

AVANCES RECIENTES EN LA INVESTIGACIÓN DE LOS MECANISMOS CELULARES DE ACCIÓN DE LOS DISOLVENTES DE ABUSO

Nayeli Páez-Martínez, Carolina López-Rubalcava, Silvia L. Cruz

SUMMARY

The intentional exposure to volatile organic solvents in order to achieve a state of intoxication constitutes a health problem throughout the world, which mainly affects children and adolescents. In spite of its importance, the study of the molecular mechanisms of action of abused solvents was not addressed until lately. This paper reviews some of the relevant recent advances in this field.

During the last three decades, behavioral studies have provided evidence that solvents have similar effects on the central nervous system as depressant drugs such as ethanol, barbiturates and benzodiazepines. Based on this evidence, it was first hypothesized that abused solvents could share some of the cellular mechanisms of action of other depressant drugs. Using recombinant receptors expressed in *Xenopus* oocytes and the two-electrode voltage clamp technique, Cruz et al. studied the effects of several commonly abused solvents on the cationic currents elicited through glutamatergic receptors. These studies showed that toluene produces a non-competitive, rapid, complete and reversible inhibition of NMDA receptor ion currents. The NR1/2B NMDA receptor subtype is more sensitive than the NR1/2A and NR1/2C subtypes. The inhibitory concentration at 50% (IC_{50}) for toluene on NR1/2B receptors is 0.17 mM. At the same range of concentrations, toluene has no effect on non-NMDA (AMPA and kainate) receptors. These findings were soon extended to 1,1,1, trichloroethane (TCE) and a series of alkylbenzenes (benzene, m-xylene, ethylbenzene and propylbenzene), all of which were found to inhibit NMDA-induced currents in a dose-dependent manner, at sub-millimolar concentrations. Interestingly, flurothyl, a convulsive solvent with physicochemical properties similar to those of many abused solvents (high lipophilicity and volatility), has no effect on glutamatergic receptors. It is worth noting that the range of solvent concentrations tested in these studies does not affect the stability of cellular membranes. Taken together, these findings strongly suggested a specificity of action for abused solvents, which encouraged further research on the effects of these compounds at other neurotransmitter receptors. Thus, in 2000, Beckstead and coworkers studied the effects of toluene, TCE and trichloroethylene on the ionic currents mediated by GABA_A and glycine receptors in *Xenopus* oocytes. They found out that all three solvents increase these currents at 0.2 – 0.9

mM, acting as allosteric modulators of these channels. More recently, Bale et al. showed that toluene has also inhibitory effects on different cholinergic nicotinic receptor subtypes in vitro, the most sensitive of which is the $\alpha_4\beta_2$ receptor subtype (toluene's $IC_{50} = 0.2$ mM). Moreover, in cultured neuronal cells, toluene inhibits the calcium response to acetylcholine with an $IC_{50} = 0.5$ mM. In a recent paper, Lopreato and coworkers reported that toluene, TCE and trichloroethylene increase the ionic currents activated by serotonin through 5-HT₃ receptors at concentrations lower than 1 mM. All these effects occur at a range of concentrations that does not compromise the integrity of cell membranes and that is relevant to human exposure to solvents during intoxication. The actions of abused solvents on voltage-gated ion channels have also been a focus of attention in the last few years. According to Tillar et al., toluene inhibits Ca²⁺ currents in KCl-depolarized pheochromocytoma cells, but other authors have found that toluene might activate these channels. Another solvent, TCE, reduces Ca²⁺ currents in dorsal root ganglion cells, although this effect is only seen at relatively high concentrations ($IC_{50} = 4-6$ mM). In a recent report, our group showed that toluene blocks human cardiac sodium channels transfected into *Xenopus* oocytes. This effect occurs at micromolar concentrations and depends on the dose and on the frequency of stimulation of the channel. The so far described mechanisms of action of solvents are similar to those described for alcohol. A comparison of the potencies of toluene and ethanol to produce similar effects reveals that toluene is, in general, 10-1000 times more potent than ethanol. In the last years an increasing interest has emerged on the effects of abused solvents in the mesolimbic dopaminergic system. According to several researches toluene, like other drugs of abuse, increases dopamine release in selected brain areas. Finally, the formation of free radicals has been proposed as a mechanism that might be involved in the harmful chronic effects of solvents, such as neurotoxicity. In summary, basic research on the cellular effects of solvents has experienced an important increase in the last decade. As a result, it is now clear that these substances do not act through a non-specific membrane fluidization as it was once proposed, but through interactions with several receptor systems at sub-millimolar concentrations.

Key words: Inhalants; solvents; neurotransmitters; mechanisms of action; review.

Departamento de Farmacobiología, Cinvestav, IPN. Calzada de los Tenorios #235, Col. Granjas Coapa, México, 14330, D.F. Tel: (5255)-5483-2853. Fax: (5255)-5483-2863

Recibido: 6 de junio de 2003. Aceptado: 19 de junio de 2003.

