



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

Departamento de Farmacobiología

**Neuroinflamación y alteraciones electrofisiológicas derivadas de la exposición crónica
a tolueno y ciclohexano en la corteza prefrontal medial de ratas adolescentes**

Tesis que presenta:

M. en C. Monserrat Armenta Reséndiz

Para obtener el Grado de:

**Doctora en Ciencias en
Neurofarmacología y Terapéutica Experimental**

Directores de la Tesis:

Dra. Silvia Lorenia Cruz Martín Del Campo

Dr. Emilio Javier Galván Espinosa

Ciudad de México

Junio de 2018

Todos los experimentos se realizaron en los laboratorios 9 y 10 del departamento de Farmacobiología de la Unidad Coapa del CINVESTAV, y estuvieron apoyados por los proyectos: CONACYT- 239192 (SLC) (EJG) a cargo de la Dra. Silvia L. Cruz Martín del Campo y del Dr. Emilio J. Galván Espinosa. También por la beca de doctorado no. 261796 (MAR) de Monserrat Armenta Reséndiz.

*“Al azar agradezco tres dones: haber nacido mujer,
de clase baja y nación oprimida.
Y el turbio azul de ser tres veces rebelde”.*

Maria-Mercè Marçal

Agradecimientos

Al CONACYT y al CINVESTAV por ser instituciones que apoyan el desarrollo científico de México.

A mis tutores los doctores Silvia L. Cruz y Emilio J. Espinosa por sus aportaciones al proyecto y a los experimentos desarrollados en sus laboratorios.

A mis sinodales los doctores Claudia González Espinosa, Carolina López Rubalcava, Nayeli Páez Martínez y Francisco Sotres Bayón por sus contribuciones al crecimiento de esta tesis y de este trabajo de investigación.

A los Sres. Abraham Contreras y Juan Javier López por sus consejos, buenos deseos, apoyo técnico y por el cafecito matutino.

A Araceli Hernández y a todos mis compañeros del laboratorio 10: Luz María, Valeria, César y Frida por su apoyo y grata convivencia en el laboratorio.

A mis compañeros del laboratorio 9: Leonardo, Gabriel, Cindy, Martín, Melissa, Jesús, Ernesto, Jonathan por sus enseñanzas y compañerismo en el laboratorio.

A las personas con las que compartí momentos muy agradables en CINVESTAV como Meli, Fabi, Karlita, Zyan,, Lalo, Heber, César, Ileri, Leo, Ivette, Franco, Vladi, Lupis, Dianita, Liz y Bruno.

A mis amigos Omar Domínguez, Lizbeth Fuentes, Miguel A. Sicilia, y Paulina Soberanes quienes irradian inspiración en su camino.

A mis papás quienes son mi fuente inagotable de soporte emocional y mis más grandes maestros.

A mi familia Armenta-Azcarraga por su cariño y apoyo. A mis abuelos que representan para mí un motivo de continuo progreso.

A la familia Del Ángel por sus apapachos, consejos y enseñanzas.

A Jeredi Del Ángel por su paciencia, su amor, su sonrisa, por ser mi cómplice y mi más adorable compañero de aventuras.

¡Gracias!

ÍNDICE GENERAL

INDICE DE FIGURAS	iv
INDICE DE TABLAS	vi
ABREVIATURAS	vii
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
PRESENTACIÓN	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Inhalables.....	1
1.1.1 Tolueno.....	2
1.1.1.1 Usos.....	2
1.1.1.2 Farmacocinética.....	3
1.1.1.3 Efectos conductuales.....	3
1.1.1.4 Efectos moleculares.....	3
1.1.2 Ciclohexano.....	4
1.1.2.1 Usos.....	5
1.1.2.2 Farmacocinética.....	6
1.1.2.3 Efectos conductuales.....	6
1.2 El cerebro adolescente: vulnerabilidad al consumo de drogas.....	7
1.2.1 La corteza prefrontal.....	10
1.2.2. Propiedades intrínsecas de las neuronas.....	11
1.2.2.1 Propiedades pasivas de la membrana.....	13
1.2.2.2 Propiedades activas de la membrana.....	14
1.3 Neuroinflamación: comunicación entre las células gliales y las neuronas.....	15
1.3.1 Astrocitos.....	16
1.3.2 Microglía.....	17
1.3.3 Mediadores inflamatorios.....	21
1.3.4 Neuroinflamación y disolventes.....	23
1.3.5 La minociclina: inhibidor del proceso de neuroinflamación.....	24
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26

2.1 Justificación.....	26
2.2 Hipótesis.....	26
3. OBJETIVOS.....	27
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
4.1 Animales.....	28
4.2 Exposición a disolventes.....	28
4.3 Diseño experimental.....	28
4.4 Registro electrofisiológicos de células con técnica de patch-clamp.....	32
4.4.1 Obtención y preparación de rebanadas.....	32
4.4.2 Determinación de las propiedades intrínsecas.....	32
4.4.3 Determinación de la actividad sináptica espontánea.....	33
4.5 Inmunofluorescencia.....	33
4.6 Evaluación de la expresión de citocinas por qPCR.....	34
4.7 Prueba de evitación pasiva.....	35
4.8 Prueba de reconocimiento de objeto novedoso (modificada).....	36
4.9 Análisis estadístico.....	36
5. RESULTADOS.....	37
5.1 Resultados electrofisiológicos.....	37
5.1.1 Características electrofisiológicas de las neuronas piramidales de la corteza medial prefrontal.....	39
5.1.2 La exposición repetida al tolueno modifica las propiedades pasivas de la membrana de manera concentración dependiente.....	39
5.1.3 La exposición repetida al tolueno, pero no al ciclohexano, modifica las propiedades pasivas de la membrana.....	40
5.1.4 La exposición crónica al tolueno y al ciclohexano produce cambios en la cinética del potencial de acción.....	42
5.1.5 La exposición crónica al tolueno incrementa la frecuencia de disparo de las neuronas piramidales.....	45
5.1.6 La exposición crónica al tolueno pero no al ciclohexano disminuye la corriente post hiperpolarizante.....	45
5.1.7 La exposición crónica al tolueno, pero no al ciclohexano, incrementa la.....	48

actividad sináptica espontánea.....	
5.1.8 El tratamiento de minociclina bloquea el efecto de la exposición crónica al tolueno sobre la excitabilidad intrínseca de las neuronas de la corteza.....	50
5.2 Resultados de inmunofluorescencia.....	55
5.2.1 La exposición crónica a tolueno pero no al ciclohexano incrementa la expresión de GFAP e Iba-1 en la región PL de la CPFm y el tratamiento de minociclina evita este incremento.....	55
5.3 Resultados de PCR en tiempo real.....	57
5.3.1 El tratamiento de minociclina bloquea el efecto de la exposición crónica al tolueno sobre la expresión de IL-1 β en la CPFm.....	57
5.4 Evaluación conductual.....	58
5.4.1 El tratamiento de minociclina bloquea el efecto de la exposición crónica al tolueno sobre el deterioro cognitivo.....	58
6. DISCUSIÓN	60
6.1 Efectos de la exposición crónica al tolueno y ciclohexano en las propiedades intrínsecas de las neuronas piramidales.....	61
6.2 Efecto de la neuroinflamación en la excitabilidad intrínseca de las neuronas.....	63
6.3 Efectos del tolueno y del ciclohexano sobre la fluidez membranal.....	65
6.4 Efectos del tolueno y el ciclohexano sobre el proceso de neuroinflamación.....	67
6.5 Efectos de la neuroinflamación asociada a la exposición crónica de tolueno en el deterioro cognitivo.....	69
7. CONCLUSIONES	71
8. PERSPECTIVAS	72
9. BIBLIOGRAFÍA	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química y principales propiedades fisicoquímicas del tolueno.....	2
Figura 2. Estructura química y principales propiedades fisicoquímicas del ciclohexano.....	5
Figura 3. Maduración de la corteza prefrontal.....	9
Figura 4. Propiedades intrínsecas de la membrana.....	11
Figura 5. Esquema de las fases del PA.....	12
Figura 6. Cambios que se presentan en la astrogliosis reactiva después de lesiones graves en el SNC, trastornos neurodegenerativos e infecciones sistémicas.....	18
Figura 7. Desarrollo de la microglía de roedores en regiones como hipocampo y corteza.....	19
Figura 8. Funciones inmunológicas generales de la microglía.....	20
Figura 9. Curva de calibración de las concentraciones de tolueno.....	30
Figura 10. Esquema del diseño experimental.....	31
Figura 11. Patrón de disparo.....	38
Figura 12. Propiedades pasivas de membrana de neuronas piramidales en la capa V de la CPFm de ratas adolescentes tratadas con diferentes concentraciones de tolueno.....	39
Figura 13. Propiedades pasivas de membrana de neuronas piramidales en la capa V de la CPFm de ratas adolescentes tratadas con tolueno y ciclohexano.....	41
Figura 14. Cinética del PA y umbral de disparo.....	44
Figura 15. Frecuencia de disparo.....	46
Figura 16. Corriente Post hiperpolarizante y Post potencial hiperpolarizante.....	47
Figura 17. Actividad eléctrica espontánea.....	49

