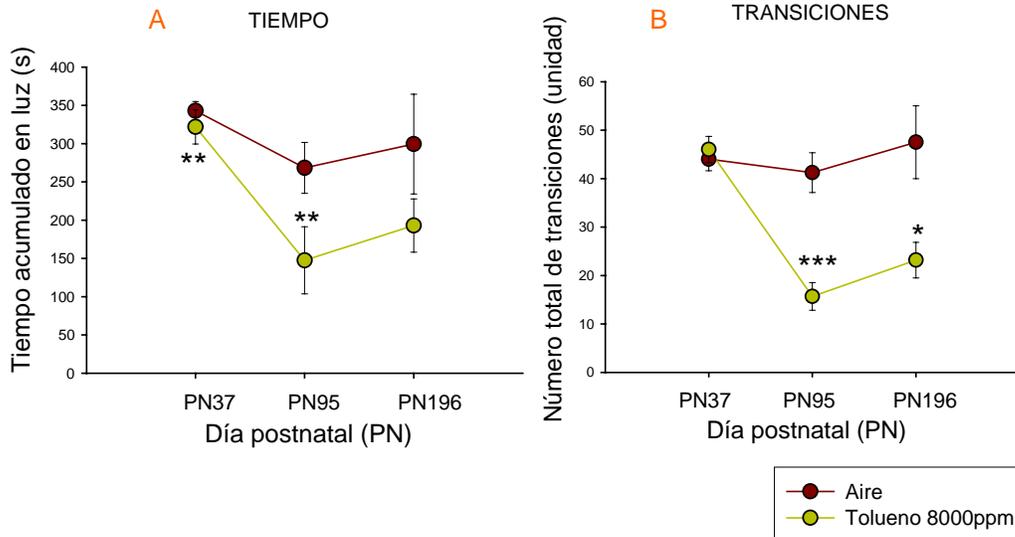
7.4.2.2 Modelos de luz/oscuridad

La figura 7 muestra el efecto de la exposición prenatal a aire o tolueno 8000 ppm sobre la conducta de ratones sometidos al modelo de ansiedad de luz/oscuridad.

En el panel A se observa el tiempo acumulado en la zona de luz. El grupo control se mantuvo constante en el tiempo acumulado que permaneció en la zona de luz a las diferentes edades analizadas. El grupo tratado con tolueno presentó una disminución del tiempo acumulado en luz y sus valores siempre se ubican por debajo de los valores del grupo control. Al comparar ambos grupos se observa una diferencia significativa en el tiempo de acumulado en la zona iluminada al primer y tercer mes de edad. El ANOVA de dos vías señala que en este parámetro influyó el tratamiento y la edad de manera independiente.

En el panel B se muestra el número total de transiciones entre el compartimento oscuro y el iluminado. El grupo control muestra un comportamiento constante en el número de transiciones en función de la edad. Por su parte, el grupo de tolueno muestra una disminución de este parámetro. Al comparar ambos grupos se puede observar que el grupo expuesto a tolueno tiende a presentar menor número de transiciones, con una diferencia significativa al tercer y sexto mes de edad. El ANOVA de dos vías muestra que el tratamiento y la edad de manera independiente y en conjunto influyeron significativamente en la variación de este parámetro.

MODELO LUZ - OSCURIDAD



LUZ - OSCURIDAD				
CONDUCTA	FUENTE DE VARIACIÓN	DF	F	P
Tiempo en luz	Tratamiento	1	11.1	0.001
	Edad	2	4.6	0.013
	Tratamiento x edad	2	0.2	0.807
Número de transiciones	Tratamiento	1	35.6	<0.001
	edad	2	7.9	<0.001
	Tratamiento x edad	2	5.4	0.007

Figura 7 Efecto de la exposición prenatal a aire o tolueno 8000 ppm sobre (A) el tiempo acumulado de inmovilidad en luz y (B) el número de transiciones en el modelo de luz –oscuridad de las crías al primer, tercer y sexto mes de edad. Los valores muestran la media \pm e.e. prueba U de Mann-Whitney * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. La tabla muestra los valores de la prueba estadística ANOVA dos vías.

7.4.3. Modelos de depresión

7.4.3.1. Modelos de nado forzado

La figura 8 muestra el efecto de la exposición prenatal a aire o tolueno 8000 ppm en animales sometidos a la prueba de depresión de nado forzado. En esta figura se muestran el tiempo acumulado de inmovilidad durante 10 minutos. En ambos casos se observa que el grupo control y el grupo tolueno permanecen constantes en el tiempo acumulado de inmovilidad. Al comparar ambos grupos no hubo diferencias significativas entre ellos.