RESUMEN

El presente trabajo es una revisión de los hallazgos recientes acerca de los mecanismos de acción de disolventes orgánicos industriales en el nivel molecular. Se incluyen los efectos de algunos de los principales disolventes de abuso sobre los receptores a glutamato del tipo NMDA y no-NMDA, receptores a GABA_A, glicina, 5-HT₃, nicotínicos y muscarínicos, así como sobre el sistema de neurotransmisión mesolímbico dopaminérgico y sobre la formación de especies reactivas de oxígeno. La mayoría de los estudios de los efectos de disolventes sobre receptores ionotrópicos se obtuvo utilizando receptores recombinantes, expresados en ovocitos de ranas *Xenopus laevis*, y registrando las corrientes iónicas a través de ellos por medio de la técnica de fijación de voltaje de dos electrodos. Otros estudios se realizaron en cultivos neuronales. Los datos obtenidos pueden resumirse de la siguiente manera: A) El benceno, el tolueno, el m-xileno, el etil-benceno, el propil-benceno y el 1,1,1-tricloroetano (TCE) inhiben los receptores NMDA; con mayor potencia a los receptores del subtipo NR1/2B que a los del subtipo NR1/2A. La inhibición es completa, reversible y dependiente de la concentración del disolvente y no se presenta para otros tipos de receptores glutamatergicos como los no-NMDA (AMPA y kainato). B) El tolueno, el TCE y el tricloroetileno aumentan la función de los receptores GABAérgicos del subtipo GABA_A, de los receptores a glicina y de los receptores a la serotonina del subtipo 5-HT₃. C) El tolueno inhibe con diferente potencia a distintos subtipos de receptores colinérgicos nicotínicos; de ellos, el más sensible el $\alpha_4\beta_2$. En cuanto a sus efectos sobre los receptores muscarínicos, el tolueno también posee actividad antagonista aunque con menor potencia que la observada para antagonizar a los receptores nicotínicos. Los estudios enfocados a los efectos del tolueno sobre canales iónicos activados por voltaje han demostrado que este disolvente inhibe las corrientes de calcio inducidas por la depolarización de células de feocromocitoma y que también actúa como antagonista de los canales cardiacos de sodio. Es importante señalar que las concentraciones en que los disolventes ejercen sus efectos *in vitro* son relevantes para el consumo humano en condiciones de intoxicación. En conjunto, estos estudios demuestran que los disolventes tienen un mecanismo de acción complejo similar al descrito para el etanol. Sin embargo, un

estudio comparativo muestra que el tolueno es de 10 a 1000 veces más potente que el etanol. Por otra parte, la formación de radicales libres parece ser un mecanismo común a varios disolventes y se ha propuesto que pudiera cumplir un papel importante en algunos de sus efectos crónicos.

Palabras clave: Inhalables; disolventes; neurotransmisores; mecanismos de acción; revisión.

INTRODUCCIÓN

Los inhalables de abuso se definen como aquellas sustancias volátiles a temperatura ambiente que se inhalan para producir un estado alterado de conciencia. Dentro de este grupo se encuentran sustancias muy distintas entre sí que sólo comparten la vía de administración y el hecho de ser utilizadas como drogas de abuso. Los inhalables se clasifican en tres grandes categorías: a) disolventes orgánicos industriales (*thinner*, desengrasantes, gasolina, pegamentos, etc.); b) gases (refrigerantes, aerosoles y anestésicos); y c) nitritos (41). Los disolventes, a su vez, se clasifican en varios grupos de acuerdo con su estructura química (cuadro 1).

Los disolventes se encuentran en productos de uso comercial, su posesión es legal, son baratos y la inhalación de sus vapores no se considera una conducta de alto riesgo. Esto los convierte en drogas de abuso de fácil acceso. El abuso de inhalables constituye un problema de magnitud mundial que repercute en la salud pública, no sólo porque afecta a grandes grupos sociales, muchos de ellos marginados, sino porque se presenta a edades muy tempranas y provoca graves secuelas para la salud, incluida la presentación ocasional de muertes súbitas (16, 19, 26).

A pesar de su importancia, durante mucho tiempo se relegó el estudio de estas sustancias como drogas

CUADRO 1
Clasificación de los disolventes de acuerdo con su estructura química

Grupo	Estructura química característica	Ejemplos
Hidrocarburos alifáticos	Cadenas lineales o ramificadas de carbono e hidrógeno	Hexano, heptano
Hidrocarburos aromáticos	Estructuras que contienen 6 átomos de carbono con un átomo de hidrogeno por carbono. Contiene 3 dobles ligaduras y varias formas resonantes	Benceno, tolueno, xileno, etil-benceno, propil-benceno (alquilbencenos)
Hidrocarburos halogenados	Hidrocarburos con un átomo de algún halógeno que reemplaza uno o más átomos de hidrógeno	1,1,1-tricloroetano (TCE), cloroformo, fluorotil
Hidrocarburos cíclicos	Anillos de hidrocarburos saturados o insaturados	Ciclohexano
Alcoholes	Estructuras que contienen un solo grupo hidroxilo (-OH)	Etanol, metanol
Eteres	Contienen una ligadura C-O-C	Dietil éter, isopropil éter
Esteres	Estructuras que contienen un grupo carboxilo (-COO) en el interior de una cadena de hidrocarburo	Etil acetato, isopropil acetato
Aldehidos	Son compuestos con un grupo carbonilo (-CO) al final de una cadena de hidrocarburo	Formaldehido, acetaldehido
Cetonas	Contienen un grupo carbonilo entre la estructura del hidrocarburo	Acetona; metil,etil-cetona, ciclohexanona

Modificado de Ayres y Taylor (6)

de abuso. De hecho, en una revisión de 1994 todavía se afirma que el mecanismo de acción de los inhalables es “un misterio” (16). Esta situación ha cambiado radicalmente en los últimos años, por lo que el propósito de la presente revisión es resumir algunos de los avances más recientes en este campo.

Observando el proceso de intoxicación de los usuarios y gracias a estudios conductuales realizados con animales de laboratorio, se estableció que los disolventes tenían efectos similares a los de los depresores clásicos del Sistema Nervioso Central (SNC), como los barbitúricos, las benzodiazepinas y el alcohol (18). Con base en ello se propuso que estas sustancias podrían compartir algunos mecanismos de acción.

