



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO**

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS

"DR. IGNACIO CHÁVEZ"

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

**“PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES PURINÉRGICOS P2X_{2/3}
Y P2X₃ EN EL EFECTO NOCICEPTIVO DEL TOLUENO”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA SALUD**

PRESENTA:

M.C.P. YESLIE SALUD RODRÍGUEZ HERREJÓN

DIRECTORA DE TESIS:

D. EN C. MARCIA YVETTE GAUTHEREAU TORRES

CO-DIRECTOR DE TESIS:

D. EN C. LUIS FERNANDO ORTEGA VARELA



MORELIA, MICHOACÁN, MÉXICO AGOSTO DE 2021

El comité tutorial designado por la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Aprobó la tesis presentada por:

Médica, Cirujana y Partera Yeslie Salud Rodríguez Herrejón

Doctor en Ciencias

Daniel Godínez Hernández

Doctora en Ciencias

Marcia Yvette Gauthereau Torres

Doctor en Ciencias

Luis Fernando Ortega Varela

Doctor en Ciencias

José Miguel Cervantes Alfaro

Doctor en Ciencias

Vinicio Granados Soto

La Maestría en Ciencias de la Salud de la
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad
del CONACyT

La estudiante de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas
“Dr. Ignacio Chávez” de la
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
agradece al CONACYT la beca que le fue otorgada
durante la realización de su tesis
Núm de becario CONACYT: 732177

Dirección de Tesis:

Doctora en Ciencias en la especialidad de Farmacología

Marcia Yvette Gauthereau Torres

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Co-Dirección de Tesis:

Doctor en Investigación en Medicina

Luis Fernando Ortega Varela

Contribuciones:

Químico Farmacobiólogo

David Tenorio Guzmán

Química Farmacobióloga

Lesly Yareli Duran Díaz

Dedicatoria

A la mujer más extraordinaria y mayor ejemplo de lucha, todo lo que soy y espero ser se lo debo a ella; atribuyo cada éxito en esta vida a la enseñanza que recibí de su parte.

Te amo mamá.

Agradecimientos

A mis padres:

Maria Salud Herrejón y Guillermo Rodríguez

Por haberme dado el ejemplo que ha normado mis actos, así como el amor y apoyo incondicional que me han brindado a lo largo de mi vida.

A mis hermanos:

Fernando Rodríguez y Javier Rodríguez

Por motivarme a conocer el campo de la investigación, así como el amor y apoyo que siempre me han brindado.

A mi esposo:

David Tenorio Guzmán

Gracias por todo el amor que me das día a día y por tu apoyo incondicional en mi desarrollo profesional. Te amo.

A la D. en C. Marcia Yvette Gauthereau Torres y el D en C. Luis Fernando Ortega Varela

Por el apoyo y tiempo que me dedicaron en el desarrollo de este trabajo.

A mis sinodales:

El D. en C. Daniel Godínez Hernández, el D. C. José Miguel Cervantes Alfaro y el D. en C. Vinicio Granados Soto por sus valiosas observaciones, las cuales me ayudaron a perfeccionar este trabajo.

ABREVIATURAS

ABC: Área bajo la curva.

AMPA: Receptor del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico.

ASIC: Canales iónicos sensibles a ácido.

ATP: Adenosín trifosfato.

BDNF: Factor neurotrófico derivado de cerebro.

CI₅₀: Concentración inhibitoria 50.

cPLA2: Fosfolipasa A2 dependiente de calcio.

COX-2: Ciclo-oxigenasa 2.

DMSO: dimetilsulfóxido

DSM-V: Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales, volumen 5.

ENCODAT: Encuesta Nacional de Consumo de Drogas, Alcohol y Tabaco.

EPA: Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos.

EUA: Estados Unidos de América.

GABA: Ácido γ -aminobutírico.

IASP: Asociación Internacional para el Estudio del Dolor.

NMDA: Receptores de ácido N-metil D-aspartico.

NOM-062 ZOO-1999: Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

SNC: Sistema nervioso central.

TCE: 1,1,1-tricloroetano.

TNF: Factor de necrosis tumoral.

UNOC: Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito en México.

ÍNDICE

RESUMEN	15
ABSTRACT	16
INTRODUCCIÓN	17
I. Inhalables	17
1.1. Definición y clasificación	17
1.2. Epidemiología de los inhalables.....	18
1.3. GENERALIDADES	20
1.3.1 Tolueno.....	20
1.3.1.1. Propiedades fisicoquímicas	20
1.3.1.2. Usos.....	21
1.3.1.3. Tipos de exposición	21
1.3.1.4. Farmacocinética.....	22
1.3.1.5. Abuso de inhalables.....	23
1.3.1.6. Efectos del uso de inhalables	24
1.3.1.7. Mecanismo de acción	24
1.4. Receptores purinérgicos	26
1.5. Receptores P2X y dolor.....	28
1.6. Dolor	30
1.6.1. Nocicepción	31
1.6.2. Nociceptores.....	33
1.6.3. Clasificación del dolor	34
1.6.3.1. Dolor nociceptivo	34
1.6.3.2. Dolor inflamatorio.....	35
1.6.3.3. Dolor patológico (neurapático y disfuncional)	37

1.6.4. Vías centrales del dolor	39
1.6.5. Vías ascendentes del dolor.....	40
1.6.6. Vías descendentes del dolor.....	43
1.7. Alodinia e hiperalgesia.....	44
1.8. Tolueno y nocicepción	47
II. Justificación.....	52
III. Hipótesis.....	53
IV. Objetivos.....	53
4.1. Objetivo general.....	53
4.2. Objetivos particulares	53
V. Material y métodos.....	53
5.1. Animales	53
5.2. Fármacos.....	54
5.3. Exposición a tolueno.....	54
5.4. Nocicepción inflamatoria aguda inducida por formalina.....	56
5.5. Hiperalgesia sostenida y alodinia secundaria de larga duración	56
VI. Estrategia experimental	57
VII. Análisis estadístico.....	58
VIII. RESULTADOS.....	59
8.1. Efecto de la exposición aguda al tolueno sobre la nocicepción aguda y de larga duración inducida por formalina.....	59
8.2. Efecto de la exposición crónica al tolueno sobre la nocicepción aguda y de larga duración inducida por formalina.....	63
8.3. Efecto del antagonista de los receptores purinérgicos P2X _{2/3} y P2X ₃ RO-3 en la nocicepción aguda inducida por formalina, la alodinia secundaria e hiperalgesia en ratas previamente expuestas al aire o tolueno de manera aguda y crónica.....	68

8.4. Efecto del antagonista de los receptores purinérgicos P2X _{2/3} y P2X ₃ A-317491 en la nocicepción aguda inducida por formalina, la alodinia secundaria e hiperalgesia en ratas previamente expuestas al aire o tolueno de manera aguda y crónica.....	76
IX.DISCUSIÓN.....	91
X. CONCLUSIONES	95
XI. REFERENCIAS	96

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del tolueno	21
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química del tolueno	20
Figura 2. Encuesta Nacional sobre el porcentaje de jóvenes de 12 a 17 años que consumen drogas por grupo de edad.....	24
Figura 3. Estructura de los receptores purinérgicos	27
Figura 4. Receptor purinérgico ionotrópico.....	29
Figura 5. Los procesos de la nocicepción	32
Figura 6. Los nociceptores y la sensación del dolor.....	34
Figura 7. Principales vías ascendentes que transmiten información nociceptiva de la médula espinal a los centros superiores.....	42
Figura 8. Cambios en la sensación de dolor inducida por una lesión.....	46
Figura 9. Efectos del tolueno sobre la nocicepción aguda en la prueba de la plancha caliente.	49
Figura 10. Aumento de la nocicepción, alodinia e hiperalgesia en la prueba de la formalina	50
Figura 11. Cámara de exposición estática.	55
Figura 12. Estrategia experimental.....	57
Figura 13. Curso temporal del promedio de sacudidas de la pata observados después de la inyección de formalina.....	59
Figura 14. Área bajo curva (ABC) de retiros de la pata observados después de la inyección de formalina al 1% en ratas previamente expuestas al aire o a tolueno 6000 ppm de manera aguda.	60

Figura 15. Curso temporal del número de respuestas ipsilaterales (IL) y contralaterales (CL) de retiro de la pata a 10 aplicaciones de filamentos de von Frey usando una fuerza de flexión de 10 mN (alodinia).....	61
Figura 16. Curso temporal del número de respuestas ipsilaterales (IL) y contralaterales (CL) de retiro de la pata a 10 aplicaciones de filamentos de von Frey usando una fuerza de flexión de 250 mN (hiperalgesia).....	62
Figura 17. Curso temporal del promedio de sacudidas de la pata observados después de la inyección de formalina al 1% en ratas previamente expuestas al aire o al tolueno (6000 ppm) de manera crónica.....	63
Figura 18. Área bajo la curva del número de retiros de la pata observados después de la inyección de formalina al 1% en ratas previamente expuestas al aire (A) o a tolueno 6000 ppm (Tol) de manera crónica.....	64
Figura 19. Comparación de los grupos expuestos a tolueno (6000 ppm) de manera aguda y crónica.....	65
Figura 20. Respuestas de retirada de la pata ipsilateral (IL) a la aplicación de filamentos de von Frey (10 y 250 mN).....	66
Figura 21. Respuestas de retirada de la pata contralateral (CL) a la aplicación de filamentos de von Frey (10 y 250 mN).....	67
Figura 22. Peso corporal de ratas antes y después de la exposición a tolueno (6000 ppm) o aire (control).....	68
Figura 23. Los efectos inducidos por la administración s.c. de DMSO y solución salina en la prueba de la formalina.....	69
Figura 24. Efecto del antagonista de los receptores P2X ₃ y P2X _{2/3} RO-3 (300 nmol) en la nocicepción aguda inducida por formalina de manera aguda.....	70
Figura 25. Efecto del antagonista de los receptores P2X ₃ y P2X _{2/3} RO-3 (300 nmol) en la nocicepción inducida por formalina de manera crónica.....	71
Figura 26. Efecto del antagonista de los receptores P2X ₃ y P2X _{2/3} RO-3 (300 nmol) en la alodinia de manera aguda.	Error! Bookmark not defined.
Figura 27. Efecto del antagonista de los receptores P2X ₃ y P2X _{2/3} RO-3 (300 nmol) en la hiperalgesia de manera aguda.....	Error! Bookmark not defined.

Figura 28. Efecto del antagonista de los receptores P2X₃ y P2X_{2/3} RO-3 (300 nmol) en la alodinia de manera crónica.....**Error! Bookmark not defined.**

Figura 29. Efecto del antagonista de los receptores P2X₃ y P2X_{2/3} RO-3 (300 nmol) en la hiperalgesia de manera crónica.....**Error! Bookmark not defined.**

Figura 30. Efecto del antagonista de los receptores P2X₃ y P2X_{2/3} A-317491 (300 nmol) en la nocicepción aguda inducida por formalina de manera aguda..... **Error! Bookmark not defined.**

Figura 31. Efecto del antagonista de los receptores P2X₃ y P2X_{2/3} A-317491 (300 nmol) en la nocicepción de manera crónica.**Error! Bookmark not defined.**

Figura 32. Efecto del antagonista de los receptores P2X₃ y P2X_{2/3} A-317491 (30 nmol) en la nocicepción de manera aguda..... 79

Figura 33. Efecto del antagonista de los receptores P2X₃ y P2X_{2/3} A-317491 (30 nmol) en la nocicepción de manera crónica. 80

Figura 34. Efecto del antagonista de los receptores P2X₃ y P2X_{2/3} A-317491 (300 nmol) en la alodinia de manera aguda. 81

Figura 35. Efecto del antagonista de los receptores P2X₃ y P2X_{2/3} A-317491 (300 nmol) en la hiperalgesia de manera aguda. 82

Figura 36. Efecto del antagonista de los receptores P2X₃ y P2X_{2/3} A-317491 (300 nmol) en la alodinia de manera crónica.....**Error! Bookmark not defined.**

Figura 37. Efecto del antagonista de los receptores P2X₃ y P2X_{2/3} A-317491 (300 nmol) en la hiperalgesia de manera crónica.....**Error! Bookmark not defined.**

Figura 38. Efecto del antagonista de los receptores P2X₃ y P2X_{2/3} A-317491 (30 nmol) en la alodinia de manera aguda.**Error! Bookmark not defined.**

Figura 39. Efecto del antagonista de los receptores P2X₃ y P2X_{2/3} A-317491 (30 nmol) en la hiperalgesia de manera aguda**Error! Bookmark not defined.**

Figura 40. Efecto del antagonista de los receptores P2X₃ y P2X_{2/3} A-317491 (30 nmol) en la alodinia de manera crónica.....**Error! Bookmark not defined.**

Figura 41. Efecto del antagonista de los receptores P2X₃ y P2X_{2/3} A-317491 (30 nmol) en la hiperalgesia de manera crónica.....**Error! Bookmark not defined.**

Figura 42. Efecto del antagonista de los receptores P2X₃ y P2X_{2/3} A-317491 (30 y 300 nmol) en la nocicepción aguda inducida por formalina en ratas expuestas a tolueno (6000 ppm) o a aire de manera aguda 89

Figura 43. Efecto del antagonista de los receptores P2X₃ y P2X_{2/3} A-317491 (30 y 300 nmol) en la nocicepción aguda inducida por formalina en ratas expuestas a tolueno (6000 ppm) o a aire de manera crónica..... 90

RESUMEN

El tolueno es un miembro representativo de los disolventes inhalables, que son sustancias volátiles a temperatura ambiente que cuando son inhaladas producen un estado alterado de la conciencia, ocasionando efectos depresores sobre el sistema nervioso central (SNC). Se sabe que el tolueno afecta la función de los receptores purinérgicos P2X_{2/3} y P2X₃ potenciándolos o inhibiéndolos y que estos receptores están asociados en la percepción del dolor. Existe evidencia que indica que la exposición a tolueno puede producir un aumento en la nocicepción a través de sistemas de neurotransmisores como el serotoninérgico; sin embargo, se desconoce si otros sistemas de neurotransmisores están involucrados en el efecto pronociceptivo del tolueno. Además, cuando existe un estímulo persistente se puede producir un error en el procesamiento nociceptivo, llevando a estados de hiperalgesia y alodinia. **Objetivo general:** Evaluar la participación de los receptores purinérgicos P2X_{2/3} y P2X₃ en el efecto de la exposición a tolueno sobre la nocicepción, la hiperalgesia y la alodinia. **Materiales y métodos:** Los experimentos se realizaron en ratas Wistar hembra, que fueron expuestas a tolueno (6000 ppm) o a aire de manera aguda o crónica y algunas fueron tratadas con antagonistas de los receptores P2X_{2/3} y P2X₃ (A-317491 y RO-3). Los animales se sometieron a la prueba de la formalina para posteriormente hacer la evaluación de hiperalgesia y alodinia con filamentos de Von frey. Se utilizó el análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de una prueba de comparación múltiple. **Resultados:** La exposición aguda a tolueno aumentó la nocicepción inflamatoria aguda inducida por formalina, además, se produjo desarrollo de hiperalgesia y alodinia en las ratas. La exposición crónica a tolueno produjo una aparente tolerancia farmacológica; sin embargo, continúa el desarrollo de nocicepción, alodinia e hiperalgesia inducida por formalina. Tras el pretratamiento con RO-3 y A-317491, los datos sugieren que los receptores periféricos P2X_{2/3} y P2X₃ participan en el desarrollo del efecto pronociceptivo del tolueno dependiente de la dosis.

Palabras clave: receptores P2X_{2/3} y P2X₃, alodinia, hiperalgesia, tolueno A-317491 y RO-3.

ABSTRACT

Toluene is a representative member of inhalant solvents, which are volatile substances at room temperature that when are inhaled produce an altered state of consciousness, causing depressant effects on the central nervous system (CNS). Toluene is known to affect the function of the purinergic receptors P2X_{2/3} and P2X₃ by enhancing or inhibiting them and these receptors are associated with the perception of pain. There is evidence indicating that exposure to toluene can cause an increase in nociception through neurotransmitter systems such as serotonergic system; however, it is unknown whether other neurotransmitter systems are involved in the pronociceptive effect of toluene. In addition, when there is a persistent stimulus, an error in nociceptive processing can occur, leading to states of hyperalgesia and allodynia. General objective: To evaluate the participation of the purinergic receptors P2X_{2/3} and P2X₃ in the effect of toluene exposure on nociception, hyperalgesia and allodynia. Materials and methods: Experiments were carried out in female Wistar rats, which were acutely or chronically exposed to toluene (6000 ppm) or air and some were treated with P2X_{2/3} and P2X₃ receptor antagonists (A-317491 and RO-3). Animals were subjected to the formalin test to subsequently evaluate hyperalgesia and allodynia with Von frey filaments. One-way analysis of variance (ANOVA) was used followed by a multiple comparison test. Results: Acute toluene exposure increased formalin-induced acute inflammatory nociception, in addition, there was a development of hyperalgesia and allodynia in rats. Chronic toluene exposure produced an apparent tolerance; however, the development of formalin-induced nociception, allodynia, and hyperalgesia continued. After pretreatment with RO-3 and A-317491, data suggest that peripheral receptors P2X_{2/3} and P2X₃ participate in the development of dose-dependent pronociceptive effect of toluene.

Key words: P2X_{2/3} and P2X₃ receptors, allodynia, hyperalgesia, toluene. A-317491. RO-3.

INTRODUCCIÓN

I. Inhalables

1.1. Definición y clasificación

Los inhalables son sustancias volátiles a temperatura ambiente, que se administran por la vía de la inhalación con el fin de alterar el estado de conciencia y el estado de ánimo y así alcanzar estados placenteros (Cruz et al., 2003). De acuerdo a la definición de inhalables, la cual abarca una gama amplia de sustancias químicas encontradas en cientos de productos diferentes que pueden tener diversos efectos farmacológicos, se han propuesto cuatro categorías generales para clasificar a los inhalables: aerosoles, gases, nitritos y disolventes volátiles, basándose en la forma en la que estos se encuentran en los productos domésticos, industriales y médicos (NIDA, 2010).

1. **Aerosoles:** Son rociadores que contienen propulsores y disolventes. Estos incluyen a las pinturas pulverizadas, atomizadores para desodorantes y fijadores de pelo, rociadores de aceite vegetal para cocinar y rociadores para proteger telas o tejidos (NIDA, 2010).

2. **Gases:** Incluyen a los anestésicos de uso médico como el éter, el cloroformo, el halotano y el óxido nitroso, siendo este último gas el que más se consume en situación de abuso. También dentro de esta categoría se incluyen a los gases que se utilizan en productos domésticos o comerciales, como los encendedores de butano, los tanques de gas propano y los refrigerantes (NIDA, 2010).

3. **Nitritos:** Se consideran una clase especial de inhalables, ya que a diferencia de la mayoría de los demás inhalables que actúan directamente sobre el sistema nervioso central (SNC), la acción principal de los nitritos es dilatar los vasos sanguíneos y relajar los músculos. Asimismo, mientras que los demás inhalables se utilizan para alterar el estado de ánimo, los nitritos se usan principalmente para intensificar el placer sexual por producir vasodilatación en los órganos sexuales (NIDA, 2010).

4. Disolventes volátiles: Son líquidos con presiones de vapor altas y altamente lipofílicos. Los disolventes volátiles se encuentran dentro de un grupo numeroso de componentes usados en la industria y en productos domésticos (Cruz et al., 2009). Los disolventes volátiles están presentes en una variedad de productos económicos que se pueden obtener fácilmente y que son de uso común. Esta categoría incluye a los removedores de pinturas, líquidos para lavado en seco, desengrasantes, gasolinas, pegamentos, líquidos correctores y marcadores con punta de fieltro. Su posesión es legal, son baratos y la inhalación de sus vapores no se considera una conducta de alto riesgo en comparación con otras drogas, lo que los convierte en drogas de abuso de fácil acceso (Cruz et al., 2003). Cabe destacar que en la mayoría de los casos, los productos comerciales que son sujetos de inhalación son mezclas complejas de disolventes que contienen tolueno en mayor porcentaje, pero que también pueden poseer otros disolventes de abuso como, el xileno y el benceno (Arlie-Soborg, 1992).

1.2. Epidemiología de los inhalables

El consumo y abuso de drogas en los últimos años se ha ubicado en el contexto mundial como uno de los problemas de salud pública de mayor relevancia, debido a las consecuencias sanitarias y sociales que experimentan quienes las consumen. De acuerdo al reporte mundial de drogas del 2019, cerca de 271 millones de personas en el mundo usaron drogas en el último año, que representa 5.5% de la población de 15 a 64 años, y 31 millones presentaron algún trastorno relacionado con el uso de sustancias, cifra que equivale a 11% de los usuarios de drogas (ONUDD, 2019). En México, entre 2011 y 2016 se registró un incremento de 47% entre las personas de 12 a 65 años de edad que consumieron drogas ilegales al menos una vez en su vida, pasando de 5.7 millones a 8.4 millones, donde la tendencia de consumo coloca en los primeros lugares al cannabis, la cocaína y los inhalables. El consumo de los inhalables como drogas de abuso se encuentra en el tercer lugar en la población de 12 a 65 años, y en los adolescentes representa el segundo lugar entre las sustancias más consumidas (ENCODAT, 2016-2017).

Ahora se acepta ampliamente que los disolventes volátiles son una clase distinta de drogas de abuso, y que el uso crónico de disolventes puede llevar a un trastorno por abuso de sustancias (abuso o dependencia), según lo define el DSM-V (Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales, 2016). En un estudio acerca de usuarios frecuentes de disolventes, el 35% de los sujetos cumplió con los criterios de abuso de sustancias, mientras que el 28% cumplió con los criterios de dependencia. Además, el 10.5% de los usuarios mostró tolerancia al efecto de los disolventes, y el 11% mostró signos de abstinencia al cesar el uso del disolvente (Ridenour et al., 2007).

Los estudios epidemiológicos sugieren que los adolescentes y los adultos jóvenes que abusan de los inhalables muestran efectos tóxicos significativos, agudos y crónicos, incluidos síntomas depresivos, ansiedad, impulsividad y comportamiento antisocial (Lubman y Yücel, 2008; Perron y Howard, 2009).

1.3. GENERALIDADES

1.3.1 Tolueno

1.3.1.1. Propiedades fisicoquímicas

El tolueno, también conocido como toluol, fenilmetano, metilbenceno o monometil benceno, es un líquido incoloro de olor picante a temperatura ambiente, con alta afinidad por los lípidos (tabla 1). Es un buen disolvente (una sustancia que puede disolver a otras sustancias). Además, esta sustancia reacciona fuertemente con una gran cantidad de compuestos químicos, particularmente con aquellos que se componen de nitrógeno y con algunos plásticos (figura 1). El tolueno también se encuentra en forma natural en el petróleo crudo y en el árbol tolú. Es producido en el proceso de manufactura de la gasolina y de otros combustibles a partir del petróleo crudo y en la manufactura de coque a partir de carbón (ATSDR, 2015).

TOLUENO

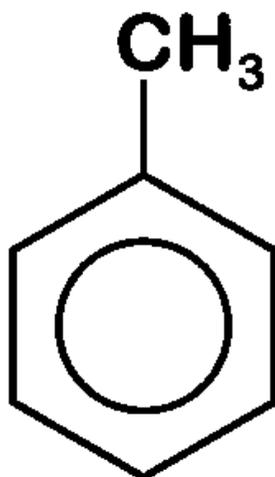


Figura 1. Estructura química del tolueno, que consiste en un anillo aromático con un grupo metilo.

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del tolueno (tomado y modificado de ATSDR, 2015).

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

1.3.1.2. Usos

El tolueno existe de forma natural en el petróleo crudo y en el árbol tolú. Se produce en el proceso de fabricación de gasolina y otros combustibles del petróleo crudo (ATSDR, 2011). Este disolvente se usa también en la producción de un gran número de químicos industriales (benceno, disocianato de tolueno, fenol, derivados bencílicos y benzoílicos, ácido benzoico, nitrotolueno, vinil tolueno y sacarina) y es un subproducto de la producción de estireno y en las operaciones de la quema de coque (combustible derivado del carbón). También, su demanda es cada vez mayor para la producción de pinturas, adhesivos, cosméticos, perfumes y anticongelantes (EPA, 1994).

1.3.1.3. Tipos de exposición

La exposición al tolueno se divide en dos clases: ocupacional y de abuso. La exposición ocupacional, como su nombre lo indica, se produce en aquellas personas que se dedican a la elaboración o manejo de productos que contengan este disolvente, teniendo una exposición de 10-200 ppm. Sin embargo, la Norma Oficial Mexicana-010 de la Secretaría del Trabajo y Prevención Social sugiere una exposición de 20-50 ppm en una jornada de 8 horas. Por otro lado, en la exposición con fines de abuso de este disolvente, la cantidad es muy variable, ya

que depende de cuántas veces al día lo inhalen y en qué proporción, esto varía desde las 500-30,000 ppm (ATSDR, 2015; Villatoro et al., 2011).

Los niveles de exposición durante los episodios de abuso son mucho más altos que las concentraciones presentadas durante las exposiciones ocasionales u ocupacionales. Los adictos a inhalables pueden exponerse por unos minutos a varios miles de partes por millón (2000-30,000 ppm) de disolventes volátiles (Marjot y McLeod, 1989). El abuso típico implica de 15 a 20 inhalaciones de concentraciones muy altas de disolventes volátiles, lo cual ocurre en periodos muy cortos de tiempo (10-15 minutos) (Villatoro et al, 2011; Bowen et al., 2007).

Los disolventes volátiles ingresan al organismo por la nariz o por la boca de diversas maneras (NIDA, 2010):

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

1.3.1.4. Farmacocinética

El tolueno se absorbe en nuestro cuerpo cuando inhalamos sus vapores, ingerimos alimentos o bebemos agua contaminada, cuando se trabaja con sustancias que lo contienen, o bien cuando se usan productos cosméticos que contienen este disolvente, ya que es capaz de atravesar la piel y llegar hasta el torrente sanguíneo. Cuando esto ocurre, el tolueno se distribuye por todo el organismo, principalmente en el cerebro, el hígado y los pulmones (ATSDR, 2015).

Según algunos estudios, se sugiere que el tolueno tiende a acumularse más en el cerebro que en el hígado cuando la exposición es por vía de la inhalación, mientras que tras una exposición vía oral, el hígado contiene la mayor concentración de tolueno (ATSDR, 2015).

Los hidrocarburos aromáticos, como el tolueno, tienden a ser metabolizados por vía hepática mediante la conversión a ácido benzoico por el citocromo P450 y

dos enzimas: alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa. El ácido benzoico se conjuga entonces con glicina para formar ácido hipúrico (80%) o con ácido glucorónico para formar benzoilglucurónido (20%), ambos son solubles en agua y son fácilmente eliminados a través de los riñones a las 12 horas posteriores a la exposición. El ácido hipúrico presente tanto en la sangre como en la orina se utiliza como marcador biológico de la exposición a tolueno (Dinwinddie, 1994; Filley et al., 2004; Hannigan y Bowen, 2010).

Estudios realizados tanto en animales como en humanos han demostrado que la mayoría del tolueno presente en el organismo se elimina a través de la orina, principalmente como metabolitos (Löf et al., 1990; 1993; Turkall et al., 1991; Tardif et al., 1992; 1998). Una cantidad menor, pero significativa, de tolueno inhalado se elimina en el aire exhalado (Pellizzari et al., 1992; Monster et al., 1993). Turkall et al. (1991) estimaron que aproximadamente el 22% de una dosis oral única de tolueno, en ratas, se elimina al exhalar y que el resto se elimina principalmente a través de la orina.

1.3.1.5. Abuso de inhalables

El abuso de inhalables es un problema importante de salud en México y hasta ahora sigue siendo el grupo de drogas menos estudiado, no solo por las edades tan tempranas a las cuales se inicia su consumo, sino también por el aumento en su uso; en los últimos años (figura 2) (Villatoro, 2011). Entre el 2008 y el 2012, se ha reportado un aumento en el uso de inhalables de un 4.2% a un 7.5% en el estado de Michoacán. Hasta hace pocos años en México, el abuso de inhalables se limitaba a un grupo minoritario, los jóvenes de un nivel socioeconómico bajo, pero se ha extendido y ahora se observa en todos los sectores, convirtiéndose así en una droga de elección sobre todo en la comunidad estudiantil (Villatoro, 2011).

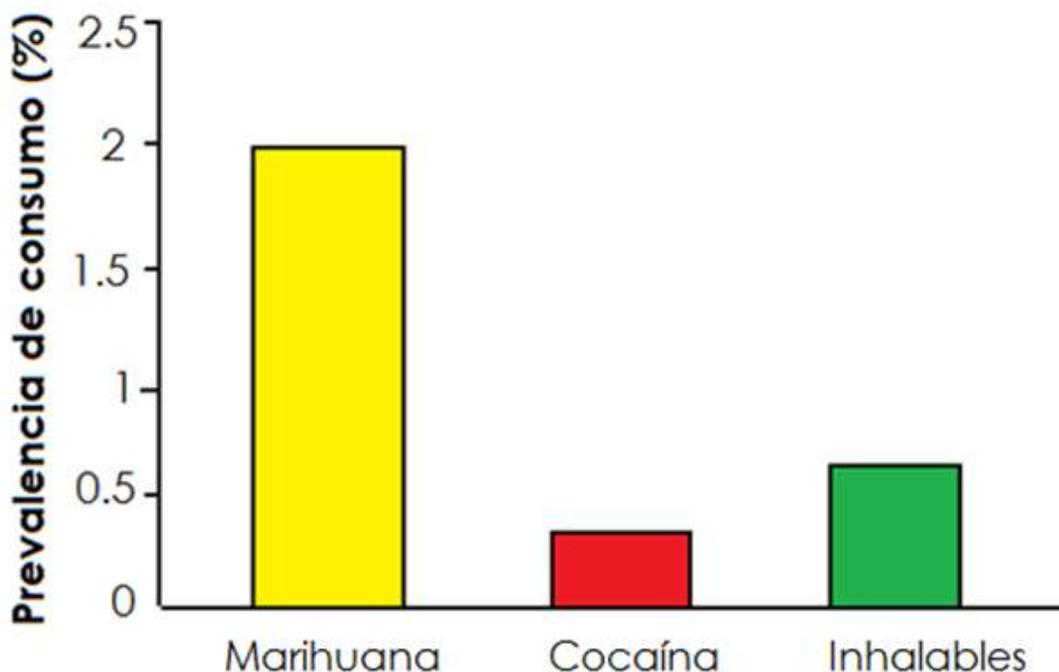


Figura 2. Encuesta Nacional sobre el porcentaje de jóvenes de 12 a 17 años que consumen drogas (Villatoro, 2011).

1.3.1.6. Efectos del uso de inhalables

La mayoría de los inhalables producen una euforia rápida que se parece a la intoxicación alcohólica, seguida por somnolencia y aturdimiento, pudiendo llegar a un estado de inconciencia. Los inhalables producen efectos neurotóxicos, los cuales reflejan daños al control cognitivo, motriz, visual y auditivo. Asimismo, los inhalables son muy tóxicos para diversos órganos, como corazón, pulmones, hígado y riñones. Aunque algunos de los daños producidos pueden ser parcialmente reversibles cuando cesa el abuso de los inhalables, muchos de los daños son irreversibles (NIDA, 2010).

1.3.1.7. Mecanismo de acción

A pesar de la incidencia de abuso, el mecanismo de acción de los inhalables no se conoce del todo. Los efectos depresores del sistema nervioso central (SNC) producidos por el etanol, agentes anestésicos volátiles y los inhalables sugirieron la posibilidad de que estos compuestos tuvieran un

mecanismo de acción similar. En trabajos previos se ha encontrado que los canales iónicos activados por neurotransmisores pueden ser sitios primarios de acción de los alcoholes y los agentes anestésicos volátiles (Beckstead et al., 2000).

Se sabe que el tolueno actúa sobre diferentes blancos moleculares con afinidad y eficacia diferente. El tolueno, al igual que el etanol, es un depresor del SNC debido a su capacidad de bloquear el sistema glutamatérgico excitatorio, al actuar como un antagonista no competitivo del receptor a N-metil D-aspartato (NMDA). Con base en su estructura molecular, se han identificado muchos subtipos del receptor NMDA, entre los cuales, aquellos canales formados por las subunidades NR1 y NR2B son las más sensibles a los efectos inhibitorios del tolueno (Cruz et al., 1998).

Otro efecto relevante del tolueno, el tricloroetileno y el 1,1,1-tricloroetano (TCE) es que aumentan la función de dos receptores inhibitorios ligados a un canal iónico: los receptores GABA_A y glicina. Beckstead et al. (2000) demostraron que el tolueno, el TCE y el tricloroetileno aumentan significativa y reversiblemente la corriente iónica a través de los receptores GABA_A expresados en ovocitos de *Xenopus laevis*. Por su parte, Lopreato et al. (2003) reportaron que el tolueno, TCE y tricloroetileno incrementan la corriente iónica activada por la serotonina a través del receptor 5-HT₃. Otros receptores inhibidos por el tolueno son el receptor nicotínico formado por las subunidades $\alpha_4\beta_2$ y aquellos formados por las subunidades α_7 . Este efecto se observa también con el percloroetileno (Bale et al., 2002; 2005).