Figura 18. Curva I/V y propiedades pasivas de la membrana con el tratamiento de minociclina.....	51
Figura 19. Frecuencia de disparo con el tratamiento de minociclina.....	52
Figura 20. Cinética del potencial de acción y umbral de disparo con el tratamiento de minociclina.....	53
Figura 21. Postpotencial hiperpolarizante con el tratamiento de minociclina.....	54
Figura 22. Inmunofluorescencia de Iba-1 y GFAP en la región PL de la CPFm.....	56
Figura 23. Expresión relativa de IL- 1 β y TGF- β en la corteza prelímbica de la mPFC de ratas adolescentes.....	57
Figura 24. Efecto del tolueno, del ciclohexano y del tratamiento con minociclina sobre el aprendizaje y la memoria temporal.....	59
Figura 25. Esquema que resume los principales hallazgos de este trabajo.....	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cuadro comparativo de algunos de los efectos que se producen con la inhalación del tolueno y del ciclohexano.....	7
Tabla 2. Definiciones de los principales términos electrofisiológicos que describen a las propiedades pasivas de la membrana.....	13
Tabla 3. Definiciones de los principales términos electrofisiológicos que describen a las propiedades activas de la membrana.....	14
Tabla 4. Principales citocinas del sistema inmune.....	22
Tabla 5. Mecanismo de acción de la minociclina.....	25
Tabla 6. Anticuerpos para la técnica de inmunofluorescencia.....	33
Tabla 7. Parámetros del PA.....	43

ABREVIATURAS

5-HT _{2A/B}	Receptores de 5-hidroxitriptamina acoplados a proteínas Gq
5-HT ₃	Receptores de 5-hidroxitriptamina ionotrópico de Na ⁺ y K ⁺
5-HT ₄	Receptores de 5-hidroxitriptamina acoplados a proteínas Gs
ABC	Área bajo la curva
AD	Disparo adaptativo
AKT	Proteína cinasa B
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
ANOVA	Análisis de la varianza
ARNm	Ácido Ribonucléico mensajero
ASE	Actividad Sináptica Espontánea
ATP	Trifosfato de adenosina
BK	Canales de gran conductancia de potasio (Big Potassium)
C1q	Uno de los factores del complemento
Ca ²⁺	Calcio
CaCl ₂	Cloruro de calcio
CO	Corteza orbito motora
CO ₂	Dióxido de carbono
CPF	Corteza prefrontal
CPFm	Corteza prefrontal medial
CYP2E1	Citocromo p450 2E1
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daño
DR	Disparo regular
E.E	Error estándar

EPSCs	Corrientes excitadoras post sinápticas
EPSP	Potencial excitador post sináptico
EROs	Especies reactivas de oxígeno
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GABA _A	Receptor ionotrópico tipo A de ácido γ -aminobutírico
GFAP	Proteína acidica fibrilar glial
I _{AHP}	Corriente post hiperpolarizante
Iba-1	Molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1
IL-1 β	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IPSCs	Corrientes inhibitoras post sinápticas
IPSP	Potencial inhibitor post sináptico
I-V	relación corriente –voltaje
K ⁺	Potasio
KCl	Cloruro de potasio
Kv	Canales de potasio dependientes de voltaje
LCRa	Líquido cefalorraquídeo artificial
LPS	Lipopolisacárido bacteriano
LTD	Depresión a largo plazo
LTP	Potenciación a largo plazo
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
MMP	metaloproteasas de matriz
N2B	Subunidad del receptor NMDA
NA ⁺	Sodio
NaCl	Cloruro de sodio

NaH ₂ PO ₄	Bifosfato de sodio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NIH	National Institute of Health
NMDA	N-metil-D-aspartato
NOD	Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors
O ₂	Oxígeno
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
PA	Potencial de acción
pA	pico amperios
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PI3K	Proteína cinasa 3-fosfatidilinositol
PL	Prelímbica
PMR	Potencial de membrana en reposo
PN	Días post natales
PTZ	Pentilentetrazol
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RI	Ráfaga intrínseca
R _n	Resistencia de entrada
SK	canales de potasio activados por calcio de pequeña conductancia
SNC	Sistema nervioso central
Tau	Constante de tiempo
TEA	Tetraetilamonio
TGFβ	Factor de crecimiento transformante β

TLR4	Receptor tipo Toll 4
TNF	Factor de necrosis tumoral
TTX	Tetradotoxina

Resumen

El tolueno y el ciclohexano son disolventes que se encuentran en productos industriales utilizados como drogas de abuso por adolescentes. La exposición crónica al tolueno produce déficits cognitivos graves, sin embargo, existen pocos estudios sobre las adaptaciones neuronales en la corteza prefrontal medial (CPFm). El ciclohexano es un disolvente que no tiene efectos conductuales como el tolueno, pese a ello no hay estudios que diluciden sus efectos neuronales. Por otro lado, la neuroinflamación producida por agentes tóxicos contribuye a problemas cognitivos y neuronales. Por ello decidimos estudiar los efectos neuronales y cognitivos de la exposición repetida al tolueno y al ciclohexano, y evaluar la posible relación que existe entre estos efectos con el proceso de neuroinflamación. Ratas Wistar macho fueron expuestas durante 30 min en una cámara de exposición estática, al aire, 8000 ppm de tolueno o ciclohexano dos veces al día, durante 10 días (PN 22 – 35). Otro grupo de animales fue expuesto con el mismo protocolo de tolueno pero también fue administrado diariamente con minociclina (50 mg/kg i.p.), un fármaco inhibidor del proceso de neuroinflamación. Se registraron neuronas piramidales de la capa V de la región PL con la técnica de patch-clamp. Se cuantificó la expresión de IL-1 β y TGF- β (mediadores del proceso de inflamación) mediante la técnica de qPCR. Se evaluó la inmunoreactividad de la microglía y los astrocitos y por último se evaluaron el aprendizaje y la memoria temporal con la prueba de evitación pasiva y reconocimiento de objeto novedoso. En este trabajo encontramos que el tolueno a 8000 ppm altera las propiedades pasivas, la frecuencia de disparo, reduce la I_{AHP} e incrementa la actividad sináptica espontánea. El ciclohexano también tiene efectos sobre la rectificación de la curva IV y la frecuencia de disparo pero no resultan significativos y no modifica ni la I_{AHP}, ni la actividad sináptica espontánea. Además, la exposición repetida al tolueno incrementa la expresión de IL-1 β , la fluorescencia de GFAP e Iba-1 en la región PL de la CPFm, disminuye la latencia de paso en la prueba de evitación pasiva y disminuye el índice de reconocimiento en la prueba de orden temporal. En conclusión, nuestros resultados muestran que la exposición repetida al tolueno aumenta la excitabilidad de las neuronas piramidales de la capa V en CPFm de ratas adolescentes, produce un patrón que indica neuroinflamación y deteriora conductas asociadas a la adecuada función de la CPFm y que la exposición al ciclohexano no tuvo efectos similares al tolueno.

Abstract

Toluene and cyclohexane are solvents found in industrial products that can be intentionally inhaled by adolescents. Chronic exposure to toluene produces severe cognitive deficits; however, there are few studies on neuronal adaptations in the medial prefrontal cortex (mPFC). Cyclohexane is a solvent that does not share a profile of behavioral effects with toluene, suggesting that it has less potential for abuse; despite this there are no studies that elucidate its neuronal effects. On the other hand, neuroinflammation produced by toxic agents such as solvents contributes to cognitive and neuronal problems. Therefore, we decided to study the neuronal and cognitive effects of repeated exposure to toluene and cyclohexane, and to evaluate the possible relationship between these effects with the neuroinflammation process. Individual groups of male Wistar rats were exposed for 30 min in a static exposure chamber, in air, 8000 ppm of toluene or cyclohexane twice a day, for 10 days (PN 22-35). Another group of animals was exposed with the same protocol at 8000 ppm toluene and was administered daily with minocycline (50 mg / kg i.p.) a neuroinflammatory process inhibitor drug. After completing the exposure period, pyramidal neurons from layer V of the PL region were recorded with the patch-clamp technique. The expression of IL-1 β and TGF- β (mediators of the inflammation process) was quantified by the qPCR technique. The immunoreactivity of the microglia and the astrocytes was evaluated and finally the learning and the temporary memory were evaluated with the passive avoidance test and the novel object recognition. In this work we find that toluene at 8000 ppm alters the passive properties, the firing frequency, reduces the IAHP and increases the spontaneous synaptic activity. Cyclohexane also has effects on the rectification of the IV curve and the firing frequency but they are not significant and do not modify the IAHP or the spontaneous synaptic activity. In addition, repeated exposure to toluene increases the expression of IL-1 β , the fluorescence of GFAP and Iba-1 in the PL region of the mPFC, decreases the step latency in the passive avoidance test and decreases the recognition rate in the temporary order test. In conclusion, our results show that repeated exposure to toluene increases the excitability of the pyramidal neurons of layer V in mPFC of adolescent rats produces a pattern that indicates neuroinflammation and impairs behaviors associated with the adequate function of mPFC and that exposure Cyclohexane did not have similar effects to toluene.

Presentación

Este trabajo se centró en comparar los efectos de dos compuestos que se encuentran en productos industriales comerciales que pueden inhalarse intencionalmente con fines de abuso. Los compuestos son el tolueno y el ciclohexano, y los efectos a analizar son los cambios en la excitabilidad intrínseca de las neuronas y la posible neuroinflamación en la corteza prefrontal de ratas adolescentes expuestas a altas concentraciones de estos disolventes por periodos cortos, simulando un patrón de abuso, durante la adolescencia. Para presentar el marco conceptual que lleva al planteamiento del proyecto a continuación se resumen los antecedentes más relevantes de este estudio.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Inhalables

Los inhalables son sustancias volátiles a temperatura ambiente que se usan por la vía de la inhalación para producir un estado de intoxicación o alterado de conciencia. Se pueden agrupar según sus efectos farmacológicos en: a) disolventes y combustibles; b) óxido nitroso y otros gases; y c) nitritos (Balster et al., 2009).

Los disolventes se pueden clasificar a partir de su estructura química. Los hidrocarburos aromáticos formados por un anillo aromático y uno, dos o varios grupos metilo como sustituyentes, son los más utilizados. A este grupo pertenece el metilbenceno o tolueno que es el componente principal de desengrasantes, diluyentes, tintas, pinturas y muchos otros productos comerciales. Existen otros hidrocarburos no aromáticos como el ciclohexano y el n-hexano que también son componentes importantes de pegamentos de calzados y diluyentes, entre otros.