REVISIÓN DE LOS MECANISMOS DE ACCIÓN PROPUESTOS

Hipótesis iniciales

Durante mucho tiempo se aceptó la teoría de Meyer y Overton de principios del siglo pasado que postulaba que el efecto anestésico general de varios compuestos, incluido el etanol, se relacionaba directamente con la lipofiliidad de los compuestos (estimada por el coeficiente de partición lípido/agua; log P). Esta hipótesis consideraba que los anestésicos tenían un mecanismo de acción inespecífico dado por su capacidad de penetrar la membrana y producir cambios en su fluidez. Durante 80 años, esta teoría gozó de gran aceptación porque parecía establecer una excelente correlación entre el coeficiente de partición y la eficacia de varios de los compuestos estudiados. Con el tiempo, la misma teoría se aplicó por extensión a los disolventes orgánicos industriales. Gradualmente, sin embargo, se acumularon pruebas en contra de que el etanol actuara por este mecanismo. Tales pruebas son las siguientes: a) si bien es cierto que el etanol produce una perturbación membranal, esto sucede en concentraciones que producen intoxicaciones muy graves o letales (23); b) el A₂C, un compuesto sintético diseñado para perturbar la membrana lipídica, no mimetiza, *in vivo* o *in vitro*, los efectos del etanol (10); c) los pequeños cambios en la temperatura capaces de reproducir los cambios en la fluidez membranal producidos por el etanol no son capaces de reproducir sus efectos *in vivo* (56); y d) aunque el log P de n-alcanos y alcoholes aumenta con la longitud de los compuestos, existe un punto de corte en el cual un aumento en la lipofiliidad ya no se traduce en un aumento en eficacia (20).

No es de sorprender que a finales de la década de 1980 aparecieran los primeros trabajos que presentaban hipótesis alternativas. En 1986, Allan y Harris (4) reportaron que el etanol actúa como agonista del re-

ceptor ionotrópico GABA_A en membranas de cerebelo de ratón en concentraciones menores que las requeridas para alterar la fluidez membranal. En estudios posteriores se demostró que el etanol también inhibe selectivamente los receptores glutamatérgicos ionotrópicos del tipo NMDA en concentraciones relevantes para el consumo humano. A partir de entonces, se inició la búsqueda de nuevos blancos moleculares de acción y se obtuvo un cuadro bastante complejo de los efectos celulares del etanol (cuadro 2), que sirvió como pieza clave en el estudio del mecanismo de acción de otros alcoholes, anestésicos y disolventes. La explicación de los efectos producidos por los disolventes ya no parecía justificarse por un mecanismo inespecífico de cambios en la fluidez membranal, por lo que las investigaciones se orientaron entonces hacia la exploración del efecto de los disolventes sobre los receptores acoplados a canales iónicos.

Efectos sobre receptores glutamatérgicos

Siguiendo el camino trazado diez años atrás para el caso del etanol, nuestro grupo estudió los efectos de diferentes disolventes sobre los receptores glutamatérgicos expresados en ovocitos de rana *Xenopus laevis*. El estudio se llevó a cabo mediante una colaboración entre el Departamento de Farmacobiología del Cinvestav, México y el Medical College de Virginia (14, 15). En estos trabajos se usó la técnica de expresión de receptores recombinantes en ovocitos, la cual consiste en inyectar mRNA o cDNA para expresar las proteínas que conforman los receptores de interés. De este modo, después de varios días, es posible estudiar las corrientes iónicas activadas por la aplicación de un fármaco agonista mediante la técnica de fijación de voltaje de dos electrodos (5). Para el caso de los receptores glutamatérgicos se estudiaron los efectos de diferentes disolventes sobre los subtipos de receptores NMDA (NR1/2B, NR1/2A y NR1/2C) y no-NMDA (GluR1, GluR1/GluR2, y GluR6). Todos los alquilbencenos probados (benceno, tolueno, m-xileno, etilbenceno y propilbenceno) y un compuesto halogenado, el 1,1,1-tricloroetano (TCE) fueron capaces de inhibir las corrientes iónicas inducidas por la activación de los receptores glutamatérgicos de manera dependiente de la

CUADRO 2
Efectos del etanol

Inhibición de receptores NMDA	(28)
Inhibición de receptores AMPA y kainato	(28)
Aumento de la función de los receptores GABA _A	(4)
Modulación de los receptores a glicina	(12)
Activación de receptores nicotínicos	(3)
Potenciación de la función de los receptores 5-HT ₃	(29)
Inhibición de canales de Ca ²⁺ activados por voltaje	(50,51)
Inhibición de canales de K ⁺	(13)

dosis. El receptor NMDA del subtipo NR1/2B fue aproximadamente diez veces más sensible a los efectos inhibitorios de los disolventes que el subtipo NR1/2A (y en el caso del tolueno, también que el NR1/2C). Después de hacer los ajustes necesarios para corregir los resultados por la evaporación de los disolventes en las soluciones de registro, se obtuvieron las siguientes concentraciones inhibitorias al 50% (CI₅₀), para la inhibición de los receptores NR1/2B: benceno, 0.23 mM; tolueno, 0.17 mM; m-xileno, 0.21 mM; etilbenceno, 0.17 mM; propilbenceno, 0.35 mM y TCE, 0.18 mM. En estos estudios también se determinó que la inhibición producida por el tolueno, el más potente de los disolventes estudiados, es no competitiva y que los receptores no-NMDA (AMPA y kainato) no se inhiben siquiera a concentraciones superiores a 10 mM. Estos datos señalan que existe un efecto diferencial sobre distintos subtipos de receptores glutamatérgicos. A manera de control negativo, también se evaluaron los efectos del fluorotil sobre los receptores NMDA. Este compuesto es interesante porque, a pesar de ser un disolvente volátil muy liposoluble, es un estimulante no un depresor del SNC. El fluorotil no tuvo efecto sobre los receptores glutamatérgicos, lo cual sugirió una especificidad de acción de los diferentes compuestos que no estaba dada por cambios en la fluidez membranal. Es importante señalar que la inhibición sobre los receptores NMDA observada con los disolventes de abuso se produjo en concentraciones que no alteraron significativamente la conductancia de la membrana en reposo en ovocitos (14, 15).