La acción de los disolventes de abuso sobre los canales iónicos dependientes de voltaje también ha sido materia de investigación. De acuerdo con Tillar et al. (2002) el tolueno inhibe los canales de calcio sensibles a voltaje expresados en células de feocromocitoma de un modo reversible y dependiente de la dosis. Estos efectos ocurren a concentraciones micromolares que no comprometen la integridad de la membrana celular y que son relevantes para el abuso de disolventes. Se ha reportado también que el tolueno inhibe los canales de sodio cardiacos (Na_v 1.5) con una concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) de

aproximadamente 300 μM en ovocitos de *Xenopus* (Cruz et al., 2003) y que estos efectos podrían ser responsables, en parte, de la acción arritmogénica del tolueno (Bass, 1970; Taylor y Harris, 1970; Shepherd, 1989; Wilcosky y Simonsen, 1991; Einav et al., 1997). Además, el tolueno estimula directamente a las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral, según se ha observado en registros realizados en cortes histológicos del cerebro (Riegel et al., 2007). También puede estimular células no dopaminérgicas *in vitro* (Riegel et al., 2007), pero no *in vivo* (Riegel y French, 1999), lo que sugiere que podría estar involucrado un efecto depresor adicional al aumento de la inhibición gabaérgica (Riegel et al., 2004;2007).

Los resultados hasta el momento indican que tanto los canales iónicos activados por voltaje como los activados por ligandos son sensibles a las concentraciones de tolueno asociadas con la inhalación voluntaria de estas sustancias. Además, se observa que el tolueno y otros disolventes relacionados poseen un grado de selectividad sorprendente dada su estructura química bastante simple. Estos hallazgos sugieren que existen diferentes sitios de acción para el tolueno en las subunidades de los canales individuales y aluden a que las diferencias regionales y anatómicas en la expresión de las subunidades son determinantes importantes de la acción del disolvente (Cruz et al., 2009).

En trabajos previos se ha encontrado que el tolueno afecta la función de los receptores purinérgicos P2X, cuya acción varía según la composición de la subunidades del receptor (Woodward et al., 2004).

1.4. Receptores purinérgicos

Los receptores purinérgicos, también conocidos como purinoceptores, son una familia de receptores de membrana plasmática que se encuentran en casi todos los tejidos de los mamíferos (North, 2002). Los receptores P2 se han dividido en cinco subclases: P2X, P2Y, P2Z, P2U y P2T. Para distinguir aún más a los receptores P2 (figura 3), las subclases se han dividido en familias de receptores metabotrópicos (P2Y, P2U y P2T) e ionotrópicos (P2X y P2Z) (North, 2002).

Los receptores P2X están ampliamente distribuidos a través del sistema nervioso central y periférico, así como también en los endotelios y epitelios, en la musculatura vascular, en leucocitos y plaquetas, mastocitos y macrófagos.

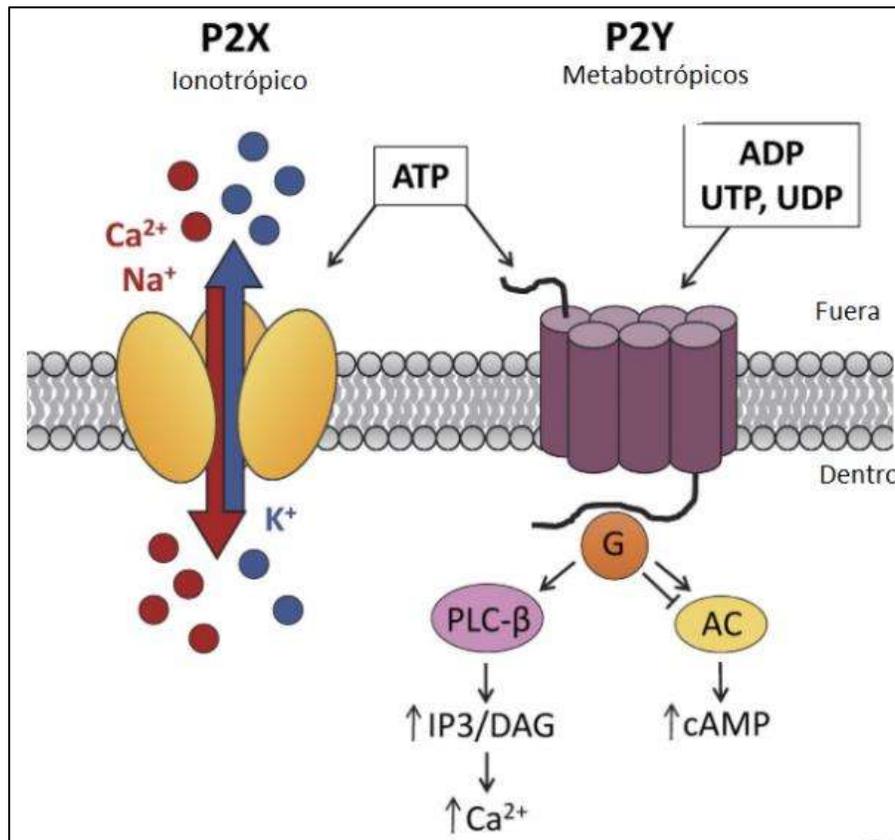


Figura 3. Estructura de los receptores purinérgicos P2X y P2Y (Modificado de Burnstock, 2012).

Los receptores P2X (P2X₁-P2X₇) conforman poros o canales catiónicos (principalmente canales de calcio, que se activan (abren) en presencia de ATP extracelular. Ni el ADP, ni la adenosina, ni los nucleótidos de uridina activan a estos receptores (North, 2002).

Además de su conocido papel en la bioenergética, el ATP sirve como neurotransmisor, tanto en el sistema nervioso central como el periférico. Cuando se libera de las terminaciones presinápticas, el ATP activa a los receptores ionotrópicos de la familia P2X, así como a los receptores metabotrópicos P2Y. Dentro del campo de la señalización purinérgica, estos receptores se han implicado en el aprendizaje y la memoria, el comportamiento locomotor, la alimentación y el sueño. También están involucrados en varias funciones celulares, incluida la proliferación y migración de células madre neurales (Burnstock, 2013).

Los receptores P2X se encuentran tanto en neuronas pre y postsinápticas como en células de la glía. Los receptores sinápticos P2X responden rápidamente (en milisegundos) al ATP liberado de las terminales nerviosas, facilitando la entrada de Ca^{2+} a la neurona. Esto se ha asociado funcionalmente a la percepción del dolor y otras sensaciones (figura 4) (Lazarowski y Schwarzbaum, 2009).

Un estudio previo en células embrionarias de riñón humano 293, también conocidas como HEK 293 o HEK-293, muestra que el tolueno produce efectos sobre los receptores P2X que varían según la composición de las subunidades del receptor. El tolueno potencia las respuestas a ATP en los receptores homoméricos P2X₂, P2X₄ y heteroméricos P2X_{2/3} y P2X_{4/6}. Por el contrario, el tolueno inhibe a los receptores P2X₃ (Woodward et al., 2004).

1.5. Receptores P2X y dolor

Existe evidencia considerable de que los receptores P2X₃ están involucrados en el dolor neuropático (Kim et al., 2008; Wirkner et al., 2007). La activación de los receptores P2X₃ homoméricos contribuye a la nocicepción aguda y al dolor inflamatorio agudo (McGaraughty y Jarvis, 2006; Burnstock, 2006), mientras que la activación de los receptores heteroméricos P2X_{2/3} participan en la nocicepción crónica y el dolor inflamatorio crónico (Barclay et al., 2002).

Curiosamente, los receptores supraespinales P2X₃ y P2X_{2/3} pueden jugar un papel inhibitor en la transmisión del dolor (Fukui et al., 2006). Los estudios funcionales con antagonistas de los receptores han revelado un papel destacado de los receptores P2X₃ en la regulación del dolor en los estados de lesión

nerviosa. Además, se demostró que la activación de los receptores P2X₃ en la médula espinal provoca alodinia e hiperalgesia (Fukuhara et al., 2000).

Por lo tanto, los antagonistas selectivos de los receptores producen acciones antinociceptivas en los paradigmas conductuales (McGaraughty et al., 2003) y electrofisiológicos (Sharp et al., 2006) en varios modelos de lesiones nerviosas. La regulación a la baja de los receptores P2X₃, utilizando oligonucleótidos antisentido, reveló un papel importante para estos receptores en el dolor neuropático (Honore et al., 2009). Un estudio reciente indica que los receptores P2X₃ median la hiperalgesia térmica en un modelo de rata de dolor neuropático trigémino (Shinoda et al., 2007). Una condición particular en la que el ATP puede contribuir de manera prominente al dolor neuropático es en estados de dolor mantenidos por el sistema nervioso simpático. Normalmente, este sistema no interactúa directamente con los nervios sensoriales. Sin embargo, después de una lesión nerviosa, puede producir una interacción simpática mediante la cual la actividad simpática puede aumentar el dolor (Jänig et al. 1996).

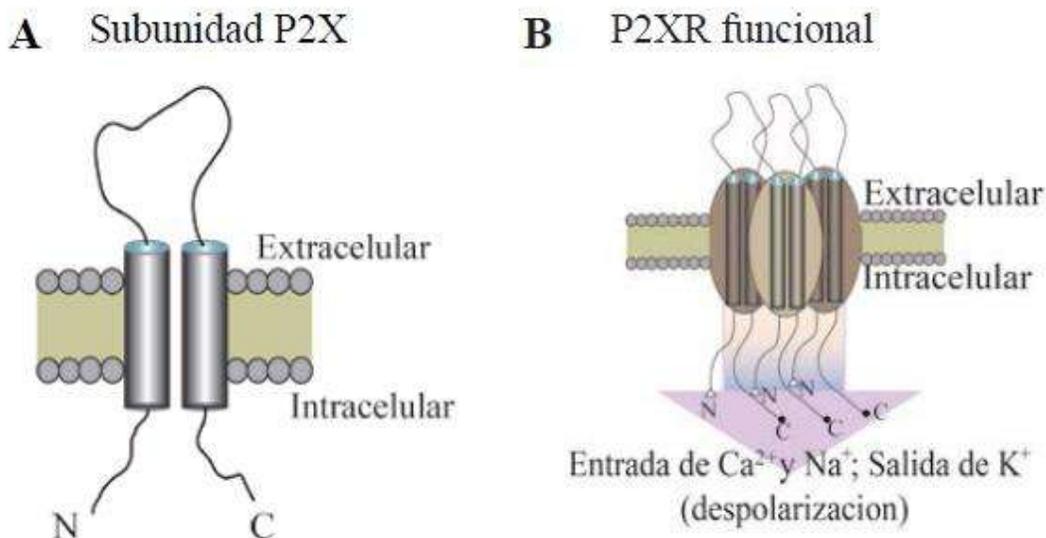


Figura 4. Receptor purinérgico ionotrópico. (A) Estructura general de una subunidad de un receptor purinérgico ionotrópico con los extremos N y C terminales orientados hacia el citosol. (B) Estructura trimérica. Se han identificado 7 tipos de subunidades que oligomerizan en trímeros para formar un canal funcional que permite el paso de cationes de Ca²⁺, Na⁺ y K⁺. (Torres et al., 1999; Guo, et al. 2007).

1.6. Dolor

La *“International Association for the Study of Pain”* define el dolor como: "Una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con, o similar a la asociada con, daño tisular real o potencial". Esta definición se amplía mediante la adición de seis notas clave y la etimología de la palabra dolor para un contexto más valioso (IASP, 2020):

- 1.- El dolor es siempre una experiencia personal que está influenciada en diversos grados por factores biológicos, psicológicos y sociales.
- 2.- El dolor y la nocicepción son fenómenos diferentes. El dolor no puede inferirse únicamente de la actividad en las neuronas sensoriales.
- 3.- A través de sus experiencias de vida, las personas aprenden el concepto de dolor.
- 4.- El informe que dé una persona de una experiencia como dolor debe ser respetado.
- 5.- Aunque el dolor generalmente cumple una función adaptativa, puede tener efectos adversos sobre la función y el bienestar social y psicológico.
- 6.- La descripción verbal es sólo una de varias conductas para expresar el dolor; la incapacidad para comunicarse no niega la posibilidad de que un humano o un animal no humano experimente dolor.

El dolor es una modalidad de sensaciones somáticas, como las del tacto, la presión y la posición. El dolor tiene una función protectora importante, ya que nos avisa de una lesión que debe de ser evitada o tratada. Más aún, la intensidad con la que se siente el dolor se ve afectada por condiciones circunstanciales y el mismo estímulo puede producir respuestas diferentes en distintos individuos en condiciones similares. Aunque el dolor está mediado por el sistema nervioso, es importante, tanto desde el punto de vista clínico como experimental, establecer una distinción entre aquél y los mecanismos nerviosos de la nocicepción, es decir, de la respuesta a una lesión tisular percibida o real (Kandel et al., 2013).

1.6.1. Nocicepción

El dolor, no es sólo una percepción nociceptiva (fisiológica), sino que constituye una experiencia subjetiva integrada por pensamientos, sensaciones y conductas. Sin embargo, los factores afectivos y psicológicos involucrados en el dolor no son medibles ni cuantificables en animales. Por lo tanto, en lo sucesivo nos referiremos a la nocicepción como medio para investigar el dolor. La nocicepción es el proceso neuronal mediante el cual se codifican y procesan los estímulos potencialmente dañinos contra los tejidos (Loeser et al., 2008). El término "nocicepción" fue acuñado por Charles Scott Sherrington para distinguir el proceso fisiológico (la actividad nerviosa) del dolor (una experiencia subjetiva) (Burke, 2007). El término deriva del latín *nocere* 'dañar' y se refiere a los mecanismos por los cuales se detectan los estímulos nocivos (figura 5). La nocicepción consiste en 4 procesos fisiológicos distintos: transducción, transmisión, percepción y modulación (D'Amours y Ferrante, 1996).

La transducción describe la conversión de estímulos nocivos en señales eléctricas por las terminales nerviosas periféricas. La transmisión es la propagación de las señales eléctricas a lo largo de las vías nociceptivas. La percepción es el proceso por el cual se integran los impulsos nociceptivos en la corteza cerebral (con factores cognoscitivos y emocionales), para crear la experiencia subjetiva de dolor. Además, desde de la médula espinal y en la misma corteza, se liberan neurotransmisores que inhiben, amplifican o alteran la señal sensorial (por ejemplo, la liberación de nuestros propios analgésicos, las endorfinas). A este último proceso se le conoce como modulación (Ariniello et al., 2002).

La nocicepción es una actividad aferente (sensitiva) del sistema nervioso central y periférico producida por la estimulación de las terminaciones nerviosas libres especializadas llamadas nociceptores o "receptores del dolor", que sólo responden a los cambios por encima del umbral del sistema, ya sean de naturaleza química (la exposición a sustancias en cualquier estado: sólido, líquido, gaseoso) o mecánica (por ejemplo: pellizcar, triturar) o térmica (calor y frío) (Portenoy et al., 1994). Las neuronas nociceptivas generan potenciales de

acción en respuesta a estímulos intensos y la frecuencia de disparo determina la intensidad del dolor (Momin y McNaughton, 2009).

Los estímulos nociceptivos de la piel o el tejido subcutáneo, como las articulaciones o los músculos, activan varias clases de terminales de nociceptores, que son las terminales periféricas de neuronas aferentes primarias, cuyos cuerpos celulares se encuentran en los ganglios de la raíz dorsal (GRD) y del trigémino (GT) (Kandel et al., 2013).



Figura 5. Los procesos de la nocicepción. El componente sensorial del dolor se denomina nocicepción y consiste de 4 procesos fisiológicos distintos: transducción, transmisión, modulación y percepción (modificado de Ariniello et al., 2002).

1.6.2. Nociceptores

El dolor se percibe gracias a la presencia de fibras nerviosas periféricas que conectan con las vías nociceptivas del sistema nervioso central (SNC). Estas neuronas contienen proteínas especializadas, generalmente canales iónicos, que pueden detectar estímulos potencialmente nocivos, que pueden ser térmicos (calor, frío), químicos (sustancias corrosivas) y mecánicos (presión dañina). Estas neuronas se conocen comúnmente como nociceptores, pueden ser de diversos tipos y nos alertan para evitar estímulos externos como las heridas, el calor excesivo, la congelación o los golpes (Woolf y Ma, 2007).

Los nociceptores están diseñados para activarse con estímulos intensos y mantienen su activación únicamente mientras está presente dicho estímulo nocivo, para protegernos del daño (figura 6). Sin embargo, ciertos estados patológicos o estímulos recurrentes o de larga duración pueden sensibilizar a estas neuronas y hacer que el dolor sea más intenso y duradero. Esta condición de dolor crónico ubica a la sensación dolorosa fuera de su papel protector y lo convierte en una enfermedad (Costigan et al., 2009). Se distinguen tres clases principales de nociceptores: térmicos, mecánicos y polimodales; así como una clase denominada nociceptores silentes. Los **nociceptores térmicos** se activan por temperaturas extremas ($>45^{\circ}\text{C}$ o $< 5^{\circ}\text{C}$). Estas formaciones tienen fibras $A\delta$ mielínicas y de pequeño diámetro que conducen las señales a 5-30 m/s. Los **nociceptores mecánicos** son activados por una presión intensa aplicada a la piel, también tienen fibras $A\delta$ mielínicas que conducen las señales a 5-30 m/s. Los **nociceptores polimodales** se activan por estímulos mecánicos, químicos o térmicos. Estos nociceptores tienen fibras C amielínicas y de diámetro pequeño que conducen las señales lentamente, por lo general a velocidades inferiores a 1 m/s. Las vísceras tienen nociceptores silentes, normalmente no se activan por una estimulación nociva, si bien su umbral de activación disminuye con la inflamación y diversas agresiones químicas. Por lo tanto, la activación de los nociceptores silentes puede contribuir al desarrollo de hiperalgesia secundaria y sensibilización central, dos síndromes que se exponen más adelante. Los nociceptores también expresan un receptor purinérgico ionotrópico, $P2X_3$, que se activa por el trifosfato

de adenosina (ATP) liberado de las células periféricas o centrales después del daño tisular (Kandel et al., 2013).

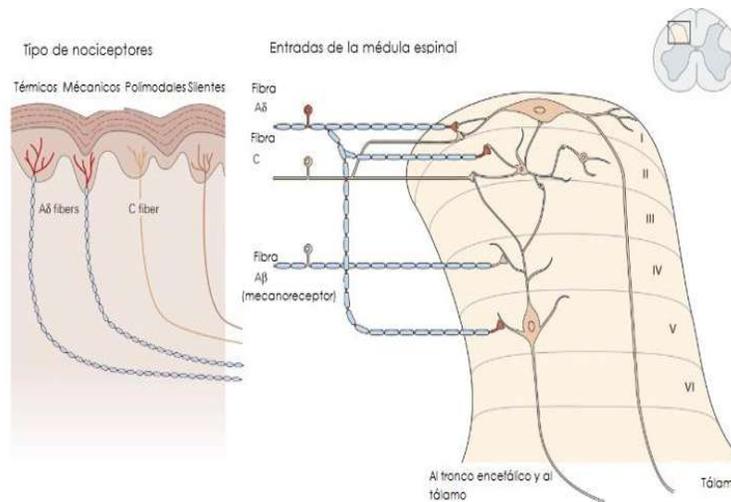


Figura 6. Los nociceptores y la sensación del dolor. Las neuronas de proyección de la lámina I reciben estímulos directos de fibras aferentes nociceptivas (A δ) mielínicas y estímulos indirectos de fibras aferentes nociceptivas (C) amielínicas por la vía de las interneuronas del pedúnculo de la lámina II (Modificado de Kandel et al., 2013).

1.6.3. Clasificación del dolor

Aunque existen numerosos criterios de clasificación del dolor, los más utilizados se basan en el mecanismo neurofisiológico, en el aspecto temporal, en la intensidad, en la etiología y en la región afectada.

Sin embargo, una clasificación muy aceptada en la investigación y tratamiento del dolor es la establecida por Woolf, que considera que existen cuatro tipos de dolor, de acuerdo con el origen somático y el mecanismo fisiológico: nociceptivo, inflamatorio, dolor patológico (neuropático y disfuncional) (Woolf, 2010).

1.6.3.1. Dolor nociceptivo

El dolor nociceptivo se produce por la estimulación de los nociceptores, provocando que el mensaje nociceptivo sea transmitido a través de las vías ascendentes hacia los centros supraespinales y sea percibido como una sensación dolorosa, son estímulos intensos pero breves, generalmente sin daño

tisular (Scholz y Woolf, 2002). El dolor nociceptivo representa la sensación asociada con la detección de estímulos nocivos de alto umbral potencialmente causantes de daño tisular, por lo que ejerce una función protectora para el organismo e induce un reflejo de retiro que nos protege del daño. Este tipo de dolor se divide en dos subtipos: somático y visceral. **a)** Dolor somático: se produce por la excitación de nociceptores somáticos superficiales o profundos (piel, musculo esquelético, vasos, etc.). Es un dolor localizado, punzante y que se irradia siguiendo trayectos nerviosos. **b)** Visceral: se debe a la estimulación de nociceptores viscerales. Este dolor es profundo, continuo y puede irradiarse a zonas alejadas del lugar donde se originó (Costigan et al., 2009).

1.6.3.2. Dolor inflamatorio

La lesión inevitable al tejido eleva la sensibilidad y asiste en la recuperación. Esto se debe a la sensibilización que desalienta el contacto físico y el movimiento. Este fenómeno se produce por la activación del sistema inmune. De hecho, el dolor es uno de los signos cardinales de la inflamación. Este segundo tipo de dolor también es protector (Costigan et al., 2009). El dolor inflamatorio se presenta cuando se daña la integridad del tejido. Esto ocurre cuando hay incisiones de la piel, quemaduras, frío extremo, fracturas, artritis, condiciones autoinmunes, presión extrema, infecciones, vasoconstricción o por el crecimiento tumoral, entre otros. Las células del sistema inmune y las células lesionadas liberan mediadores químicos tales como histamina, 5-HT, bradicinina, prostaglandinas, ATP, H⁺, factor de necrosis tumoral (TNF), endotelinas, interleucinas y otros, que en conjunto conforman la sopa inflamatoria (Costigan y Woolf., 2000).

En la sopa inflamatoria, el ATP y los H⁺ provienen de las células dañadas. Las células cebadas liberan aminas, como 5-HT e histamina, ácido araquidónico y sus derivados, incluyendo las prostaglandinas. Los macrófagos aportan citosinas, como IL-1, IL-6, TNF y factores del crecimiento. Los derivados de bradicinina provienen de varios tipos celulares. La ciclo-oxigenasa 2 (COX-2), que produce prostanoideos, se induce en el tejido inflamado (Scholz y Woolf, 2002; Costigan y Woolf., 2000; Woolf y Ma, 2007).

Los potenciales de acción de alta frecuencia causan la liberación de neuropéptidos como sustancia P, factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y glutamato (Woolf, 2010). La sustancia P y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina también contribuyen a la sopa inflamatoria, favoreciendo el reclutamiento de células del sistema inmune en el tejido inflamatorio, contribuyendo a la sensibilización periférica. Los H⁺ y el ATP pueden despolarizar directamente a las neuronas aferentes primarias por medio de la activación de canales iónicos sensibles a ácido (ASIC) o receptores P2X₃ (Basbaum et al., 2009). Consecuentemente, se efectúa la fosforilación de canales de sodio resistente a tetrodotoxina lo que incrementa las corrientes de entrada y también la excitabilidad en la terminal. La fosforilación de dichos canales se debe a la interacción de prostaglandinas, bradicinina y 5-HT sobre sus receptores, que activan a la proteína cinasa C y A (Basbaum et al., 2009). Los canales de sodio sensibles a tetrodotoxina generan potenciales de acción que se conducen desde la terminal periférica hasta el asta dorsal de la médula espinal y posteriormente a centros supraespinales. Como consecuencia de lo anterior, las señales sensoriales pueden ser percibidas como dolor. El dolor inflamatorio comienza de manera aguda debido al desarrollo de un fenómeno conocido como sensibilización periférica. Sin embargo, es capaz de perpetuarse al desarrollar la sensibilización central (Basbaum et al., 2009).

Para ayudar a la reparación de la parte del cuerpo lesionada, el sistema nervioso sensorial experimenta un cambio profundo en su capacidad de respuesta; los estímulos normalmente inocuos ahora producen dolor y las respuestas a los estímulos nocivos son exageradas y prolongadas (Juhl et al. 2008). La sensibilidad aumentada ocurre dentro del área inflamada y en áreas contiguas no inflamadas como resultado de la plasticidad en los nociceptores periféricos y las vías nociceptivas centrales (Huang et al. 2006, Hucho & Levine 2007, Woolf & Salter 2000). Debido a que el sistema del dolor después de la inflamación se sensibiliza, ya no actúa solo como un detector de estímulos nocivos, sino que también puede activarse mediante entradas inocuas de bajo umbral. La ablación de un conjunto específico de neuronas nociceptores, las que

expresan el canal de sodio Nav1.8 resistente a la tetrodotoxina, elimina el dolor inflamatorio pero deja intacto el dolor neuropático, lo que indica una diferencia fundamental en las vías neuronales responsables de estos estados de dolor (Abrahamsen et al.2008). Por lo general, el dolor inflamatorio desaparece después de la resolución de la lesión tisular inicial. Sin embargo, en los trastornos crónicos como la artritis reumatoide, el dolor persiste mientras la inflamación esté activa (Michaud et al. 2007).

1.6.3.3. Dolor patológico (neuropático y disfuncional)

El dolor patológico no tiene un papel protector. Éste resulta de una función anormal del sistema nociceptivo. El **dolor neuropático** es un desorden que puede ocurrir tras el daño al sistema nervioso, mientras que en el **dolor disfuncional** existe dolor sustancial sin la presencia de estímulo aparente, inflamación periférica ni daño al SNC. El dolor patológico es la consecuencia de la amplificación de señales en el sistema nervioso central (Woolf, 2010).

El dolor neuropático se produce por lesiones que alteran la estructura y función del sistema nervioso somatosensorial. Esta lesión produce respuestas de manera espontánea ante la estimulación nociva o inocua, resultando en amplificación patológica. Esto significa que el dolor ha perdido su función protectora y se ha tornado patológico. En este sentido, existen múltiples alteraciones distribuidas a través del sistema nervioso que contribuyen a los fenotipos del dolor. Estas alteraciones incluyen la generación ectópica de potenciales de acción, la facilitación y la desinhibición de la transmisión sináptica, la pérdida de la conectividad sináptica, la formación de nuevos circuitos sinápticos y las interacciones neuroinmunes. Aunque las lesiones neuronales son necesarias, no son suficientes para generar el dolor neuropático (Scholz y Woolf, 2002; Baron, 2006).

El dolor neuropático puede presentarse en una gran variedad de síndromes por ejemplo: en el cáncer, lesiones de la médula espinal, neuralgia del trigémino, neuralgia postherpética y neuropatía diabética, entre otros (Haanpää et al., 2009).

Por otra parte, un número significativo de síndromes dolorosos son clasificados por la Sociedad Internacional para el Estudio del Dolor como **síndrome de dolor con etiología disfuncional**, o síndromes somáticos funcionales. Estos síndromes presentan dolor como síntoma principal e incluyen la fibromialgia, intestino irritable, dolor pélvico crónico, cefalea tensional (migraña), mioartropatías crónicas del sistema masticatorio y prostatodina (Häuser et al., 2004). Dichos síndromes se caracterizan por percibirse sin déficit neurológico o anomalía periférica. El dolor se debe a la respuesta o función anormal del sistema nervioso y es resultado de un aumento de la sensibilidad del aparato sensorial que amplifica los síntomas. Sin embargo, muchos de sus mecanismos no han quedado claros hasta la fecha (Costigan et al., 2009). El dolor neuropático provocado por estímulos podría surgir como resultado de la sensibilización periférica de aferentes intactos (Fields et al. 1998) o de la amplificación dentro del SNC debido a la sensibilización central (Woolf y Salter 2000). La facilitación sináptica parece predominar en la mayoría de los pacientes con dolor neuropático periférico y en todos los pacientes con dolor neuropático central. Contribuye a la alodinia táctil dinámica, así como a la hipersensibilidad secundaria (Campbell y Meyer 2006).

Las interneuronas inhibitoras del asta dorsal hacen sinapsis con las terminales centrales de las neuronas sensoriales primarias y modulan presinápticamente la entrada aferente. Las interneuronas espinales también regulan la actividad en las neuronas de transmisión postsinápticas a través de la inhibición GABAérgica y glicinérgica. La eliminación farmacológica del control GABAérgico o glicinérgico provoca alodinia táctil (Thompson et al. 1993) y aumenta las corrientes sinápticas desde las fibras A β hasta las neuronas nociceptivas de la lámina I (Baba et al. 2003, Miraucourt et al. 2007, Torsney y MacDermott 2006). Las vías descendentes que modulan la transmisión espinal de impulsos nociceptivos se originan en la circunvolución cingulada anterior, la amígdala y el hipotálamo y se transmiten a la médula espinal a través de los núcleos del tronco encefálico en la médula periacueductal gris y rostroventral. Después de una lesión nerviosa, este intrincado sistema de control inhibitorio cambia. La inhibición tónica noradrenérgica que actúa sobre los receptores

adrenérgicos α_2 parece estar suspendida (Rahman et al. 2008), y el efecto neto de la entrada serotoninérgica descendente cambia de inhibición a facilitación (Bee & Dickenson 2008). Los inhibidores de la captación de aminas como los antidepressivos tricíclicos o los inhibidores de la recaptura de serotonina y norepinefrina aumentan la inhibición endógena al aumentar los niveles de norepinefrina (Matsuzawa Yanagida et al. 2008).

1.6.4. Vías centrales del dolor

Los nociceptores utilizan dos vías distintas para transmitir sus señales respectivas hacia el sistema nervioso central. Ambas guardan una correspondencia básica con los dos tipos de dolor: una vía para el dolor rápido agudo y otra vía para el dolor lento crónico.

Las señales correspondientes al dolor rápido agudo nacen con estímulos dolorosos de tipo mecánico o térmico; su transmisión sigue los nervios periféricos hasta la médula espinal a través de fibras de tipo $A\delta$ a una velocidad entre 6 y 30 m/s. Por el contrario, el dolor de carácter lento crónico se suscita sobre todo a partir de los estímulos químicos correspondientes, pero a veces también con estímulos mecánicos o térmicos persistentes. Este dolor lento crónico llega a la médula espinal por medio de las fibras de tipo C a una velocidad entre 0.5 y 2 m/s.

Debido a este doble sistema de inervación para el dolor, un estímulo brusco de este carácter a menudo genera una sensación dolorosa: un dolor rápido agudo que llega al cerebro a través de la vía de las fibras $A\delta$, seguido más o menos 1 s después por un dolor lento que se transmite por la vía de las fibras C. El dolor agudo informa a gran velocidad sobre la situación lesiva y, por tanto, cumple una función importante para conseguir que la persona reaccione de inmediato y se aparte del estímulo. Esta sensación produce a la larga el dolor intolerable y obliga a que la persona trate de mitigar su causa. Al entrar en la médula espinal procedentes de las raíces medulares dorsales, las fibras para el dolor hacen

sinapsis con neuronas de proyección situadas en las astas dorsales (Guyton y Hall, 2011).

En las sinapsis del asta dorsal de la médula espinal, se liberan diferentes neurotransmisores que actúan sobre numerosos receptores. Los potenciales excitadores rápidos inducen la liberación de glutamato y trifosfato de adenosina (ATP) de la neurona pre-sináptica. Los potenciales de excitación lentos inducen la liberación de glutamato y sustancia P. En este punto, la liberación de neurotransmisores está inhibida por:

a) Interneuronas GABAérgicas que actúan sobre receptores GABA_A y GABA_B. Esto produce la entrada de Cl⁻, que hiperpolariza la neurona.

b) Neuronas descendentes que liberan opioides y 5-HT, los cuales disminuyen las respuestas glutamatérgicas mediadas por receptores AMPA.

c) Neuronas descendentes que producen noradrenalina y acetilcolina, que potencian la liberación de GABA (Moore et al., 1996).

1.6.5. Vías ascendentes del dolor

En 1952 el neurocientífico sueco Bror Rexed investigó la disposición de las neuronas en la sustancia gris de la médula espinal de gato. Determinó que ésta se agrupa en 10 láminas, que históricamente se conocen como Láminas de Rexed. El escribió que las láminas I, II, III y IV funcionaban formando una unidad funcional encargada de la sensibilidad al dolor, la temperatura, el tacto y la presión. La zona más dorsal del asta corresponde a las láminas V y VI, que se asociaron con la sensibilidad propioceptiva, es decir, reciben la sensibilidad de estructuras derivadas del mesoderma (huesos, músculos, articulaciones, ligamentos), información relacionada con posición, movimiento, equilibrio, etc. La lámina VII, que corresponde a la base del asta dorsal, tiene conexiones con el cerebelo y con el mesencéfalo. La zona de la sustancia gris intermedia, relacionada con el canal central de la médula, detecta la sensibilidad interoceptiva (aquella proveniente de los órganos). Todas las láminas relacionadas con el asta ventral, específicamente la lámina X, se relacionada con la actividad motora (Wall, 1967).