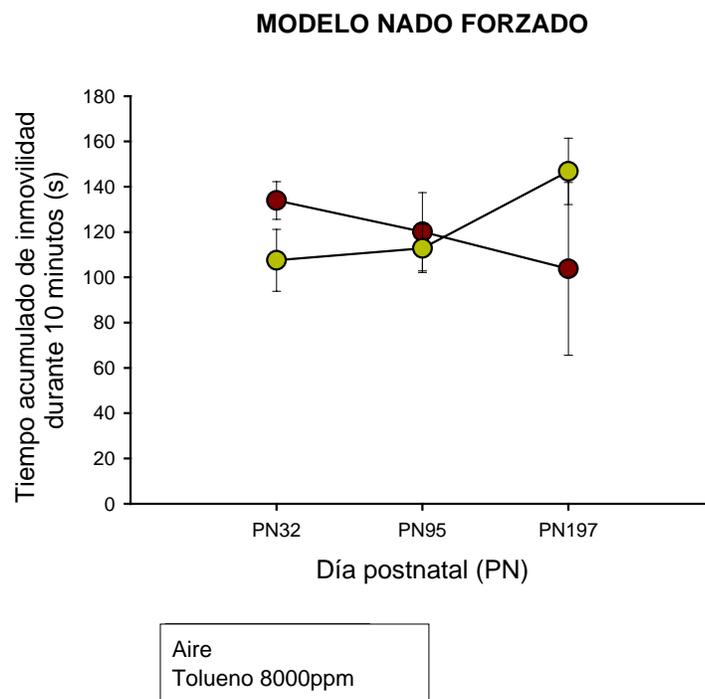


Figura 8 Efecto de la exposición prenatal a aire o tolueno 8000 ppm sobre el tiempo acumulado de inmovilidad a los 10 minutos de las crías al primer, tercer y sexto mes de edad. Los valores muestran la media \pm e.e. prueba U de Mann-Whitney no significativa.

7.4.3.2. Modelo de suspensión de la cola

La figura 9 muestra el efecto de la exposición prenatal a aire y tolueno en animales probados en el modelo de depresión de suspensión de la cola. El grupo control muestra una tendencia constante en los niveles de inmovilidad a lo largo de las edades probadas. El grupo tolueno muestra una tendencia no significativa a aumentar el tiempo acumulado de inmovilidad. Comparando los dos grupos, sólo se pueden observar tendencias por lo que no existe ninguna diferencia significativa entre ellos.

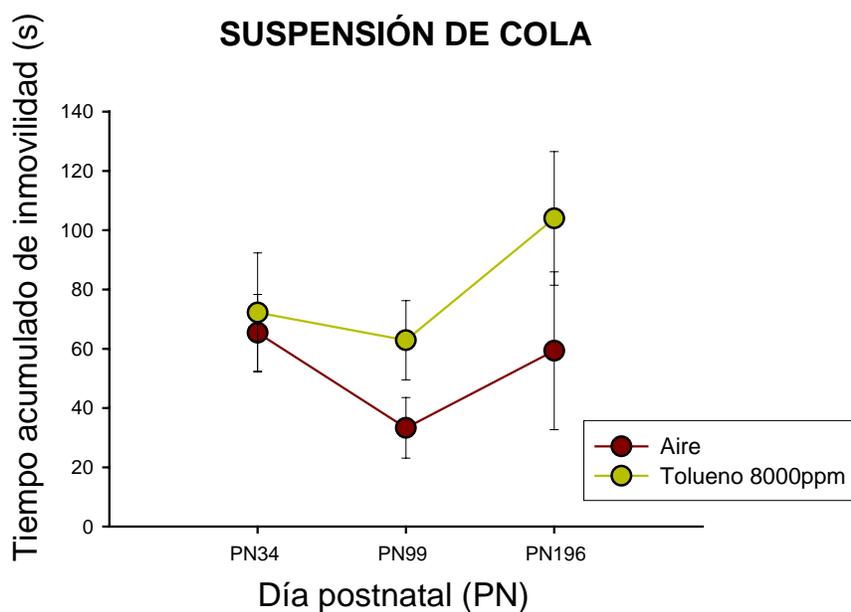


Figura 9 Efecto de la exposición prenatal a aire o tolueno 8000 ppm sobre el tiempo acumulado de inmovilidad en el modelo de suspensión de cola de las crías al primer, tercer y sexto mes de edad. Los valores muestran la media \pm e.e. prueba U de Mann-Whitney no significativa.

CAPÍTULO 8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

El propósito de esta investigación fue el de conocer los efectos que provoca de la exposición prenatal al tolueno en el desarrollo de la coordinación motora, de la fuerza y de los reflejos, así como los efectos conductuales en modelos de depresión y ansiedad en diferentes etapas de desarrollo y crecimiento del ratón.

Como se mencionó anteriormente, en humanos se han descrito casos de nacimientos prematuros y la aparición de una embriopatía conocida como el Síndrome Fetal por Disolventes, que se caracteriza por la presencia de rasgos morfológicos y psicomotores particulares tras la exposición prenatal a tolueno (Arnold et al., 1994; Pearson et al., 1994; Gospe, 1999; Edelfors et al., 2002; Chen et al., 2004; Lee et al., 2004; Chien et al., 2005), por lo que en nuestro trabajo se consideró importante la identificación de posibles malformaciones en las camadas resultantes de ratones hembra expuestas a tolueno durante la gestación. Los resultados mostraron que no hubo nacimientos prematuros, así como ningún tipo de malformación visible en las crías expuestas prenatalmente a tolueno 8000 ppm. Estos datos difieren con lo que se ha descrito en otras investigaciones donde se han expuesto ratas preñadas a diferentes concentraciones de tolueno y, se ha encontrado, que a 12000 ppm hay un incremento significativo de características negativas como retraso en la erupción de los incisivos, así como un retardo en el desarrollo físico de las crías (Bowen et al., 2005; Thiel y cols., 1996). Sin embargo, el contraste de estos resultados se puede deber a que se trata de dos especies

diferentes, o a las diversas concentraciones utilizadas, por lo que los resultados no son excluyentes.