Efectos sobre receptores GABA_A y glicina

En 2000, Beckstead y colaboradores evaluaron la participación de los receptores GABA_A y glicina como posibles blancos moleculares de los disolventes de abuso. Tras estudiar unas rebanadas de hipocampo y la expresión de receptores recombinantes en ovocitos, estos autores encontraron que el tolueno, el tricloroetileno y el TCE aumentaban de forma reversible las corrientes inhibitorias mediadas por el receptor GABA_A en concentraciones de ~0.2-0.9 mM. En este estudio se analizaron los efectos sobre receptores GABA_A del subtipo $\alpha_1\beta_1$ y sobre el receptor homomérico a glicina α_1 . En ausencia del agonista específico de cada receptor, los disolventes no tuvieron efecto sobre los receptores, lo cual implica que no actúan como agonistas directos sino como moduladores alostéricos del receptor. Al igual que lo reportado con los receptores NMDA, en las concentraciones empleadas, los disolventes no comprometieron la integridad membranal de los ovocitos (8).

Efectos sobre receptores colinérgicos

Los receptores colinérgicos se dividen en dos grandes tipos: los nicotínicos y los muscarínicos, a su vez, cada uno de ellos cuenta con varios subtipos. Los nicotínicos son receptores acoplados a canales iónicos que al activarse permiten la entrada de Na⁺ y Ca²⁺ a la célula, mientras que los muscarínicos son receptores acoplados a proteínas G. Estudios recientes han demostrado que el tolueno produce una inhibición reversible de las corrientes inducidas por acetilcolina en ovocitos de rana que expresan diversos tipos de receptores colinérgicos nicotínicos. El orden de sensibilidad de la inhibición, dada por los valores estimados de CI₅₀, fue el siguiente: $\alpha_4\beta_2$ (0.2 mM) > $\alpha_3\beta_2$ (0.4 mM) > $\alpha_3\beta_4$ (1.1 mM) > α_7 (1.2 mM) > $\alpha_4\beta_4$ (1.8 mM). Al igual que lo encontrado en los ovocitos, en las neuronas hipocámpales en cultivo, el tolueno inhibió las respuestas mediadas por la acetilcolina de forma dependiente de la dosis y con una CI₅₀ de 1.1 mM (7). Los efectos del tolueno sobre los receptores colinérgicos muscarínicos se han estudiado en células precursoras neuronales en proliferación y se ha encontrado que deprimen las respuestas de Ca²⁺ a acetilcolina con una CI₅₀ de 0.5 mM (31). Estos resultados confirman que, al igual que el etanol, el tolueno es un antagonista de los receptores colinérgicos nicotínicos y muscarínicos, si bien con diferencias importantes en potencia.

Efectos sobre receptores serotoninérgicos del tipo 5-HT₃

El subtipo de receptor 5-HT₃ es el único receptor serotoninérgico ionotrópico y es un blanco de acción del etanol, por lo cual ha sido también foco de interés en la evaluación del mecanismo de acción de los disolventes. Recientemente, Lopreato y colaboradores estudiaron el efecto del tolueno, del tricloroetileno y del TCE sobre los receptores 5-HT₃, expresados en ovocitos de rana, y encontraron que los tres compuestos aumentan las corrientes activadas por la serotonina de manera reversible y dependiente de la dosis en concentraciones menores a 1 mM (27). Estos hallazgos son interesantes porque el antagonismo de los receptores 5-HT₃ se ha propuesto como una estrategia terapéutica promisoriosa para el tratamiento del alcoholismo (24) y, al menos teóricamente, podría serlo para el abuso de inhalables.

Efectos sobre canales iónicos activados por voltaje

Si bien la mayoría de los estudios iniciales se enfocó al análisis de los efectos de los disolventes sobre los receptores ionotrópicos, recientemente Tillard y cola-

boradores (49) evaluaron los efectos del tolueno sobre las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} y la actividad de canal único en células de feocromocitoma (PC-12). De este modo encontraron que el tolueno inhibe el aumento en las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} inducidas por KCl, pero no altera las concentraciones intracelulares de calcio de células en reposo. La CI_{25} de la inhibición con tolueno fue < 0.02 mM. En contraste, de acuerdo con Westerink y Vijverberg (54), la perfusión de células PC-12 con tolueno (0.01 y 0.03 mM) produce un aumento en la frecuencia de exocitosis vesicular, un proceso dependiente de calcio. Los efectos del TCE sobre los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje también se han evaluado y se ha encontrado que este disolvente reduce las corrientes de Ca^{2+} en neuronas del ganglio de la raíz dorsal. La reducción de corriente es independiente del voltaje y la CI_{50} para este efecto fue de 4 a 6 mM (43). Recientemente, nuestro grupo estudió los efectos del tolueno sobre los canales de sodio cardiacos expresados en ovocitos, y encontró que tiene un efecto inhibitorio dependiente de la dosis y de la frecuencia de uso del canal, pero independiente del voltaje (21).