La información sobre una lesión tisular se transmite de la médula espinal al encéfalo a través de cinco vías ascendentes principales: la espinotalámica, espinoreticular, espinomesencefálica, cervicotalámica y espinohipotálamica. La mayor parte de las vías ascendentes contiene axones de neuronas nociceptivas (Commons, 2016).

El haz **espinotalámico** es la vía nociceptiva ascendente más destacada de la médula espinal (figura 7). Comprende los axones de las neuronas específicas de la nocicepción y de amplio rango dinámico de las láminas I y V-VII del asta posterior. Estos axones se proyectan al lado contralateral de la médula espinal y ascienden a la sustancia blanca anteroexterna, para terminar en el tálamo. La estimulación eléctrica del haz espinotalámico provoca dolor, mientras que la lesión de éste induce reducción de la sensibilidad dolorosa en el lado opuesto al de la lesión medular (Kandel et al., 2013).

Una gran proporción de las neuronas nociceptivas de la médula espinal envía sus axones a centros supraespinales, bulbares y talámicos. Los más importantes son el complejo medular reticular, el complejo reticular mesencefálico, la sustancia gris periacueductal y el núcleo ventroposterolateral del tálamo. La mayor parte de esta información nociceptiva se transmite por vías cruzadas ascendentes, localizadas en la región anterolateral de la médula espinal. Los fascículos mejor definidos anatómicamente son el espinotalámico, el espinoreticular y espinomesencefálico. La mayor parte de las vías espinales ascendentes contienen axones de neuronas nociceptivas (Commons, 2016).

Las neuronas de las láminas profundas del asta posterior proyectan sobre todo hacia el área reticular del mesencéfalo y otras implicadas en respuestas motoras y somatosensoriales. Otros fascículos implicados en la transmisión/modulación nociceptiva se sitúan a nivel de la sustancia blanca medular, el funículo dorsolateral descendente (con funciones antinociceptivas), y las columnas dorsales especialmente relacionadas con la transmisión del dolor de origen visceral (Commons, 2016; Bester et al., 1997).

El haz **espino-reticular** está formado por los axones de las neuronas de las láminas VII y VIII. Asciende por el cuadrante anteroexterno de la médula

espinal y termina tanto en la formación reticular como en el tálamo. En contraste con el haz espinotalámico, muchos de sus axones no cruzan la línea media. El haz **espinomesencefálico** comprende los axones de las neuronas de las láminas I y V. Se proyectan al cuadrante anteroexterno de la médula espinal hasta la formación reticular del mesencéfalo y la sustancia gris periacueductal. El haz **cervicotalámico** surge de neuronas del núcleo cervical externo, localizado en la sustancia blanca externa de los dos segmentos cervicales superiores de la médula espinal. El núcleo cervical externo recibe señales de las neuronas nociceptivas de las láminas III y IV. El haz **espinohipotálamico** comprende los axones de las neuronas de las láminas I, V y VIII. Se dirige directamente a los centros de control autónomo supraespinal y se piensa que activan respuestas neuroendocrinas y cardiovasculares complejas (Kandel et al., 2013).

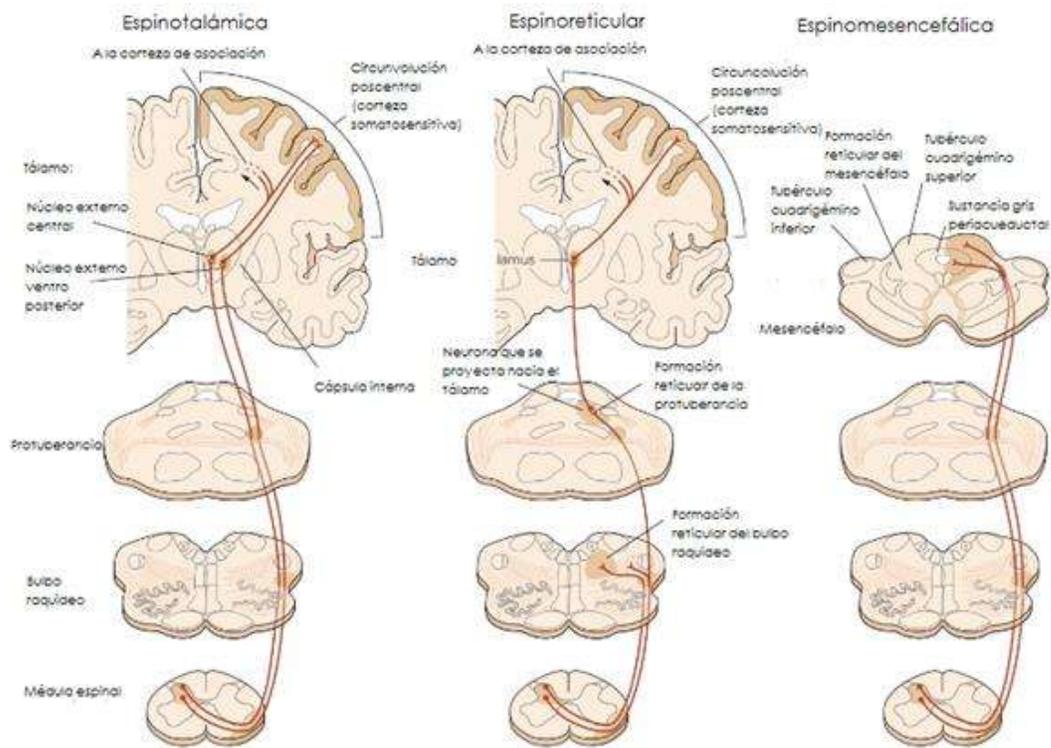


Figura 7. Tres de las principales vías ascendentes que transmiten información nociceptiva de la médula espinal a los centros superiores. El haz espinotalámico es la vía nociceptiva más destacada de la médula espinal (Modificado de Kander et al, 2013).

1.6.6. Vías descendentes del dolor

Los centros supraespinales influyen en el procesamiento nociceptivo del asta dorsal a través de vías descendentes (Milliam, 2002). Una parte importante de este sistema es la sustancia gris periacueductal, de la cual emergen y a la cual llegan proyecciones del hipotálamo, núcleo-parabraquial, núcleo del tracto solitario y estructuras cortico-límbicas, incluyendo la corteza frontal, la amígdala y el tálamo. De la sustancia gris periacueductal se proyectan neuronas hacia la parte baja del tallo cerebral en la médula rostral ventromedial, específicamente al núcleo del *raphe magnus*, que transmite el impulso por las fibras del cordón dorsolateral de la médula espinal. Éste forma conexiones sinápticas sobre las interneuronas del asta dorsal, las cuales inhiben la descarga de las neuronas espinotalámicas (Vanderah, 2007).

Diferentes regiones en la sustancia gris periacueductal están involucradas en diferentes formas de analgesia. La analgesia opioide está mediada por la sustancia gris periacueductal ventrolateral mientras que la porción lateral del núcleo procesa la analgesia no opioide (Vanderah, 2007).

La activación del sistema descendente por endorfinas se produce a través de receptores específicos, denominados receptores opioides. Estos sistemas se activan en y alrededor de la sustancia gris periacueductal del mesencéfalo. Estas neuronas se proyectan a la formación reticulada medular y el *locus coeruleus* (las principales fuentes de células serotoninérgicas y noradrenérgicas en el cerebro, respectivamente). Estas fibras descendentes se proyectan al asta posterior de la médula espinal a lo largo del fascículo denominado cordón dorsolateral (localizado en la porción dorsal de la médula espinal) para realizar sinapsis con la neurona aferente primaria entrante, la neurona de segundo orden de transmisión del dolor o interneurona. Estas neuronas moduladoras descendentes del dolor:

a) Liberan neurotransmisores en la médula espinal, especialmente serotonina (5-HT) y noradrenalina.

b) Activan pequeñas interneuronas que contienen opioides en el asta posterior espinal para liberar péptidos opioides.

La noradrenalina y la 5-HT liberadas actúan para:

a) Inhibir directamente la liberación de transmisores del dolor desde la señal aferente nociceptiva entrante.

b) Inhibir la neurona de segundo orden de transmisión del dolor.

La activación del sistema descendente del dolor explica por qué en condiciones de estrés agudo no se tiene sensación de dolor, o quizás parece muy atenuado (Fields et al., 1983).

1.7. Alodinia e hiperalgesia

En situaciones patológicas, la activación de los nociceptores puede llevar a dos tipos de estados dolorosos: la alodinia y la hiperalgesia. La **alodinia** es la percepción anormal del dolor, nacida de un estímulo que habitualmente es indoloro (IASP, 1994). Por lo común, tiene elementos de retraso en la percepción y de la sensación residual. Este dolor aparece en respuesta a un tacto ligero y viene señalado por la actividad en los mecanorreceptores de bajo umbral en presencia de una neurona central transmisora del dolor que se encuentra sensibilizada. Se cree que la alodinia se transmite a través de mecanorreceptores de umbral bajo. Se considera que la liberación de ATP por parte de las células lesionadas tiene un papel importante en la inducción de la alodinia mecánica después de una incisión cutánea (Tsuda et al., 2003).

La alodinia observada en estados de dolor neuropático también puede explicarse por un mecanismo similar de sensibilización central. Esto se demostró en humanos por un bloqueo selectivo de la actividad neural de las fibras grandes (fibras del tacto) con un bloqueo isquémico. La alodinia desapareció al eliminar la sensación táctil y se mantuvieron las funciones de otras fibras nerviosas (Campbell et al 1988). Se basan en una reversión de las acciones de los neurotransmisores inhibitorios GABA y glicina, de manera que se convierten en moléculas excitatorias y facilitan la estimulación de bajo umbral a las neuronas nociceptivas (Price et al., 2005).

Tras la aplicación repetida de estímulos nocivos, los nociceptores cercanos que no responden previamente a los estímulos acaban por hacerlo, fenómeno conocido como sensibilización. La sensibilización de nociceptores tras una lesión o inflamación se debe a la liberación de diversas sustancias químicas por las células

y tejidos dañados. Estas sustancias son la bradicinina, sustancia P, serotonina, histamina, prostanglandinas, leucotrienos, ATP y acetilcolina (Kandel et al., 2013). Una vía nerviosa para el dolor a veces se vuelve demasiado excitable. Esto da lugar a una **hiperalgesia**, que significa hipersensibilidad al dolor. Las posibles causas de este fenómeno son las siguientes:

- 1) una sensibilidad excesiva de los propios receptores para el dolor, lo que se denomina hiperalgesia primaria.
- 2) una facilitación de la transmisión sensitiva en sitios alejados al daño, lo que se llama hiperalgesia secundaria.

Un ejemplo de hiperalgesia primaria lo proporciona la enorme sensibilidad de la piel quemada por el sol, que obedece a la sensibilización de las terminaciones cutáneas al dolor por los productos tisulares locales liberados por la quemadura: la histamina, las prostaglandinas y otros. La hiperalgesia secundaria suele deberse a lesiones en la médula espinal o en el tálamo (Guyton y Hall, 2011). El hecho de que la hiperalgesia secundaria aparezca en partes del cuerpo lejanas del lugar donde se produjo la lesión original, nos indica que el mecanismo mediador en esta forma de hiperalgesia es el sistema nervioso central y no una alteración periférica. Sabemos que los impulsos generados en los nociceptores en la zona lesionada o inflamada evocan cambios centrales que, a su vez, producen una hiperalgesia secundaria (Torebjörk et al., 1992).

Estos cambios están disparados por los impulsos que llegan desde los nociceptores que inervan la zona lesionada y se mantienen debido a la mayor actividad espontánea de estos nociceptores a causa de su sensibilización. Este proceso se ha llamado sensibilización central por analogía a la sensibilización periférica observada en el lugar donde ocurre la lesión, e implica un aumento en la capacidad de excitación de las neuronas de segundo orden en la médula espinal y en las zonas supraespinales y un cambio radical en las consecuencias sensoriales de la activación de las fibras aferentes de bajo umbral que va desde el tacto al dolor. Datos experimentales demuestran que la actividad intensa o persistente en los nociceptores periféricos conduce a una mayor capacidad de respuesta de las neuronas del asta dorsal de la médula espinal (Cervero y Laird, 1996). Por lo

tanto, el cambio en la sensación evocada se conoce como hiperalgesia, también definida como un cambio hacia la izquierda en la función de estímulo-respuesta que describe la relación entre la intensidad del estímulo y la sensación de dolor (figura 8).

En esta situación, los estímulos normalmente inocuos como el cepillado y el tacto son dolorosos (alodinia), y los estímulos dolorosos leves como el pinchazo son más dolorosos (hiperalgesia). La hiperalgesia en el área de la lesión se conoce como hiperalgesia primaria, mientras que las áreas de tejido normal que rodean el sitio de la lesión, como hiperalgesia secundaria (Cervero y Laird, 1996).

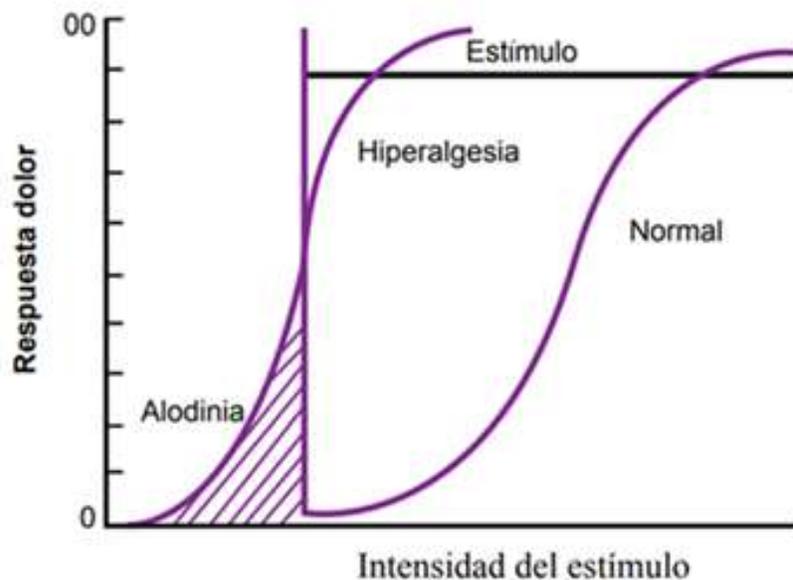


Figura 8. Diagrama que ilustra los cambios en la sensación de dolor inducida por una lesión (Cervero y Laird, 1996).

Se sabe que este fenómeno de hiperalgesia secundaria se debe a un cambio central, inducido y mantenido por la estimulación de nociceptores, de modo que la actividad en aferentes mielinizados grandes conectados a mecanorreceptores de umbral bajo provoca sensaciones dolorosas y sensaciones

táctiles (Torebjörk et al., 1992) y el aporte de los nociceptores evoca sensaciones de dolor mayores (Cervero et al., 1994).

El desarrollo de áreas de hiperalgesia secundaria es una consecuencia normal de la lesión e inflamación y, como tal, una característica del dolor. Como se describió anteriormente, la hiperalgesia secundaria es un fenómeno inducido principalmente por cambios que ocurren en el SNC, por el cual la actividad en los mecanorreceptores de bajo umbral evoca sensaciones de dolor. Este tipo de mecanismo también funciona en el dolor neuropático (Campbell et al., 1988; Gracely et al., 1992) y, por lo tanto, es posible que los mecanismos de la alodinia observados en pacientes con dolor neuropático incluyan aquellos normalmente presentes durante la hiperalgesia secundaria. La hiperalgesia secundaria puede incluso evocarse en ausencia de la percepción del dolor *per se* en sujetos humanos normales (Cervero et al., 1993).

La hiperalgesia secundaria cutánea puede evocarse en sujetos humanos normales mediante estimulación térmica prolongada a intensidades que no se perciben como dolorosas. Este mecanismo podría explicar la alodinia observada y la hiperalgesia, en ausencia de una lesión periférica aparente, en pacientes con dolor neuropático. En pacientes con neuropatía periférica dolorosa, se ha demostrado que la alodinia está mediada por neuronas aferentes mielinizadas (Campbell et al., 1988), y se ha demostrado que la anestesia local de un supuesto foco ectópico elimina la alodinia y la hiperalgesia (Gracely et al., 1992).

1.8. Tolueno y nocicepción

Se han realizado esfuerzos para estudiar los efectos celulares de los disolventes de abuso, que han resultado en el hallazgo de que el tolueno afecta canales iónicos activados por ligando. En particular, la evidencia de que el tolueno actúa como un antagonista no competitivo de los canales NMDA (Cruz et al., 1998), junto con los estudios que indican que los antagonistas del receptor NMDA poseen actividad analgésica (Tjolsen y Hole, 1997), planteó la cuestión de si el tolueno modifica la nocicepción o no. La relación entre la exposición al tolueno y la nocicepción ha sido estudiada previamente (López-Rubalcava et al., 2000; Cruz et al., 2001). El estudio de la nocicepción se basó en la evidencia de que el tolueno

aumentaba la actividad del receptor de GABA_A y glicina (Beckstead et al., 2000) y actuaba como antagonista no competitivo del receptor NMDA, pero no para los receptores AMPA y kainato, *in vitro* (Cruz et al., 1998). Dado que los agonistas del receptor GABA_A (Kaneko y Hammond, 1997; Zeilhofer et al., 2015) y los antagonistas del receptor NMDA (Chaplan et al., 1997; Zhou et al., 2011) disminuyen la nocicepción en varios modelos de dolor, se pensaba que la exposición al tolueno podría producir antinocicepción en roedores.

Se utilizó la prueba de plancha caliente como una herramienta experimental para abordar este problema ya que permite el estudio de una respuesta mediada por la médula espinal (el reflejo flexor antialgésico) y dos comportamientos integrados (lamida de la pata y escape) (figura 9) (Tjolsen y Hole, 1997). En estas condiciones, el tolueno indujo un aumento dependiente de la concentración en la nocicepción en las tres respuestas evaluadas. Como se mencionó anteriormente, estas respuestas están integradas en diferentes niveles del SNC, por lo que los efectos pronociceptivos del tolueno parecen ser un fenómeno general que involucra estructuras espinales y supraespinales (Cruz et al., 2001). Sugiriendo que el tolueno es nociceptivo en un modelo de nocicepción aguda. Junto con los experimentos de nocicepción, se evaluaron los supuestos efectos perturbadores del tolueno sobre la coordinación motora en la prueba de rota-rod.

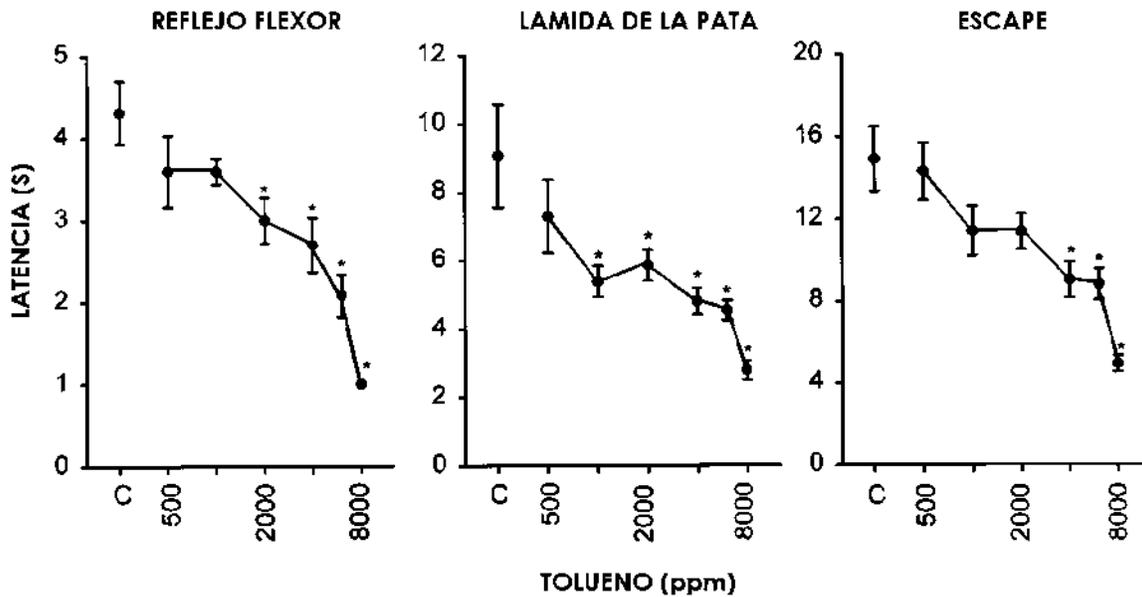


Figura 9. Efectos del tolueno sobre la nocicepción evaluados por las latencias a la aparición del reflejo flexor antialgésico, la lamida de la pata y los comportamientos de escape en ratones. Grupos independientes de animales (n=10, cada uno) fueron expuestos durante 30 minutos a diferentes concentraciones de tolueno e inmediatamente después, probados en la placa caliente (Modificada de Cruz et al., 2001).

Un estudio previo de este grupo de investigación evaluó los efectos pronociceptivos del tolueno en la hipersensibilidad nociceptiva aguda inducida por formalina (Cervantes-Durán et al., 2017) (figura 10). Además, se encontró que la exposición aguda al tolueno (6000 ppm), aumenta la nocicepción aguda en ambas fases de la prueba de formalina (más de 1 h) y alodinia mecánica e hiperalgesia duraderas (más de 12 días). Comprobando que el tolueno es nociceptivo en modelo de dolor inflamatorio, en su forma aguda, así como el desarrollo de alodinia e hiperalgesia y establece un mecanismo potencial para ello. Además, parece que los efectos pronociceptivos no están relacionados con cambios en la actividad motora en ratas (2000 a 8000 ppm) (Bowen et al., 2007) y ratones (López-Rubalcava et al., 2000; Cruz et al., 2001). En contraste, otros grupos han informado que el tolueno puede reducir la coordinación motora a 6000 ppm (Bowen y Balster, 1998). Sin embargo, el hecho de que el tratamiento posterior con tolueno no sea efectivo para aumentar la hipersensibilidad de larga duración

inducida por formalina sugiere que los efectos pronociceptivos del tolueno son independientes de las posibles modificaciones en la coordinación motora.

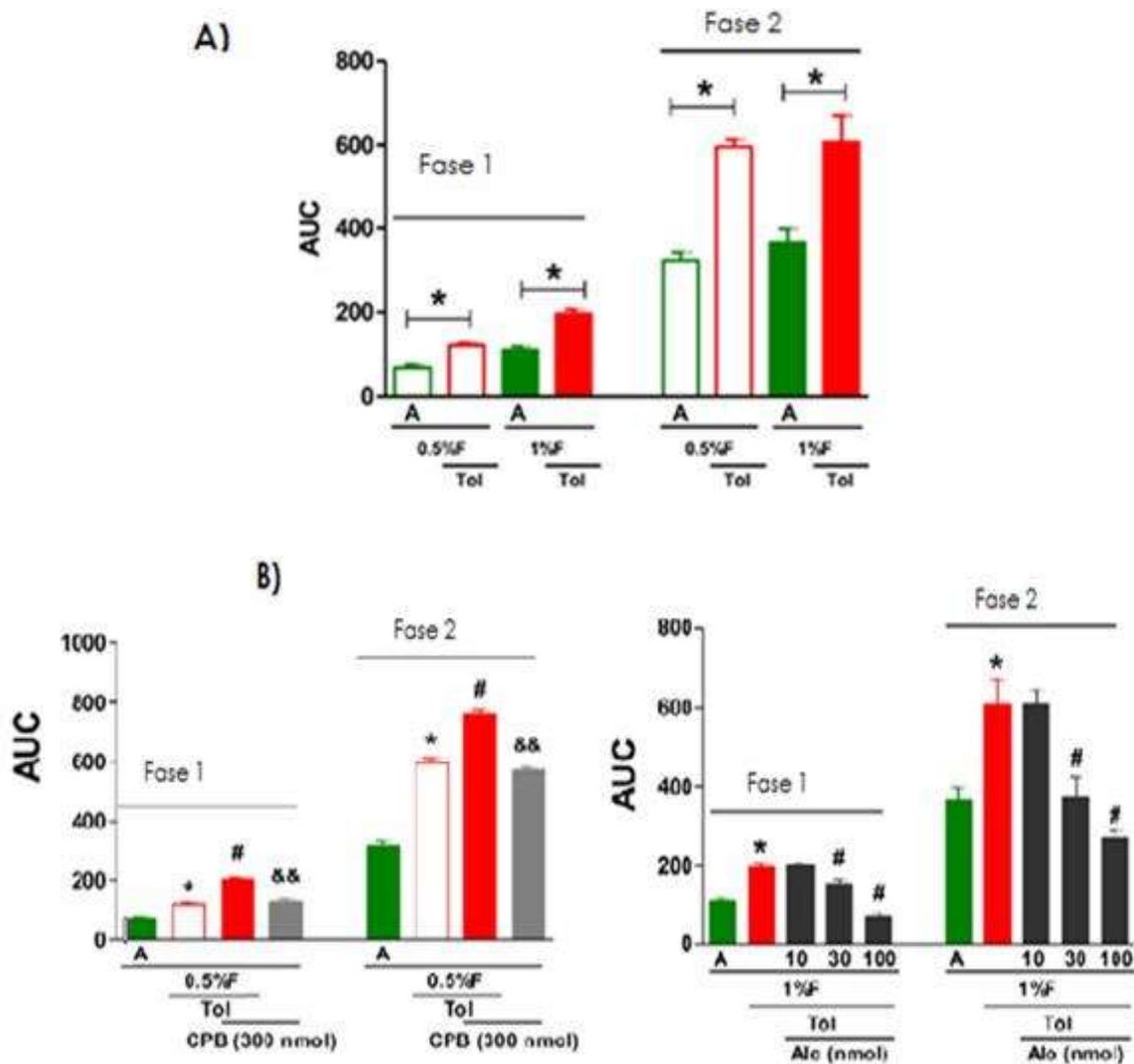


Figura 10. La inyección de formalina (F) induce un efecto nociceptivo dependiente de la concentración en ausencia y presencia de tolueno (Tol) (A). Efecto del agonista del receptor 5-HT₃ m-CPBG (CPB) en la nocicepción aguda inducida por formalina así como el efecto del antagonista del receptor 5-HT₃ alosetrón (Alo) en la nocicepción aguda inducida por formalina (B) (Modificado de Cervantes-Durán *et al.*, 2017).

Sorprendentemente, los autores encontraron que la exposición aguda al tolueno produjo hipersensibilidad térmica, en lugar de antinocicepción en ratones (López-Rubalcava et al., 2000; Cruz et al., 2001; Páez-Martínez et al., 2003). Esos autores concluyeron que otros sistemas neurotransmisores podrían estar involucrados en los efectos pronociceptivos del tolueno, motivo por el cual es necesario realizar más estudios sobre el tema.

En resumen, los datos indican que el tolueno es capaz de inducir efectos pronociceptivos en modelos de dolor inflamatorio y nociceptivo. Sin embargo, los mecanismos de acción pronociceptiva del tolueno no están claros.

II. Justificación

Los resultados de la Encuesta Nacional de Consumo de Drogas, Alcohol y Tabaco (ENCODAT, 2016-2017) indican que en México, en la población de 12 a 65 años, el consumo de drogas inhalables se mantiene en crecimiento. La investigación sobre los mecanismos de acción de los disolventes inhalables se ha retrasado respecto a otras drogas de abuso, a pesar de la creciente evidencia de que su consumo representa un problema de salud pública en México, ya que son sustancias de fácil acceso y que suelen estar presentes en productos para el hogar, como pinturas, diluyentes y aerosoles, entre otros.

El tolueno es un miembro representativo de los disolventes inhalables, que son consumidos voluntariamente por adolescentes, adultos, e incluso niños, debido a que producen un estado alterado de conciencia.

Los resultados de investigaciones previas sugieren que el tolueno aumenta la nocicepción a través de sistemas de neurotransmisores como el serotoninérgico (Cervantes-Durán et al., 2017). Sin embargo, no se sabe si otros sistemas de neurotransmisión están participando en estos efectos pronociceptivos. Por otro lado, de acuerdo a estudios realizados *in vitro*, se sabe que el tolueno se une a los receptores purinérgicos P2X_{2/3} y P2X₃, potenciándolos o inhibiéndolos, según la composición de sus subunidades y está reportado que estos receptores median la sensibilidad nociceptiva. Por lo tanto, en el presente proyecto se pretende estudiar la participación de los receptores purinérgicos P2X_{2/3} y P2X₃ en los efectos nociceptivos del tolueno.

III. Hipótesis

Los receptores purinérgicos P2X_{2/3} y P2X₃ participan en el efecto de la exposición aguda y crónica a tolueno sobre la nocicepción (alodinia e hiperalgesia) en ratas.

IV. Objetivos

4.1. Objetivo general

Evaluar la participación de los receptores purinérgicos P2X_{2/3} y P2X₃ en el efecto de la exposición a tolueno sobre la nocicepción, la hiperalgesia y la alodinia.

4.2. Objetivos particulares

- 1.- Evaluar el efecto de la exposición aguda a tolueno sobre la nocicepción (alodinia e hiperalgesia).
- 2.- Evaluar el efecto de la exposición crónica a tolueno sobre la nocicepción (alodinia e hiperalgesia).
- 3.- Evaluar la participación de los receptores purinérgicos P2X_{2/3} y P2X₃ en el efecto pronociceptivo del tolueno.

V. Material y métodos

5.1. Animales

Los experimentos se realizaron en ratas Wistar hembra, ya que estudios anteriores de nuestro laboratorio no han mostrado diferencia entre ratas macho y hembra de esta cepa en el modelo experimental (Cervantes-Durán et al., 2016). Los animales se obtuvieron del laboratorio de Farmacodependencia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y tuvieron acceso a agua y alimento *ad libitum*. Todos los experimentos siguieron las pautas sobre estándares éticos para la investigación del dolor experimental en animales (Zimmermann, 1983) y la regulación mexicana (NOM-062 ZOO-1999) para el uso y cuidado de los animales de laboratorio. Las ratas se sacrificaron en una cámara de CO₂ al final del experimento.

5.2. Fármacos

El formaldehído (37%) se compró en Merck (Darmstadt, Alemania). El tolueno (99.5%) se compró a Merck. El RO-3 (5 - [[4,5-dimetoxi-2- (metiletil) fenil] metil] -2,4-pirimidinodiamina) se adquirió en TOCRIS (Ciudad de México). El A-317491 sal de sodio hidratada (5- [[[3- fenoxifenil] metil] [(1S) - 1,2,3,4- tetrahidro- 1- naftalenil] amino] carbonil] - 1,2,4- bencenotricarboxílico), se adquirió de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). El A-317491 y el formaldehído se disolvieron en solución salina, el RO-3 se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO).

5.3. Exposición a tolueno

Se usó tolueno como el prototipo de disolvente de abuso. Los animales fueron expuestos a tolueno 6000 ppm, imitando lo que sucede en una situación de abuso de drogas (Marjot y McLeod, 1989). Las ratas se colocaron en una cámara de exposición estática que consiste en un frasco cilíndrico cubierto con una tapa hermética que tiene puertos de inyección y un ventilador que se proyecta en la cámara sobre una plataforma de malla de acero inoxidable (figura 11). Se colocó un pedazo de papel de filtro en la malla metálica, después se colocó cada rata de manera individual en la cámara, se cerró, y se inyectó una cantidad predeterminada de tolueno a través de un puerto de inyección colocado sobre el papel de filtro. Los diferentes grupos de ratas se expusieron a tolueno (6000 ppm) o a aire (control) durante 30 min (exposición aguda) o por 30 min, 2 veces al día, durante 4 semanas (exposición crónica). Se ha reportado que la concentración de tolueno que se empleó induce hipersensibilidad térmica en ratones (Cruz et al., 2001). Aproximadamente 5 minutos después, las ratas sometieron a la prueba de formalina.

El volumen de disolvente que se utilizó se calculó con la ecuación de Nelson (1971):

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

Dónde:

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

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

Cppm = Concentración a utilizar (ppm).

Vs = Volumen de la cámara de exposición estática (l).

d = Densidad del disolvente (g/ml).

P = Presión atmosférica (atm).

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

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



Figura 11. Cámara de exposición estática. Posee una jarra cromatográfica con tapa de acrílico. La tapa tiene puertos de inyección y se conecta, en su parte externa al motor de un ventilador cuyas aspas proyectan hacia el interior de la cámara. Bajo las aspas hay una malla metálica donde se coloca un papel filtro para administrar allí el disolvente.