Por otra parte, en el presente trabajo, las camadas expuestas prenatalmente a tolueno presentaron una baja tasa de mortalidad. Estos resultados también contrastan con lo reportado en trabajos previos con crías de ratas expuestas prenatalmente a 8000 y 12000 ppm de tolueno, en donde hubo un incremento en la mortalidad antes del primer mes de edad (Bowen, et al., 2005, Thiel y cols., 1996). Es importante enfatizar que las investigaciones en las que se han reportado este tipo de efectos se utilizan ratas como sujetos experimentales, por lo que las diferencias entre este trabajo y los trabajos previos podrían deberse a las diferentes especies utilizadas. Un ejemplo de esto ha sido reportado por Nakajima y colaboradores, quienes señalan que existen diferencias en el metabolismo de algunos disolventes de abuso en roedores, ya que encontraron que los ratones presentaron una mayor actividad metabólica para el benceno y tricloroetileno (TRI) en comparación con las ratas (Nakajima T., et al., 1993).

El uso de disolventes de abuso durante el embarazo provoca, entre otros efectos negativos, bajo peso en los recién nacidos (Morton, 1987). Los datos que obtuvimos en la presente investigación confirman este hecho, ya que el peso del grupo de las crías preexpuestas a tolueno siempre se mantuvo por debajo del grupo control. Thiel y Bowen han reportado resultados similares en ratas indicando que el bajo peso de las crías al nacer estaría relacionado con la concentración del tolueno durante la exposición prenatal, ya que, conforme aumenta la

concentración del disolvente, el peso promedio de las crías disminuye (Thiel, 1996; Bowen et al., 2005).

Como se ha mencionado anteriormente, la exposición prenatal a tolueno afecta la formación de estructuras como el cerebelo, el hipocampo, la corteza frontal y la occipital (Chen, 2004). Así mismo, el tolueno provoca una reducción en el número de neuronas en la corteza cerebral (Gospe et al., 1999) lo cual se traduce en alteraciones en el desarrollo psicomotor. En este trabajo se trató de identificar dichas variaciones utilizando un grupo de pruebas que miden el desarrollo de coordinación motora (prueba de geotaxia negativa), de reflejos (prueba de enderezamiento), y de fuerza (prueba de capacidad de asimiento). Los resultados obtenidos señalan que las crías tratadas prenatalmente con tolueno presentan una disminución en la coordinación motora y ninguna variación en el reflejo de enderezamiento ni en la fuerza. En un trabajo previo, Bowen reportó resultados similares en la disminución de la coordinación motora en ratas expuestas prenatalmente a 8000 y 12000 ppm de tolueno utilizando las mismas pruebas (Bowen et al., 2005). Por lo tanto, en ambas investigaciones se obtuvo el mismo efecto del tolueno al disminuir la coordinación motora de las crías posiblemente a la alteración en la formación de estructuras cerebrales relacionadas con esta función motora como lo es el cerebelo. Esta posibilidad se relaciona con la disfunción cerebelar característica del síndrome descrito para humanos, sin embargo para corroborar esta hipótesis convendría completar este estudio en el futuro con un análisis histológico de esta estructura.

En la segunda parte del trabajo se estudió la actividad locomotora de los animales prenatalmente expuestos a tolueno en el modelo de “campo abierto” una vez que cumplieron un mes, tres meses y seis meses de edad. Esta prueba de actividad nos ayuda a conocer el estado general de los animales, ya que en ella podemos observar la actividad general del ratón en un espacio abierto, incluyendo la coordinación de sus movimientos. Los resultados mostraron que la actividad general del grupo control disminuyó conforme aumentó la edad, mientras que la actividad del grupo preexpuesto a tolueno se mantuvo constante a pesar del paso del tiempo. Es importante señalar que la actividad de los roedores en el modelo de campo abierto depende en gran medida del componente novedoso de la prueba, aprovechando la característica innata de los roedores de explorar lugares desconocidos. Es posible que los animales control presentaran una disminución de la actividad locomotora derivada del aprendizaje, como consecuencia de la exposición repetida al modelo, (es decir dejan de explorar porque ya conocen el ambiente), más que por un efecto debido a la edad. La razón por la cual los animales prenatalmente expuestos a tolueno no presentan esta disminución de la actividad general en campo abierto, tras una exposición repetida al modelo, se desconoce. Sin embargo, es interesante señalar que en trabajos recientes en el laboratorio, se ha reportado que los animales expuestos agudamente a tolueno presentan una disminución de la capacidad de reconocer objetos novedosos o estímulos aversivos (Páez-Martínez et al., 2003b). Si la capacidad de reconocer ambientes conocidos se encuentra también disminuida en animales prenatalmente expuestos a tolueno, esto último podría explicar el hecho de que estos animales presenten una actividad general constante en el modelo de campo abierto aún

cuando fueron sometidos repetidamente al modelo, es decir que el ambiente continúa siendo novedoso. Sin embargo, es necesario realizar estudios específicos para comprobar esta hipótesis. Otra posibilidad, que también debe considerarse, es el hecho de que se ha reportado una hiperactividad locomotora como parte del Síndrome Fetal por Disolventes en humanos (Chen et al., 2004). Es posible que los animales que fueron expuestos prenatalmente a tolueno presenten esta característica del síndrome y lo que observamos en el modelo de campo abierto sea un efecto de hiperactividad. Para comprender mejor este hallazgo, se deberán realizar experimentos específicos encaminados a discernir entre estas posibilidades. Es importante señalar que en investigaciones similares en las que se utilizaron ratas como sujetos experimentales, no se encontraron alteraciones en la actividad locomotora de ratas tras la exposición prenatal a tolueno 300, 600, 1000 y 1200 ppm, utilizando un aparato con celdas fotosensibles para evaluarla (Thiel y cols., 1996),