A continuación, se describen algunas de las características fisicoquímicas, así como los efectos conductuales y moleculares de las sustancias volátiles que se utilizaron en el presente estudio.

1.1.1 Tolueno

El tolueno es el más simple de los alquilbencenos; se le llama también metilbenceno o fenilmetano. Es un líquido incoloro e inflamable, poco soluble y menos denso que el agua (Figura 1). Se volatiliza con facilidad y una vez en estado gaseoso, es más denso que el aire (Arlie-Soborg, 1992).

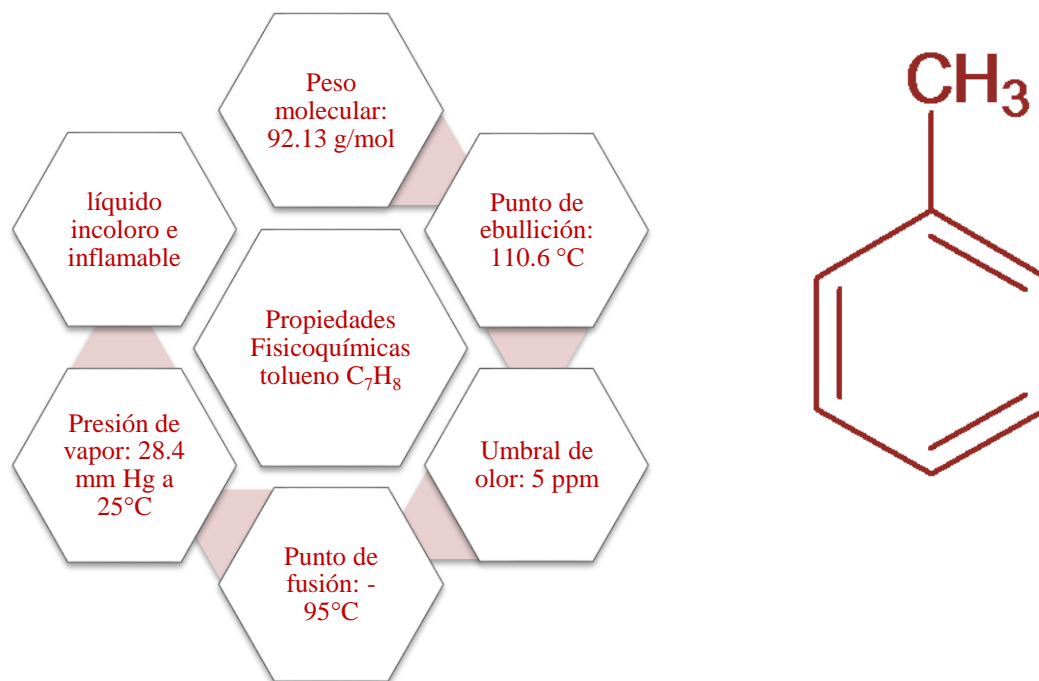


Figura 1. Estructura química y principales propiedades fisicoquímicas del tolueno.

1.1.1.1 Usos

El tolueno es un disolvente de aceites, resinas, caucho, asfalto y brea y diluyente de pinturas, barnices y tintas. Se encuentra en mezclas que se utilizan como productos de limpieza, en distintas industrias, en artesanías, en la oficina y el hogar. Además, es un componente del combustible para aviones y de la gasolina para automóviles (Haley, 1987).

1.1.1.2 Farmacocinética

El tolueno se absorbe en el organismo principalmente a través del tracto respiratorio y, en menor proporción, a través de la piel. Traspasa fácilmente la membrana alveolar. Se distribuye por los distintos tejidos en cantidades variables que dependen de sus características de perfusión y solubilidad. Se metaboliza principalmente por la vía del citocromo P450 2E1 (CYP2E1) en el hígado (Dick, 2006; Smith, 2010).

El ácido hipúrico es el producto más importante de su metabolismo. Representa aproximadamente el 68% del tolueno absorbido y aparece en la orina. La vida media de

eliminación del ácido hipúrico es muy corta, del orden de 1 a 2 horas. La cantidad de tolueno retenida en el organismo depende del porcentaje de grasa del individuo (Arlien-Soborg, 1992).

1.1.1.3 Efectos conductuales

Los efectos del tolueno son similares a los de otros depresores del sistema nervioso central (SNC) tales como el alcohol, los barbitúricos y las benzodiazepinas (Balster et al., 1998). Sin embargo, a diferencia de estos compuestos, el tolueno produce alucinaciones a concentraciones altas. Entre las acciones similares a los de otros depresores del SNC, la administración aguda de tolueno reduce la conducta tipo ansiedad (Bowen et al., 1996; López-Rubalcava et al., 2000) disminuye la coordinación locomotriz a concentraciones altas, deteriora el aprendizaje y la memoria (Bowen et al., 2006; Furlong et al., 2016; Huerta-Rivas et al., 2012) y protege contra las convulsiones producidas por diversos agentes químicos (Cruz et al., 2016). Todos estos efectos se presentan con exposiciones breves (15-30 min) a concentraciones entre 500 y 8000 ppm.

Los efectos observados en la clínica tras la exposición crónica de tolueno en concentraciones altas (de miles de ppm, como a las que se exponen las personas que inhalan intencionalmente) son: ansiedad, depresión, disgregación del pensamiento, pérdida de la memoria, problemas de aprendizaje, rinitis, bronquitis crónica, muerte neuronal, atrofia en tallo cerebral y cerebelar, ensanchamiento de ventrículos cerebrales, neuropatía óptica y del nervio acústico (Cruz et al., 2014; Filley et al., 2004; Fornazzari et al., 2003; White and Proctor, 1997).

La encefalopatía o leucoencefalopatía asociada al abuso crónico de tolueno es un desorden permanente relacionado con daño a la sustancia blanca del cerebro. El deterioro cognitivo y la neuroinflamación son los efectos más evidentes de este síndrome neurotóxico crónico (Filley et al., 2004; Fornazzari et al., 1983).

1.1.1.4 Efectos moleculares

El tolueno es una molécula que afecta diferentes blancos moleculares. Es un antagonista no competitivo de diferentes subtipos del receptor NMDA, en particular del NR1/2B (Cruz et

al., 1998). El tolueno también es un modulador del receptor GABA_A y de los receptores de glicina (Beckstead et al., 2000).

Otros efectos regulados por el tolueno son: el aumento de las corrientes activadas por los receptores 5-HT₃ (Lopreato et al., 2003), el antagonismo de algunos subtipos de receptores nicotínicos (Bale et al., 2002) y el antagonismo de los canales de sodio y de calcio activados por voltaje (Tillar et al., 2002). De estos blancos moleculares, los más sensibles a concentraciones relativamente bajas de tolueno (submilimolares) son los receptores NMDA y GABA_A.

Como sucede con las demás drogas de abuso, el tolueno activa el sistema de recompensa y produce preferencia condicionada de lugar en modelos animales de adicción y liberación de dopamina en el sistema mesolímbico (Beckley and Woodward, 2013; Gerasimov et al., 2003).

Estudios recientes han demostrado que la exposición aguda a tolueno aumenta los niveles tisulares de serotonina y dopamina en diferentes regiones cerebrales, incluida la corteza prefrontal en ratas. (Rivera-García et al., 2015). También se ha reportado que la exposición crónica al tolueno produce adaptaciones celulares tales como un aumento del número de receptores NMDA (de las subunidades NR1 y NR2B) en el hipocampo de ratas (Williams et al., 2005) y en células hipocámpales en cultivo (Bale et al., 2005).

Estudios en neuronas de la corteza prefrontal (CPF) de ratas han revelado que la administración aguda de diferentes concentraciones de tolueno (0.1, 0.3, 1 y 3 mM) inhibe las corrientes postsinápticas excitadoras o EPSCs mediadas por NMDA y aumenta las corrientes postsinápticas inhibitorias o IPSCs mediadas por GABA (Beckley and Woodward, 2011a). Sin embargo, no se han realizado estudios para determinar qué sucede en la CPF de animales expuestos de manera repetida al tolueno.

1.1.2 Ciclohexano

El ciclohexano, también llamado hexahidrobenceno, hexametileno y hexanafteno, se obtiene por la destilación de aceite crudo de petróleo o por hidrogenación de benceno a 150 °C (Figura 2) (Yasugi et al., 1994).

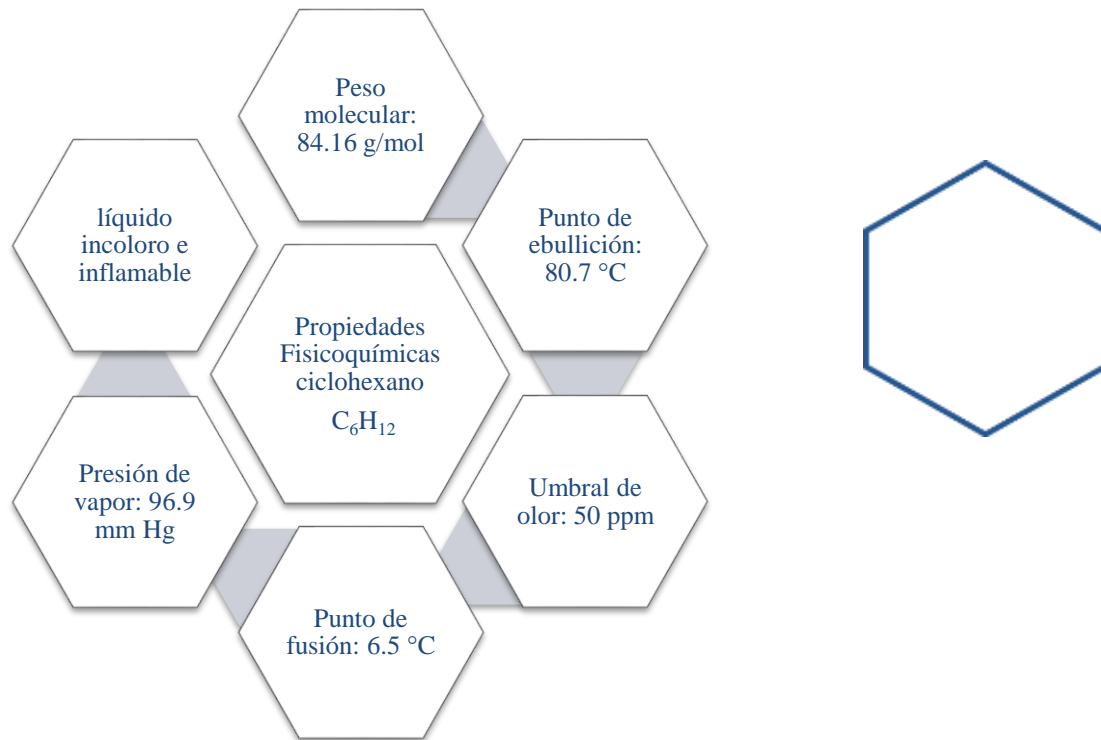


Figura 2. Estructura química y principales propiedades fisicoquímicas del ciclohexano.