5.4. Nocicepción inflamatoria aguda inducida por formalina

La nocicepción inflamatoria aguda se evaluó mediante la prueba de la formalina descrita por Dubuisson y Dennis (1977), con algunas modificaciones (Wheeler-Aceto et al., 1990; Rocha-González et al., 2005). Las ratas se colocaron en cilindros de acrílico transparentes, se colocaron espejos en cada cilindro para permitir la observación sin obstáculos. Previo a la evaluación, los animales se pusieron en las cámaras de observación por 30 minutos para permitir que se aclimaten a su entorno, luego se retiraron para la inyección de formalina. Las ratas se sujetaron suavemente con una toalla, mientras que el dorso de la pata trasera derecha se inyectó vía subcutánea con 50 μ l de formalina diluida (1%) o solución salina (0.9%) con aguja de calibre 30. Los animales se devolvieron a las cámaras y se observó el comportamiento nociceptivo inmediatamente después de la inyección de formalina. El comportamiento nociceptivo se cuantificó como el número de sacudidas de la pata inyectada durante periodos de 1 minuto, cada 5 minutos, hasta 60 minutos después de la inyección. La conducta dolorosa en este modelo es bifásica: la primera fase (0-10 min) y la segunda fase (11-60 min) después de la inyección del irritante químico (Tjolsen et al., 1992). En este modelo la disminución en el número de sacudidas se interpretó como efecto analgésico o antinociceptivo. Al final del experimento, las ratas se devolvieron a sus jaulas para la evaluación de los comportamientos nociceptivos de larga duración (hiperalgesia y alodinia secundaria) el día 6 después de la inyección de formalina (Fu et al., 2001; Ambriz-Tututi et al., 2009).

5.5. Hiperalgesia sostenida y alodinia secundaria de larga duración

Para este propósito, los animales se colocaron en jaulas de prueba con un fondo de malla de alambre y se dejaron aclimatar durante 40 minutos. Se utilizaron dos filamentos de von Frey (Stoelting Co., Wood Dale, IL) con fuerzas de flexión de 10 mN [1 g] y 250 mN [26 g] los cuales se aplicaron 10 veces en cada grupo experimental en la base del tercer dedo en la superficie plantar de ambas patas (Fu et al., 2001; Ambriz-Tututi et al., 2009; Godínez-Chaparro et al., 2011; Bravo-Hernández et al., 2012).

Se completaron tres ensayos para obtener un promedio del número de respuestas de retiro de la pata. En condiciones normales, una fuerza de 10 mN no activa los nociceptores cutáneos (Leem et al., 1993), ni provoca la retirada de la pata en animales normales. Por consiguiente, la aparición de respuestas al filamento de 10 mN es indicativa de alodinia. Por otro lado, una fuerza de 250 mN o más se considera un estímulo nocivo y la hiperalgesia se produce cuando hubo una mayor respuesta al filamento de 250 mN. La alodinia y la hiperalgesia se consideraron secundarias, ya que la estimulación con los filamentos de von Frey se aplicó en un sitio diferente al de la inyección de formalina.

VI. Estrategia experimental

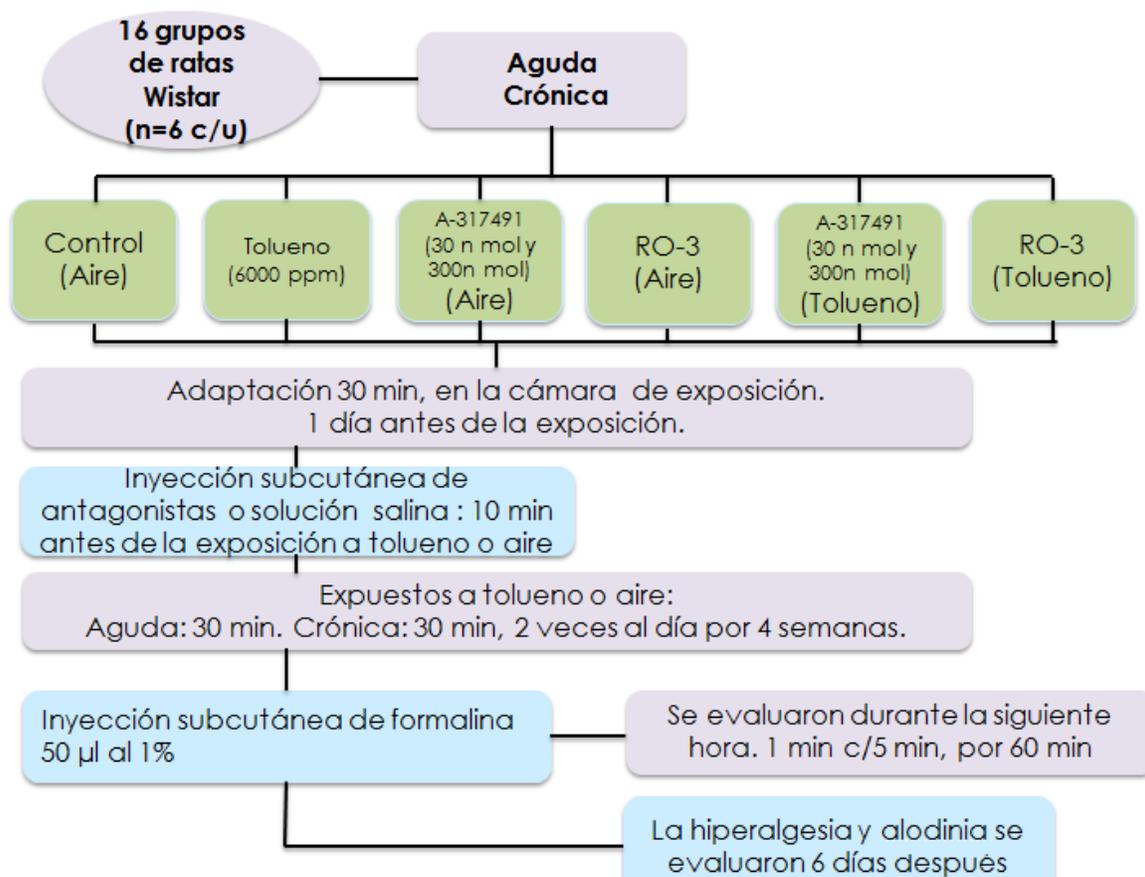


Figura 12. Estrategia experimental.

Se usaron un total de 16 grupos de 6 ratas cada uno, 2 grupos control, 2 grupos para evaluar el efecto de la exposición aguda y crónica al tolueno, 2 grupos tratados con RO-3 (antagonista de receptores P2X₃ y P2X_{2/3}) y tolueno, 2 grupos

tratados únicamente con RO-3, 4 grupos tratados con A-317491 (antagonista del receptor P2X₃ y P2X_{2/3}) y tolueno, y 4 grupos tratados únicamente con A-317491.

Para determinar si los receptores purinérgicos P2X₃ y P2X_{2/3} participan en el efecto pronociceptivo del tolueno, se usaron dos antagonistas vía subcutánea, RO-3 (300 nmol/pata) y A-317491 (30 y 300nmol/pata), administrados en la superficie dorsal de la pata trasera derecha con un vehículo (solución salina o DMSO), 10 min antes de la exposición al tolueno o al aire durante 30 minutos. Estos antagonistas son estructuralmente diferentes, pero específicos de los receptores purinérgicos P2X₃ y P2X_{2/3} (McCord et al., 2010). Luego, a las ratas se les inyectó formalina al 1% 5 minutos después de la exposición al tolueno.

VII. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron en graficas como el promedio \pm error estándar (e.e.) de 6 animales por grupo. Las curvas se construyeron trazando el número de sacudidas/minuto para la nocicepción o el número de retiros de la pata en función del tiempo para la hiperalgesia y la alodinia. El área bajo la curva (ABC) corresponde al número de sacudidas en función del tiempo o al área bajo la curva del número de retiros de la pata en función del tiempo, las cuales son una expresión de la duración e intensidad del efecto. El ABC se calculó mediante el método de los trapezoides.

Las diferencias entre cada grupo se analizaron por medio de la prueba t-Student para muestras pareadas o t-Student para muestras independientes según corresponda. Para 3 o más grupos se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido de la prueba de Student-Newman-Keuls.

El análisis estadístico y material gráfico se realizaron con el programa Sigma Plot versión 12.0. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con un valor de $p < 0.05$.

VIII. RESULTADOS

8.1. Efecto de la exposición aguda al tolueno sobre la nocicepción aguda y de larga duración inducida por formalina

Como se mencionó anteriormente (Cervantes-Durán et al., 2017), la administración subcutánea de formalina al 1% en el dorso de la pata trasera derecha de ratas expuestas a aire produjo un patrón típico de comportamiento nociceptivo dependiente del tiempo (sacudidas de la pata), caracterizado por un curso temporal bifásico (Figura 13).

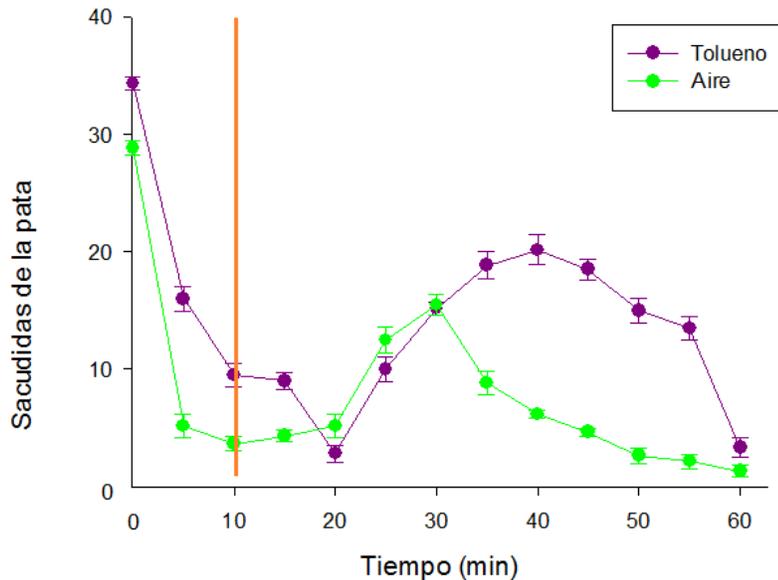


Figura 13. Curso temporal del promedio de sacudidas de la pata observados después de la inyección de formalina al 1% en ratas previamente expuestas al aire o al tolueno (6000 ppm).

La fase 1 de la respuesta nociceptiva comenzó inmediatamente después de la inyección de la formalina y luego disminuyó gradualmente en 5-10 minutos. La fase 2 comenzó 15-20 minutos después de la administración de formalina y duró aproximadamente 1 hora (Dubuisson y Denis, 1977; Castañeda-Corral et al., 2009; Cervantes-Durán et al., 2013).

La exposición de las ratas a tolueno (6000 ppm) durante 30 minutos aumentó la nocicepción aguda inducida por formalina (Figura 14).

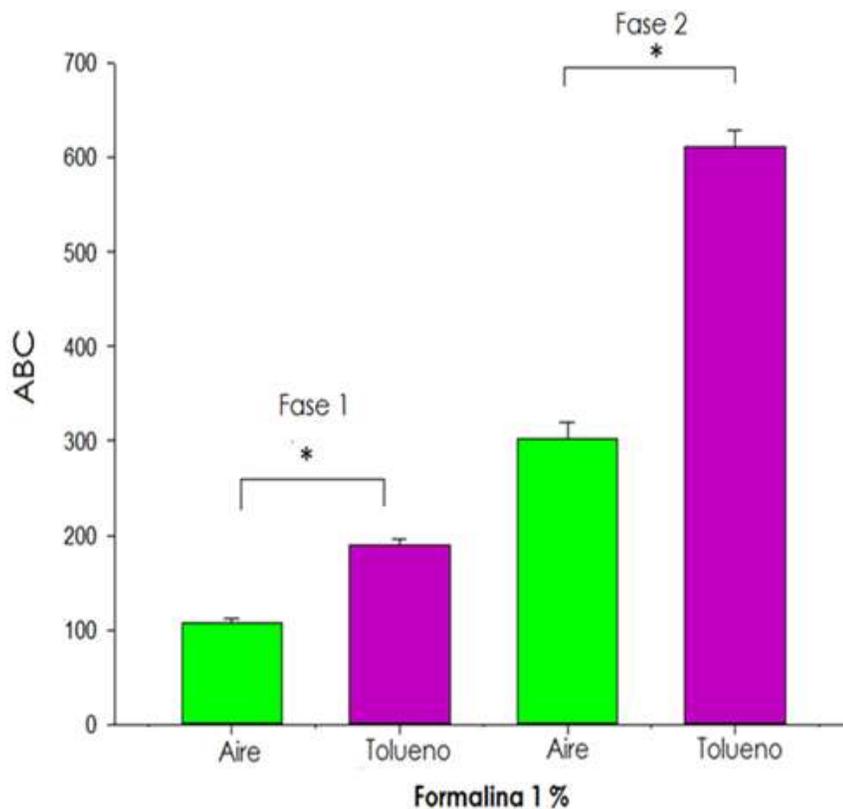


Figura 14. Área bajo la curva (ABC) de retiros de la pata observado después de la inyección de formalina al 1% en ratas previamente expuestas al aire o a tolueno 6000 ppm. Los resultados están expresados como el promedio \pm error estándar de 6 animales por grupo. Se observó una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos (* $p < 0.05$), prueba t-Student para muestras independientes.

Además de la nocicepción aguda que permaneció durante 1 hora, la inyección de formalina en la pata trasera derecha produjo alodinia secundaria e hiperalgesia en ambas patas. Esta hipersensibilidad se observó como un aumento bilateral en las respuestas de retirada de la pata luego de la aplicación de filamentos de von Frey (1 g y 26 g). Dado que la formalina se inyectó en la región dorsal de la pata y los signos de comportamiento se determinaron en la parte ventral de la pata ipsilateral (inyectada con formalina) y las patas contralaterales (no inyectadas), los comportamientos evocados pueden considerarse secundarios. La exposición de ratas a tolueno (6000 ppm) durante 30 minutos, pero no el aire, aumentó ($p < 0.05$) la alodinia (figura 15) y la hipersensibilidad de larga duración inducida por formalina al 1% en ambas patas (Figura 16).

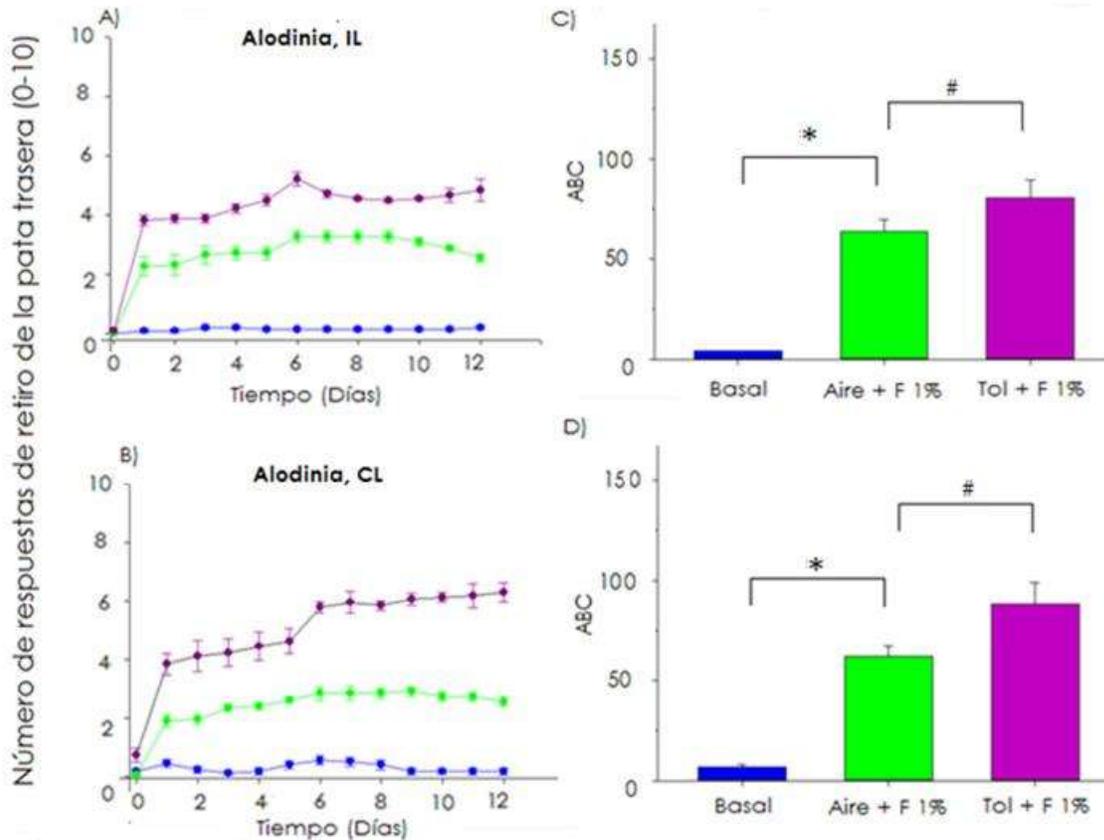


Figura 15. Curso temporal del número de respuestas ipsilaterales (IL) y contralaterales (CL) de retiro de la pata ante 10 aplicaciones de filamentos de von Frey usando una fuerza de flexión de 10 mN (alodinia) (Panel A y B), después de la administración subcutánea de formalina al 1% en ratas previamente expuestas al aire (control) o a tolueno (Tol, 6000 ppm). Las gráficas de barras (Panel C y D) representan el área bajo la curva (ABC 0-12 días). Los resultados se muestran como la media \pm error estándar de 6 animales por grupo. Se observó una diferencia estadísticamente significativa, $*p < 0.05$ entre los grupos Aire + F 1% vs grupos basales (B); $\#p < 0.05$ para Tol + 1% F vs Aire + F 1%, por ANOVA de una vía seguido por la prueba de Student – Newman – Keuls.

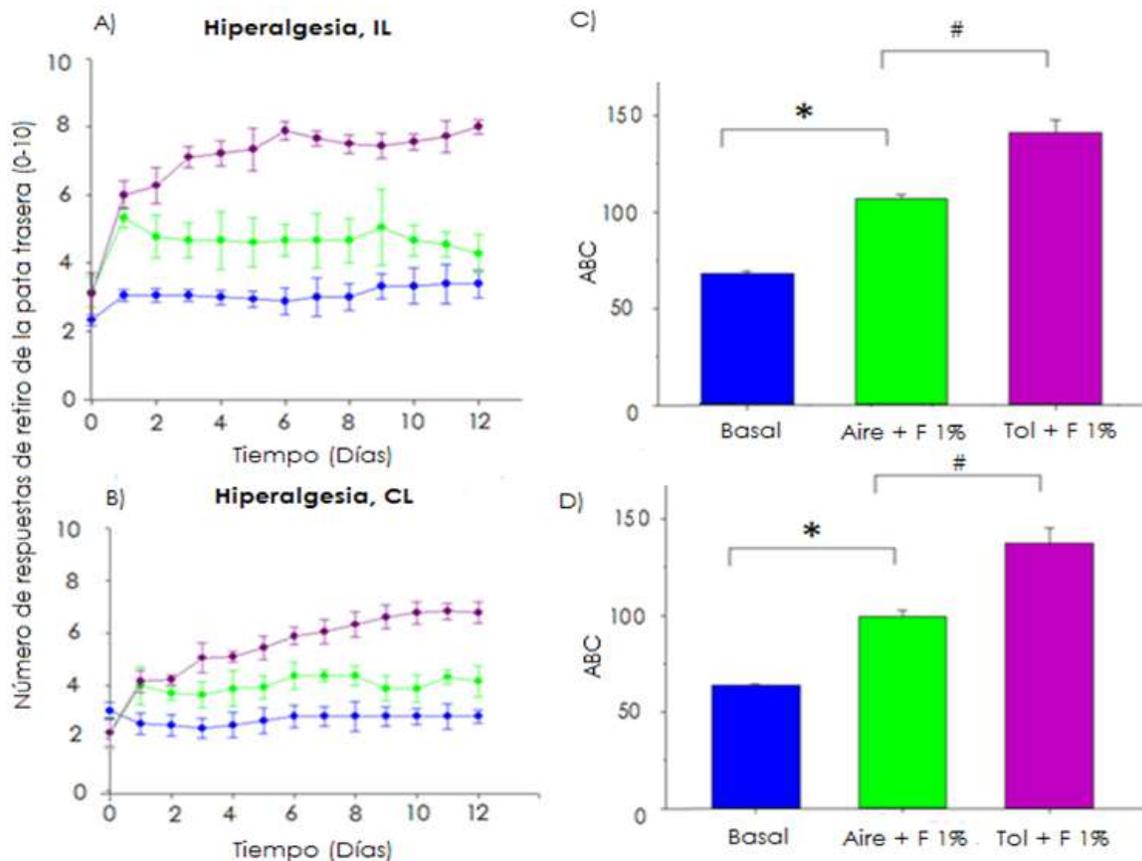


Figura 16. Curso temporal del número de respuestas ipsilaterales (IL) y contralaterales (CL) de retiro de la pata ante 10 aplicaciones de filamentos de von Frey usando una fuerza de flexión de 250 mN (hiperalgesia) (Panel A y B), después de la administración subcutánea de formalina al 1% en ratas previamente expuestas al aire (control) o tolueno (Tol, 6000 ppm). Las gráficas de barras (Panel C y D) representan el área bajo la curva (ABC 0-12 días). Los resultados se muestran como la media \pm error estándar de 6 animales por grupo. Se observó una diferencia estadísticamente significativa, $*p < 0.05$ entre los grupos Aire + F 1% vs grupos basales (B); $\#p < 0.05$ para Tol + 1%F vs Aire + F 1%, por ANOVA de una vía seguido por la prueba de Student – Newman – Keuls.

Al igual que en estudios previos, encontramos que la alodinia secundaria e hiperalgesia inducida por formalina ya se establecieron 6 días después de la inyección de formalina (Fu et al., 2001; Ambriz-Tututi et al., 2009; Ambriz-Tututi et al., 2011; Cruz et al., 2017). Por lo tanto, para los siguientes experimentos evaluamos la hipersensibilidad sólo en el día 6.

8.2. Efecto de la exposición crónica al tolueno sobre la nocicepción aguda y de larga duración inducida por formalina

La exposición crónica a tolueno se llevó a cabo por un periodo de 30 minutos, dos veces al día, con una diferencia de 6 horas, durante 4 semanas. La administración subcutánea de formalina al 1%, en el dorso de la pata trasera derecha en ratas expuestas a aire así como al tolueno, produjo un patrón típico de comportamiento nociceptivo (sacudidas de la pata) dependiente del tiempo caracterizado por un curso bifásico (figura 17), en donde el grupo expuesto a tolueno de manera crónica mostró una respuesta exacerbada en comparación con su grupo control.

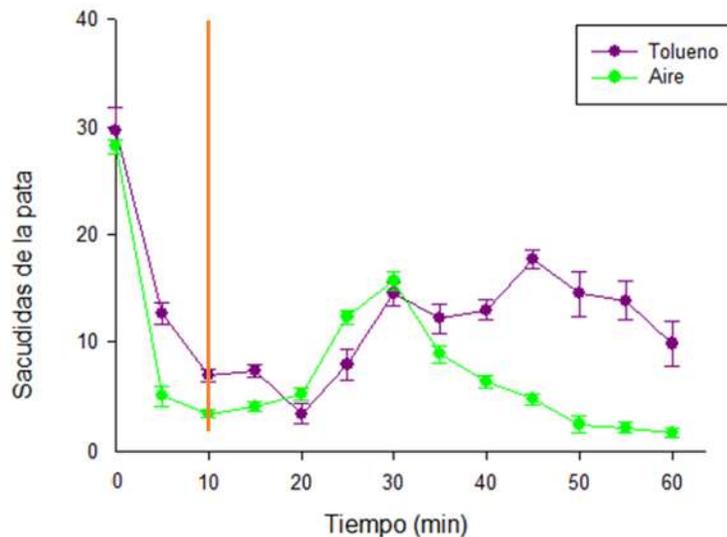


Figura 17. Curso temporal del promedio de sacudidas de la pata observados después de la inyección de formalina al 1% en ratas previamente expuestas al aire o al tolueno (6000 ppm) de manera crónica.

La fase 1 de la respuesta nociceptiva comenzó inmediatamente después de la inyección de la formalina y luego disminuyó gradualmente en 5-10 minutos. La fase 2 comenzó 15 minutos después de la administración de formalina y duró aproximadamente 1 hora (Dubuinsson y Denis, 1977; Castañeda-Corral et al., 2009; Cervantes-Durán et al., 2013). La exposición de las ratas a tolueno (6000

ppm) durante 30 minutos 2 veces al día, durante 4 semanas, aumentó la nocicepción aguda inducida por formalina de manera significativa (figura 18).

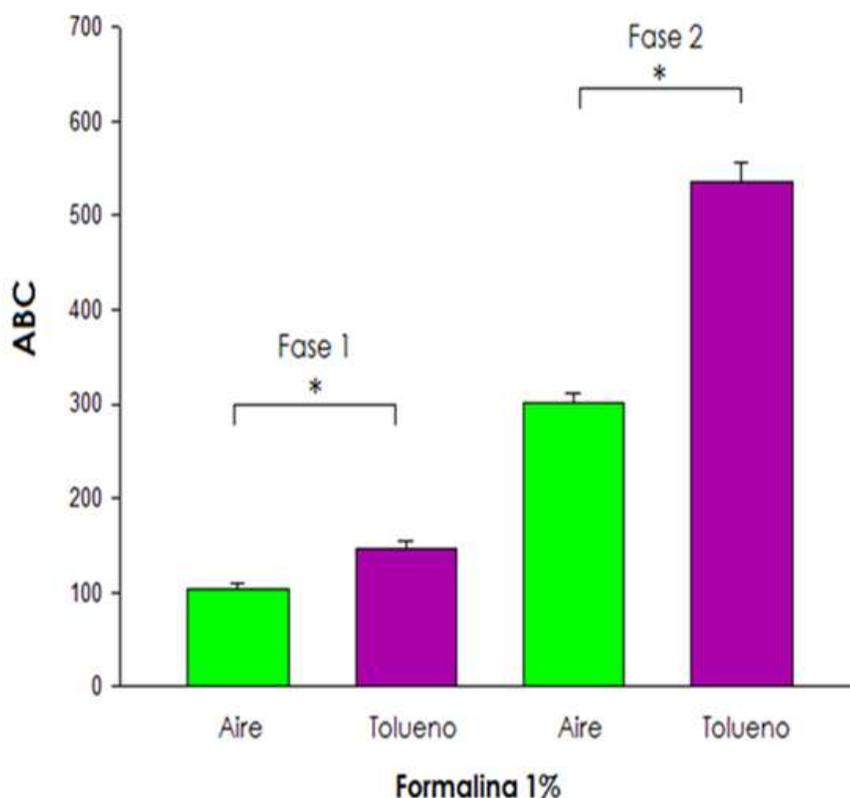


Figura 18. Área bajo la curva del número de retiros de la pata observados después de la inyección de formalina al 1% en ratas previamente expuestas al aire (A) o a tolueno 6000 ppm (Tol) de manera crónica. La inyección de formalina induce un efecto nociceptivo en ausencia y presencia de tolueno. Los resultados están expresados como el promedio \pm error estándar de 6 animales por grupo. Se observó una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($*p < 0.05$), prueba t-Student para muestras independientes.

Comparando los grupos expuestos a tolueno (6000 ppm) de manera aguda y crónica en ambas fases de la prueba de la formalina se observó una disminución de la respuesta en los grupos expuestos de forma crónica (figura 19), debido al probable desarrollo de tolerancia farmacológica, definida como la pérdida o disminución del efecto de cierta droga o fármaco tras su exposición repetida (Brunton et.al., 2007).

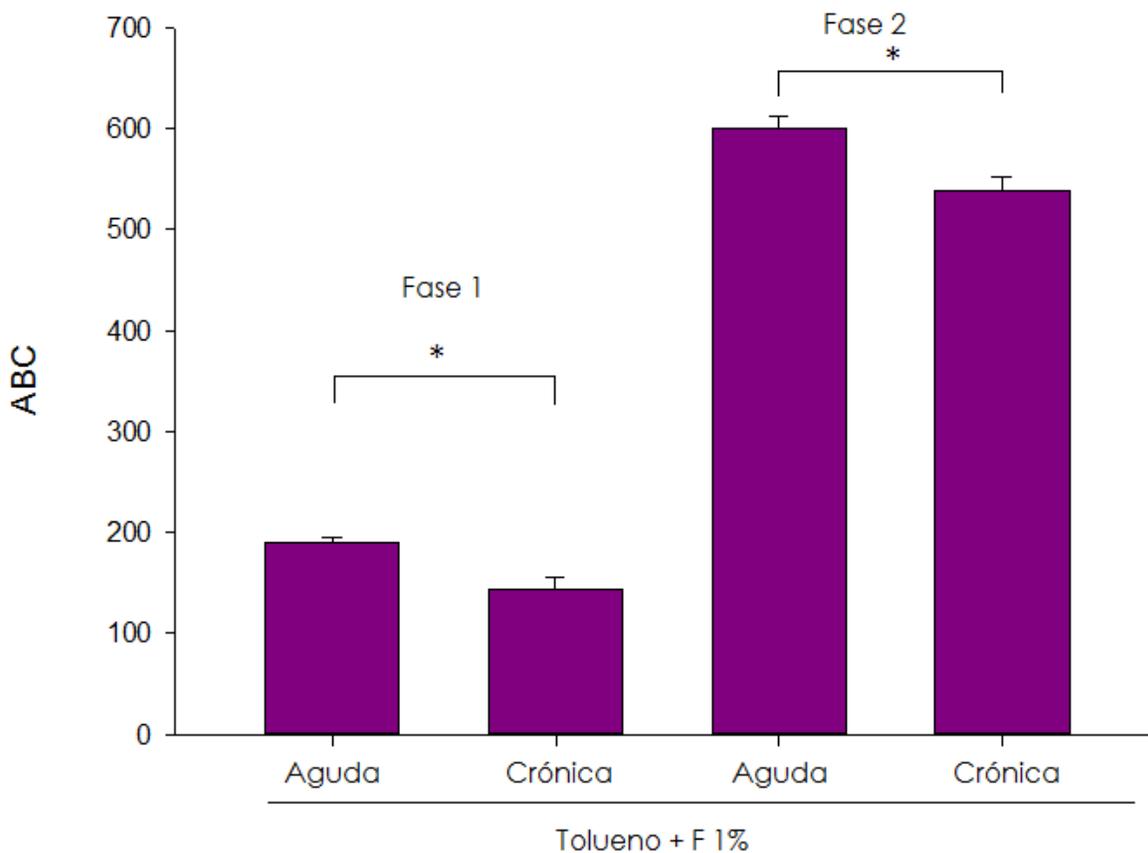


Figura 19. Comparación entre los grupos expuestos a tolueno (6000 ppm) de manera aguda y crónica. Se observó una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos de $p < 0.05$, (prueba t-Student para muestras independientes).

Como se mencionó anteriormente, encontramos que la hiperalgesia inducida por formalina y la alodinia secundaria se establecieron 6 días después de la inyección de formalina (Fu et al., 2001; Ambriz-Tututi et al., 2009; Ambriz-Tututi et al., 2011; Cruz et al., 2017). Por lo tanto, evaluamos la hipersensibilidad con la prueba de los filamentos de von Frey con dos fuerzas de flexión (10 y 250 mN) sólo en el día 6, tanto en la pata ipsilateral como en la contralateral, donde se observó desarrollo de hiperalgesia y alodinia tanto en el grupo expuesto a tolueno (6000 ppm) como en el grupo expuesto al aire de manera crónica; sin embargo a diferencia de los grupos expuestos de manera aguda se presentó una disminución

al estímulo en el grupo expuesto a tolueno de manera crónica tanto para el filamento fino como para el grueso (figura 20 y 21).

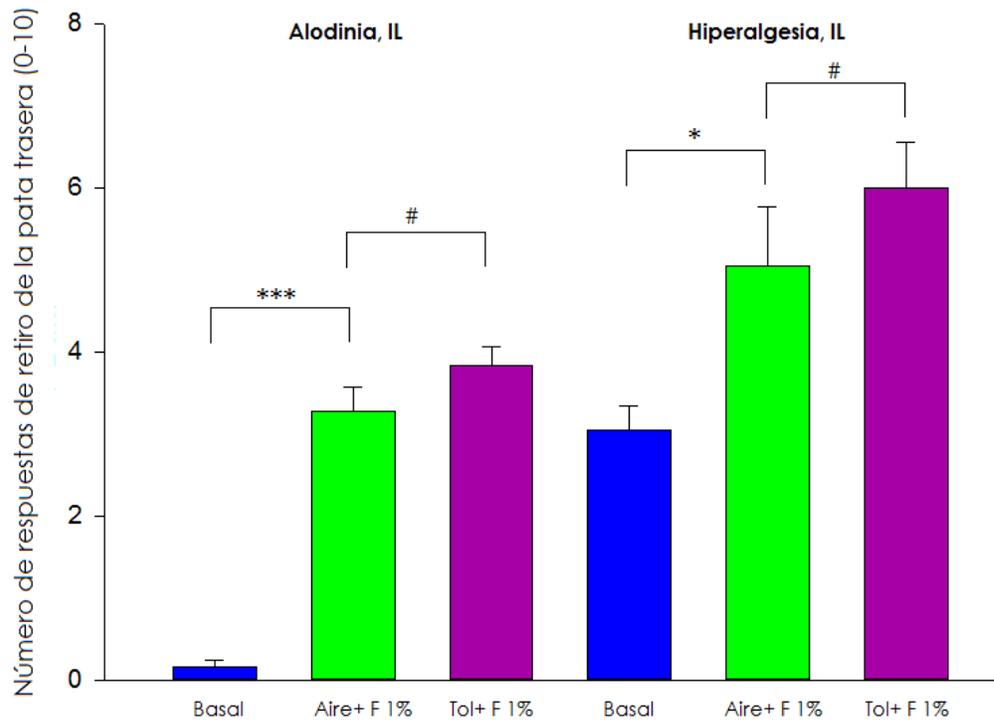


Figura 20. Respuestas de retirada de la pata ipsilateral (IL) ante la aplicación de filamentos de von Frey (10 y 250 mN) en la superficie plantar de las patas de las ratas, antes (grupos basales) y después de la administración de formalina al 1% (F). La alodinia secundaria y la hiperalgnesia se evaluaron el día 6. Se observó una diferencia estadísticamente significativa ($*p < 0.05$ y $***p < 0.001$) en los grupos Aire + F 1% vs grupos basales; $\#p < 0.05$ para Tol + F1% vs Aire + F1 %, por ANOVA de una vía seguido por la prueba de Student – Newman – Keuls.