Comparación de los efectos del tolueno y el etanol

Las investigaciones recientes han demostrado que los disolventes tienen un mecanismo de acción complejo muy similar al del etanol. Esto no debería extrañarnos puesto que el etanol es también un disolvente, sólo que se administra por vía oral. En el cuadro 3 se hace una comparación de las concentraciones efectivas en

que el tolueno (el disolvente mejor estudiado a la fecha) y el etanol ejercen sus efectos sobre varios sistemas de receptores. Como puede verse, el etanol inhibe los receptores NMDA y nicotínicos y potencia los receptores $GABA_A$, glicina y 5-HT₃ en concentraciones entre 10 y 100 veces mayores que las del tolueno. Esta diferencia es aún mayor para los efectos inhibitorios de ambos compuestos sobre canales de Ca^{2+} . Aunque algunas de las diferencias podrían estar dadas por variaciones en las condiciones experimentales, parece ser una constante que el tolueno es mucho más potente que el etanol.

EFFECTOS DE LOS DISOLVENTES SOBRE EL SISTEMA DOPAMINÉRGICO

Las actividades que aseguran la supervivencia inmediata del individuo (comer y beber) y la supervivencia a largo plazo de las especies (actividad sexual y conducta maternal) son percibidas, al menos en mamíferos, como conductas placenteras. El sistema neuronal implícito en estas conductas es el sistema mesolímbico dopaminérgico. Se denomina así al circuito formado por una red neuronal que involucra varios núcleos cerebrales entre los que destacan el área ventral tegmental (AVT), el núcleo *accumbens* y la corteza prefrontal. Como su nombre lo indica, el sistema mesolímbico dopaminérgico actúa produciendo un aumento en la liberación de dopamina. La mayoría de las drogas de abuso (si no es que todas) activan este sistema, lo cual lleva a una alteración de la conducta que se manifiesta

CUADRO 3
Comparación de las potencias del etanol y el tolueno

Receptor	Efecto	Tolueno	Etanol	Preparación
NMDA	↓	CI_{50} -0.2 mM (14)	CI_{50} -100 mM (37) CI_{50} -30 mM (28) CI_{50} -146 mM (55)	- Ovocitos - Neuronas hipocampales - Neuronas corticales en cultivo
$GABA_A$	↑	-0.2-0.9 mM (8)	50-400 mM (36) 15-50 mM (4) 20-50 mM (47) 50 mM (48) 10-50 mM (53)	- Ovocitos - Membranas de cerebelo de ratón - Sinaptosomas - Neuronas de médula espinal - Neuronas hipocampales
Glicina	↑	-0.2-0.9 mM (8)	10-200 mM (33) 50 mM (12) 1-200 mM (2)	- Ovocitos - Neuronas espinales de pollo - Neuronas espinales de ratón
Nicotínicos	↓*	↓ $\alpha_7, \alpha_4\beta_2$ -0.2-2 mM (7) CI_{50} = 1.1 mM (7)	↓ α_7 5-100 mM (11,57) ↑ $\alpha_4\beta_2$ 30-300mM (3,11)	- Ovocitos - Neuronas hipocampales
5-HT ₃	↑	< 1mM (27)	50-200 mM (32) 25-100 mM (29) 10-100 mM (30)	- Ovocitos - Células de neuroblastoma - Rec. 5-HT ₃ transgénicos en células renales
Canales de Ca^{2+}		↑ CI_{25} =0.02mM (49) ↓ 0.01-0.03mM (54)	↓ 25 mM (39) ↓ 10-50 mM (51)	- Células de feocromocitoma - Neurohipófisis de rata

* El tolueno tiene un efecto inhibitorio sobre todos los tipos de receptores nicotínicos probados a la fecha (7), mientras que el etanol tiene un efecto inhibitorio sobre algunos subtipos y excitatorio sobre otros (3, 11).

en un deseo compulsivo de búsqueda e ingestión de la sustancia (1). Mediante la técnica de microdiálisis, se ha encontrado, que al igual que con los reforzantes naturales, la administración de opioides, cocaína, anfetaminas, nicotina, cannabinoides y etanol produce un aumento en los niveles extracelulares de dopamina en el núcleo *accumbens* (42). Recientemente, también se evaluaron los efectos de los disolventes sobre la liberación de dopamina y se obtuvieron resultados interesantes. De acuerdo con estudios hechos por Rea (44), la inhalación de 1000 ppm de tolueno durante ocho horas aumenta el contenido de dopamina en el tejido estriatal de ratas. Lo mismo sucede cuando los animales se exponen a 1000 y 2000 ppm de tolueno durante dos horas (46). Según otros trabajos, la administración a 3000 ppm de tolueno también produce un aumento de dopamina en la corteza prefrontal, pero no en el núcleo *accumbens*. De manera interesante, si se administra tolueno con cocaína, aumentan significativamente los niveles de dopamina en este núcleo, con un incremento mayor que la suma de los componentes individuales. Esto sugiere que puede haber una potenciación de los efectos de los disolventes cuando se combinan con otras drogas de abuso (22). Aunque aún no se conocen los mecanismos que intervienen en el aumento en la liberación de dopamina tras la exposición a disolventes, se ha sugerido que éste se puede asociar con una acción directa del tolueno sobre las neuronas dopaminérgicas (45), con su acción indirecta mediante la inhibición de receptores NMDA (14,15) o con la potenciación sobre los receptores GABA_A (8) y/o 5-HT₃ (27).