1.1.2.1 Usos

El ciclohexano está presente de forma natural en todos los tipos de petróleo crudo. La mayor parte se emplea en la producción de plásticos, con cantidades menores destinadas a su uso como disolvente y como agente químico intermedio. La exposición ocupacional al ciclohexano suele producirse en combinación con otros disolventes. Una mezcla de disolventes que incluye n-hexano y ciclohexano, conocida como “hexano comercial”, es muy utilizada como disolvente en la industria del calzado. La población general puede estar expuesta al ciclohexano debido a que está presente en la gasolina (Yasugi et al., 1994; Yuasa et al., 1996).

1.1.2.2 Farmacocinética

El ciclohexano se absorbe por vía pulmonar, y se exhala, en su mayoría, de inmediato con la respiración. Los productos principales de su metabolismo son derivados hidroxilados que se excretan tras la conjugación con ácidos glucurónicos en la orina. Los metabolitos urinarios incluyen al ciclohexanol y a la ciclohexanona (Luttrell and Lyiza, 2010).

1.1.2.3 Efectos conductuales

Existen pocos estudios de los efectos moleculares del ciclohexano. En un trabajo de nuestro laboratorio en el que se indujeron crisis convulsivas con pentilentetrazol (PTZ), se pudo observar que el tolueno y otros alquilbencenos disminuían las crisis inducidas por PTZ, mientras que el ciclohexano y el hexano carecían de actividad (Cruz et al., 2016), lo cual sugiere la posibilidad de que exista una relación estructura química - actividad biológica y que los compuestos que carecen de un anillo bencénico no actúen como depresores del sistema nervioso central (SNC).

Otro estudio de nuestro laboratorio demostró que la exposición aguda al ciclohexano con concentraciones similares a las que son efectivas para el tolueno, no tuvo efectos en las pruebas de evitación pasiva (aprendizaje), enterramiento defensivo (prueba de efectos tipo ansiolíticos), coordinación motriz, plancha caliente y sensibilidad al choque eléctrico (nocicepción) (Armenta-Reséndiz, tesis de maestría 2013).

Esta evidencia podría ser útil para la fabricación de la variedad de productos que contienen elevados porcentajes de tolueno, ya que el ciclohexano, al no ser un disolvente que ocasione efectos psicoactivos, podría ser sustituyente del tolueno en algunos de estos compuestos. Existe un estudio donde se señala que el ciclohexano tiene un efecto en la activación de la glía y también un efecto deletéreo en el laberinto acuático de Morris (Campos-Ordóñez et al., 2015). Sin embargo, se desconoce si este disolvente es capaz de inducir efectos en las neuronas de la CPFm y en el desempeño de algunas funciones ejecutivas como la memoria de trabajo después de exposiciones repetidas.

Tabla 1. Cuadro comparativo de algunos de los efectos que se producen con la inhalación del tolueno y del ciclohexano

Disolvente	Tolueno	Ciclohexano
Concentración máx. permitida	50 ppm	300 ppm
Metabolismo	CYP2E1	Conjugación
Estrés oxidativo	Sí	No se sabe
Alteraciones conductuales	Sí	No
Principal mecanismo de acción	Antagonista NMDA y Agonista alosterico positivo GABAA	No se sabe
Efectos depresores del SNC	Sí	No
Activación de microglía y astrocitos	Sí en modelos ocupacionales	Sí en exposiciones muy crónicas

1.2 El cerebro adolescente: vulnerabilidad al consumo de drogas

Los principales consumidores de disolventes en varios países del mundo, incluyendo México son adolescentes estudiantes de primaria, secundaria y preparatoria (Hynes-Dowell et al., 2011; Villatoro et al., 2011). El consumo de inhalables se inicia en etapas muy tempranas de la vida, cuando el SNC todavía está en proceso de maduración. La adolescencia es una etapa donde existen conductas de alto riesgo derivadas de un bajo control de impulsos y de una capacidad disminuida en la toma de decisiones, asociadas a los procesos de maduración del cerebro adolescente. Por este motivo la adolescencia es una etapa de mayor vulnerabilidad para el inicio del consumo de drogas (Blakemore, 2008).

En la adolescencia se presentan cambios a nivel endócrino y neurobiológico determinantes para la vida adulta del individuo. Estos cambios incluyen la maduración de sistemas de neurotransmisión, la poda neuronal, el incremento en los niveles hormonales y la maduración de regiones anatómicas cerebrales como la CPF y regiones límbicas (He and Crews, 2007; Spear, 2000). La maduración se alcanza inicialmente en las áreas de

proyección como las relacionadas con el control motor y posteriormente en las áreas asociativas. La corteza prefrontal es una de las últimas regiones en alcanzar su madurez completando el proceso de mielinización de sus proyecciones aferentes y eferentes entre los 21 y 25 años de edad (Lenroot et al., 2009; Spear, 2000). Los cambios en los volúmenes de materia gris y blanca que se observan en la adolescencia se han asociado a la poda de conexiones sinápticas y a la producción de mielina como parte de un refinamiento de las conexiones entre neuronas y células gliales (Casey et al., 2008; Paus et al., 2008). En concreto, tres procesos se llevan a cabo en la transición de la adolescencia a la edad adulta:

a) Proliferación neuronal. Es un proceso de rápido crecimiento de la materia gris, observado principalmente en la fase final de la infancia y principios de la pubertad, donde tiene lugar la formación de nuevas conexiones neuronales.

b) Poda neuronal o maduración de la materia gris. Es un proceso que determina la permanencia de conexiones sinápticas a través de un refinamiento que consiste en podar o eliminar sinapsis que no serán necesarias para la vida adulta del individuo, lo cual da como resultado una disminución neta del volumen de la materia gris. La poda está fuertemente influenciada por la experiencia y esto hace que el cerebro de los adolescentes resulte extremadamente versátil y capaz de realizar cambios en función de las demandas del entorno (Blakemore, 2008).

c) Mielinización. En la adolescencia se produce una mielinización progresiva de axones que produce incrementos en el volumen de la sustancia blanca, cuya función es acelerar el flujo de información y la velocidad global de procesamiento de la información en el cerebro. En todos estos procesos participan activamente el sistema inmune y las células gliales como la microglía, los astrocitos y los oligodendrocitos (Casey et al., 2008; Spear, 2000).

Los cambios en la adolescencia en el cerebro no sólo incluyen modificaciones en la sustancia blanca y la sustancia gris, sino también en los sistemas de neurotransmisión. Este proceso de reducción y refinamiento de circuitos neuronales en la CPF se manifiesta con la pérdida de sinapsis, especialmente excitadoras glutamatérgicas y con el incremento de la actividad dopaminérgica y serotoninérgica. En el estriado y núcleo accumbens, se ha visto una sobreproducción de receptores dopaminérgicos (Guerri and Pascual, 2010).

Los adolescentes que consumen sustancias de abuso son particularmente vulnerables a diversas alteraciones en el funcionamiento del cerebro, la cognición y el comportamiento. Existe evidencia de que el consumo de drogas en la adolescencia, como el alcohol, interfiere con la maduración de la CPF (He and Crews, 2007; Medina-Mora and Real, 2008; María Pascual et al., 2014; Ward et al., 2014). Estudios en humanos adolescentes muestran que, tras el consumo de alcohol crónico, hay disminuciones en el funcionamiento neurocognitivo, especialmente en la atención, el funcionamiento visoespacial y el aprendizaje (Meruelo et al., 2017); hay también cambios morfológicos, disminución de la sustancia blanca y alteraciones en la neurotransmisión (María Pascual et al., 2014; Pascual et al., 2010). El alcohol y el tolueno comparten varios mecanismos de acción pues ambos son antagonistas del receptor NMDA y moduladores alostéricos positivos del receptor GABA_A. El tolueno, al igual que el alcohol, deteriora el aprendizaje y la memoria en roedores adolescentes (Baydas et al., 2003; Huerta-Rivas et al., 2012; Montes et al., 2017; Win-Shwe and Fujimaki, 2012), sin embargo, existen pocas evidencias de sus efectos directos en la corteza prefrontal en proceso de maduración.