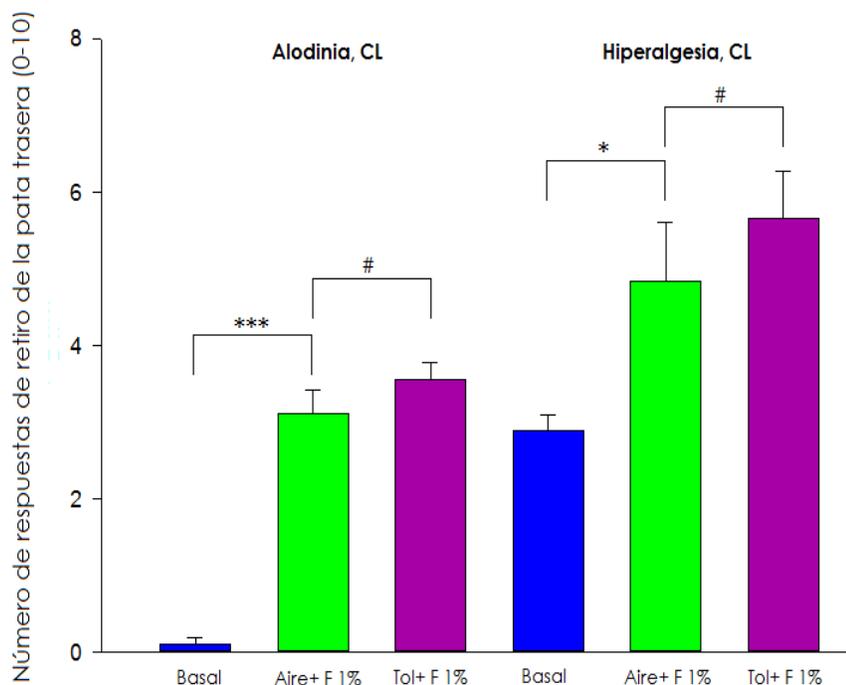


Figura 21. Respuestas de retirada de la pata contralateral (CL) ante la aplicación de filamentos de von Frey (10 y 250 mN) a la superficie plantar de las patas de las ratas, antes (grupos basales) y después de la administración de la formalina al 1% (F). La alodinia secundaria y la hiperalgnesia se evaluaron el día 6. Se observó una diferencia estadísticamente significativa ($*p<0.05$ y $***p<0.001$) en los grupos Aire + F 1% vs grupos basal; $\#p<0.05$ para Tol + F1% vs Aire + F1 %, por ANOVA de una vía seguido por la prueba de Student – Newman – Keuls.

De manera adicional, se registraron los pesos corporales del grupo control y el grupo expuesto a tolueno antes y después de la exposición crónica al disolvente o a aire (pre y post-tratamiento). Se observó un aumento de los pesos tanto del grupo control como del grupo tolueno al comparar el pre y el post tratamiento. Además, se observó una diferencia entre los pesos post-tratamiento del grupo control vs grupo tolueno, indicando que los animales expuestos a tolueno tuvieron un menor incremento de peso que los del grupo control (figura 22).

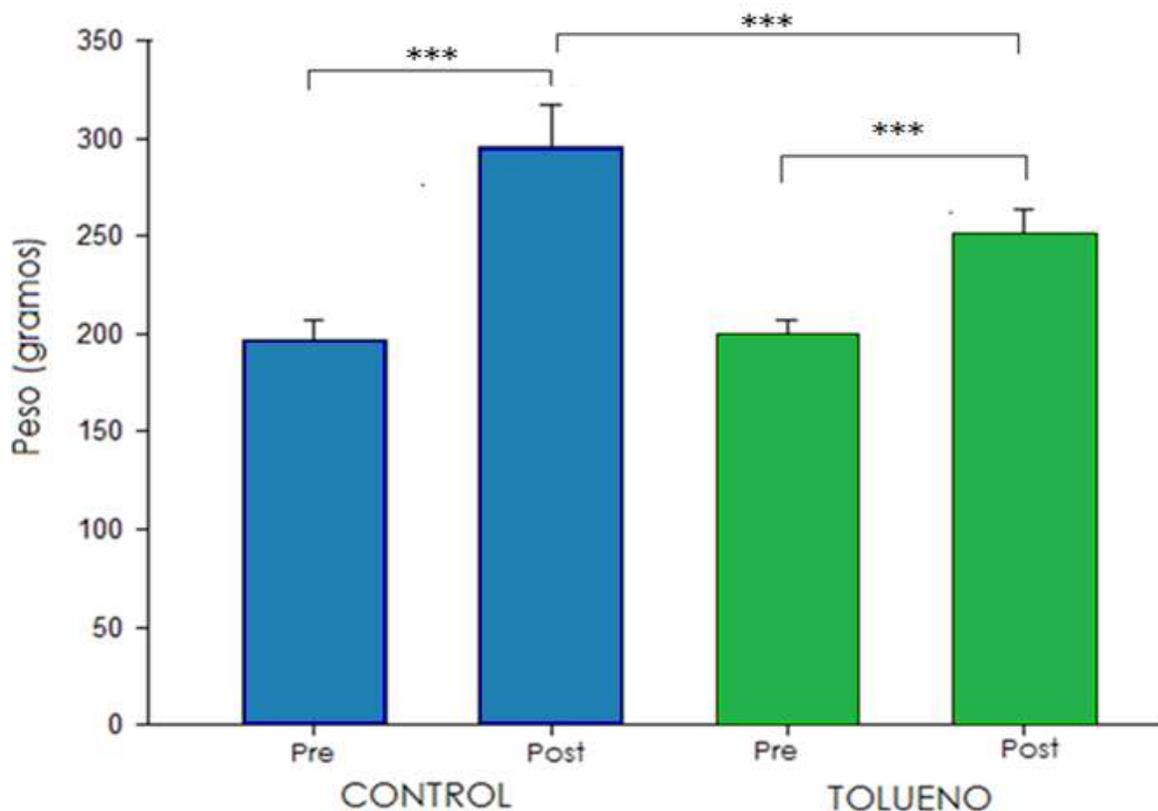


Figura 22. Peso corporal de las ratas antes y después de la exposición a tolueno (6000 ppm) o aire (control) de manera crónica (n=6 por grupo). Los resultados se muestran como la media \pm error estándar. Se observó una diferencia significativa en ambos grupos entre el pre vs post tratamiento ($p < 0.001$) (prueba t Student para muestras relacionadas) y entre el peso del grupo control vs el grupo tolueno postratamiento (prueba t Student para muestras independientes).

8.3. Efecto del antagonista de los receptores purinérgicos P2X_{2/3} y P2X₃ RO-3 (300 nmol) en la nocicepción aguda inducida por formalina, la alodinia secundaria e hiperalgesia en ratas previamente expuestas al aire o tolueno (6000 ppm) de manera aguda y crónica.

Para evaluar si los receptores P2X_{2/3} y P2X₃ participan en el efecto pronociceptivo del tolueno en la prueba de la formalina, utilizamos el antagonista altamente selectivo de los receptores P2X_{2/3} y P2X₃ RO-3 (300 nmol), el cual debido a sus propiedades fisicoquímicas se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO). Para descartar que el vehículo (DMSO) pudiera tener algún efecto, se realizó un grupo control expuesto al aire, previamente tratado con 50 μ l de DMSO vía local, administrado (40 min) antes de la prueba de la formalina y de esta manera poder

valorar si el vehículo del antagonista RO-3 es inerte o pudiera modificar el efecto del mismo. Los efectos inducidos por la administración subcutánea de DMSO o solución salina en la prueba de la formalina no mostraron diferencias significativas ($p=0.4$). Por lo tanto, se concluye que el DMSO se puede usar como vehículo, ya que no modifica el efecto de la formalina (Figura 23).

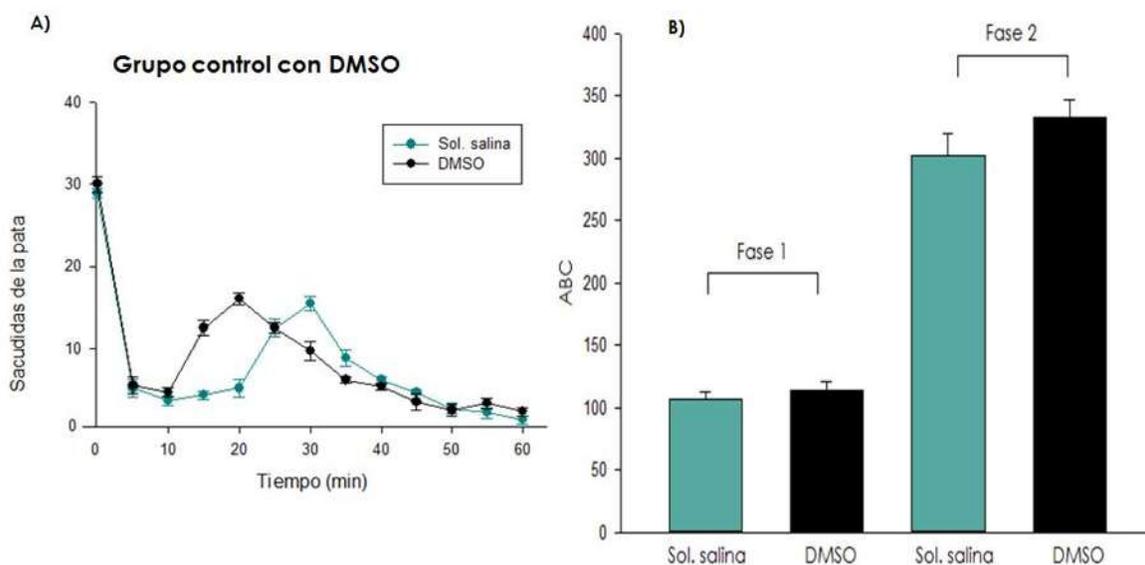


Figura 23. Los efectos inducidos por la administración s.c. de DMSO y solución salina en la prueba de formalina. (A) Curso temporal del número de sacudidas de la pata observados después de la inyección de formalina al 1% en ratas previamente expuestas al aire de manera aguda, a las que se les administró el vehículo (solución salina o DMSO). Área bajo curva (B) de retiros de la pata observado después de la inyección de formalina al 1% en ratas a las que se les administró solución salina o DMSO. Los resultados están expresados como el promedio \pm error estándar de 6 animales por grupo. No se observó diferencia estadísticamente significativa entre los grupos ($p=0.4$), prueba t-Student para muestras independientes.

El pretratamiento periférico local ipsilateral, pero no contralateral (datos no mostrados), con RO-3 (300 nmol/pata) administrado 40 min antes de la formalina, redujo ($p < 0.05$) el efecto pronociceptivo del tolueno (6000 ppm) en ambas fases de la prueba de la formalina al 1%, en el grupo expuesto de manera aguda (Figura 24) así como crónica (Figura 25). La dosis probada de RO-3, también pudo

reducir los efectos nociceptivos de la formalina en ausencia de tolueno. Además, el RO-3 redujo ($p < 0.05$) el efecto pronociceptivo en la alodinia mecánica secundaria inducida por formalina al 1% y la hiperalgesia en ratas expuestas de manera aguda (Figura 26 y 27) y crónica a tolueno (Figura 28 y 29).

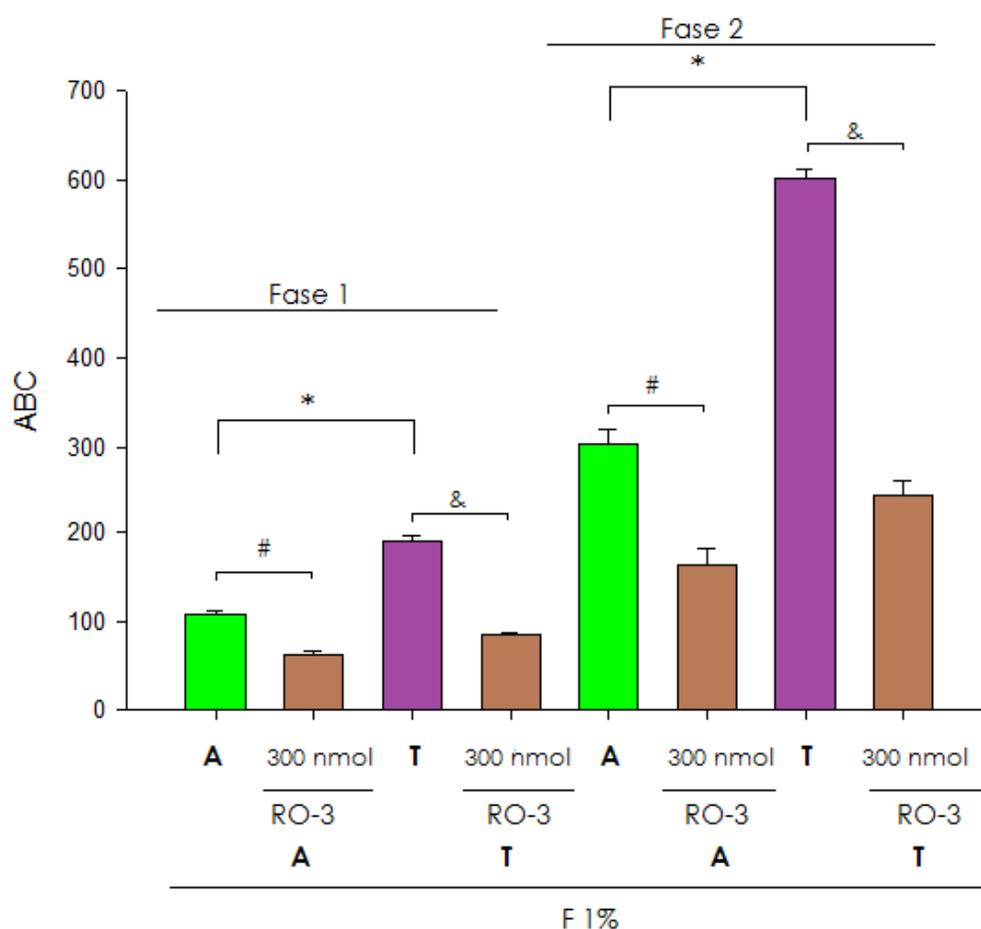


Figura 24. Efecto del antagonista de los receptores $P2X_3$ y $P2X_{2/3}$ RO-3 (300 nmol) en la nocicepción aguda inducida por formalina en ratas expuestas a tolueno (6000 ppm) o a aire de manera aguda. Los datos se expresan como el área bajo el número de sacudidas contra la curva de tiempo (ABC). Se observó una diferencia estadísticamente significativa ($*p < 0.05$) en los grupos entre el A + F 1% vs T + F 1%; $\#p < 0.05$ para A + 1% F vs A + 1% F + RO-3; $\&p < 0.05$ para T + 1% F vs T + RO-3, por ANOVA de una vía seguido por la prueba de Student–Newman–Keuls.

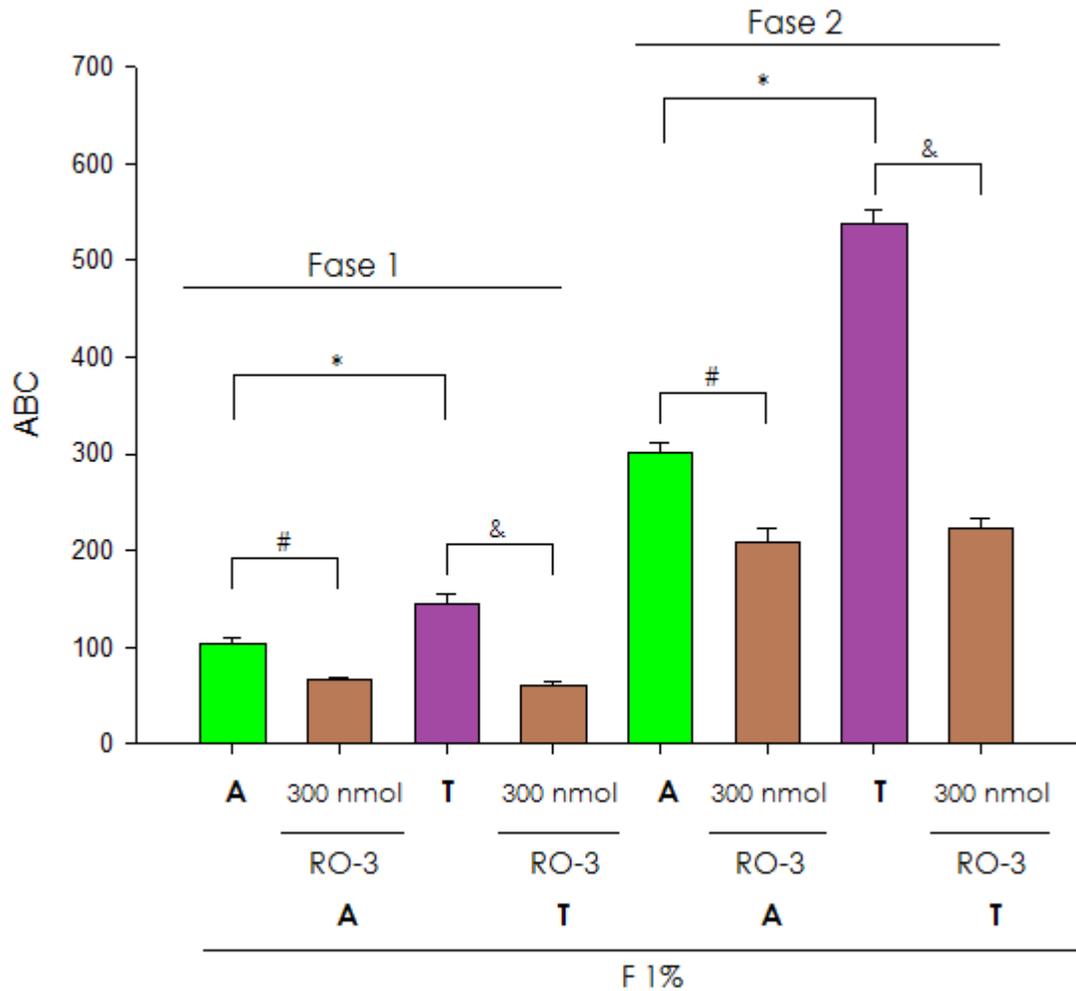


Figura 25. Efecto del antagonista de los receptores P2X₃ y P2X_{2/3} RO-3 (300 nmol) en la nocicepción inducida por formalina en ratas expuestas a tolueno (6000 ppm) o a aire de manera crónica. Los datos se expresan como el área bajo el número de estremecimientos contra la curva de tiempo (ABC). Se observó una diferencia estadísticamente significativa *p<0.05 en los grupos entre el A+ F 1% vs T+ F1%; #p<0.05 para A+ 1%F vs A-317491; &p<0.05 para T+1%F vs T+ RO-3, por ANOVA de una vía seguido por la prueba de Student – Newman – Keuls.

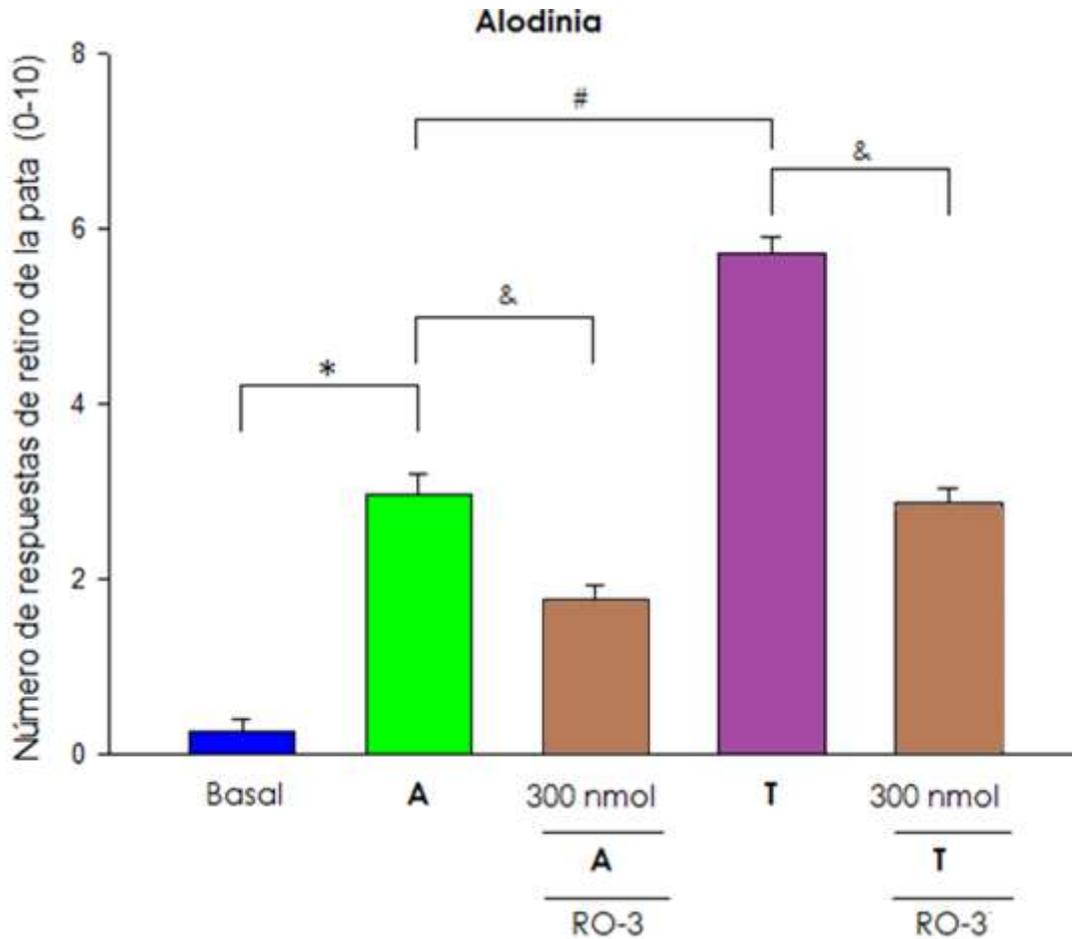


Figura 26. Efecto del antagonista de los receptores P2X₃ y P2X_{2/3}, RO-3 (300 nmol) en la alodinia secundaria en ratas previamente expuestas al aire (A) o a tolueno (Tol, 6000 ppm) de manera aguda. Los datos se expresan como el promedio ± e.e. de las respuestas de retirada de la pata ante la aplicación del filamento de von Frey (10 mN) a la superficie plantar de la pata de la rata, antes (grupo basal, B) y después de la formalina al 1% (F). La alodinia secundaria y la hiperalgesia se evaluaron el día 6 posterior a la prueba de la formalina. * p <0.05 grupo basal (B) vs el grupo A + 1% F; # p <0.05 grupo A + 1% F vs grupo T + 1% F; & p <0.05 vs grupo RO-3 vs grupo A + 1% F y T + 1% F, por ANOVA de una vía seguido por la prueba de Student–Newman–Keuls.

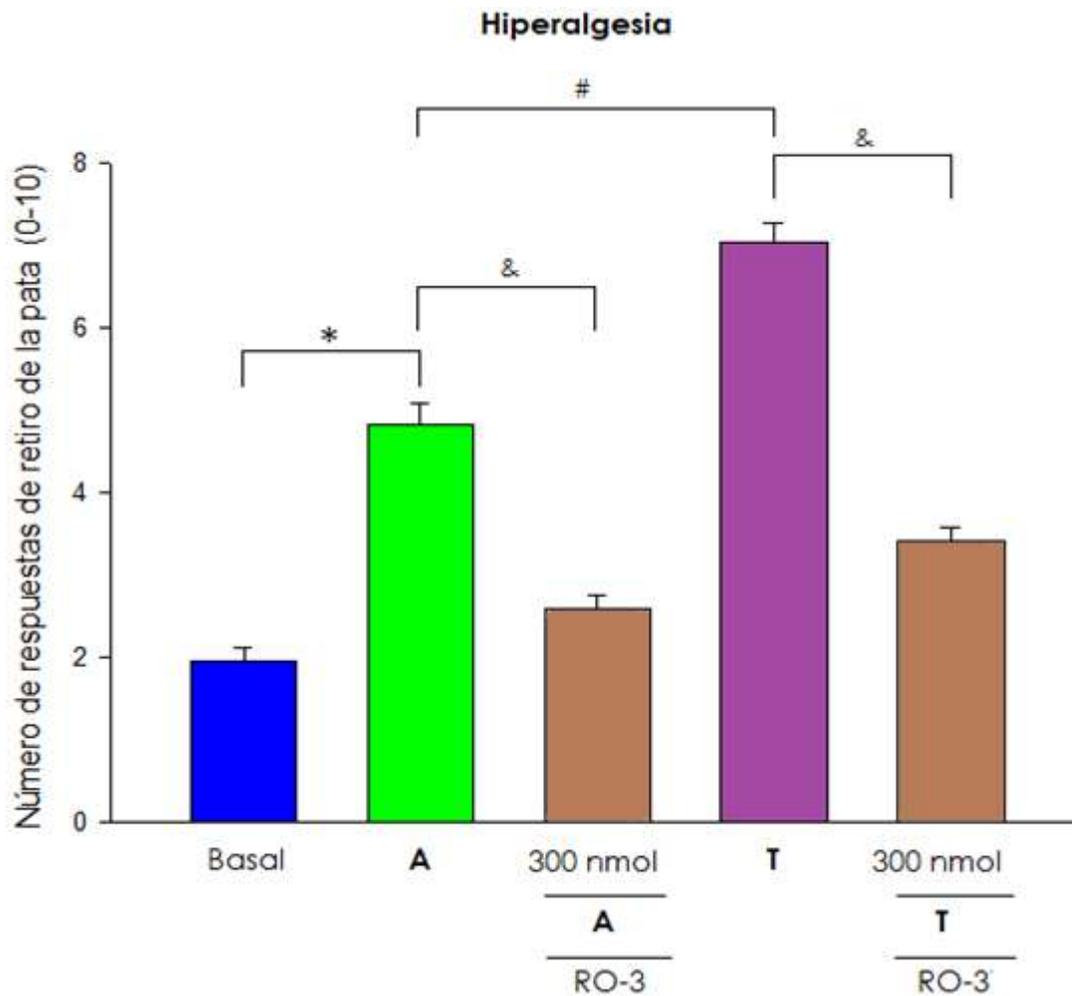


Figura 27. Efecto del antagonista de los receptores P2X₃ y P2X_{2/3} RO-3 (300 nmol) en la hiperalgnesia en ratas previamente expuestas a aire (A) o a tolueno (Tol, 6000 ppm) de manera aguda. Los datos se expresan como el promedio ± e.e. de las respuestas de retirada de la pata ante la aplicación del filamento de von Frey (250 mN) a la superficie plantar de la pata de la rata, antes (grupo basal, B) y después de formalina al 1% (F). La alodinia secundaria y la hiperalgnesia se evaluaron el día 6 posterior a la prueba de la formalina. * p < 0,05 grupo basal (B) vs el grupo A + 1% F; # p < 0.05 grupo A + 1% F vs grupo T + 1% F; & p < 0.05 RO-3 vs grupo A + 1% F y T + 1% F, por ANOVA de una vía seguido por la prueba de Student–Newman–Keuls.

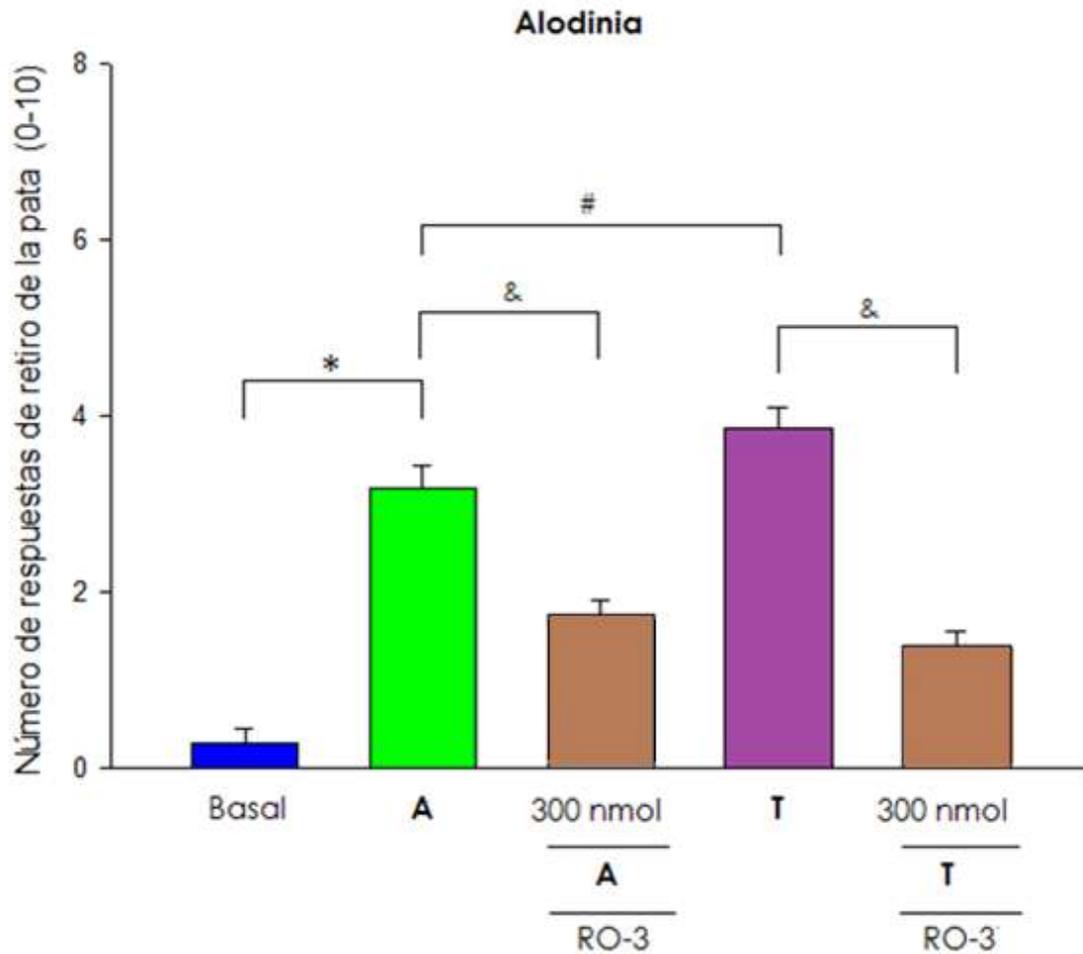


Figura 28. Efecto del antagonista de los receptores P2X₃ y P2X_{2/3} RO-3 (300 nmol) en la alodinia secundaria en ratas previamente expuestas a aire (A) o a tolueno (Tol , 6000 ppm) de manera crónica. Los datos se expresan como el promedio \pm e.e. de las respuestas de retirada de la pata ante la aplicación del filamento de von Frey (10 mN) a la superficie plantar de la pata de la rata, antes (grupo basal, B) y después de formalina al 1% (F). La alodinia secundaria y la hiperalgesia se evaluaron el día 6 posterior a la prueba de la formalina. * $p < 0,05$ grupo basal (B) vs el grupo A + 1% F; # $p < 0.05$ frente al grupo A + 1% F vs grupo T + 1% F; & $p < 0.05$ RO-3 vs grupo A + 1% F y T + 1% F, por ANOVA de una vía seguido por la prueba de Student–Newman–Keuls.