EFFECTOS DE LOS DISOLVENTES SOBRE LA FORMACIÓN DE RADICALES LIBRES

De acuerdo con algunos investigadores, la formación de especies reactivas de oxígeno podría ser parte de los mecanismos de acción responsables de los efectos crónicos de algunos disolventes, como la producción de daño cerebral y hepático. Se sabe que varios hidrocarburos alifáticos y alicíclicos incrementan la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) en células granulares cerebrales de rata (17). El benceno y el tolueno no tienen efecto en esta preparación, mientras que el xileno aumenta la formación de ROS pero sólo en altas concentraciones. La potencia en la formación de las especies reactivas de oxígeno parece estar relacionada con los valores de coeficiente de partición de los compuestos analizados. Empleando otra preparación (sinaptosomas de cerebro de rata), Myhre y colaboradores (40) observaron que los hidrocarburos alifáticos, naftalénicos y aromá-

ticos estimulan la producción de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno. En otro trabajo se encontró que la administración i.p. de tolueno y de sus metabolitos, benzil alcohol y benzaldehído, produjo una elevación de la frecuencia de formación de especies reactivas de oxígeno en el hígado; en el caso del tolueno, lo mismo ocurrió en el cerebro (34). Se sabe que un exceso de ROS en células puede causar un daño oxidativo de proteínas, lípidos y DNA, lo cual, a su vez, puede provocar daño celular o la muerte. Con base en estos antecedentes, Dreiem y colaboradores (17) proponen que la formación de especies reactivas de oxígeno puede contribuir al desarrollo de encefalopatía tóxica crónica después de la exposición a disolventes.

RELEVANCIA DE LAS CONCENTRACIONES SOBRE LOS EFECTOS CONDUCTUALES DE LOS DISOLVENTES

A lo largo de este trabajo se ha descrito que los efectos de los disolventes se produjeron en cada uno de los receptores analizados, en concentraciones dentro del rango submilimolar. Este dato es importante ya que se ha encontrado que en estas concentraciones los disolventes causan efectos conductuales agudos tanto en humanos como en animales de laboratorio. Así, se han reportado concentraciones de disolventes de entre 0.01-0.2 mM en muestras de sangre de inhaladores (25,35,38). De forma paralela, en estudios con animales de laboratorio se encontraron concentraciones entre 0.1 y 0.2 mM en ratas expuestas a 575 ppm de tolueno (9), y se observaron claros efectos conductuales en concentraciones cerebrales de TCE entre 0.5 y 1.5 mM (52). En suma, para la inhibición o estimulación de los diferentes receptores, las concentraciones efectivas de los disolventes, parecen ser relevantes respecto de aquellas asociadas con los efectos conductuales de los disolventes tanto en animales como en el humano.

CONCLUSIONES

En los últimos años se han acumulado pruebas que indican que los efectos de los disolventes de abuso ya no pueden considerarse sólo como cambios inespecíficos en la fluidez membranal, sino que deben entenderse como un complejo mecanismo de acción que involucra varios sistemas de neurotransmisión. Hasta el momento, el tolueno es el disolvente mejor estudiado. Actúa como antagonista de los receptores NMDA, nicotínicos y muscarínicos, además de potenciar los receptores GABA_A, glicina y 5-HT₃. Al igual que muchas otras drogas de abuso, el tolueno libera dopamina en el circuito mesolímbico dopaminérgico.

La formación de especies reactivas de oxígeno producida por varios disolventes se ha propuesto como un posible mecanismo de daños derivados de la exposición crónica a estas sustancias. Aunque sin duda resta resolver muchas preguntas, los avances logrados en los últimos años en el estudio de los mecanismos de acción de los disolventes, ofrecen herramientas muy útiles para abordar nuevas preguntas experimentales. Una de las metas a largo plazo de la investigación en inhalables es hacer estudios comparativos de diversos compuestos para reconocer los más dañinos y sustituirlos por otros menos peligrosos en los productos comerciales. Este objetivo, al igual que muchos otros (lograr intervenciones en el tratamiento y prevención del abuso de inhalables, por ejemplo), sólo se logrará con un conocimiento más completo de cómo actúan estas sustancias en los seres vivos.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo de Conacyt (donativo 30571M a S.L.C., beca 138625 a N.P.M.) para la realización de este trabajo.