Los modelos animales, como mencionamos anteriormente, se utilizan como una preparación experimental desarrollada en una especie con la finalidad de estudiar fenómenos que ocurren en otra especie. Los modelos utilizados en esta investigación para el estudio de conductas similares a la ansiedad fueron el de enterramiento defensivo y el modelo de luz/oscuridad. Una ventaja del uso de estos dos modelos es que cada uno mide diferentes expresiones conductuales de ansiedad o temor. Por una parte, en el modelo de luz/oscuridad los ratones presentan una disminución en la conducta de exploración al estar en un ambiente aversivo (zona desconocida y altamente iluminada), mientras que en el modelo de

enterramiento defensivo los ratones pueden expresar dos tipos de conductas al estar frente a un estímulo aversivo (electrodo electrificado). Por una parte, pueden presentar una conducta activa que es la conducta de enterramiento, o bien, una conducta pasiva al inmovilizarse o “congelarse” ante el estímulo aversivo.

El modelo de enterramiento defensivo se basa en la conducta natural de los roedores de enterrar o esconder aquellos estímulos que le son aversivos como puede ser una luz brillante, un olor desagradable, e incluso pueden llegar a enterrar al macho dominante (Pinel y Treit, 1983). Como se mencionó anteriormente, en este modelo el estímulo aversivo es un electrodo que produce una pequeña descarga al hacer contacto con él, por lo que el parámetro registrado que se relaciona directamente con la ansiedad es la conducta de enterramiento. Se ha demostrado que las drogas con propiedades ansiolíticas en la práctica clínica disminuyen esta conducta, por lo que el enterramiento se ha usado extensamente como un índice de miedo/ansiedad en estudios de investigación básica (De Boer y col., 2003).

Nuestros resultados en este modelo señalan que el grupo control presentó una disminución del tiempo total de enterramiento conforme aumentaba la edad. Este resultado se puede deber a que los animales, al ser expuestos repetidamente al modelo, reconozcan el estímulo aversivo y en lugar de enterrarlo ya no se acerquen a él. De hecho, Pinel y Treit reportaron que un animal expuesto al modelo puede recordarlo hasta 20 días después de haber sido sometido al estímulo aversivo (Pinel y Treit, 1978). Sin embargo, no se han reportado estudios

en los que se prueben animales hasta tres meses después de la primera exposición al modelo de enterramiento. Será necesario hacer estudios específicos para ver hasta cuánto tiempo después de haber pasado por la prueba de enterramiento el ratón recuerda el modelo. Por otra parte, también existe la posibilidad de que la misma edad modifique la expresión de la conducta de enterramiento. Por ejemplo, López-Rubalcava y Fernández-Guasti en 1996 reportaron que las ratas modifican la expresión de temor o ansiedad dependiendo de su edad al ser sometidas al modelo de enterramiento defensivo. En este caso, los animales de 3 meses de edad muestran mayor conducta de enterramiento y poca inmovilidad o congelamiento, mientras que animales de 6 meses de edad presentan menor conducta de enterramiento y mayor conducta de inmovilidad o congelamiento (López – Rubalcava et al., 1996). Con base en estos datos, es posible que al igual que las ratas, los ratones modifiquen la expresión conductual de temor/ansiedad dependiendo de la edad del sujeto experimental.

En nuestra investigación, el grupo preexposto a tolueno mantuvo constante la conducta de enterramiento a pesar del cambio en edad. De igual manera, el número de choques se mantuvo constante al primer y tercer mes de edad. Al igual que en la actividad locomotora puedes ser que en este modelo el tolueno afecte el aprendizaje o la memoria de reconocimiento de un estímulo aversivo (electrodo). Este efecto podría, en un momento dado, explicar por qué en estos animales no disminuye la conducta de enterramiento, aún cuando se exponga repetidamente el ratón al modelo. Sin embargo, se deberán realizar más estudios para confirmar esta interpretación. Es importante señalar que en el

modelo de enterramiento defensivo un incremento en la conducta de enterramiento se interpreta como un incremento en los niveles de ansiedad o temor del animal. En un estudio previo, Treit examinó varios agentes e identificó a la escopolamina, la clorpromacina, la yohimbina y el pentilnetetrazol como agentes que incrementan la conducta de enterramiento (Treit, D., 1989). Es posible que la exposición prenatal a tolueno incremente los niveles de ansiedad y que esto se refleje en un incremento en la conducta de enterramiento al mes y a los tres meses de edad, en comparación con el grupo control. Por otra parte, también es importante señalar que en trabajos previos se ha reportado que la exposición a tolueno de forma aguda de animales adultos reduce la conducta de enterramiento, es decir tiene efectos ansiolíticos (López-Rubalcava et al., 2000 y Páez-Martínez et al., 2003). Se deberán realizar estudios específicos para analizar estos resultados tipo ansiolíticos. Sin embargo, hay que mencionar que en apoyo al efecto ansiogénico del tolueno por exposición prenatal, están los resultados encontrados en el modelo de luz/oscuridad (ver más adelante).