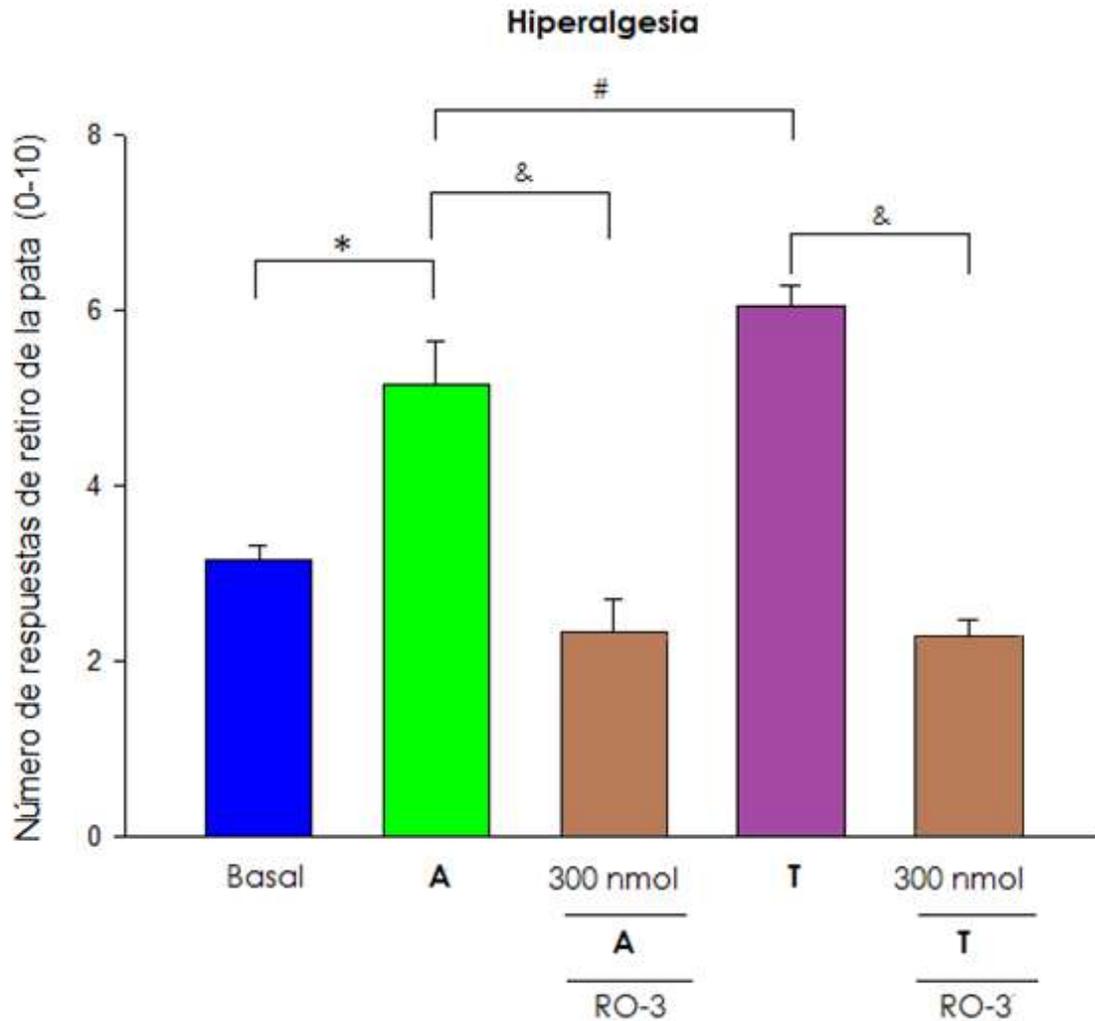


Figura 29. Efecto del antagonista de los receptores P2X₃ y P2X_{2/3} RO-3 (300 nmol) en la hiperalgnesia en ratas previamente expuestas a aire (A) o a tolueno (Tol, 6000 ppm) de manera crónica. Los datos se expresan como el promedio \pm e.e. de las respuestas de retirada de la pata ante la aplicación del filamento de von Frey (250 mN) a la superficie plantar de la pata de la rata, antes (grupo basal, B) y después de formalina al 1% (F). La alodinia secundaria y la hiperalgnesia se evaluaron el día 6 posterior a la prueba de la formalina. * $p < 0.05$ grupo basal (B) vs el grupo A + 1% F; # $p < 0.05$ frente al grupo A + 1% F vs grupo T + 1% F; & $p < 0,05$ RO-3 vs grupo A + 1% F y T + 1% F, por ANOVA de una vía seguido por la prueba de Student–Newman–Keuls

8.4. Efecto del antagonista de los receptores purinérgicos P2X_{2/3} y P2X₃ A-317491 (30 y 300 nmol) en la nocicepción aguda inducida por formalina, la alodinia secundaria e hiperalgesia en ratas previamente expuestas al aire o tolueno (6000 ppm) de manera aguda y crónica.

Para evaluar si los receptores P2X_{2/3} y P2X₃ participan en el efecto pronociceptivo del tolueno en la prueba de formalina, utilizamos el antagonista altamente selectivo y afín de los receptores P2X_{2/3} y P2X₃ A-317491. El pretratamiento periférico local ipsilateral, pero no contralateral (datos no mostrados), con A-317491 a 300 nmol/pata administrado 40 min antes de la formalina, redujo ($p < 0.05$) el efecto pronociceptivo del tolueno (6000 ppm) en ambas fases de la prueba de formalina al 1%, tanto en el grupo expuesto de manera aguda (Figura 30), como crónica (Figura 31). Por otro lado, no hubo diferencias estadísticamente significativas para los grupos tratados con A-317491 a la dosis de 30 nmol/pata, expuestos de manera aguda (Figura 32) y crónica (Figura 33). Además, el día 6 se evaluó la hipersensibilidad con la prueba de los filamentos de von Frey con dos fuerzas de flexión (10 y 250 mN), donde el A-317491 (300 nmol/pata) redujo ($p < 0.05$) el efecto pronociceptivo en la alodinia mecánica secundaria inducida por formalina al 1% y la hiperalgesia en ratas expuestas a tolueno de manera aguda (Figura 34 y 35) y crónica (Figura 36 y 37). Sin embargo, la dosis de 30 nmol/pata de A-317491 no mostró cambios significativos en la alodinia mecánica secundaria inducida por formalina al 1% y en la hiperalgesia en ratas expuestas a tolueno de manera aguda (Figura 38 y 39) y crónica (Figura 40 y 41).

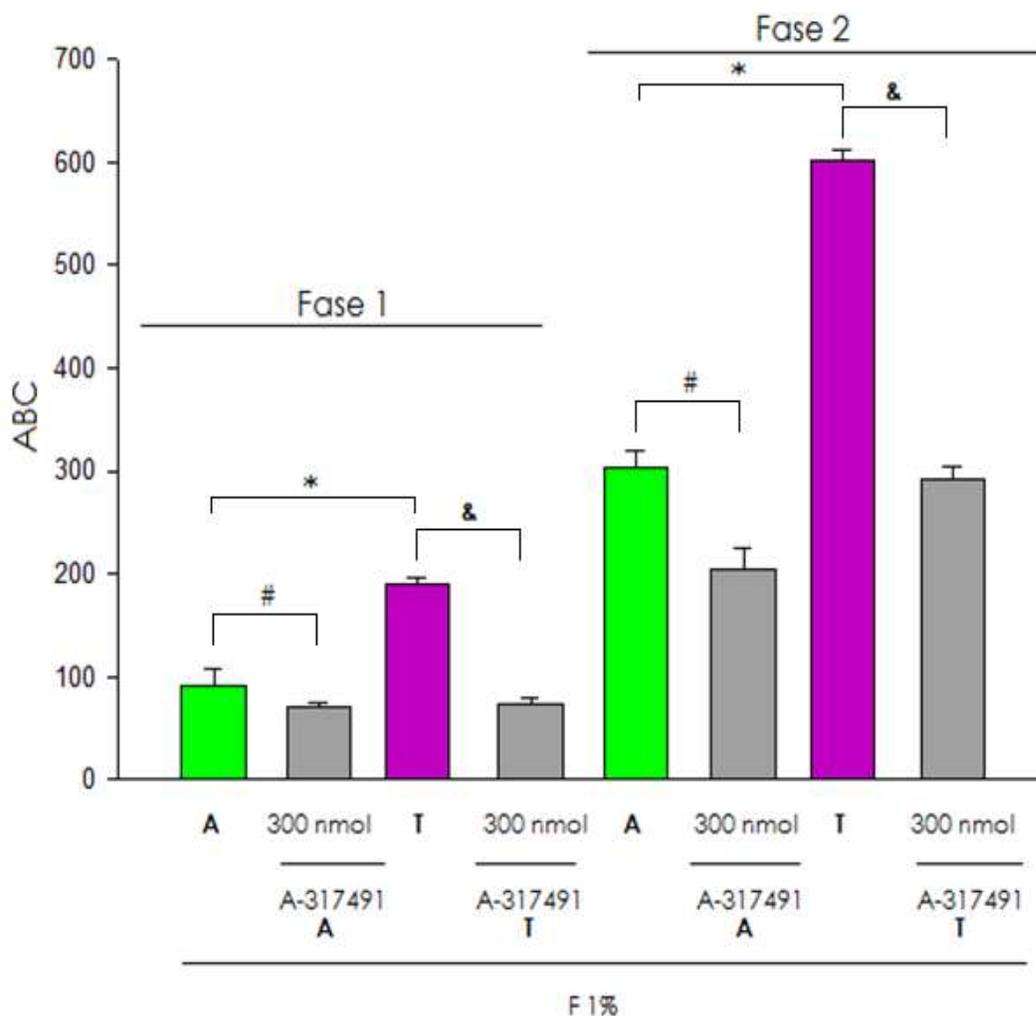


Figura 30. Efecto del antagonista de los receptores P2X₃ y P2X_{2/3} A-317491 (300 nmol) en la nocicepción aguda inducida por formalina en ratas expuestas a tolueno (6000 ppm) o a aire de manera aguda. Los datos se expresan como el área bajo el número de sacudidas contra la curva de tiempo (ABC). Se observó una diferencia estadísticamente significativa * $p < 0.05$ en los grupos entre el A+ F 1% vs T+ F1% ; # $p < 0.05$ para A+ 1%F vs A-317491; & $p < 0.05$ para T+1%F vs T+ A-317491, por ANOVA de una vía seguido por la prueba de Student–Newman–Keuls.

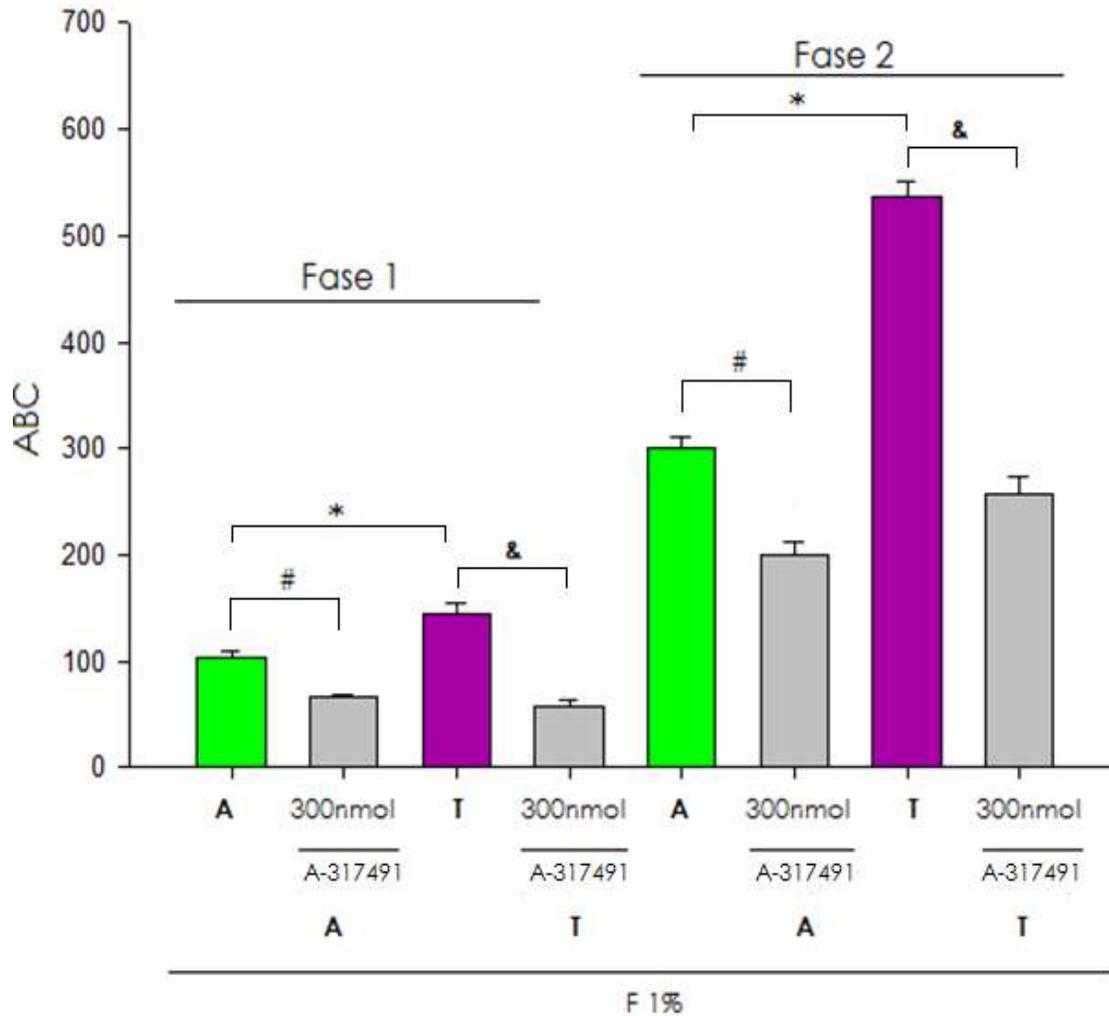


Figura 31. Efecto del antagonista de los receptores P2X₃ y P2X_{2/3} A-317491 (300 nmol) en la nocicepción aguda inducida por formalina en ratas expuestas a tolueno (6000 ppm) o a aire de manera crónica. Los datos se expresan como el área bajo el número de sacudidas contra la curva de tiempo (ABC). Se observó una diferencia estadísticamente significativa * $p < 0.05$ en los grupos entre el A+ F 1% vs T+ F1% ; # $p < 0.05$ para A+ 1%F vs A-317491; & $p < 0.05$ para T+1%F vs T+ A-317491, por ANOVA de una vía seguido por la prueba de Student–Newman–Keuls.

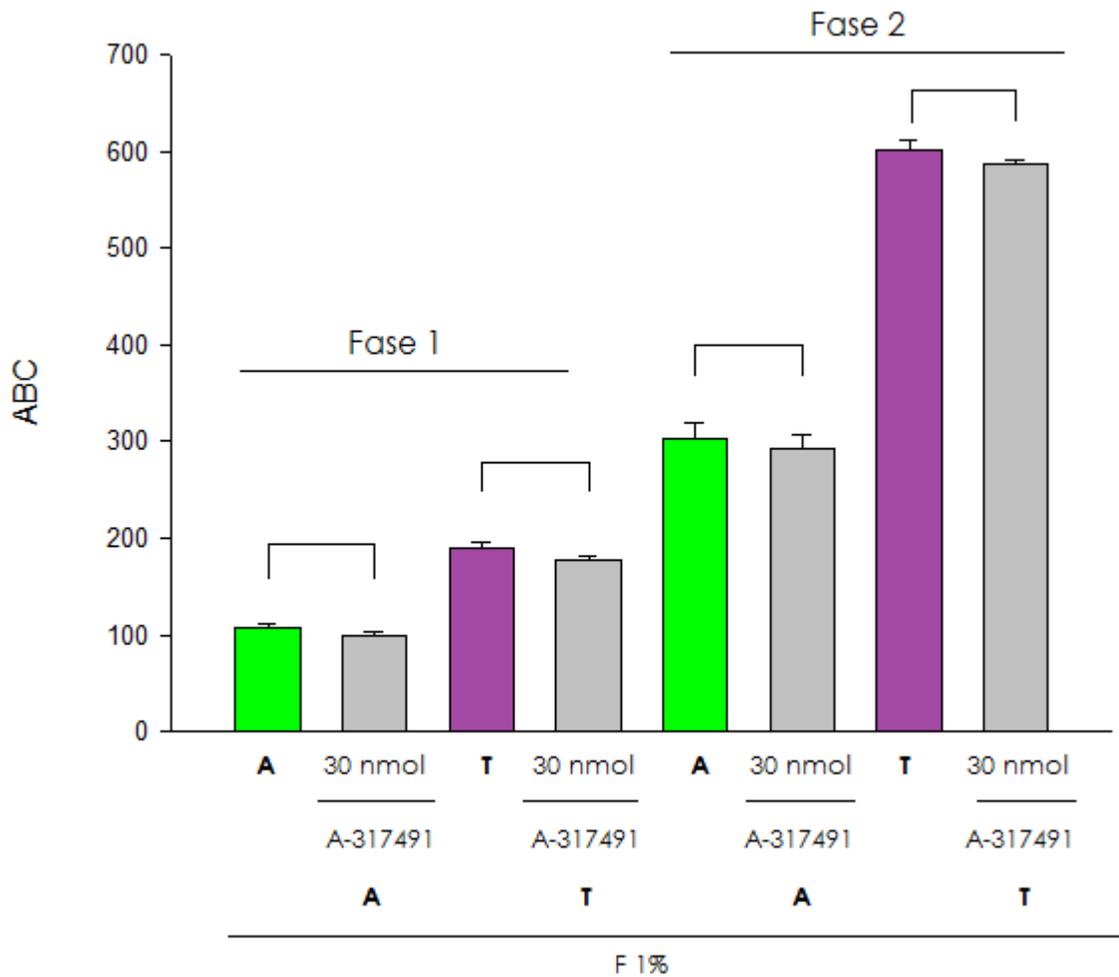


Figura 32. Efecto del antagonista de los receptores P2X₃ y P2X_{2/3} A-317491 (30 nmol) en la nocicepción aguda inducida por formalina en ratas expuestas a tolueno (6000 ppm) o a aire de manera aguda. Los datos se expresan como el área bajo el número de sacudidas contra la curva de tiempo (ABC). No se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.4$) entre los grupos, por ANOVA de una vía seguido por la prueba de Student–Newman–Keuls.

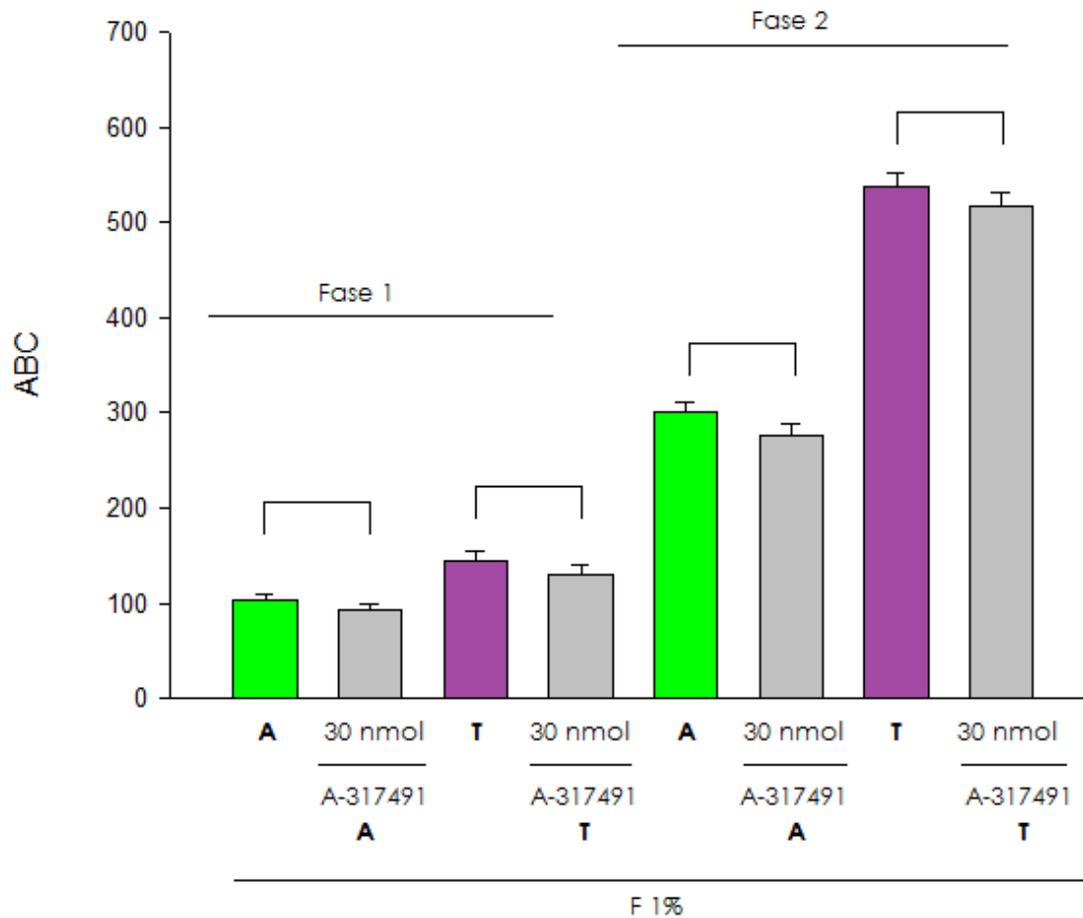


Figura 33. Efecto del antagonista de los receptores P2X₃ y P2X_{2/3} A-317491 (30 nmol) en la nocicepción aguda inducida por formalina en ratas expuestas a tolueno (6000 ppm) o a aire de manera crónica. Los datos se expresan como el área bajo el número de estremecimientos contra la curva de tiempo (ABC). No se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.4$) en los grupos, por ANOVA de una vía seguido por la prueba de Student–Newman–Keuls.

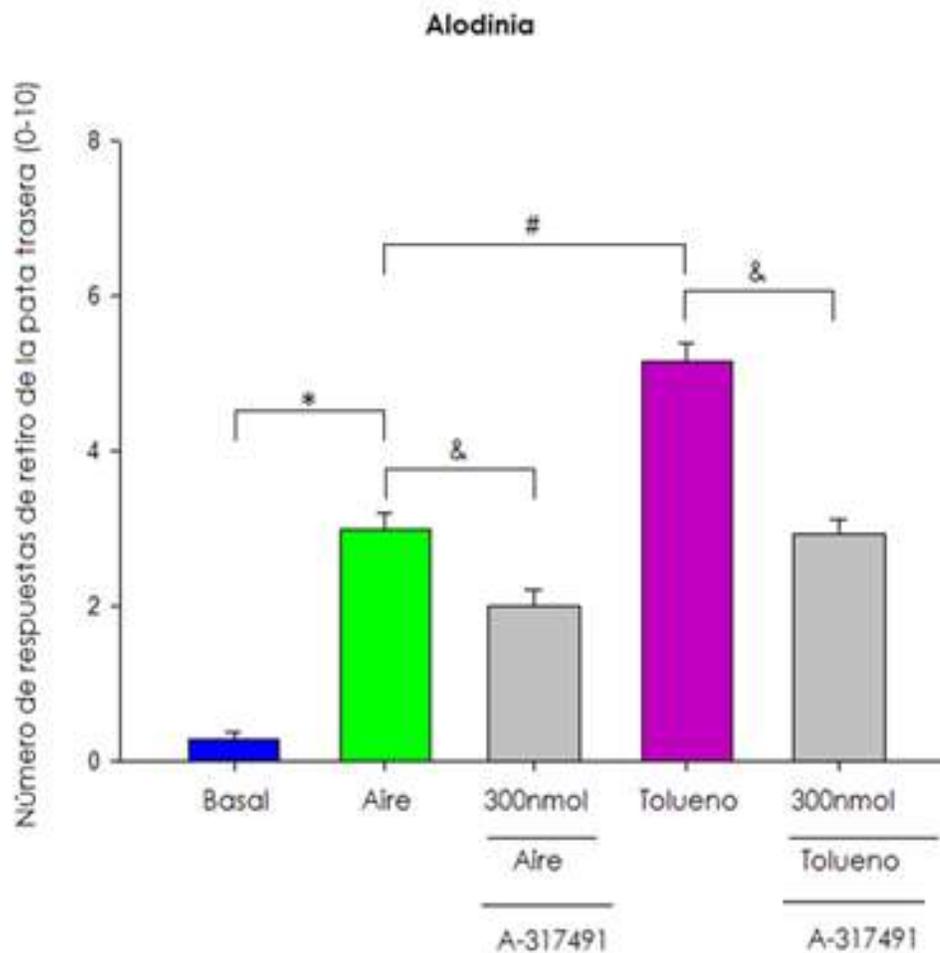


Figura 34. Efecto del antagonista de los receptores P2X₃ y P2X_{2/3} A-317491 (300 nmol) en la alodinia secundaria en ratas previamente expuestas a aire (A) o a tolueno (Tol, 6000 ppm) de manera aguda. Los datos se expresan como el promedio \pm e.e. de las respuestas de retirada de la pata ante la aplicación del filamento de von Frey (10 mN) a la superficie plantar de la pata de la rata, antes (grupo basal, B) y después de la administración de formalina al 1% (F). La alodinia secundaria y la hiperalgesia se evaluaron el día 6 posterior a la prueba de la formalina. * $p < 0.05$ grupo basal (B) vs el grupo A + 1% F; # $p < 0,05$ grupo A + 1% F vs grupo T + 1% F; & $p < 0.05$ A-317491 vs grupo A + 1% F y T + 1% F, por ANOVA de una vía seguido por la prueba de Student–Newman–Keuls.

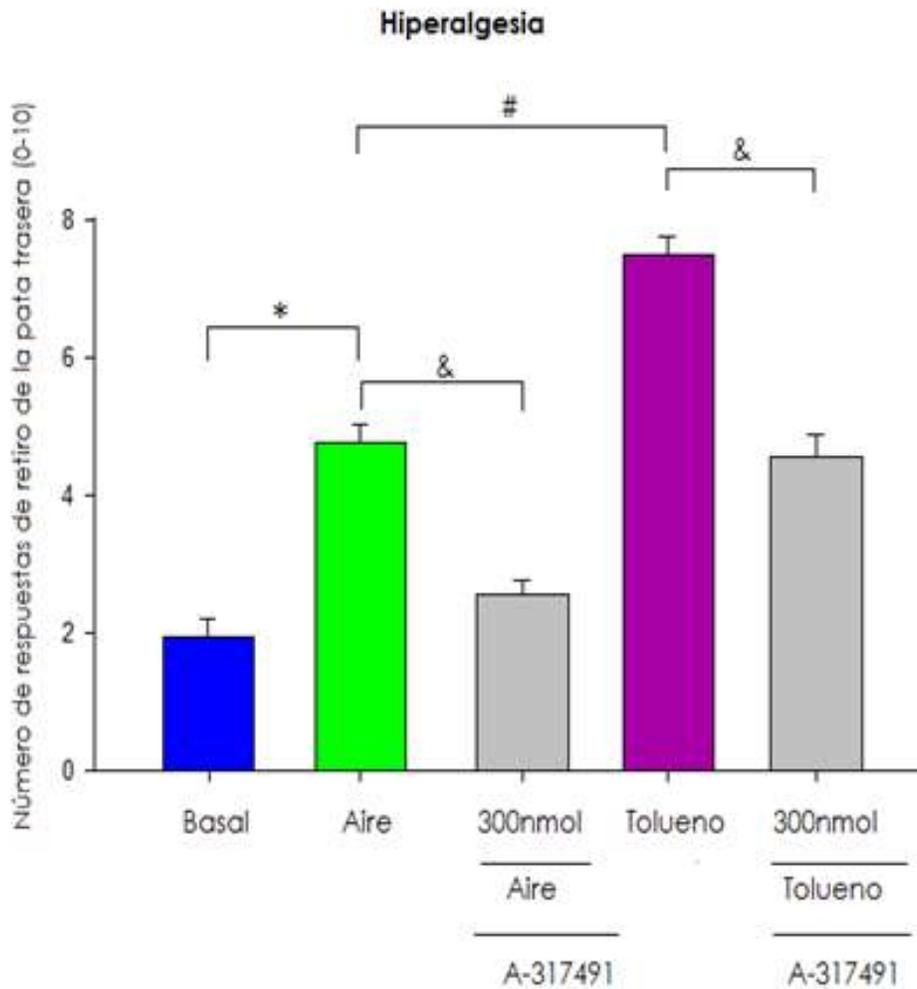


Figura 35. Efecto del antagonista de los receptores P2X₃ y P2X_{2/3} A-317491 (300 nmol) en la hiperalgnesia en ratas previamente expuestas a aire (A) o a tolueno (Tol, 6000 ppm) de manera aguda. Los datos se expresan como el promedio \pm e.e. de las respuestas de retirada de la pata ante la aplicación del filamento de von Frey (250 mN) a la superficie plantar de la pata de la rata, antes (grupo basal, B) y después de la administración de formalina al 1% (F). La alodinia secundaria y la hiperalgnesia se evaluaron el día 6 posterior a la prueba de la formalina. * $p < 0.05$ grupo basal (B) vs el grupo A + 1% F; # $p < 0.05$ grupo A + 1% F vs grupo T + 1% F; & $p < 0.05$ A-317491 vs grupo A + 1% F y T + 1% F, por ANOVA de una vía seguido por la prueba de Student–Newman–Keuls.

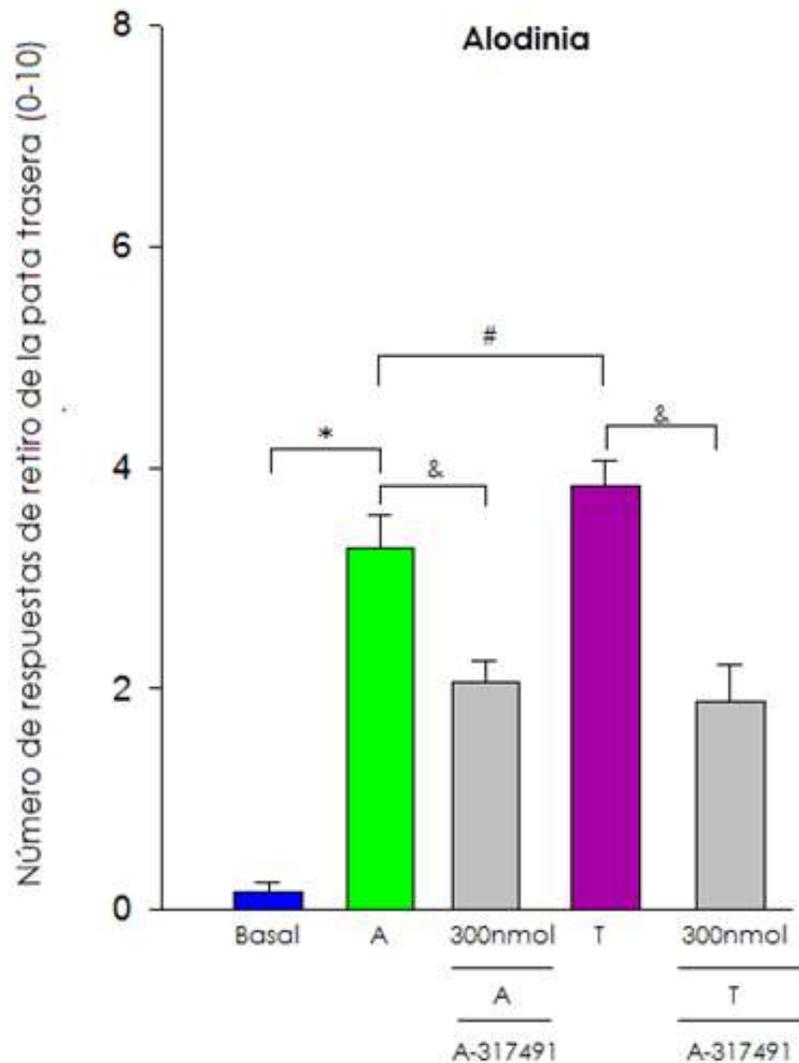


Figura 36. Efecto del antagonista de los receptores P2X₃ y P2X_{2/3} A-317491 (300 nmol) en la alodinia secundaria en ratas previamente expuestas a aire (A) o a tolueno (Tol, 6000 ppm) de manera crónica. Los datos se expresan como el promedio \pm e.e. de las respuestas de retirada de la pata ante la aplicación del filamento de von Frey (10 mN) a la superficie plantar de la pata de la rata, antes (grupo basal, B) y después de la administración de formalina al 1% (F). La alodinia secundaria y la hiperalgesia se evaluaron el día 6 posterior a la prueba de la formalina. * $p < 0.05$ grupo basal (B) vs el grupo A + 1% F; # $p < 0.05$ grupo A + 1% F vs grupo T + 1% F; & $p < 0.05$ A-317491 vs grupo A + 1% F y T + 1% F, por ANOVA de una vía seguido por la prueba de Student–Newman–Keuls.