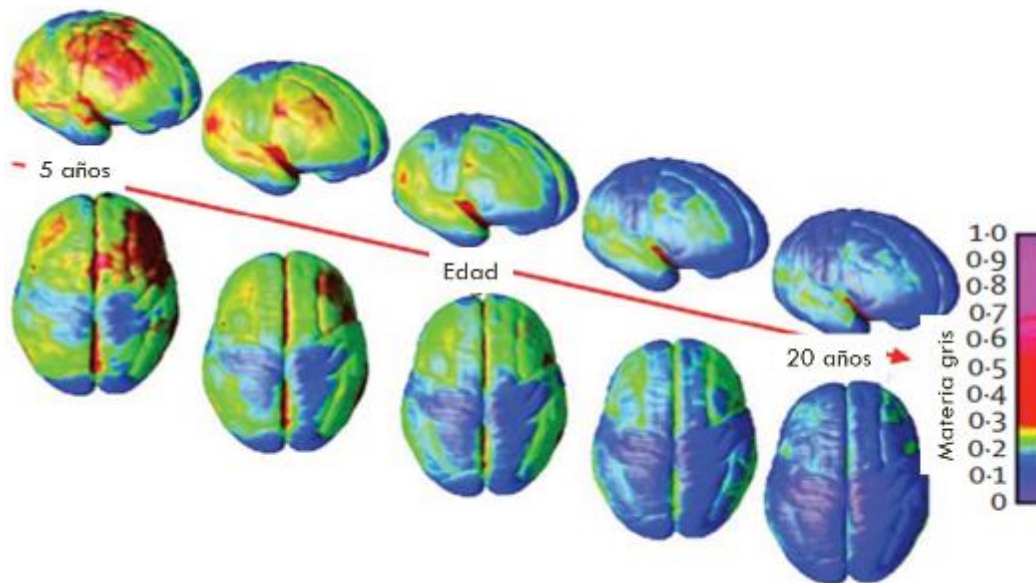


Figura 3. Maduración de la corteza prefrontal. La densidad de la materia gris disminuye durante la adolescencia y la adultez temprana en un patrón de atrás hacia adelante en relación con la maduración del cerebro y de la poda de las conexiones neurales. Las regiones en azul, son las que han alcanzado la maduración (Paus et al., 2008).

1.2.1 La corteza prefrontal

La CPF participa en la integración e interpretación de estímulos desde las estructuras corticales y subcorticales (Abernathy et al., 2010). Su definición está basada en criterios conectivo-funcionales y corresponde al área cortical que recibe proyecciones del núcleo medial dorsal del tálamo (Uylings et al., 2003). Está relacionada con procesos de planeación, memoria de trabajo, toma de decisiones, flexibilidad cognitiva, inhibición de impulsos y evaluación del riesgo (Casey et al., 2008, 1997; Diamond et al., 2002; Konishi et al., 2002).

La CPF recibe aferencias serotoninérgicas del núcleo dorsal del rafé, aferencias noradrenérgicas del locus coeruleus y dopaminérgicas y GABAérgicas del área tegmental ventral y del núcleo accumbens. Las funciones de esta región están reguladas por la interacción dinámica de la red ejecutiva y la red límbica. La primera equivale a la corteza prefrontal medial (CPFm) en roedores; y la segunda, a la corteza orbitofrontal (CO) en mamíferos (Sturman and Moghaddam, 2011).

La CPF está organizada en láminas o capas que van de la I a la VI, y su población neuronal la conforman neuronas piramidales e interneuronas gabaérgicas y colinérgicas. Las neuronas piramidales glutamatérgicas representan aproximadamente el 80% de la población neuronal de la CPF. Estas neuronas hacen conexión con interneuronas gabaérgicas y con piramidales de áreas subcorticales (Abernathy et al., 2010). En general, las neuronas piramidales han sido catalogadas por su tipo de disparo en tres clases: neuronas de disparo regular (DR), neuronas de ráfagas intrínsecas (RI) (Elston et al., 2005) y neuronas con un patrón adaptativo de disparo (AD) (Satake et al., 2008). Los somas de estas neuronas se encuentran principalmente en las capas III y V. Nuestro trabajo se centró en determinar los cambios producidos por el tolueno y el ciclohexano en las propiedades pasivas y activas de las neuronas piramidales localizadas en la capa V de la CPFm. Estas neuronas son particularmente importantes para la planificación, la atención, la memoria de trabajo y otras respuestas cognitivas, ya que coordinan y dirigen la producción de información a otras regiones corticales, así como al estriado dorsal y ventral (Euston et al., 2012; Uylings et al., 2003).

1.2.2. Propiedades intrínsecas de las neuronas

El término "propiedades eléctricas intrínsecas" o "excitabilidad intrínseca" se ha utilizado para abarcar tanto las propiedades pasivas de la membrana como las activas. La excitabilidad intrínseca es un determinante importante de la capacidad neuronal de traducir la entrada sináptica en un PA, desempeñando así un papel crítico en la transmisión de información de la red neuronal (Schulz, 2006). La excitabilidad intrínseca puede experimentar modificaciones dependientes de la experiencia, del aprendizaje, de la estimulación eléctrica (Cudmore and Turrigiano, 2004; Daoudal and Debanne, 2003a; S Kourrich et al., 2015a) y de la presencia de sustancias químicas. Algunas modificaciones pueden estar mediadas por efectos sobre diversos canales dependientes de voltaje y por canales dependientes de Ca^{2+} en la membrana celular, tales como los canales de K^+ activados por Ca^{2+} , que subyacen a la fase de hiperpolarización y determinan la frecuencia de disparo, así como los canales catiónicos activados por la hiperpolarización y modulados por nucleótidos cíclicos (Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated o HCN) (Daoudal and Debanne, 2003b; Saïd Kourrich et al., 2015; Satake et al., 2008).

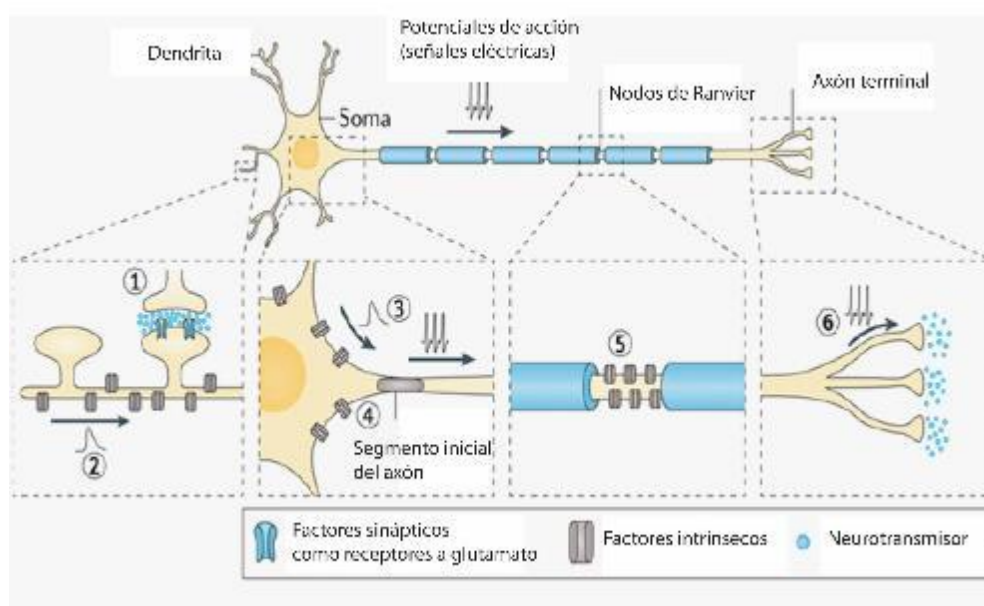


Figura 4. Propiedades intrínsecas de la membrana. (1). Se recibe una señal por una neurona a través de neurotransmisores, (2). Se genera un potencial postsináptico excitador (EPSP) influenciado por factores intrínsecos (como los canales iónicos de voltaje, K^+ , Na^+ y Ca^{2+}) a medida que se desplaza

a lo largo de la dendrita (3) y (4). Llega al soma, a la colina axonal, y al segmento inicial del axón que es un compartimento rico en canales de Na^+ . (5). Si un EPSP es lo suficientemente fuerte como para despolarizar la membrana al umbral del PA, entonces se generan PA que serán influenciados por factores intrínsecos, por ejemplo los localizados en los nodos de Ranvier. (6). EL PA viaja a lo largo del axón hasta alcanzar la terminal del axón donde produce la liberación del neurotransmisor. La modulación de la función del canal iónico en cualquiera de estos pasos puede dar lugar a la plasticidad de la excitabilidad intrínseca, y por lo tanto, alterar la generación o la conducción de los potenciales de acción. La figura se obtuvo de (S Kourrich et al., 2015b).