Finalmente, en el modelo de enterramiento defensivo, se observó que el tolueno provocó que la variable del grado de choque en el grupo pretratado con tolueno fuera mayor que en el grupo control, indicando una mayor susceptibilidad al dolor y mayor sensibilización al choque del electrodo en el grupo experimental. Esto se corrobora con lo reportado por Páez-Martínez y colaboradores acerca de que el tolueno posee efectos pronociceptivos, por lo que hay una mayor sensibilidad al dolor (Páez-Martínez et al., 2003b, 2003c).

El otro modelo de ansiedad utilizado fue la prueba de luz/oscuridad, la cual se basa en la aversión innata de los roedores a las áreas iluminadas y la exploración espontánea como respuesta a estímulos o situaciones estresantes, como lo es un ambiente nuevo y la luz. Se ha encontrado que los ansiolíticos incrementan la exploración de un ambiente aversivo (observándose un incremento en el número de transiciones entre los dos compartimientos del modelo) y un incremento en el tiempo acumulado en la zona iluminada, mientras que los ansiogénicos disminuyen estos parámetros (Bourin y col., 2003).

Nuestros resultados señalan que el grupo control permaneció mayor tiempo en el área iluminada y presentó mayor cantidad de transiciones que el grupo preexposto a tolueno. Estos resultados confirman lo reportado por Bourin y Hascoët en 2003, donde ratones control exhiben un aumento en la actividad total, caracterizada por un incremento en los movimientos en cada compartimento, así como un incremento en el número de transiciones (Bourin y Hascoët, 2003). Estos resultados se pueden deber, como mencionamos anteriormente en el modelo de enterramiento defensivo, a una habituación al modelo (Bourin y Hascoët, 2003). Por otra parte, se observa que los animales prenatalmente expuestos a tolueno presentan menor número de transiciones y pasan menos tiempo en el área iluminada que el grupo control, lo que se puede interpretar como un incremento en los niveles de ansiedad o temor. Esto se puede deber a que el tolueno presente nuevamente alguna propiedad que afecte el aprendizaje o la memoria de reconocimiento del estímulo aversivo, que en este caso fue la luz. Esta incapacidad de aprendizaje o memoria por parte de las crías en el modelo de

luz/oscuridad es similar al obtenido en el modelo de enterramiento defensivo, por lo que se ambos modelos convergen en la teoría de que el tolueno administrado prenatalmente incrementa los niveles de ansiedad.

En conjunto, ambos modelos señalan que el tolueno parece tener efecto tipo ansiogénico en animales expuestos durante la etapa prenatal, lo cual contrasta claramente con lo observado en animales expuestos al tolueno durante la etapa adulta.

Los modelos animales utilizados en esta investigación para el estudio de conductas similares a la depresión, fueron el de nado forzado y el de suspensión de la cola.

Las bases de la prueba de nado forzado consisten en someter al animal a una situación estresante de la que no puede escapar. En algún momento se presenta una conducta de inmovilidad, que se considera un estado de “desesperanza” conductual, el cual, se propone, es análogo al estado de desesperanza o abandono que muestra un individuo deprimido (Cyran et al., 2005). Cabe señalar que mediante el uso de esta prueba ha sido posible determinar los mecanismos de acción de diversos antidepresivos, substratos neuroanatómicos participantes en la depresión experimental, así como cambios endocrinos y neuroquímicos (Estrada-Camarena, 2006).

La base de la prueba de suspensión de cola también está en someter al animal a una situación estresante de la cual no hay manera de escapar. En esta situación al principio se presentan movimientos orientados al escape de la situación pero, posteriormente, se toma una postura de inmovilidad ante la imposibilidad del escape. Esta inmovilidad parece ser análoga a la observación clínica de pacientes deprimidos que carecen de la motivación para realizar esfuerzos, lo cual se refleja en una disfunción psicomotora pronunciada. Se ha determinado que tratamientos antidepresivos provocan la persistencia de conductas dirigidas al escape por periodos de tiempo más largos (Cyran et al., 2005).

Es interesante señalar que en ninguno de los dos modelos de depresión utilizados se observó efecto alguno de la exposición prenatal a tolueno, contrario a lo observado en los modelos de ansiedad. Sin embargo, en otras investigaciones llevadas a cabo en nuestro laboratorio, se ha reportado que tras la exposición aguda, el tolueno tiene un efecto tipo antidepresivo, dependiente de la concentración, en los mismos modelos de depresión (Soberanes, 2007).

De este proyecto se derivan un gran número de posibles investigaciones, como se mencionó anteriormente en la discusión de los resultados, así como una gran cantidad de variantes para esta línea de investigación. Algunas de estas proyecciones son:

- Utilizar crías hembras
- Utilizar diversas concentraciones de tolueno

- Utilizar otros compuestos de los disolventes de abuso
- Utilizar otros modelos de ansiedad y depresión

Con base en estos hallazgos, otra perspectiva de investigación que puede ser de interés es estudiar los efectos de la exposición a disolventes en diferentes etapas de maduración de las crías.