REFERENCIAS

1. ABBOTT A: Neurobiological perspectives on drugs of abuse. *Trends Pharmacol Sci*, 13:169, 1992.
2. AGUAYO LG, TAPIA JC, PANCETTI FC: Potentiation of the glycine-activated Cl⁻ current by ethanol in cultured mouse spinal neurons. *J Pharmacol Exp Ther*, 279:1116-1122, 1996.
3. AISTRUP GL, MARSZALEC W, NARAHASHI T: Ethanol modulation of nicotinic acetylcholine receptor currents in cultured cortical neurons. *Mol Pharmacol*, 55:39-49, 1999.
4. ALLAN AM, HARRIS RA: Gamma-aminobutyric acid and alcohol actions: neurochemical studies of long sleep and short sleep mice. *Life Sci*, 39:2005-2015, 1986.
5. ASTON-JONES GS, SIGGINS GR: Electrophysiology. En: *Psychopharmacology the Fourth Generation of Progress*. Bloom FE, Kupfer DJ (eds). Raven Press, Nueva York, 1995.
6. AYRES PH, TAYLOR DW: Solvents. En: *Principles and Methods of Toxicology*. Segunda Edición. Hayes W (ed). Raven Press, Ltd., Nueva York, 1989.
7. BALE AS, SMOTHERS CT, WOODWARD JJ: Inhibition of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by the abused solvent, toluene. *Br J Pharmacol*, 137:375-383, 2002.
8. BECKSTEAD MJ, WEINER JL, EGER EI, GONG DH, MIHIC SJ: Glycine and γ -aminobutyric acid_A receptor function is enhanced by inhaled drugs of abuse. *Mol Pharmacol*, 57:1199-1205, 2000.
9. BENIGNUS VA, MULLER KE, BARTON CN, BITTILO-FER JA: Toluene levels in blood and brain of rats during and after respiratory exposure. *Toxicol App Pharmacol*, 61:326-334, 1981.
10. BUCK KJ, ALLAN AM, HARRIS RA: Fluidization of brain membranes by A2C does not produce anaesthesia and does not augment muscimol stimulated ³⁶Cl⁻ influx. *Eur J Pharmacol*, 160:359-367, 1989.
11. CARDOSO RA, BROZOWSKI SJ, CHAVEZ-NORIEGA LE, HARPOLD M, VALENZUELA CF, HARRIS RA: Effects of ethanol on recombinant human neuronal nicotinic acetylcholine receptors expressed in Xenopus oocytes. *J Pharmacol Exp Ther*, 289:774-80, 1999.
12. CELENTANO JJ, GIBBS TT, FARB DH: Ethanol potentiates GABA- and glycine-induced chloride currents in chick spinal cord neurons. *Brain Res*, 455:377-380, 1988.
13. COVARRUBIAS M, VYAS TB, ESCOBAR L, WEI A: Alcohols inhibit a cloned potassium channel at a discrete saturable site. *J Biol Chem*, 270:19408-19416, 1995.
14. CRUZ SL, MIRSHAHI T, THOMAS B, BALSTER RL, WOODWARD JJ: Effects of the abused solvent toluene on recombinant N-Methyl-D-Aspartate and non-N-Methyl-D-Aspartate receptors expressed in Xenopus oocytes. *J Pharmacol Exp Ther*, 286:334-340, 1998.
15. CRUZ SL, BALSTER RL, WOODWARD JJ: Effects of volatile solvents on recombinant N-methyl-D-aspartate receptors expressed in Xenopus oocytes. *Br J Pharmacol*, 131:1303-1308, 2000.
16. DINWIDDIE SH: Abuse of inhalants: a review. *Addiction*, 89:925-939, 1994.
17. DREIEM A, MYHRE O, FONNUM F: Relationship between lipophilicity of C6-C10 hydrocarbon solvents and their ROS-inducing potency in rat cerebellar granule cells. *Neurotoxicology*, 23:701-709, 2002.
18. EVANS EB, BALSTER RL: CNS. Depressant effects of volatile organic solvents. *Neurosci Biobehav Rev*, 15:233-241, 1991.
19. FLANAGAN RJ: Volatile solvent abuse. *Bull Narcotics* 46:49-78, 1994.
20. FRANKS NP, LIEB WR: Mapping of general anaesthetic target sites provides a molecular basis for cutoff effects. *Nature*, 316:349-351, 1985.
21. GAUTHEREAU MY, CRUZ SL, ORTA-SALAZAR G, MILLAN-PEREZ-PEÑA L, SALINAS-STEFANON E: Toluene inhibits sodium currents from human cardiac sodium channels transfected into Xenopus laevis oocytes. *Drug Alcohol Depend* (en prensa).
22. GERASIMOV MR, SCHIFFER WK, MARSTELLAR D, FERRIERI R, ALEXOFF D, DEWEY SL: Toluene inhalation produces regionally specific changes in extracellular dopamine. *Drug Alcohol Depend*, 65:243-251, 2002.
23. HARRIS RA, SCHROEDER F: Ethanol and the physical properties of brain membranes: Fluorescence studies. *Mol Pharmacol*, 20:128-137, 1981.
24. JOHNSON BA, AIT-DAOUD N: Neuropharmacological treatments for alcoholism: scientific basis and clinical findings. *Psychopharmacology*, 149:327-344, 2000.
25. KING MD: Neurological sequelae of toluene abuse. *Hum Toxicol*, 1:281-287, 1982.
26. KOZEL N, SLOBODA Z, DE LA ROSA M (eds): *Epidemiology of Inhalant Abuse: An International Perspective*. NIDA Res. Monograph Series No. 148. Department of Health and Human Services, Rockville, 1995.
27. LOPREATO GF, PHELAN R, BORGHESE CM, BECKSTEAD MJ, MIHIC SJ: Inhaled drugs of abuse enhance serotonin-3 receptor function. *Drug Alcohol Depend*, 70:11-15, 2003.
28. LOVINGER DM, WHITE G, WEIGHT FF: Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons. *Science*, 243:1721-1724, 1989.
29. LOVINGER DM: Ethanol potentiates ion current mediated by 5-HT₃ receptors on neuroblastoma cells and isolated neurons. *Alcohol Alcohol Suppl*, 1:181-185, 1991.
30. LOVINGER DM, ZHOU Q: Alcohols potentiate ion current mediated by recombinant 5-HT₃ receptors expressed in a mammalian cell line. *Neuropharmacology*, 33:1567-1572, 1994.
31. MA W, SHAFFER KM, PANCRAZIO JJ, SHUGHNESSY JO, STENGER DA, ZHANG L, BARKER JL, MARIC D: Toluene inhibits muscarinic receptor-mediated cytosolic Ca²⁺ responses in neural precursor cells. *Neurotoxicology*, 23:61-68, 2002.