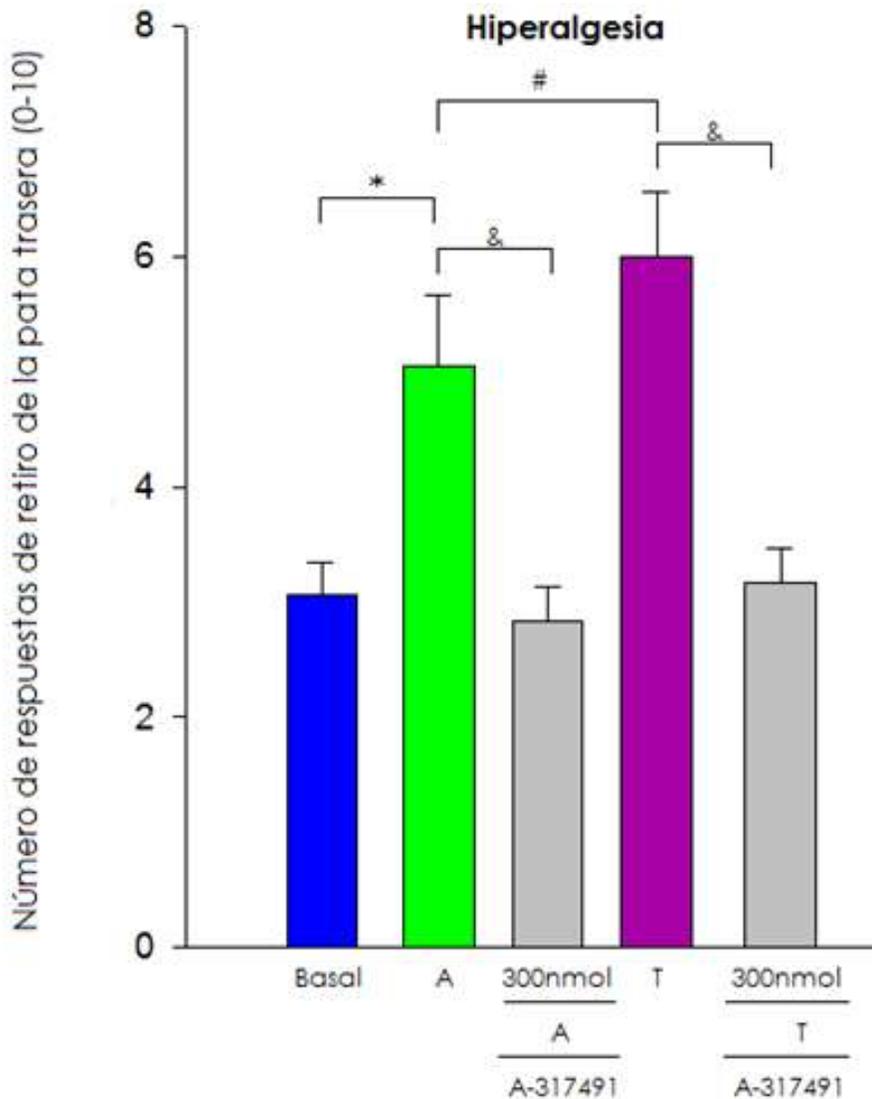


Figura 37. Efecto del antagonista de los receptores P2X₃ y P2X_{2/3} A-317491 (300 nmol) en la hiperalgnesia en ratas previamente expuestas a aire (A) o a tolueno (Tol, 6000 ppm) de manera crónica. Los datos se expresan como el promedio ± e.e. de las respuestas de retirada de la pata ante la aplicación del filamento de von Frey (250 mN) a la superficie plantar de la pata de la rata, antes (grupo basal, B) y después de la administración de formalina al 1% (F). La alodinia secundaria y la hiperalgnesia se evaluaron el día 6 posterior a la prueba de la formalina. * p <0.05 grupo basal (B) vs el grupo A + 1% F; # p <0.05 grupo A + 1% F vs grupo T + 1% F; & p <0.05 A-317491 vs grupo A + 1% F y T + 1% F, por ANOVA de una vía seguido por la prueba de Student–Newman–Keuls.

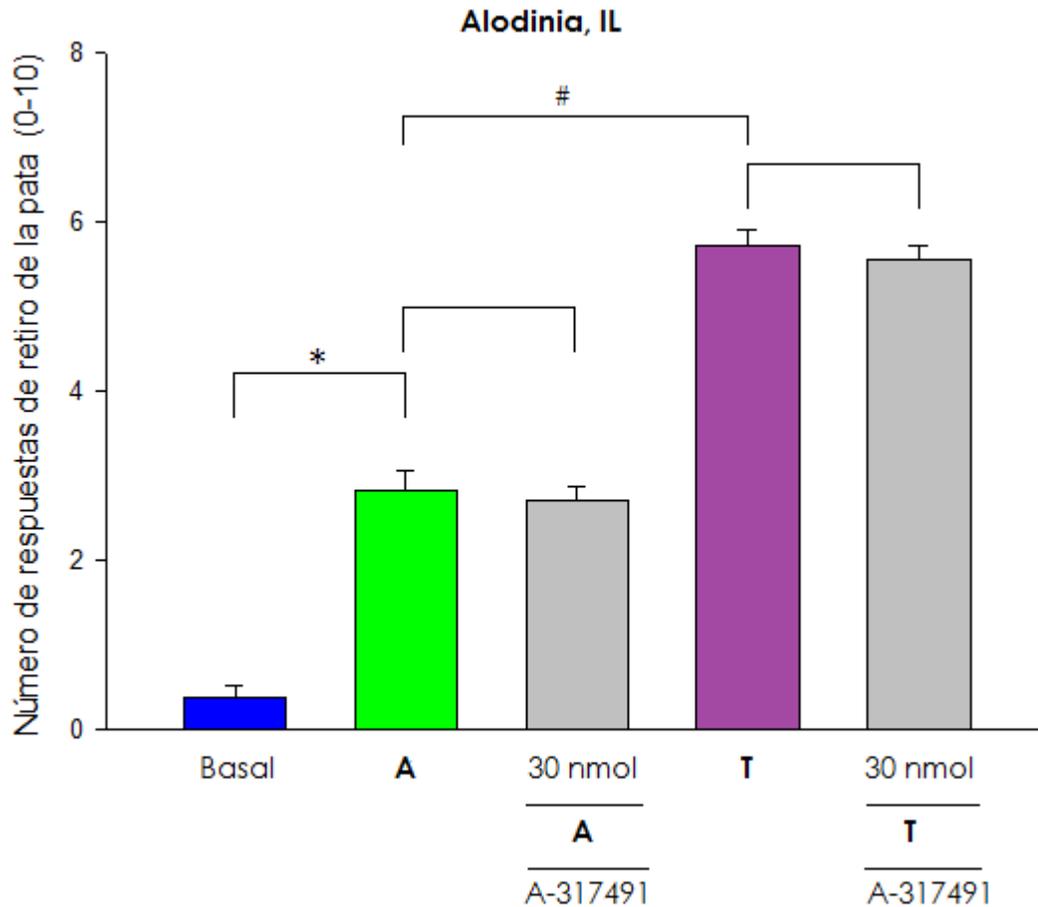


Figura 38. Efecto del antagonista de los receptores P2X₃ y P2X_{2/3} A-317491 (30 nmol) en la alodinia secundaria en ratas previamente expuestas a aire (A) o a tolueno (Tol, 6000 ppm) de manera aguda. Los datos se expresan como el promedio ± e.e. de las respuestas de retirada de la pata ante la aplicación del filamento de von Frey (10 mN) a la superficie plantar de la pata de la rata, antes (grupo basal, B) y después de la administración de formalina al 1% (F). La alodinia secundaria y la hiperalgesia se evaluaron el día 6 posterior a la prueba de la formalina. * p <0.05 grupo basal (B) vs el grupo A + 1% F; # p <0.05 grupo A + 1% F vs grupo T + 1% F; por ANOVA de una vía seguido por la prueba de Student–Newman–Keuls.

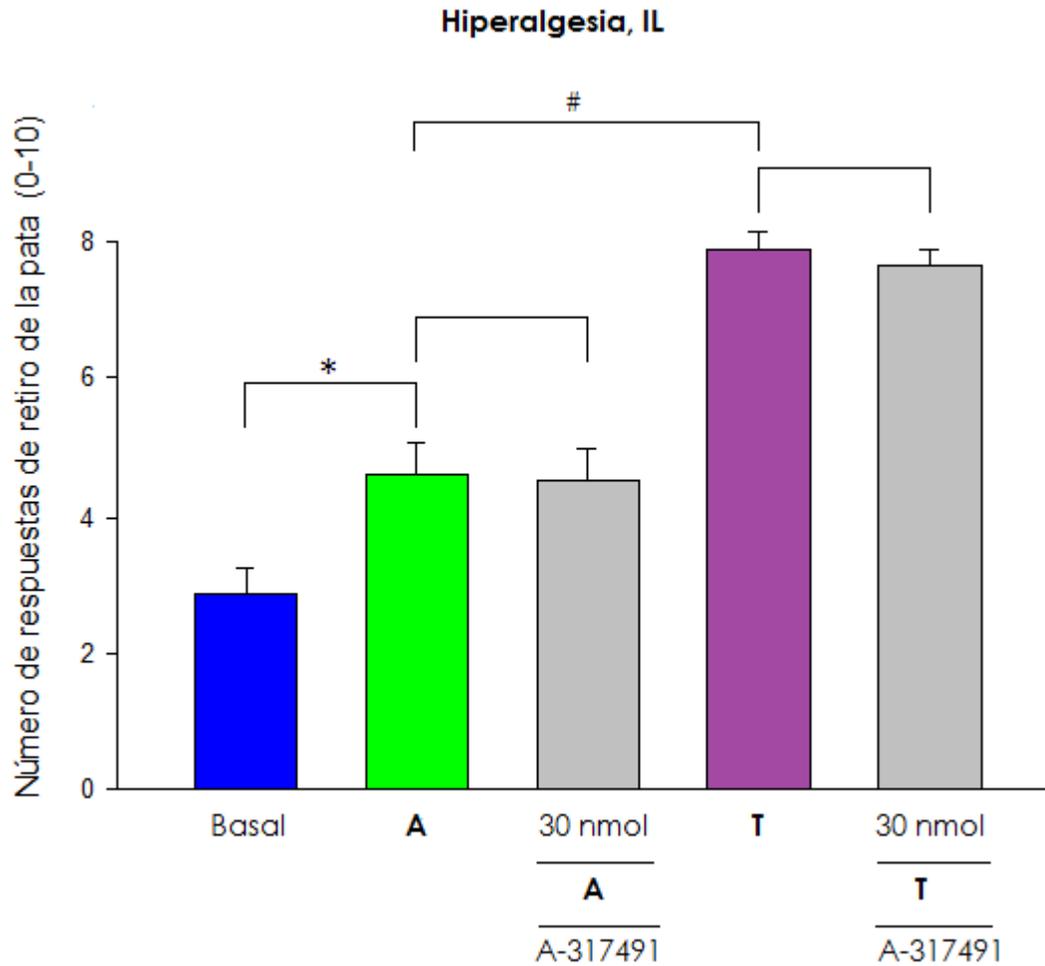


Figura 39. Efecto del antagonista de los receptores P2X₃ y P2X_{2/3} A-317491 (30 nmol) en la hiperalgnesia en ratas previamente expuestas a aire (A) o a tolueno (Tol, 6000 ppm) de manera aguda. Los datos se expresan como el promedio \pm e.e. de las respuestas de retirada de la pata ante la aplicación del filamento de von Frey (250 mN) a la superficie plantar de la pata de la rata, antes (grupo basal, B) y después de la administración de formalina al 1% (F). La alodinia secundaria y la hiperalgnesia se evaluaron el día 6 posterior a la prueba de la formalina. * $p < 0.05$ grupo basal (B) vs el grupo A + 1% F; # $p < 0.05$ grupo A + 1% F vs grupo T + 1% F; por ANOVA de una vía seguido por la prueba de Student–Newman–Keuls.

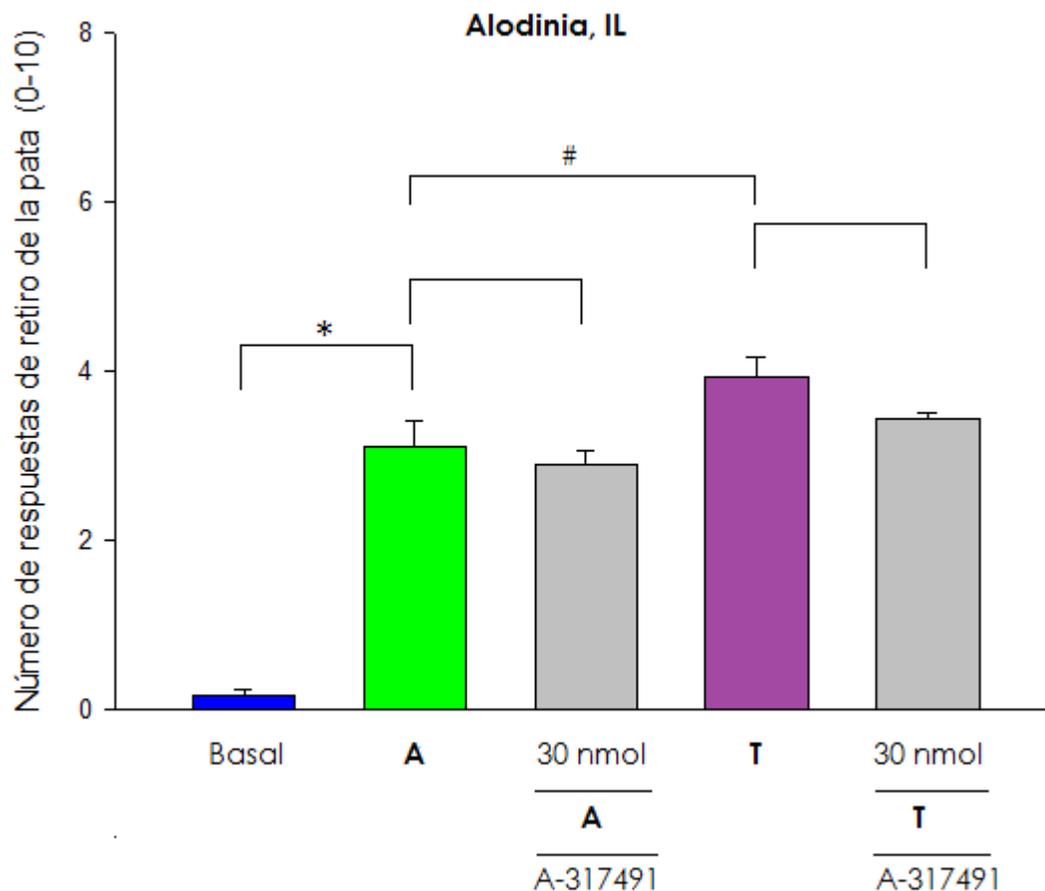


Figura 40. Efecto del antagonista de los receptores P2X₃ y P2X_{2/3} A-317491 (30 nmol) en la alodinia secundaria en ratas previamente expuestas a aire (A) o a tolueno (Tol, 6000 ppm) de manera crónica. Los datos se expresan como el promedio ± e.e. de las respuestas de retirada de la pata ante la aplicación del filamento de von Frey (10 mN) a la superficie plantar de la pata de la rata, antes (grupo basal, B) y después de la administración de formalina al 1% (F). La alodinia secundaria y la hiperalgesia se evaluaron el día 6 posterior a la prueba de la formalina. * p <0.05 grupo basal (B) vs el grupo A + 1% F; # p <0.05 grupo A + 1% F vs grupo T + 1% F; por ANOVA de una vía seguido por la prueba de Student–Newman–Keuls.

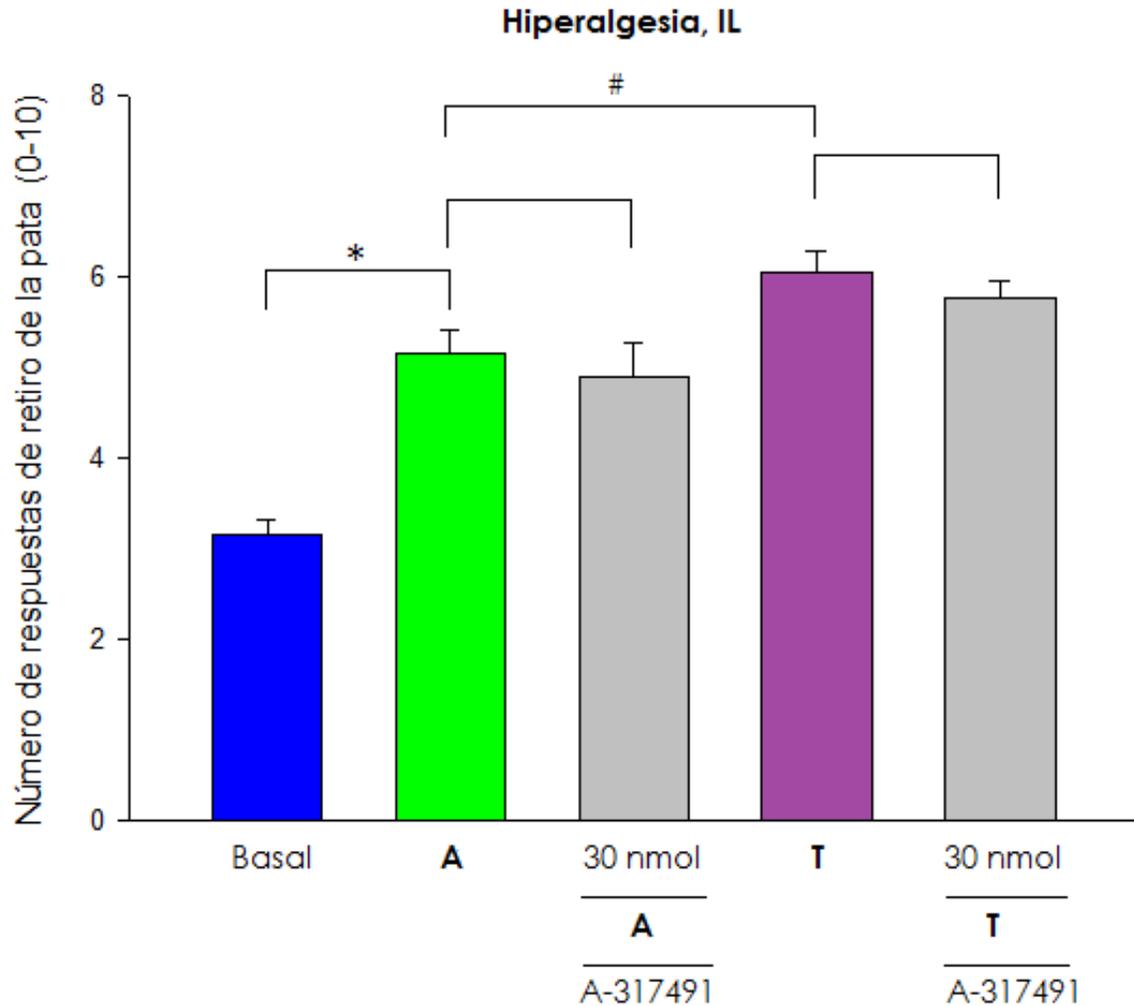


Figura 41. Efecto del antagonista de los receptores P2X₃ y P2X_{2/3} A-317491 (30 nmol) en la hiperalgnesia en ratas previamente expuestas a aire (A) o a tolueno (Tol, 6000 ppm) de manera crónica. Los datos se expresan como el promedio ± e.e. de las respuestas de retirada de la pata ante la aplicación del filamento de von Frey (250 mN) a la superficie plantar de la pata de la rata, antes (grupo basal, B) y después de la administración de formalina al 1% (F). La alodinia secundaria y la hiperalgnesia se evaluaron el día 6 posterior a la prueba de la formalina. * p <0.05 grupo basal (B) vs el grupo A + 1% F; # p <0.05 grupo A + 1% F vs grupo T + 1% F; por ANOVA de una vía seguido por la prueba de Student–Newman–Keuls.

Comparando los grupos expuestos a tolueno de manera aguda, se observó una diferencia estadísticamente significativa con los grupos tratados con el antagonista A-317491 a dosis de 300 nmol pero no con la dosis de 30 nmol (Figura 42). De

igual manera se observó un comportamiento similar con los grupos expuesto a tolueno de manera crónica (Figura 43). Con estos resultados se sugiere que los receptores P2X₃ y P2X_{2/3} participan en el efecto pronociceptivo del tolueno dependiendo de la dosis del antagonista.

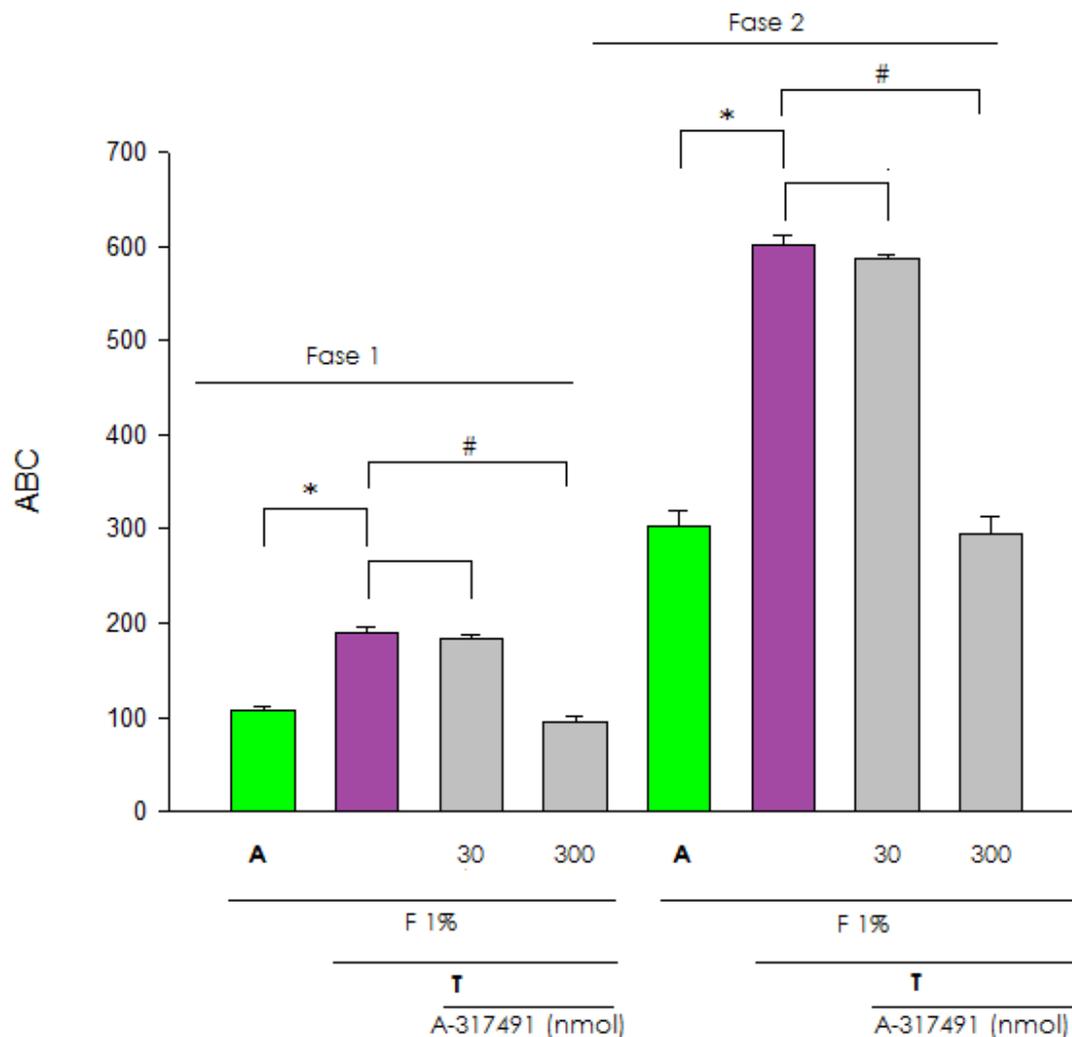


Figura 42. Efecto del antagonista de los receptores P2X₃ y P2X_{2/3} A-317491 (30 y 300 nmol) en la nocicepción aguda inducida por formalina en ratas expuestas a tolueno (6000 ppm) o a aire de manera aguda. Los datos se expresan como el área bajo el número de sacudidas contra la curva de tiempo (ABC). Se observaron diferencias estadísticamente significativas *p<0.05 entre los grupo A + F 1% vs T + F 1% ; #p<0.05 para T + 1%F vs A-317491 300 nmol; por ANOVA de una vía seguido por la prueba de Student–Newman–Keuls.

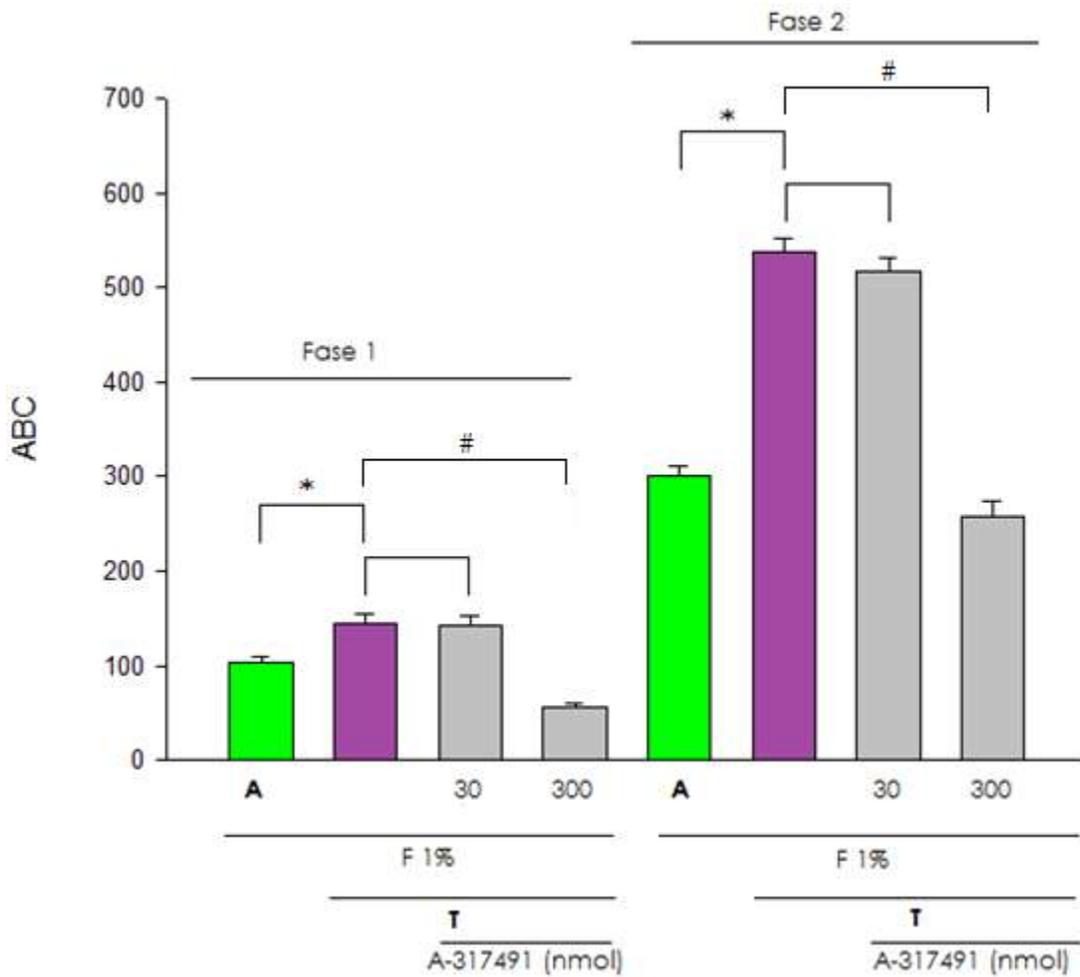


Figura 43. Efecto del antagonista de los receptores P2X₃ y P2X_{2/3} A-317491 (30 y 300 nmol) en la nocicepción aguda inducida por formalina en ratas expuestas a tolueno (6000 ppm) o a aire de manera crónica. Los datos se expresan como el área bajo el número de sacudidas contra la curva de tiempo (ABC). Se observaron diferencias estadísticamente significativas, * $p < 0.05$ entre los grupos A + F 1% vs T + F1% ; # $p < 0.05$ para T + 1%F vs A-317491 300 nmol; por ANOVA de una vía seguido por la prueba de Student–Newman–Keuls.

IX. DISCUSIÓN

9.1. La exposición aguda al tolueno aumenta los comportamientos nociceptivos.

La exposición aguda al tolueno (6000 ppm), pero no al aire, aumenta la nocicepción aguda en ambas fases de la prueba de formalina (más de 1 h) en la alodinia mecánica y la hiperalgesia (más de 12 días). Estos efectos pronociceptivos no parecen estar relacionados con cambios en la actividad motora, ya que estudios previos han informado que la exposición aguda al tolueno (2000 a 8000 ppm) no alteró la coordinación motora en ratas (Bowen et al., 2007) y ratones (López-Rubalcava et al., 2000; Cruz et al., 2001). Por el contrario, otros grupos han informado que el tolueno puede reducir la coordinación motora a 6000 ppm (Bowen y Balster, 1998; Páez-Martínez et al., 2003). Sin embargo, el hecho de que el postratamiento con tolueno no sea eficaz para aumentar la hipersensibilidad prolongada inducida por la formalina sugiere que los efectos pronociceptivos del tolueno son independientes de posibles modificaciones en la coordinación motora. Sin embargo, para evitar aún más los posibles efectos del tolueno sobre la actividad locomotora, comenzamos la inyección de formalina aproximadamente 5 minutos después de la exposición al tolueno, como se reportó anteriormente (Huerta-Rivas et al., 2012). Nuestros resultados se asemejan a estudios previos (Cervantes-Durán et al., 2017) donde se demuestra que el tolueno puede aumentar la nocicepción en un modelo de dolor inflamatorio en ratas. Nuestros datos concuerdan con observaciones previas que muestran que la exposición al tolueno (500-8000 ppm) durante 30 min induce una hiperalgesia térmica dependiente de la dosis en ratones sometidos a la prueba de la placa caliente, el cual es un modelo de dolor diferente (López-Rubalcava et al., 2000; Cruz et al., 2001; Páez_Martínez et al., 2003). Por el contrario, nuestros resultados no concuerdan con los que demuestran que el tolueno produce antinocicepción en la prueba del umbral de choque (Huerta-Rivas et al., 2012). En conjunto, nuestros datos indican que el tolueno es capaz de inducir efectos pronociceptivos en roedores inflamados. Los mecanismos de la acción pronociceptiva del tolueno no están claros, parece ser que actúa a diferentes niveles de la respuesta

nociceptiva. Además, tras la exposición crónica de tolueno se observó una disminución del efecto del tolueno la cual puede deberse a diversos cambios moleculares, los cuales afectan a procesos farmacocinéticos y farmacodinámicos, dentro de los cuales podría estar participando la tolerancia metabólica, la cual ocurre generalmente por inducción enzimática, en este caso las drogas que desarrollan tolerancia incrementan la tasa metabólica, perdiendo sus efectos y eliminándose del organismo en forma mucho más rápida e intensamente en relación con el transcurso del tiempo. Debido a que este proceso es muy común en el alcohol y a su vez, el tolueno comparte mecanismos de acción con éste, por esa razón se puede sugerir que este cambio molecular está presente (Brunton et al., 2007).

De igual forma, se puede concluir que están involucrados cambios moleculares farmacodinámicos, conocidos como tolerancia celular, que comprenden distintos procesos como la variación en el número de receptores o la desensibilización de los mismos. Así mismo, estaría presente un efecto conocido como “*down regulation*” o regulación a la baja el cual es un mecanismo de adaptación que modula la respuesta celular ante la sobre estimulación o sobreocupación de los receptores, disminuyendo el número y sensibilidad de la interacción fármaco-receptor (Martyn et al., 1992), en este caso el tolueno, que es un antagonista no competitivo de los receptores NMDA (Cruz et al., 1998), sería el sobre ocupante. En cuanto a la alodinia y la hiperalgesia, se obtuvieron resultados similares a los de la investigación base (Cervantes-Durán et al., 2017) los cuales confirman que la exposición aguda a tolueno (6000 ppm) y la aplicación de la prueba de la formalina al 1% en modelos de roedores inflamados desarrolla mecanismos que mantienen la alodinia y la hiperalgesia en el día 6 post tratamiento, además, sugerimos que la exposición crónica de tolueno en este modelo de dolor inflamatorio continua desarrollando alodinia e hiperalgesia pero con una tendencia a la disminución del efecto, sugiriendo una tolerancia farmacológica al tolueno y además en algunos grupos el bloqueo también al efecto de la formalina.

Gauthereau y col (2009), expusieron ratas macho de la cepa Wistar a tolueno, xileno y benceno (6000 ppm) por un periodo de dos meses (30 min, 2 veces al día, con diferencia de 6 horas) con el fin de estudiar el efecto de los disolventes sobre la ingesta de glutamato monosódico (sabor umami), ingesta de alimento y peso corporal de las ratas. Los resultados mostraron un aumento en la ingesta de la solución de glutamato en las ratas expuestas a los disolventes, además de un menor aumento de peso para el grupo expuesto a benceno en comparación con el grupo control. Los grupos expuestos a tolueno y xileno no presentaron diferencias significativas en cuanto al peso corporal.