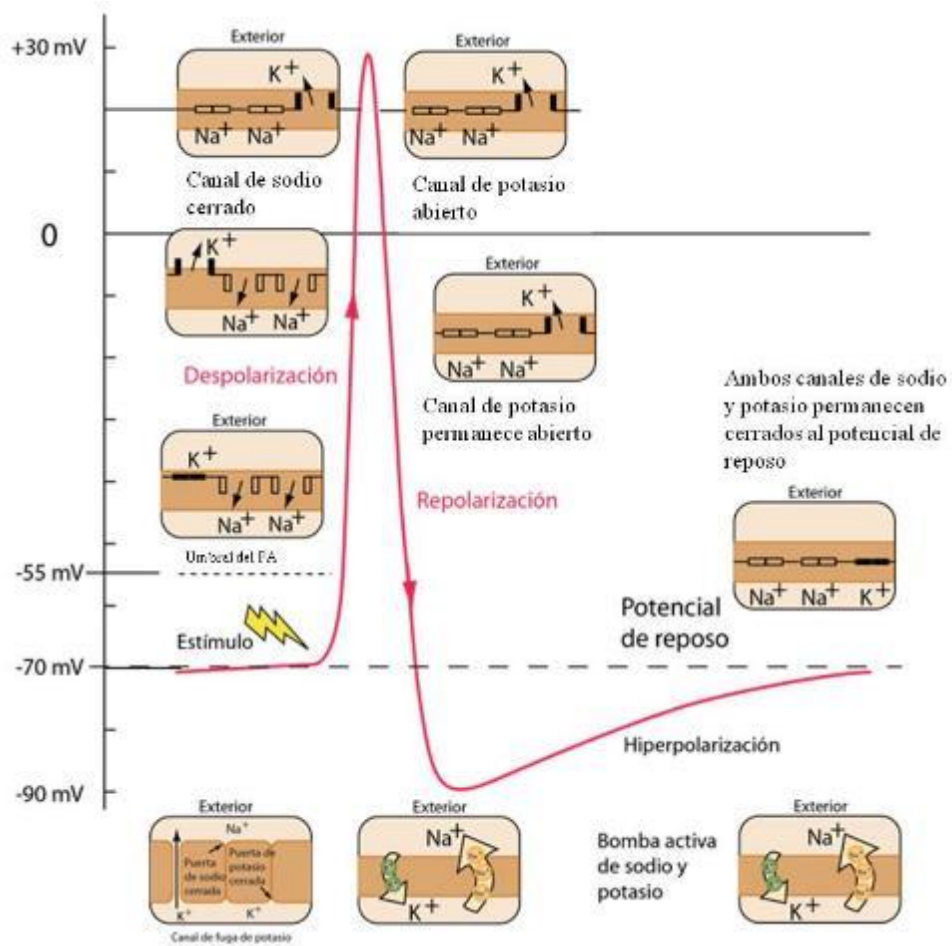


Figura 5. Esquema de las fases del PA. Fuente de la imagen: <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu> Georgia State University.

1.2.2.1 Propiedades pasivas de la membrana

Las propiedades pasivas de la membrana son las que determinan el tiempo y la amplitud del cambio de potencial sináptico generado por una corriente sináptica. Las propiedades pasivas son determinantes para que un potencial sináptico generado en una dendrita induzca una despolarización subliminar en la zona de descarga del cono axónico. Las propiedades pasivas influyen en la velocidad con la que se puede conducir un potencial de acción (Kandel et al., 1991). Las neuronas tienen tres propiedades eléctricas pasivas que son importantes para la transmisión de señales eléctricas: la resistencia de la membrana en reposo, la capacitancia de la membrana y la resistencia a lo largo de los axones y las dendritas (Cole et al., 1970; Kandel et al., 1991). La Tabla 1 resume algunos conceptos asociados con las propiedades pasivas de la membrana.

Tabla 2. Definiciones de los principales términos electrofisiológicos que describen a las propiedades pasivas de la membrana

Término	Definición	Unidades
<i>Capacitor</i>	Es un elemento de un circuito eléctrico que puede separar cargas.	
<i>Capacitancia (C)</i>	Es una medida de la cantidad de energía eléctrica almacenada por una diferencia de cargas.	Faradios (F)
<i>Resistencia (r)</i>	Es un elemento de un circuito eléctrico que determina la dificultad con la que se mueven las cargas eléctricas en un conductor.	Ohm (Ω)
<i>Conductancia g</i>	Es el inverso de la resistencia (1/r). Indica la facilidad con la que se mueven los iones a través de un conductor (canal iónico).	Siemens (s)
<i>Resistencia de entrada Ri</i>	Es la relación entre la corriente y el voltaje. Determina la magnitud de la despolarización en respuesta a una corriente constante.	Ohm (Ω)

<i>Potencial de membrana V</i>	Es la diferencia de potencial que existe entre el interior y el exterior de una célula. Es el valor de potencial de la membrana dada principalmente por distribución pasiva del ión potasio.	Voltios (V)
<i>Potencial de membrana en reposo</i>		
<i>Tau o constante de tiempo</i>	Es el tiempo necesario para alcanzar el 63% del voltaje final.	Segundos (s)
<i>Potenciales electrotónicos</i>	Cambios del potencial de membrana que no provocan la generación de potenciales de acción y se comportan como potenciales graduados que disminuyen en el tiempo y la distancia.	

1.2.2.2 Propiedades activas de la membrana

Las propiedades activas de la membrana otorgan a las células la capacidad de integrar estímulos entrantes, disparar o mantener oscilaciones sub-umbrales en ausencia de entradas sinápticas. Con ello, las células son capaces de disparar, aumentar su frecuencia de disparo con la fuerza derivada de un estímulo o por la acción de los neuromoduladores más que únicamente tener una relación de entrada-salida clásica (Binder et al., 1993; Kandel et al., 1991). En la siguiente tabla se puntualizan algunas propiedades activas.

Tabla 3. Definiciones de los principales términos electrofisiológicos que describen a las propiedades activas de la membrana.

Término	Definición	Unidades
<i>Umbral de disparo del potencial de acción</i>	Es el voltaje al cual se activan canales iónicos que generan un flujo de iones capaz de producir un cambio en el voltaje de la membrana denominado potencial de acción, que es una respuesta de tipo todo o nada. En la mayoría de las células corresponde al umbral de activación de los canales de sodio dependientes de voltaje.	mV
<i>Corriente I</i>	Es el flujo neto de cargas que atraviesa un conductor durante una unidad de tiempo determinada.	Amperios.

<i>Excitabilidad</i>	Capacidad de una célula de producir cambios en el potencial de membrana y en algunos casos, generar potenciales de acción.	
<i>Potencial de inversión</i>	El potencial en el que la corriente es igual a cero.	mV
<i>Despolarización</i>	Reducción de la separación de carga a través de la membrana que da lugar a un potencial de membrana menos negativo.	
<i>Hiperpolarización</i>	Aumento de la separación de carga a través de la membrana que induce un potencial de membrana más negativo.	
<i>Periodo refractario</i>	Tiempo en el cual no se puede generar el disparo de otro PA porque los canales de Na ⁺ están en estado inactivado.	ms

1.3 Neuroinflamación: comunicación entre las células gliales y las neuronas

La comunicación entre las neuronas y las células gliales está implicada en múltiples procesos celulares y moleculares para facilitar la formación y función correcta de circuitos neuronales. Existen estudios que demuestran que hay una relación entre la activación de las células del sistema inmune residente en el SNC, como la microglía, y la presencia de desórdenes psiquiátricos y cognitivos (Bilbo et al., 2012; Eyo et al., 2017; Hernandez-Rabaza et al., 2016; Pascual et al., 2012; Villegas-Llerena et al., 2015). En el caso de la adolescencia, la adecuada convergencia entre las señales inmunes y neuronales a lo largo del proceso de maduración de la CPF tiene consecuencias importantes para el establecimiento del circuito neuronal maduro que subyace a algunas funciones cognitivas y conductuales críticas para la etapa adulta (Staci D. Bilbo et al., 2012; Grassi-Oliveira et al., 2016).

La neuroglía desempeña un papel muy importante en la comunicación neuronal, la microglía y los astrocitos son dos de las principales células gliales que modulan de manera directa e indirecta las sinapsis, la homeostasis, el metabolismo, el flujo sanguíneo, la

neurotransmisión y la gliotransmisión. Estas mismas células son capaces de activarse y facilitar en el SNC un estado de neuroinflamación (Frick et al., 2013; von Bernhardt et al., 2016).

La neuroinflamación es un proceso donde el sistema inmune participa promoviendo la eliminación de patógenos o de tejido dañado que liberan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), o patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) en respuesta a una infección o a algún evento que afecta la integridad tisular en el SNC. Diversas células del sistema inmune innato llegan al sitio donde ocurre el daño y liberan moduladores como las citocinas y las quimiocinas que desencadenan la inflamación. Se ha establecido una relación importante entre la neuroinflamación y la neurotransmisión. Existen reportes que asocian al proceso inflamatorio con el deterioro cognitivo en trastornos psiquiátricos, daño cerebral, hipoxia, y dependencia a sustancias, entre otros trastornos. (Capuron and Miller, 2011; Herrera et al., 2015; María Pascual et al., 2014; Prinz and Priller, 2014). A continuación, se describen las principales células y moléculas que participan en el proceso de neuroinflamación y su relación con las alteraciones neuronales.

1.3.1 Astrocitos

Los astrocitos son las células gliales más abundantes en el SNC, interactúan con neuronas, vasos sanguíneos y otras estructuras del SNC. Los astrocitos son responsables de una amplia variedad de funciones complejas y esenciales en el SNC sano, incluyendo la modulación de la transmisión sináptica y participación activa en las funciones del circuito neuronal que desembocan en el procesamiento de la información adecuada (Sofroniew and Vinters, 2010; von Bernhardt et al., 2016).

Los astrocitos influyen en la poda sináptica liberando señales que liberan moléculas que sirven como guía para los axones en crecimiento, como la tenascina C y proteoglicanos. Otra de las funciones de los astrocitos es inducir la expresión de la proteína C1q en las sinapsis, marcándolas para su eliminación por medio de la microglía. Además, inducen desmielinización por la pérdida o disfunción de las conexinas astrocíticas y por alteraciones en las uniones comunicantes entre astrocitos. Los astrocitos participan también en la transmisión sináptica removiendo el potasio extracelular y algunos neurotransmisores como

el glutamato (Sofroniew and Vinters, 2010). Por otro lado, los astrocitos producen y liberan diversos mediadores moleculares, como las prostaglandinas, el óxido nítrico y el ácido araquidónico, que pueden aumentar o disminuir el diámetro de los vasos sanguíneos del CNS y el flujo sanguíneo, de manera coordinada (Dringen, 2000). Otra de las funciones importantes de los astrocitos es que forman parte de la barrera hematoencefálica gracias a que sus pies rodean a los pericitos que cubren a las células endoteliales y a las uniones estrechas entre ellas (Sofroniew and Vinters, 2010).