32. MACHUTK, HARRIS RA: Alcohols and anesthetics enhance the function of 5-hydroxytryptamine₃ receptors expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J Pharmacol Exp Ther*, 271:898-905, 1994.
33. MASCIA MP, MIHIC SJ, VALENZUELA CF, SCHOFIELD PR, HARRIS RA: A single amino acid determines differences in ethanol actions on strychnine-sensitive glycine receptors. *Mol Pharmacol*, 50:402-406, 1996.
34. MATTIA CJ, ADAMS JD Jr, BONDY SC: Free radical induction in the brain and liver by products of toluene catabolism. *Biochem Pharmacol*, 46:103-110, 1993.
35. MEREDITH TJ, RUPRAH M, LIDDLE A, FLANAGAN RL: Diagnosis and treatment of acute poisoning with volatile substances. *Hum Toxicol*, 8:277-286, 1989.
36. MIHIC SJ, WHITING PJ, HARRIS RA: Anaesthetic concentrations of alcohols potentiate GABA_A receptor-mediated currents: lack of subunit specificity. *Eur J Pharmacol*, 268:209-214, 1994.
37. MIRSHAHI T, WOODWARD JJ: Ethanol sensitivity of heteromeric NMDA receptors: effects of subunit assembly, glycine and NMDAR1 Mg(2+)-insensitive mutants. *Neuropharmacology*, 34:347-355, 1995.
38. MORTON HG: Occurrence and treatment of solvent abuse in children and adolescents. *Pharmacol Ther*, 33:449-469, 1987.
39. MULLIKIN-KILPATRICK D, TREISTMAN SN: Electrophysiological studies on calcium channels in naive and ethanol-treated PC12 cells. *Alcohol Alcohol Suppl*, 2:385-389, 1993.
40. MYHRE O, FONNUM F: The effect of aliphatic, naphthenic, and aromatic hydrocarbons on production of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in rat brain synaptosome fraction: the involvement of calcium, nitric oxide synthase, mitochondria, and phospholipase A. *Biochem Pharmacol*, 62:119-128, 2001.
41. National Institute on Drug Abuse (NIDA): *Inhalant Abuse*. En: <http://www.nida.nih.gov/ResearchReports/Inhalants>, 1999.
42. NESTLER EJ, HYMAN SE, MALENKA RC (eds): Reinforcement and addictive disorders. En: *Molecular Neuropharmacology*. A Foundation for Clinical Neuroscience. McGraw-Hill Co., 355-382, 2001.
43. OKUDA M, KUNITSUGU I, KOBAYAKAWA S, HOBARA T: Effect of 1,1,1-trichloroethane on calcium current of rat dorsal root ganglion neurons. *Bull Environ Contam Toxicol*, 67:476-482, 2001.
44. REA TM, NASH JF, ZABIK JE, BORN GS, KESSLER WV: Effects of toluene inhalation on brain biogenic amines in the rat. *Toxicology*, 31:143-150, 1984.
45. RIEGEL AC, FRENCH ED: An electrophysiological analysis of rat ventral tegmental dopamine neuronal activity during acute toluene exposure. *Pharmacol Toxicol*, 85:37-43, 1999.
46. STENGARD K, HÖGLUND G, UNGERSTEDT U: Extracellular dopamine levels within the striatum increase during inhalation exposure to toluene. A microdialysis study in awake, freely moving rats. *Toxicol Lett*, 71:245-255, 1994.
47. SUZDAK PD, SCHWARTZ RD, SKOLNICK P, PAUL SM: Ethanol stimulates gamma-aminobutyric acid receptor-mediated chloride transport in rat brain synaptoneurosome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83:4071-4075, 1986.
48. TICKU MK, LOWRIMORE P, LEHOULLIER P: Ethanol enhances GABA-induced ³⁶Cl-influx in primary spinal cord cultured neurons. *Brain Res Bull*, 17:123-126, 1986.
49. TILLAR R, SHAFER TJ, WOODWARD JJ: Toluene inhibits voltage-sensitive calcium channels expressed in pheochromocytoma cells. *Neurochem Int*, 41:391-397, 2002.
50. WANG X, LEMOS JR, DAYANITHI G, NORDMANN JJ, TREISTMAN SN: Ethanol reduces vasopressin release by inhibiting calcium currents in nerve terminals. *Brain Res*, 551:339-341, 1991.
51. WANG X, WANG G, LEMOS JR, TREISTMAN SN: Ethanol directly modulates gating of a dihydropyridine-sensitive Ca²⁺ channel in neurohypophysial terminals. *J Neurosci*, 14:5453-5460, 1994.
52. WARREN DA, BOWEN SE, JENNINGS WB, DALLAS CE, BALSTER RL: Biphasic effects of 1,1,1-trichloroethane on the locomotor activity of mice: relationship to blood and brain solvent concentrations. *Toxicol Sci*, 56:365-373, 2000.
53. WEINER JL, ZHANG L, CARLEN PL: Potentiation of GABA_A-mediated synaptic current by ethanol in hippocampal CA1 neurons: possible role of protein kinase C. *J Pharmacol Exp Ther*, 268:1388-1395, 1994.
54. WESTERINK RHS, VIJVERBERG HPM: Toluene-induced, Ca²⁺ dependent vesicular catecholamine release in rat PC12 cells. *Neurosci Lett*, 326:81-84, 2002.
55. WIRKNER K, EBERTS C, POELCHEN W, ALLGAIER C, ILLES P: Mechanism of inhibition by ethanol of NMDA and AMPA receptor channel functions in cultured rat cortical neurons. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 362(6):568-76, 2000.
56. WOODWARD JJ: Overview of the effects of alcohol on the cerebral nervous system. *Neurochem Int*, 35:93-94, 1999.
57. YU D, ZHANG L, EISELE JL, BERTRAND D, CHANG-GEUX JP, WEIGHT FF: Ethanol inhibition of nicotinic acetylcholine type alpha 7 receptors involves the amino-terminal domain of the receptor. *Mol Pharmacol*, 50:1010-1016, 1996.