Cabe señalar que, además de la exposición prenatal, se ha observado que existe un periodo llamado sinaptogénesis o aceleración del crecimiento cerebral, el cual representa un periodo postnatal de desarrollo, durante el cual muchos componentes del cerebro en desarrollo son particularmente vulnerables al efecto de neurotóxicos. Este periodo ocurre durante la etapa temprana postnatal en ratas y corresponde al tercer trimestre del desarrollo fetal humano. (Dobbing J. Sands J., 1979). A pesar de que nuestra investigación sólo abarcó las últimas dos semanas de exposición prenatal, los resultados que se han obtenido en ratas expuestas durante la sinaptogénesis, demuestran que el tolueno provoca un aumento en la actividad locomotora, una disminución en el umbral a la presentación de convulsiones inducidas por NMDA y un incremento en la expresión de la subunidad NR2A en hipocampo y cerebelo (Lee et. al, 2004; Chen, 2004). Estos datos señalan que este disolvente induce cambios en periodos postnatales tempranos, provocando cambios en estructuras cerebrales y en la neuroplasticidad del sistema nervioso (Lee et. al, 2004), lo que está demostrando nuevamente, que este periodo es de gran susceptibilidad, incluso mayor, que la adolescencia temprana (Chien et al, 2005).

Finalmente, esperamos que con esta investigación se logre contribuir a hacer un poco de conciencia respecto a los aspectos sociales que el fenómeno de drogadicción con inhalables representa en nuestro país. Las cifras que a este respecto proveen los censos sobre adicciones son alarmantes. Durante el año 2002 los pacientes atendidos en los Centros de Tratamiento Gubernamentales y No Gubernamentales (específicamente en los Centros de Integración Juvenil), muestran que los inhalables se situaron como la tercera droga de inicio más reportada (después de la marihuana y la cocaína) y, en el cuarto lugar, de las drogas de impacto social (Observatorio mexicano en tabaco, alcohol y otras drogas, 2003). La mayoría de los usuarios se encuentra en el rango de 5 a 14 años de edad, sólo han concluido la primaria y la mayoría pertenece a un nivel socioeconómico medio-bajo, datos que reflejan los aspectos culturales, sociales y económicos de este fenómeno.

Sin embargo, si bien sigue predominando la población masculina, la población femenina aumenta en el consumo de todas las drogas de abuso. Los estudios respecto al consumo de drogas en general, o de alcohol en particular, y el embarazo son realmente escasos ya que es muy difícil obtenerlos, debido a que la población que abusa de inhalables no desea acercarse a las instituciones de atención médica (Romero, 1997). Con respecto a las drogas médicas y las drogas ilegales, pocos son los trabajos que se han dedicado a estudiar el uso de este tipo de drogas psicotrópicas durante el embarazo y la lactancia en nuestro país. En Latinoamérica, el consumo de cocaína se ha iniciado desde hace una década en forma importante por hombres y mujeres, sin embargo, sigue siendo prevaeciente

el consumo de marihuana y disolventes inhalables consumidos en su mayoría por población joven, por lo que pueden darse la convergencia entre el embarazo en adolescentes y el abuso de sustancias en grupos de mayor riesgo, como pueden ser las niñas de la calle (Romero, 1997).

REFERENCIAS

- Ayres P.H., Taylor W. D., Solvents en *Principles and Methods of Toxicology*, 2a ed., Wallace Hayes, Raven Press, EUA, (1989), pp. 102-129.
- Bale S., Tu Y., Carpenter-Hyland E. P., Chandler L. J., Woodward J. J., Alterations in glutamatergic and gabaergic ion channel activity in hippocampal neurons following exposure to the abused solvent toluene, *Neuroscience* 130 (2005) 197 – 206.
- Bourin M., Hacoët M., The mouse light/dark box test, *Eur. J. Pharmacol.* 463 (2003) 55-65.
- Bowen S. E., Batis J.C., Páez-Martínez N., Cruz S.L., The last decade of solvent research in animal models of abuse: Mechanistic and behavioral studies, *Neurotoxicology and Teratology* 28 (6) (2006) 636-47.
- Brackbill Y., Woodward L., Medicamentos y embarazo, contacto del niño con los medicamentos y consumo materno, Biblioteca de la Salud, Serie Fronteras, Instituto Nacional de Salud Pública, Secretaria de Salud, Fondo de Cultura Económica, México, (1988) pp: 5-6.
- Chen H. H., Wei C., Chan M., Neonatal Toluene Exposure Alters Glutamate-Induced Calcium Signaling in Developing Cerebellar Granule Neurons, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1025 (2004) 556–560.

- Chen H. H., Lee Y., Chan M., Lo P., The Role of *N*-Methyl-D-aspartate Receptors in Neurobehavioral Changes Induced by Toluene Exposure during Synaptogenesis, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1025 (2004): 552–555.
- Chien T. H., Chan M., Tang Y., Chen H., Toluene exposure during the brain growth spurt reduces behavioral responses to noncompetitive *N*-methyl-*D*-aspartate receptor antagonists in adult rats, *Psychopharmacology* (2005) 182: 468-474.
- Clement Y., Chapouthier G., Biological bases of anxiety. *Neurosci. Biol. Behav. Rev.*, 22 (1998) 623-633.
- Costero, Barroso R., Alteraciones microscópicas encontradas en el Sistema Nervioso Central de gatos y ratas albinas, relacionables con la intoxicación experimental por inhalación de solventes industriales (tolueno y tiner). En Compilación de investigaciones específicas en disolventes inhalables. Centro de Integración Juvenil, México. (1988) pp: 411-440.
- Cruz S. L., Mirshashi T., Thomas B., Balster R. L., Woodward J. J., Effects of the abused solvent toluene on recombinant *N*-methyl-*D*-aspartate and non-*N*-methyl-*D*-aspartate receptors expressed in *Xenopus* oocytes, *Br. J. Pharmacol. Exp. Ther.* 286 (1998) 334-340.
- Cruz S. L., López-Rubalcava C., Efectos y mecanismos de acción de las drogas de abuso en Las adicciones: dimensión, impacto y perspectivas, R. Tapia, 2ª ed. Manual Moderno, (2001), pp. 261-275.