Por otro lado, existen estudios en los que la exposición a tolueno afecto la ingesta de alimento y por lo tanto el peso corporal de las ratas, por ejemplo, Herrera-López (2013) expuso ratas macho de la cepa Wistar de dos meses de edad a 4000 ppm de tolueno por un periodo de 60 días (30 min, 2 veces al día), en donde se observó que apartir de la quinta semana de exposición, el grupo tolueno tuvo un menor consumo de alimento presentando una significancia estadística al compararlo con el control. Además hubo diferencia significativa entre los pesos del grupo tolueno y el grupo control a partir de la sexta semana de exposición al disolvente, donde los animales del grupo tolueno tuvieron un menor aumento de peso, en comparación con el grupo control. Es posible que la edad de las ratas, el periodo de exposición al disolvente y las variaciones en las concentraciones empleadas influyan en la menor ganancia de peso, ya que en algunos de los estudios mencionados se utilizaron ratas más jóvenes y periodos más prolongados en comparación con las de nuestro estudio.

Por otra parte, en el caso de nuestras ratas expuestas a 6000 ppm de tolueno durante un mes se observó un aumento estadísticamente significativo entre los pesos pre y post tratamiento, al igual que en el grupo control. Además, hubo significancia estadística al comparar los pesos del grupo control vs el grupo tolueno post tratamiento, es decir, los animales del grupo control aumentaron aún más de peso que los del grupo tolueno. Al parecer una concentración más alta de tolueno sí tuvo efecto sobre los pesos corporales de las ratas en sólo un mes de exposición.

En general, los datos sugieren que la exposición prolongada y a concentraciones elevadas de tolueno tiene como efecto una alteración en la ganancia de peso en las ratas; sin embargo es probable que los mecanismos subyacentes sean complejos y multifactoriales.

9.2. El efecto pronociceptivo del tolueno en la nocicepción inducida por formalina depende de los receptores periféricos P2X₃ y P2X_{2/3}.

La evidencia de la participación de los receptores P2X₃ y P2X_{2/3} en el efecto pronociceptivo del tolueno proviene del bloqueo dependiente de la dosis producido por el pretratamiento a nivel periférico con el A-317491 y la dosis única de RO-3 (antagonistas altamente selectivos de los receptores P2X₃ y P2X_{2/3}) del efecto pronociceptivo de tolueno en nocicepción aguda y crónica inducida por la formalina al 1%. Existe evidencia considerable de que los receptores P2X₃ y P2X_{2/3} están involucrados tanto procesos de dolor agudo como crónico (Costigan, 2009). Donde principalmente la activación de los receptores P2X₃ homoméricos contribuye a la nocicepción aguda y al dolor inflamatorio agudo (McGaraughty y Jarvis, 2006; Burnstock, 2006), mientras que la activación de los receptores heteroméricos P2X_{2/3} participan en la nocicepción crónica y el dolor inflamatorio crónico (Barclay et al., 2002).

Nuestros resultados concuerdan con otros estudios que demuestra que el tolueno activa a los receptores purinérgicos P2X₃ (Woodward et al., 2004). Sin tener la certeza de cuál de los dos receptores es el responsable del efecto, por tratarse de una investigación a nivel exclusivamente periférica, dejando un gran campo de investigación en diferentes niveles de la transducción de señales. También hay evidencia de que el tolueno recluta otros mecanismos (Cervantes-Durán et al., 2017) que podrían explicar sus efectos pronociceptivos que involucran la participación de los receptores 5-HT₃ en el efecto pronociceptivo del tolueno proviene del bloqueo dependiente de la dosis producido por alosetrón (un antagonista del receptor 5-HT₃ altamente selectivo (Hirata et al., 2007)) del efecto pronociceptivo tolueno en nocicepción aguda y duradera inducida por formalina; la capacidad de m-CPBG (un agonista del receptor 5-HT₃ (Kilpatrick et al., 1990;

Niemeyer y Lummis, 1998; Brady et al., 2001)) para mejorar aún más el efecto pronociceptivo del tolueno en hipersensibilidad aguda y duradera. Por lo tanto, se sugiere que existen otros sistemas de neurotransmisión como lo es el sistema purinérgico a nivel periférico, que participa en el efecto pronociceptivo del tolueno además del sistema serotoninérgico.

Dejando así abierta la posibilidad para futuras investigaciones dónde se puedan analizar estos resultados con técnicas in vitro de biología molecular como la de RNA de interferencia, por mencionar alguna, para indagar específicamente el receptor bloqueado. Así como utilizar otros modelos para ver la interacción con otro tipo de dolor.

X. CONCLUSIONES

- 1.- La exposición aguda a tolueno aumenta la nocicepción inducida por formalina en modelos de dolor inflamatorio en ratas.
- 2.- En la exposición crónica a tolueno continua el desarrollo de nocicepción, alodinia e hiperalgesia inducida por formalina en modelos de dolor inflamatorio en ratas con una probable tolerancia farmacológica.
- 3.- Los datos sugieren que los receptores periféricos P2X_{2/3} y P2X₃ participan en el desarrollo del efecto pronociceptivo del tolueno dependiente de la dosis en modelos de dolor inflamatorio en ratas.

XI. REFERENCIAS

Abrahamsen, B., Zhao, J., Asante, C. O., Cendan, C. M., Marsh, S., Martinez-Barbera, J. P., ... Wood, J. N. (2008). *The Cell and Molecular Basis of Mechanical, Cold, and Inflammatory Pain*. *Science*, 321(5889), 702–705.

Ambriz-Tututi, M., L. Cruz, S., Urquiza-Marín, H., & Granados-Soto, V. (2011). Formalin-induced long-term secondary allodynia and hyperalgesia are maintained by descending facilitation. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 98, 417–424.

Ariniello, L., McComb, M. & Carey, J. (2002). *Brain Facts: A primer on the brain and nervous system*, Washington, Society for Neurosciences.

Arlie-Soborg, P., Hansen, L., & Ladefoged, O. (1992). Report on a conference on organic solvents and the nervous system. *Neurotoxicology and teratology*, 14(1), 81-82.

ATSDR. Agency for toxic substances and disease registry. *U.S. Department of health and human services*. Toxicological profile for toluene. Atlanta, Georgia. pp. 1-111, (2011).

ATSDR. Toxicological profile for toluene-Draft. *U.S. Department of health and human services*. 2015; (September). <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp41.pdf>

Baba, H., Ji, R.-R., Kohno, T., Moore, K. A., Ataka, T., Wakai, A., ... Woolf, C. J. (2003). *Removal of GABAergic inhibition facilitates polysynaptic A fiber-mediated excitatory transmission to the superficial spinal dorsal horn*. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 24(3), 818–830.

Barclay, J., Pate, S., Dorn, G. D., Wotherspoon, G., Moffatt, S., Eunson, L., Abdel'a, S., Natt, F., Hall, J., Winter, J., Bevan, S., Wishar, W., Fox, A., & Ganju, P.

(2002). Functional Downregulation of P2X3 Receptor Subunit in Rat Sensory Neurons Reveals a Significant Role in Chronic Neuropathic and Inflammatory Pain. *The Journal of Neuroscience*, 22(18), 8139–8147.

Bale, A. S., Meacham, C. A., Benignus, V. A., Bushnell, P. J., & Shafer, T. J. (2005). Volatile organic compounds inhibit human and rat neuronal nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 205, 77 – 88.

Bale, A. S., Smothers, C. T., & Woodward, J. J. (2002). Inhibition of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by the abused solvent, toluene. *British Journal of Pharmacology*, 137, 375–383.

Baron, R. (2006). Mechanisms of Disease: neuropathic pain—a clinical perspective. *Nature Clinical Practice Neurology*, 2(2), 95–106.

Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G., & Julius, D. (2009). Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *National Institutes of Health*, 139(2), 267–284.

Bass, M. (1970). Sudden Sniffing Death. *The Journal of the American Medical Association*, 212(12), 2075–2079.

Bee, L. A., & Dickenson, A. H. (2008). *Descending facilitation from the brainstem determines behavioural and neuronal hypersensitivity following nerve injury and efficacy of pregabalin*. *Pain*, 140(1), 209–223

Beckstead, M. J., Weiner, J. L., Eger, E. ., Gong, D. ., & Mihic, S. . (2000). Glycine and g-Aminobutyric AcidA Receptor Function Is Enhanced by Inhaled Drugs of Abuse. *Molecular Pharmacology*, 57, 1199–1205.

Bester, H., Matsumoto, N., Besson, J. M., & Bernard, J. F. (1997). Further Evidence for the Involvement of the Spinoparabrachial Pathway in Nociceptive Processes: A c-Fos Study in the Rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 383, 439–458.

Bowen, S. E., & Balster, R. L. (1998). A direct comparison of inhalant effects on locomotor activity and schedule-controlled behavior in mice. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*, 6(3), 235–247.

Bowen, S. E., Charlesworth, J. D., Tokarz, M. E., Wright, M. J., & Wiley, A. (2007). Decreased sensitivity in adolescent vs. adult rats to the locomotor activating effects of toluene. *Neurotoxicology and Teratology*, 29, 599–606.

Bravo-Hernández, M., Cervantes-Durán, C., Pineda-Farias, J. B., Barragán-Iglesias, P., López-Sánchez, P., & Granados-Soto, V. (2012). Role of peripheral and spinal 5-HT₃ receptors in development and maintenance of formalin-induced long-term secondary allodynia and hyperalgesia. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 101, 246–257.

Brunton, L. L., Lazo, J. S., & Parker, K. . (2007). *Las bases farmacológicas de la terapéutica*.

Burke R. E. (2007). Sir Charles Sherrington's the integrative action of the nervous system: a centenary appreciation. *Brain: a journal of neurology*, 130(4), 887–894.

Burnstock, G. (2006). Purinergic P₂ receptors as targets for novel analgesics. *Pharmacology & Therapeutics*, 110, 433 – 454.

Burnstock, G. (2012). Purinergic signalling: Its unpopular beginning, its acceptance and its exciting future. *Bioessays*, 34, 218–225.

Burnstock, G. (2013). Purinergic mechanisms and pain—An update. *European Journal of Pharmacology*, 717, 24–40

.

Campbell, J. N., Raja, S. N., & Meyer, R. A. (1988). Myelinated afferents signal the hyperalgesia associated with nerve injury. *Pain*, 32, 89–94.

Campbell, J. N., & Meyer, R. A. (2006). *Mechanisms of Neuropathic Pain*. *Neuron*, 52(1), 77–92.

Cervantes-Durán, C., Vidal-Cantú, G. C., Godínez-Chaparro, B., & Granados-Soto, V. (2016). Role of spinal 5-HT₂ receptors subtypes in formalin-induced long-lasting hypersensitivity. *Pharmacological Reports*, 68, 434–442.

Cervantes-Durán, Claudia, Ortega-Varela, L. F., Godínez-Hernández, D., Granados-Soto, V., & Gauthereau-Torres, M. Y. (2017). Toluene exposure enhances acute and chronic formalin-induced nociception in rats: Participation of 5-HT₃ receptors. *NeuroToxicology*, 63, 97–105.

Cervero, F., Gilbert, R., Hammond, R. G. E., & Tanner, J. (1993). Development of secondary hyperalgesia following non-painful thermal stimulation of the skin: a psychophysical study in man. *Pain*, 54, 181–189.

Cervero, F., & Laird, J. M. . (1996). From acute to chronic pain: mechanisms and hypotheses. *Progress in Brain Research*, 110, 4–10.

Cervero, F., Meyer, R. A., & Campbell, J. (1994). A psychophysical study of secondary hyperalgesia: evidence for increased pain to input from nociceptors. *Pain*, 58, 21–28.

Chaplan, S., Malmberg, A., & Yaksh, T. (1997). Efficacy of Spinal NMDA Receptor Antagonism in Formalin Hyperalgesia and Nerve Injury Evoked Allodynia in the

Rat. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 280, 829–838.

Coderre, T. J., & Van Empel, I. (1994). The utility of excitatory amino acid (EAA) antagonists as analgesic agents. II. Assessment of the antinociceptive activity of combinations of competitive and non-competitive NMDA antagonists with ag. *Pain*, 59, 353–359.

Commons, K. G. (2016). Ascending serotonin neuron diversity under two umbrellas. *Brain Struct Funct*, 221(7), 3347–3360.

Costigan, M., & Woolf, C. J. (2000). Pain: Molecular mechanisms. *The Journal of Pain*, 1(3), 35–44.

Costigan, M., Scholz, J., & Woolf, C. J. (2009). Neuropathic Pain: A Maladaptive Response of the Nervous System to Damage. *Annual Review of Neuroscience*, 32(1), 1–32.

Cruz, S.L., Mirshahi, T., Thomas, B., Balster, R.L., & Woodward, J.J., (1998). Effects of the abused solvent toluene on recombinant N-methyl-D-aspartate and non-N- methyl-D-aspartate receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 286(1), 334–340.

Cruz, S. L., Páez-Martínez, N., Pellicer, F., Salazar, L. A., & López-Rubalcava, C. (2001). Toluene increases acute thermociception in mice. *Behavioural Brain Research*, 120,213-220.

Cruz, S. L., Gauthereau, M. Y., Camacho-Muñoz, C., López-Rubalcava, C., & Balster, R. L. (2003). Effects of inhaled toluene and 1,1,1-trichloroethane on seizures and death produced by N-methyl-d-aspartic acid in mice. *Behavioural Brain Research*, 140(1-2), 195–202.

Cruz, S. L., Orta-Salazar, G., Gauthereau, M. Y., Millan-Perez Peña, L., & Salinas-Stefanón, E. M. (2003). Inhibition of cardiac sodium currents by toluene exposure. *British Journal of Pharmacology*, *140*(4), 653–660.

Cruz, S. L., Soberanes-Chávez, P., Páez-Martínez, N., & López-Rubalcava, C. (2009). Toluene has antidepressant-like actions in two animal models used for the screening of antidepressant drugs. *Psychopharmacology*, *204*(2), 279–286.

D' Amours, R. H., & Ferrante, F. M. (1996). Postoperative Pain Management. *Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy*, *24*(4), 227–236.

Dinwiddie, S. H. (1994) Abuse of inhalants: a review. *Addiction*, *89*(8), 925–939.

DSM-V (Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales) Septiembre 2016.

Dubuisson, D., Dennis, S. (1977). The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain*, *4*, 161–174.

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

Encuesta Nacional de Consumo de Drogas, Alcohol y Tabaco (2016-2017). Reporte de Drogas. México. www.inprf.gob.mx, www.conadic.gob.mx, www.insp.mx.

Evans, E. B., & Balster, R. L. (1991). CNS depressant effects of volatile organic solvents. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *15*(2), 233–241.

Field, H.L., Bry, J., Hentall I., & Zorman G. (1983). The activity of neurons in the rostral medulla of the rat during withdrawal from noxious heat. *The Journal of Neuroscience*, *3*(12), 2545-2552.

Fields, H. L., Rowbotham, M., & Baron, R. (1998). *Postherpetic Neuralgia: Irritable Nociceptors and Deafferentation. Neurobiology of Disease*, 5(4), 209–227.

Filley, C. M., Halliday, W., & Kleinschmidt-Demasters, B. K. (2004). The Effects of Toluene on the Central Nervous System. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 63(1), 1–12.

Fu, K.-Y., Light, A. R., & Maixner, W. (2001). Long-Lasting Inflammation and Long-Term Hyperalgesia After Subcutaneous Formalin Injection Into the Rat Hindpaw. *The Journal of Pain*, 2(1), 2–11.

Fukui, M., Nakagawa, T., Minami, M., Satoh, M., & Kaneko, S. (2006). Inhibitory Role of Supraspinal P2X3/P2X2/3 Subtypes on Nociception in Rats. *Molecular Pain*, 2, 2–19.

Fukuhara, N., Imai, Y., Sakakibara, A., Morita, K., Kitayama, S., Tanne, K., & Dohi, T. (2000). Regulation of the development of allodynia by intrathecally administered P2 purinoceptor agonists and antagonists in mice. *Neuroscience Letters*, 292(1), 25–28.

Garland, E. L., Howard, M. O., Vaughn M. G., & Perron B. E. (2011). Volatile Substance Misuse: A Global Perspective. *Substance Use & Misuse*, 46(1), 140–147.

Gracely, R. H., Lynch, S. A., & Bennett, G. J. (1992) Painful neuropathy: altered central processing maintained dynamically by peripheral input, *Pain*, 51, 175-194.

Guyton, A. C., & Hall, J. E. (2011). *Tratado de Fisiología médica*.

Häuser, W., Henningsen, P., Derra, C., & Türp, J. C. (2004). Funktionelle somatische Schmerzsyndrome. *Der Schmerz*, 18(2), 136–140

Haanpää, M. L., Backonja, M., Bennett, M. I., Smith, B. H., Treede, R., & Baron R. (2009). Assessment of Neuropathic Pain in Primary Care. *The American Journal of Medicine*, 122(10), S13–S21.

Hannigan, J. H., & Bowen, S. E. (2010). Reproductive Toxicology and Teratology of Abused Toluene. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 56(2), 184–200.

Honore, P., Kage, K., Mikusa, J., Watt, A. T., Johnston, J. F., Wyatt, J. R., Faltynek, C. R., Jarvis, M. F., Lynch, K. (2002). Analgesic profile of intrathecal P2X3 antisense oligonucleotide treatment in chronic inflammatory and neuropathic pain states in rats. *Pain*, 99(1), 11–19.

Huang, J., Zhang, X., McNaughton, P.A. (2006) Inflammatory pain: the cellular basis of heat hyperalgesia. *Curr. Neuropharmacol*, 4(3),197–206.

Hucho, T., & Levine, J. D. (2007). *Signaling Pathways in Sensitization: Toward a Nociceptor Cell Biology*. *Neuron*, 55(3), 365–376.

Huerta-Rivas, A., López-Rubalcava, C., Sánchez-Serrano, S. L., Valdez-Tapia, M., Lamas, M., & Cruz, S. L. (2012). *Toluene impairs learning and memory, has antinociceptive effects, and modifies histone acetylation in the dentate gyrus of adolescent and adult rats*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 102(1), 48–57. doi:10.1016/j.pbb.2012.03.018 .

IASP (1994). The following pain terminology is updated from "Part III: Pain Terms, A Current List with Definitions and Notes on Usage". [Classification of Chronic Pain](#), Second Edition, IASP Task Force on Taxonomy, edited by H. Merskey and N. Bogduk, IASP Press, Seattle, 209-214.

IASP (2020). The revised International Association for the Study of Pain definition of pain. *Pain*, 00(00), 1-7.

Informe Mundial de Drogas (2019). Oficinas de las Naciones Unidas contra la droga y el delito. ONUDC.

https://wdr.unodc.org/wdr2019/prelaunch/WDR2019_B1_S.pdf.

Jänig, W., Levine, J. D., & Michaelis, M. (1996). Interactions of sympathetic and primary afferent neurons following nerve injury and tissue trauma. *The Polymodal Pathological Pain Receptor—A Gateway to Pathological Pain*, 113, 161–184.

Jänig W, Levine JD, Michaelis M. (1996) Interactions of sympathetic and primary afferent neurons following nerve injury and tissue trauma. *Prog Brain Res*;113:161–84.

Juhl, G. I., Jensen, T. S., Norholt, S. E., & Svensson, P. (2008). *Central sensitization phenomena after third molar surgery: A quantitative sensory testing study. European Journal of Pain*, 12(1), 116–127. doi:10.1016/j.ejpain.2007.04.002

Kandel, E.R., Schwartz J.H, Jessell T.M., Siegelbaum S.A.,Hudpeth A.J. (2013). Principles of Neural Science. New York. E.A.U. McGraw-Hill companies. Pag. 472-480.

Kim, Y. S., Paik, S. K., Cho, Y. S., Shin, H. S., Bae, J. Y., Moritani, M., Yoshida, A., Ahn, D. K., Valtschanoff, J., & Hwang, S. J. (2008). Expression of P2X3 receptor in the trigeminal sensory nuclei of the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 506(4), 627–639.

Lazarowski, E. R., Schwarzbaum, P. J., (2009). Señales purinérgicas. *Medicina (Buenos Aires)*, 69, 267-276

Leem, J. W., Willis, W. D., & Chung, J. M. (1993). Cutaneous sensory receptors in the rat foot. *Journal of Neurophysiology*, 69(5), 1684–1699.

Li, P., & Zhuo, M. (1998). Silent glutamatergic synapses and nociception in mammalian spinal cord. *Nature*, 393(6686), 695–698.

Loeser, J. D., & Treede, R.-D. (2008). The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain*, 137(3), 473–477.

Lopreato, G. F., Phelan, R., Borghese, C. M., Beckstead, M. J., & Mihic, S. J. (2003). Inhaled drugs of abuse enhance serotonin-3 receptor function. *Drug and Alcohol Dependence*, 70(1), 11–15.

López-Rubalcava, C., Hen, R., & Cruz, S. L. (2000). Anxiolytic-like actions of toluene in the burying behavior and plus-maze tests: differences in sensitivity between 5-HT1B knockout and wild-type mice. *Behavioural Brain Research*, 115(1), 85–94.

Löf, A., Wallén, M., & Hjelm, E. W. (1990). Influence of Paracetamol and Acetylsalicylic Acid on the Toxicokinetics of Toluene. *Pharmacology & Toxicology*, 66(2), 138–141.

Löf, A., Hjelm, E. W., & Colmsjo, A. (1993). Toxicokinetics of toluene and urinary excretion of hippuric acid after human exposure to H₈-toluene. *British Journal of Industrial Medicine*, 50(1), 55-59.

Lubman, D. I., & Yücel, M. (2008). Drugs, mental health and the adolescent brain: implications for early intervention. *Early Intervention in Psychiatry*, 2(2), 63–66.

Marjot, R., McLeod, A. A. (1989). Chronic non-neurological toxicity from volatile substance abuse. *Human Toxicology*, 8, 301–306.

Martyn, J. A., White, D. A., Gronert, G. A. (1992). Up-and-down regulation of skeletal muscle acetylcholine receptors. *Anesthesiology*, 76, 822–843.

Matsuzawa-Yanagida, K., Narita, M., Nakajima, M., Kuzumaki, N., Niikura, K., Nozaki, H., Takagi, T., Tamai, E., Hareyama, N., Terada, M., Yamazaki, M., & Suzuki, T. (2008). Usefulness of antidepressants for improving the neuropathic pain-like state and pain-induced anxiety through actions at different brain sites. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 33(8), 1952–1965.

McCord, J. L., Tsuchimochi, H., & Kaufman, M. P. (2010). P2X2/3 and P2X3 receptors contribute to the metaboreceptor component of the exercise pressor reflex. *Journal of Applied Physiology*, 109(5), 1416–1423.

McGaraughty, S., Wismer, C. T., Zhu, C. Z., Mikusa, J., Honore, P., Chu, K. L., Lee, C. H., Faltynek, C. R., & Jarvis, M. F. (2003). Effects of A-317491, a novel and selective P2X3/P2X2/3receptor antagonist, on neuropathic, inflammatory and chemogenic nociception following intrathecal and intraplantar administration. *British Journal of Pharmacology*, 140(8), 1381–1388

McGaraughty, S., & Jarvis, M. F. (2006). Purinergic control of neuropathic pain. *Drug Development Research*, 67(4), 376–388.

Michaud, K., Bombardier, C., & Emery, P. (2007). Quality of life in patients with rheumatoid arthritis: does abatacept make a difference?. *Clinical and experimental rheumatology*, 25(5 Suppl 46), S35–S45.

Millan, M. J. (2002). Descending control of pain. *Progress in Neurobiology*, 66(6), 355–474.

Miraucourt, L. S., Dallel, R., & Voisin, D. L. (2007). *Glycine Inhibitory Dysfunction Turns Touch into Pain through PKC γ Interneurons*. *PLoS ONE*, 2(11), e1116.

Miyata, H., Kono, J., Ushijima, S., Yanagita, T., Miyasato, K., & Fukui, K. (2004). Clinical features of nicotine dependence compared with those of alcohol, methamphetamine, and inhalant dependence. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1025, 481–488.

Monster, A. C., Kęzić, S., van de Gevel, I., & de Wolff, F. A. (1993). Evaluation of biological monitoring parameters for occupational exposure to toluene. *International archives of occupational and environmental health*, 65(1 Suppl), S159–S162

Momin, A., & McNaughton, P. A. (2009). Regulation of firing frequency in nociceptive neurons by pro-inflammatory mediators. *Experimental brain research*, 196(1), 45–52.

Moore, J. K., Osen, K. K., Storm-Mathisen, J., & Ottersen, O. P. (1996). gamma-Aminobutyric acid and glycine in the baboon cochlear nuclei: an immunocytochemical colocalization study with reference to interspecies differences in inhibitory systems. *The Journal of comparative neurology*, 369(4), 497–519.

Nacional Institute on Drug Abuse, Natinal Institues of health, U.S. Departament of Health and Human Services. (2010). NIDA. Infofacts. Inhalants.www.drugabuse.gov

North R. A. (2002). Molecular physiology of P2X receptors. *Physiological reviews*, 82(4), 1013–1067.

Páez-Martínez, N., Cruz, S. L., & López-Rubalcava, C. (2003). Comparative study of the effects of toluene, benzene, 1,1,1-trichloroethane, diethyl ether, and flurothyl on anxiety and nociception in mice. *Toxicology and applied pharmacology*, 193(1), 9–16.

Pellizzari, E. D., Wallace, L. A., & Gordon, S. M. (1992). Elimination kinetics of volatile organics in humans using breath measurements. *Journal of exposure analysis and environmental epidemiology*, 2(3), 341–355.

Perron, B. E., & Howard, M. O. (2009). Adolescent inhalant use, abuse and dependence. *Addiction (Abingdon, England)*, 104(7), 1185–1192.

Portenoy, Russell K.; Brennan, Michael J., (1994). Chronic Pain Management. En Good, David C.; Couch, James R. *Handbook of Neurorehabilitation*.

Price, T. J., Cervero, F., & de Koninck, Y. (2005). Role of cation-chloride-cotransporters (CCC) in pain and hyperalgesia. *Current topics in medicinal chemistry*, 5(6), 547–555.

Rahman, W., D'Mello, R., & Dickenson, A. H. (2008). *Peripheral Nerve Injury–Induced Changes in Spinal α 2-Adrenoceptor–Mediated Modulation of Mechanically Evoked Dorsal Horn Neuronal Responses*. *The Journal of Pain*, 9(4), 350–359

Ridenour, T. A., Bray, B. C., Cottler, L. B., (2007). Fiabilidad de uso, abuso y dependencia de cuatro tipos de inhalantes en adolescentes y adultos jóvenes. Dependencia de drogas y alcohol. *Revista Adicción y Ciencia*, 91, 40–49.

Riegel, A. C., Ali, S. F., Torinese, S., & French, E. D. (2004). Repeated exposure to the abused inhalant toluene alters levels of neurotransmitters and generates peroxynitrite in nigrostriatal and mesolimbic nuclei in rat. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1025, 543–551.

Riegel, A. C., & French, E. D. (1999). An electrophysiological analysis of rat ventral tegmental dopamine neuronal activity during acute toluene exposure. *Pharmacology & toxicology*, 85(1), 37–43.

Riegel, A. C., Zapata, A., Shippenberg, T. S., & French, E. D. (2007). The abused inhalant toluene increases dopamine release in the nucleus accumbens by directly stimulating ventral tegmental area neurons. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 32(7), 1558–1569.

Rocha-González, H. I., Meneses, A., Carlton, S. M., & Granados-Soto, V. (2005). Pronociceptive role of peripheral and spinal 5-HT₇ receptors in the formalin test. *Pain*, 117(1-2), 182–192.

Scholz, J., & Woolf, C. J. (2002). Can we conquer pain?. *Nature neuroscience*, 5 Suppl, 1062–1067.

Sharp, C. J., Reeve, A. J., Collins, S. D., Martindale, J. C., Summerfield, S. G., Sargent, B. S., Bate, S. T., & Chessell, I. P. (2006). Investigation into the role of P2X₃/P2X_{2/3} receptors in neuropathic pain following chronic constriction injury in the rat: an electrophysiological study. *British journal of pharmacology*, 148(6), 845–852.

Shepherd R. T. (1989). Mechanism of sudden death associated with volatile substance abuse. *Human toxicology*, 8(4), 287–291.

Shinoda, M., Kawashima, K., Ozaki, N., Asai, H., Nagamine, K., & Sugiura, Y. (2007). P2X3 receptor mediates heat hyperalgesia in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *The journal of pain: official journal of the American Pain Society*, 8(7), 588–597.

Tardif, R., Plaa, G. L., & Brodeur, J. (1992). Influence of various mixtures of inhaled toluene and xylene on the biological monitoring of exposure to these solvents in rats. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 70(3), 385–393.

Tardif, R., Truchon, G., & Brodeur, J. (1998). Comparison of Hippuric Acid and O-Cresol in Urine and Unchanged Toluene in Alveolar Air for the Biological Monitoring of Exposure to Toluene in Human Volunteers. *Applied Occupational and Environmental Hygiene*, 13(2), 127–132.

Taylor, G. J., & Harris, W. S. (1970). Glue sniffing causes heart block in mice. *Science (New York, N.Y.)*, 170(3960), 866–868.

Thompson, S. W., Woolf, C. J., & Sivilotti, L. G. (1993). *Small-caliber afferent inputs produce a heterosynaptic facilitation of the synaptic responses evoked by primary afferent A-fibers in the neonatal rat spinal cord in vitro*. *Journal of Neurophysiology*, 69(6), 2116–2128.

Tjolsen, A., & Hole, K. (1997). *The Pharmacology of Pain*.

Tjolsen, A., Berge, O. G., Hunskaar, S., Rosland, J. H., & Hole, K. (1992). The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*, 51(1), 5–17.

Tillar, R., Shafer, T. J., & Woodward, J. J. (2002). Toluene inhibits voltage-sensitive calcium channels expressed in pheochromocytoma cells. *Neurochemistry international*, 41(6), 391–397.

Torres, G. E., Egan, T. M., & Voigt, M. M. (1999). Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners. *The Journal of biological chemistry*, 274(10), 6653–6659.

Torsney, C. (2006). *Disinhibition Opens the Gate to Pathological Pain Signaling in Superficial Neurokinin 1 Receptor-Expressing Neurons in Rat Spinal Cord*. *Journal of Neuroscience*, 26(6), 1833–1843

Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, S., Mizokoshi, A., Kohsaka, S., Salter, M. W., & Inoue, K. (2003). P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature*, 424(6950), 778–783.

Turkall, R. M., Skowronski, G. A., & Abdel-Rahman, M. S. (1991). Differences in kinetics of pure and soil-adsorbed toluene in orally exposed male rats. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 20(2), 155–160.

Torebjörk, H. E., Lundberg, L. E., & LaMotte, R. H. (1992). Central changes in processing of mechanoreceptive input in capsaicin-induced secondary hyperalgesia in humans. *The Journal of physiology*, 448, 765–780.

United States Environmental Protection Agency. (1994). Chemicals in the environment: toluene (CAS NO. 108-88-3). Retrieved August 2001 from Environmental Protection Agency Office of pollution Prevention and Toxics websites.

Vanderah, T. W. (2007). Fisiopatología del dolor. *Clínicas Médicas de Norteamérica*, 91, 1-12.

Verschueren, K. (1985). Handbook of Environmental Data on Organic Chemicals. *Soil Science*, 139(4), 376.

Villatoro, J. A., Cruz, S. L., Ortiz, A., & Medina-Mora, M. E. (2011). Volatile substance misuse in Mexico: correlates and trends. *Substance use & misuse*, 46 Suppl 1, 40–45.

Wall, P. D. (1967). The laminar organization of dorsal horn and effects of descending impulses. *The Journal of physiology*, 188(3), 403–423.

Wheeler-Aceto, H., Porreca, F., & Cowan, A. (1990). The rat paw formalin test: comparison of noxious agents. *Pain*, 40(2), 229–238.

Wilcosky, T. C., & Simonsen, N. R. (1991). Solvent exposure and cardiovascular disease. *American journal of industrial medicine*, 19(5), 569–586.

Wirkner, K., Sperlagh, B., & Illes, P. (2007). P2X3 receptor involvement in pain states. *Molecular neurobiology*, 36(2), 165–183.

Woodward, J. J., & Beckley, J. (2014). Effects of the abused inhalant toluene on the mesolimbic dopamine system. *Journal of drug and alcohol research*, 3, 235-838.

Woodward, J. J., Nowak, M., & Davies, D. L. (2004). Effects of the abused solvent toluene on recombinant P2X receptors expressed in HEK293 cells. *Brain research. Molecular brain research*, 125(1-2), 86–95.

Woolf, C. J., & Ma, Q. (2007). Nociceptors--noxious stimulus detectors. *Neuron*, 55(3), 353–364.

Woolf C. J. (2010). What is this thing called pain?. *The Journal of clinical investigation*, 120(11), 3742–3744.

Woolf, C. J. & Salter, M., W. (2000). *Neuronal Plasticity: Increasing the Gain in Pain. Science, 288(5472), 1765–1768.*

Yaksh TL. (1997) Preclinical models of nociception. *PA: Lippincott-Raven Publishers, 685–718.*

Zeilhofer, H. U., Ralvenius, W. T., & Acuña, M. A. (2015). Restoring the spinal pain gate: GABA(A) receptors as targets for novel analgesics. *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.), 73, 71–96.*

Zhou, H. Y., Chen, S. R., & Pan, H. L. (2011). Targeting N-methyl-D-aspartate receptors for treatment of neuropathic pain. *Expert review of clinical pharmacology, 4(3), 379–388.*

Zimmermann M. (1983). Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain, 16(2), 109–110.*