La hipótesis de la "sinapsis tripartita" postula que los astrocitos interactúan con las neuronas durante la actividad sináptica de una manera esencial para el procesamiento de la información por circuitos neuronales. Sin embargo, cuando existe un insulto, daño o patógeno que activa de manera aberrante la actividad de los astrocitos se presenta el fenómeno conocido como astrogliosis reactiva. Ésta se refiere a los cambios moleculares, celulares y funcionales en astrocitos que se producen en respuesta a todas las formas y gravedad de lesión y enfermedad del SNC, incluyendo perturbaciones sutiles (Sofroniew and Vinters, 2010). Los cambios experimentados por los astrocitos reactivos varían con la gravedad del insulto y se presentan alteraciones progresivas en la expresión molecular, hipertrofia celular progresiva y en casos severos, proliferación y formación de cicatrices. Los cambios que se presentan en la astrogliosis reactiva están regulados de forma específica por el contexto mediante señalización inter e intracelular y pueden alterar las actividades de los astrocitos tanto a través de la ganancia como de la pérdida de funciones, afectando a las células neurales y no neuronales circundantes (Sofroniew and Vinters, 2010) .

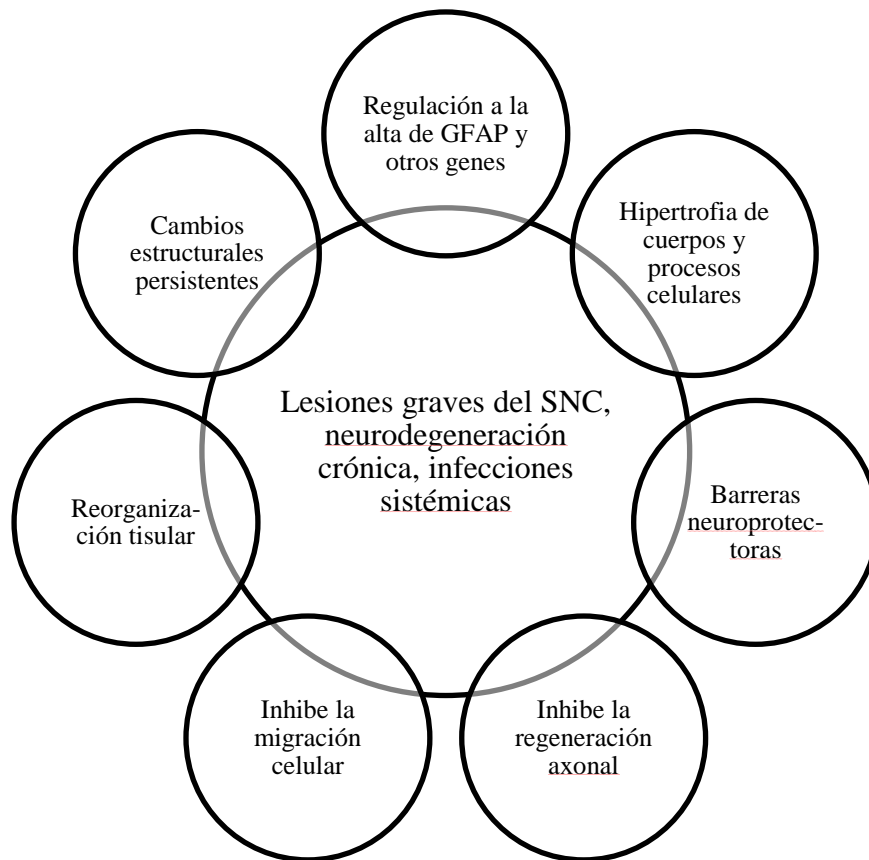


Figura 6. Cambios que se presentan en la astrogliosis reactiva después de lesiones graves en el SNC, trastornos neurodegenerativos e infecciones sistémicas.

1.3.2. Microglía

La microglía está constituida por los macrófagos residentes en el tejido cerebral, y sirven tanto para funciones relacionadas con el sistema inmune como en el desarrollo y la homeostasis del cerebro (Burke et al., 2016). Los macrófagos residentes en los tejidos constituyen una población heterogénea de células inmunitarias que comparten un origen mieloide común pero que tienen morfologías y funciones distintas (Casano and Peri, 2015; Graeber and Streit, 2010; Li and Zhang, 2016).

Las células microgliales son de linaje mesodérmico (similares a otras células inmunitarias) y colonizan el cerebro de los roedores alrededor del día embrionario E9-10 a través de la infiltración de precursores primitivos de macrófagos del saco vitelino del embrión (Casano and Peri, 2015; Chan et al., 2007; Ginhoux et al., 2013). La microglía en el cerebro en

desarrollo tiene una morfología especialmente redonda, coherente con su papel como macrófagos (Male and Rezaie, 2001). Sin embargo, una vez maduras, estas células cambian su morfología y su función hasta tener una forma caracterizada por un cuerpo celular más pequeño con procesos más largos y finos (Ekdahl, 2012). A pesar de ello, la microglía dentro de ciertas regiones del cerebro adolescente continúa mostrando lo que parece ser una morfología más "activada" o inmadura, con gruesas ramas, lo que sugiere que en ciertas regiones cerebrales tanto las neuronas como las células de la glía continúan su proceso de maduración (Bilbo et al., 2012).

Desarrollo de la microglía en el hipocampo y en la corteza de roedores

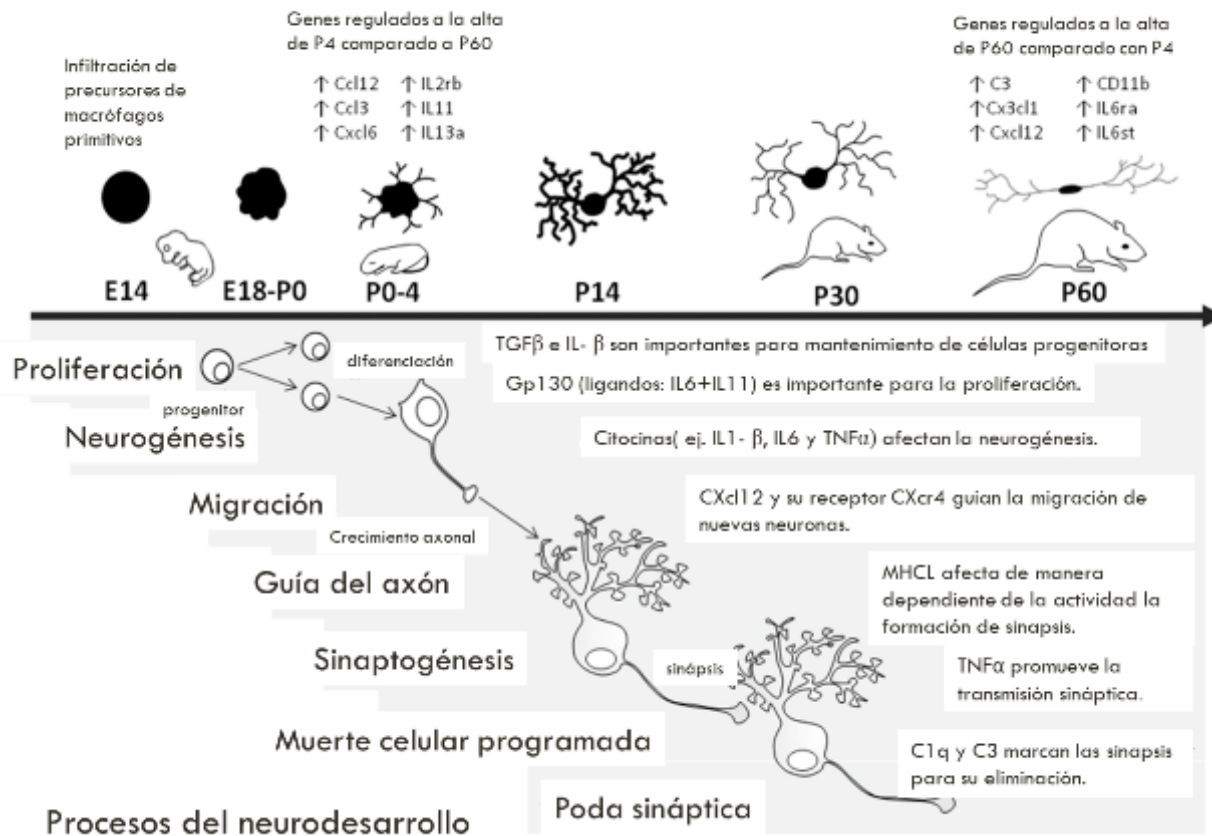


Figura 7. Desarrollo de la microglía de roedores en regiones como hipocampo y corteza. Figura modificada de (Bilbo et al., 2012).

Las células de microglía tienen diferentes funciones dentro del SNC. Como macrófagos, eliminan células apoptóticas y patógenos. La microglía también participa de manera activa en el desarrollo determinando procesos como la supervivencia neuronal y el crecimiento axonal. Estas células exploran continuamente el parénquima cerebral con sus procesos móviles, pueden recibir señales atrayentes y regular procesos de la poda sináptica, pues son las células encargadas de fagocitar y eliminar algunas sinapsis marcadas previamente por moléculas como la C1q (Casano and Peri, 2015; Graeber and Streit, 2010; Qi et al., 2016).