- Cruz S. L., Gauthereau M. Y., Camacho-Muñoz C., Lopez-Rubalcava C., Balster R. L., Effects of inhaled tolueno and 1,1,1-trichloroethane on seizures and death produced by *N*-methyl-D-aspartic acid in mice. *Behav. Brain. Res.* 140 (2003) 195-202.
- Cryan J. F., Valentino R. J., Lucki I., Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test, *Neurosci. Biol. Behav. Rev.* 29 (2005) 547-569.
- Cyran J. F., Mombereau C., Vassout A., The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: Review of pharmacological and genetic studies in mice, *Neurosci. Biol. Behav. Rev.* 29 (2005) 571-625.
- Curzon G., Gibson E., Kenneddy A. J., Kennett G. A., Sarma G. S., Anxiogenic and other effects of MCCP, a 5-HT_{1C} agonist. En *New concepts in anxiety*. M. Briley and S. E. File, Ed. The MacMillan Press, London, (1991), pp 154-168.
- De Boer S., Koolhaas J. M., Defensive burying in rodents: ethology, neurobiology and psychopharmacology, *Eur. J. Pharmacol.* 463 (2003) 145-161.
- Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM – IV) American Psychiatric Association, Washington, DC, (1995) pp: 181-278, 323-456.
- Dobbing J., Sands J., Comparative aspects of the brain growth spurt, *Early Hum. Dev.* (1979) 3:79–83.

- Edelfors S., Hass U., Hougaard K. S., Changes in Markers of Oxidative Stress and Membrane Properties in Synaptosomes from Rats Exposed Prenatally to Toluene, *Pharmacology & Toxicology* (2002), 90, 26–31.
- Estrada – Camarena E., Fernández – Guasti A., López – Rubalcava C., Interaction between estrogens and antidepressants in the forced swimming test in rats, *Psychopharmacology* (2004) 173: 139-145.
- Estrada – Camarena E., Fernández – Guasti A., López – Rubalcava C., Participation of the 5-HT_{1A} receptor in the antidepressant-like effect of estrogens in the forced swimming test, *Neuropsychopharmacology* (2006) 31: 247-255.
- Geyer M. Y Markou A., Animal models of psychiatric disorders. (In) *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*, Ed. Bloom, F.E. & Kupfer, D.J. New York: Raven Press (1995) pp: 787–798.
- Gibbons R., Davis J., Consistent evidence for biological subtype of depression characterized by low CSF monoamine levels. *Acta Psychiatr Scand.* (1986) 74:8-12.
- Gospe S. M., Zhou S. S., Prenatal Exposure to Toluene Results in Abnormal Neurogenesis and Migration in Rat Somatosensory Cortex, *Pediatric Research* (2000), 47 362-368.

- Grasso P., Sharratt M., Davies D.M., Irvine D., Neurophysiological and Psychological Disorders and Occupational Exposure to Organic Solvents en *Fd Chem Toxic.* 22 (1984) 819-852.
- Hafez E. S., Reproduction and breeding techniques for laboratory animals, Lea and Febiger, USA, (1970) pp: 158-167.
- Institute for Laboratory Animal Research, Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research, ILAR Press (1993) pp.: 181-190.
- Karcz-Kubicha M. y Liljequist S., Evidence for an anxiogenic action of AMPA receptor antagonists in the plus-maze test, *Eur. J. Pharmacol.*, 279 (1995) 171-177.
- Jessa M., Anzar M., Bidinsky A. y Plaznik A., The effects of repeated administration of diazepam, MK 801 y CGP 37849 on rat behaviour in two models of anxiety. *Eur. Psychopharmacol.*, 6 (1996) 55-61.
- Lee Y. F., Lo P.S., Wang Y.J., Hu A., Chen H.H., Neonatal toluene exposure alters N-methyl-D-aspartate receptor subunit expression in the hippocampus and cerebellum in juvenile rats, *Neuropharmacology* 48 (2005) 195–203.
- López-Rubalcava C., Fernández-Guasti A., Urbá-Holmgren R., Age-Dependent Differences in the Rat's Conditioned Defensive Burying Behavior: Effect of 5-HT 1A Compounds, *Developmental Psychobiology* 29 (1996) (2):157 – 169.

- Lopreato G. F., Phelan R., Borghese C. M., Beck Stead M. J., Mihic S. J., Inhaled drugs of abuse enhance serotonin-3 receptor function, *Drug Alcohol Depend*, (2003) 70:11-15.
- Madden J. S., Alcoholismo y farmacodependencia, 2a ed., El Manual Moderno, S.A. de C.V, (1986), pp. 86-94.
- Medina-Mora M. E., Los conceptos de uso, abuso, dependencia y su medición en Las adicciones: dimensión, impacto y perspectivas, R. Tapia, 2ª ed. Manual Moderno, (2001), pp. 21-44.
- Mitchell J. L., Pregnant, Substance – Using Women, Treatment Improvement Protocol (TIP), Series 2, US Department of Health and Human Services, (1993) pp: 16.
- Moore K., Persuad T. V. N., Embriología clínica, Mc Graw – Hill Interamericana, México, (1998) pp.: 135-147.
- Morton H. G., Occurrence and treatment of solvent abuse in children and adolescents en *Pharmac. Ther* 33 (1987) 449 - 469.
- Moser VC, Balster RL, Acute motor and lethal effects of inhaled toluene, 1,1,1-trichloroethane, halothane and ethanol in mice: effects of exposure duration. *Toxicol. App. Pharmacol.* 1985; 77:285-291.
- Nagy A., Gertsenstein M., Vintersten K., Behringer R., Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, EUA, (2003) pp: 34-37.

- Nakajima T., Wang R.S., et al, Cytochrome P450-related differences between rats and mice in the metabolism of benzene, toluene and trichloroethylene in liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.* 9;45(5) (1993): 1079-85.
- National Institute on Drug Abuse (NIDA): Community Drug Alert Bulletin, Inhalants, EUA, (2004).
- National Institute on Drug Abuse (NIDA): Drug dependence in pregnancy: clinical management of mother and child, US Department of Health, Education, and Welfare, Public Health Service, Alcohol, Drug Abuse and Mental Health Administration, NIDA, pp: 17-19.
- Observatorio mexicano en tabaco, alcohol y otras drogas. Editorial del Consejo Nacional contra las Adicciones, México, (2003).
- Olivier B., Van Wijngaarden I. , Soudijn W., 5-HT₃ receptor antagonists and anxiety; a preclinical and clinical review, *European Neuropsychopharmacology*, 10 (1999): 77-95.
- Paddy S., Alcohol, Tobacco and Other drugs may harm the unborn, US Department of Health and Human Services, (1990) pp: 15-20.
- Páez – Martínez N., Lopez-Rubalcava C., Cruz S. L., Avances Recientes en la Investigación de los Mecanismos Celulares de Acción de los Disolventes de Abuso, *Salud Ment.* 26 (2003a) 43-50

- Páez – Martínez N., Lopez-Rubalcava C., Cruz S. L., Avances en la investigación básica de los efectos in vivo de los disolventes de abuso, *Salud Ment.* , 26 (2003b) 8-16.
- Páez – Martínez N., Cruz S. L., Lopez-Rubalcava C., Comparative study of the effects of toluene, benzene, 1,1,1-trichloroethane, diethyl ether, and flurothyl on anxiety and nociception in mice, *Toxicol. App. Pharmacol* 193 (2003c) 9-16.
- Pinel J. P., Treit D., Burying as a defensive response in rats, *J.Comp. Physiol. Psychol* 92 (1978) 708-712.
- Pinel J. P., Treit D., The conditioned defensive burying paradigm and behavioral neuroscience. En: Robinson, T.E. (Ed.), *Behavioral Approaches to Brain Research*. Oxford Univ. Press, New York, (1983) pp. 212– 234.
- Pittenger C., Sanadora G., Kristal J. H., The NMDA receptor as a therapeutic target in major depressive disorder, *CNS Neurol Disord Drug Targets* (2007) 101-15.
- Rodríguez–Manzo G., López-Rubalcava C., Hen R., Fernández-Guasti A., Participation of 5-HT1B receptors in the inhibitory actions of serotonin on masculine sexual behavior of mice: pharmacological analysis in 5-HT1B receptor knockout mice, *British Journal of Pharmacology* (2002) 136, 1127– 1134.

- Romero M., Gómez Castro C., La mujer embarazada con problemas de adicciones: consideraciones de género, investigación y tratamiento, *Perinatología y Reproducción Humana*, 11 (1997) 207-216.
- Rosenbaun J., The drug treatment of anxiety, *N. Engl j Med* 306 (1982) 401 – 404.
- Schildkraut J. J., The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* (1995) 7 (4):524-533.
- Schuckit M. A., Drug and alcohol abuse. A Clinical Guide to Diagnosis and Treatment, 5a ed. Kluwer Academic / Plenum Publishers, EUA, (2000), pp. 47-52.
- Soberanes P., *Evaluación de las propiedades antidepresivas de tolueno en dos modelos de depresión*, S. L. Cruz, México, UNAM, Tesis licenciatura, (2007).
- Strüder H. K., Wiecker H., Physiology and pathophysiology of the serotonergic system and its implications, *Int J Sports Med*. (2001) 467-81.
- Thiel R., Chahoud I., Postnatal development and behaviour of Wistar rats after prenatal toluene exposure, *Arch Toxicol* (1997) 71: 258-265.
- Wiley J. L. y Balster R. L., Preclinical evaluation of N-methyl-D-aspartate antagonists for antianxiety effects: a review. In Multiple sigma and PCP receptor ligands: Mechanisms for neuromodulation and neuroprotection? J. M. Kamenka and E. F. Domino, ed. NPP Books, Ann Arbor (1992), pp 801-815.

- Wiley J. I., Bale A. S., Balster R. I., Evaluation of toluene dependence and cross-sensitization to diazepam. *Life Sci*, 72 (2003), 23-33.
- Williams J. M., Stafford D., Steketee J. D., Effects of repeated inhalation of toluene on ionotropic GABA_A and glutamate receptor subunit levels in rat brain, *Neurochem. Int.* 46 (2005) 1 – 10.
- Willner P., Validation criteria for animal models of human mental disorders: learned helplessness as a paradigm case. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. (1986) 10(6):677-90.