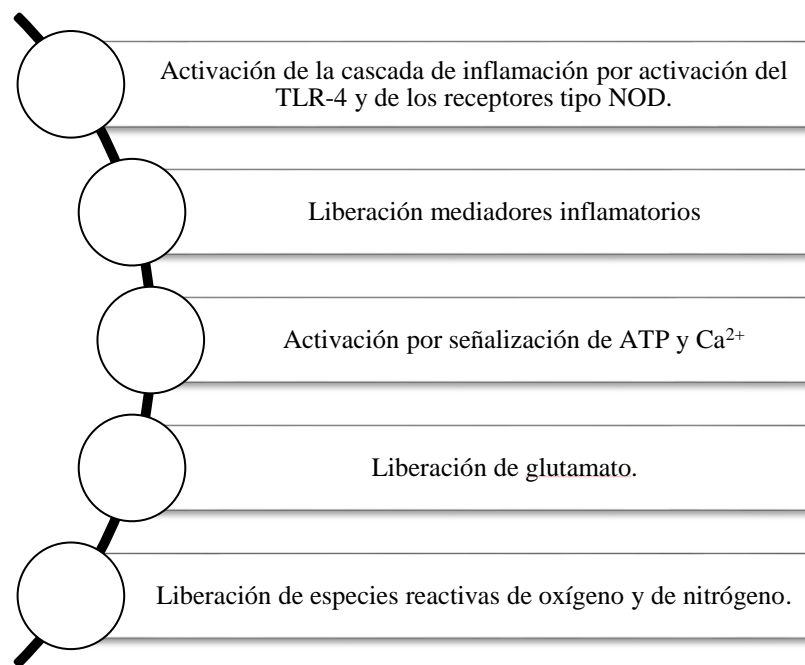


Figura 8. Funciones inmunológicas generales de la microglía

Las células de la microglía son células inmunocompetentes que originalmente se describieron anatómicamente como poseedoras de una morfología altamente ramificada y que podían cambiar a una morfología ameboides, cuyos cambios dependían de estados no patológicos a activados o patológicos, respectivamente (Leong and Ling, 1992; Macht, 2016). Desde entonces, la comprensión de los cambios morfológicos microgliales y de las funciones fisiológicas ha evolucionado sustancialmente. En la actualidad, se han

identificado tres fenotipos de microglía: M0, M1 y M2 (Franco and Fernandez-Suarez, 2015).

- M0, presentan una morfología ramificada y son características del cerebro adulto sano. Se les conoce como microglía “en reposo” (Casano and Peri, 2015).
- M1 o activación clásica, células con morfología ameboides, se caracterizan principalmente por la producción de citocinas pro-inflamatorias, así como altos niveles de lisosomas que permiten la fagocitosis.
- M2 o activación alternativa, se asocian fisiológicamente con la reparación tisular y/o la producción de citocinas antiinflamatorias. Morfológicamente, las células M2 tienden a mostrar hiper-ramificación (Cherry et al., 2014; Li and Zhang, 2016).

Otra de las funciones importantes de la microglía es la interacción neurona-glía ya que la microglía participa en la regulación de glutamato extracelular y directamente en las sinapsis.

Entre la microglía y los astrocitos hay comunicación bidireccional, principalmente a través de la señalización de ATP y los receptores purinérgicos. La microglía induce un reclutamiento de astrocitos que puede potenciar la señalización glutamatérgica (Pascual et al., 2012). La mayoría de los estudios relacionados con la microglía y la comunicación con astrocitos se centran en estados proinflamatorios que son relevantes para la infección, las enfermedades, los traumatismos y las patologías (Burke et al., 2016; Pascual et al., 2012).

1.3.3. Mediadores inflamatorios

Las citocinas son polipéptidos producidos en respuesta a microorganismos y otros antígenos que median y regulan las reacciones inmunitarias e inflamatorias. Participan en procesos de crecimiento y maduración de los diferentes tipos celulares involucrados en el proceso inflamatorio. Las quimiocinas, por otro lado, son proteínas que se encargan de enviar señales a las células del sistema inmune para atraerlas al sitio afectado. Algunas de las principales citocinas se describen en la Tabla 3 y la información fue tomada del libro de Abbas .

Tabla 4. Principales citocinas del sistema inmune

Citocina	Funciones	Señalización	Células secretoras
<i>IL-1β</i>	Proinflamatoria. Se libera en respuesta a LPS. Estimula la secreción de quimiocinas. Activa células endoteliales y neutrófilos.	La unión de IL-1 β al receptor de interleucina 1 tipo I activa a la cinasa asociada al receptor de IL-1 (IRAK) y finalmente a los factores de transcripción NF-kB y AP-1.	Macrófagos, células endoteliales, células epiteliales, células gliales
<i>TNF</i>	Proinflamatoria. Se libera en respuesta a LPS. Estimula la secreción de quimiocinas. Activa células endoteliales y neutrófilos.	Se une a su receptor TNF-RI e induce activación de caspasas y apoptosis. Se une a TNF-RII y provoca la atracción de proteínas denominadas factores asociados al receptor TNF (TRAF) hacia los dominios citoplasmáticos de los receptores. Los TRAF activan NF-kB y AP-1 y se induce liberación de citocinas.	Macrófagos, linfocitos T, linfocitos NK y células cebadas, células gliales
<i>TGF-β</i>	Anti-inflamatoria. Inhibe la proliferación y funciones efectoras de linfocitos T y B y de macrófagos.	Se une a los receptores tipos I y II envían señales a través de un dominio serina/treonina cinasa que fosforila factores de transcripción denominados SMAD.	Macrófagos, linfocitos T, células cebadas, células gliales
<i>IL-10</i>	Anti-inflamatoria. Inhibe la síntesis de IL-12. Inhibe a los macrófagos y las células dendríticas activadas.	Se une al receptor de citocinas tipo II. Se produce por macrófagos activados para inhibir sus funciones. Retroalimentación negativa.	Macrófagos, linfocitos T, algunos tipos celulares no linfocíticos, células gliales

La **IL-1** es mediadora de la respuesta inflamatoria aguda causada por bacterias Gram negativas u otros microorganismos infecciosos y también se libera por otros estímulos como el daño celular (Abbas, 2006).

El factor de crecimiento transformador beta o **TGF- β** inhibe la proliferación, diferenciación y activación de linfocitos T y la activación de los macrófagos. Actúa en gran medida para contrarrestar los efectos de las citocinas proinflamatorias.

Las citocinas proinflamatorias en el SNC son liberadas por células del sistema inmune residentes como la microglía, también los astrocitos son capaces de liberar citocinas y los macrófagos que se encuentran cercanos a la barrera hematoencefálica (Prinz and Priller, 2014).

La comunicación neuroinmune es compleja. Las citocinas pueden alterar la actividad o liberación de neurotransmisores. Por ejemplo, la exposición aguda a citocinas liberadas tras un estímulo como la administración de lipopolisacárido bacteriano (LPS) modifica la concentración de serotonina en diversas regiones cerebrales (Capuron and Miller, 2011). También se ha reportado que la serotonina modula la liberación de exosomas que contienen mediadores inflamatorios a través de la activación de receptores serotoninérgicos 5-HT_{2A/B} y 5-HT₄ que se encuentran en la superficie microglial (Glebov et al., 2015).

Las citocinas también regulan la síntesis y recaptura de la dopamina, estimulan la liberación de glutamato de células gliales e inhiben su recaptura con mecanismos como la regulación a la baja de los transportadores de glutamato (Kitagami et al., 2003; Schafers and Sorkin, 2008).

1.3.4. Neuroinflamación y disolventes

Existe una relación entre el consumo de diversas sustancias de abuso y procesos neuroinflamatorios (Marshall et al., 2013; Pascual et al., 2014; Ray et al., 2014; Win-Shwe et al., 2010). En el caso particular del tolueno, la exposición a concentraciones bajas de por tiempos prolongados, que simulan una exposición de tipo ocupacional, (9 ó 90 ppm, 30 min/día, durante 3 días y 1 vez por semana/4 sem) produce un incremento en el hipocampo del ARNm del receptor TLR4, TNF y NF- κ B, así como del ARNm de un marcador de la

activación de astrocitos (la proteína ácida fibrilar de la glía o GFAP) y de un marcador de la activación de la microglía (la proteína adaptadora que une calcio ionizado o Iba-1) (Win-Shwe et al., 2011; Win-Shwe et al., 2012). De acuerdo con otro estudio, la administración repetida de tolueno a concentraciones más altas (1500 ppm por 4 horas/7 días) aumenta la expresión de ARNm de citocinas como TNF, TGF- β , y marcadores de glía como GFAP en el cerebelo de rata (Gotohda et al., 2000). Sin embargo, hasta el momento no hay reportes lo que sucede en la CPFm con administraciones prolongadas y con concentraciones elevadas para mimetizar exposiciones tipo abuso. Por otra parte, el ciclohexano ha sido muy poco estudiado en general y en particular en lo referente a procesos neuroinflamatorios.

1.3.5. La minociclina: inhibidor del proceso de neuroinflamación

La minociclina es un antibiótico con propiedades antiinflamatorias que ha sido probado como coadyuvante en la terapia farmacológica de la esquizofrenia, además de otras patologías psiquiátricas y cognitivas, donde la neuroinflamación participa como un potenciador del deterioro (Capuron and Miller, 2011; Dean et al., 2012; Henry et al., 2008). Este fármaco es un potente inhibidor de la activación de la vía transduccional del factor nuclear NF- κ B (Mattei et al., 2014). Se han propuesto varios mecanismos por los cuales ejerce su efecto neuroprotector como: A) la inhibición de la expresión y actividad de las metaloproteasas de matriz membranal, (Jordán et al., 2006). B) Interfiere con la producción de especies reactivas de oxígeno. C) Activa la vía de señalización PKI3/AKT. D) Bloquea la activación de p38 MAPK (Tikka and Koistinaho, 2001; Zhu et al., 2002). E) Bloquea la translocación al núcleo de NF-KB y por lo tanto la síntesis de proteínas.

Estudios *in vitro* han demostrado que la minociclina (50 mg/kg i.p) protege del daño neuronal a animales sometidos a modelos que reproducen el consumo intermitente de alcohol (Agrawal et al., 2011). En modelos animales de adicción, la minociclina ha mostrado efectos conductuales favorables al promover la disminución de consumo de etanol en ratas. Sin embargo, este fármaco no ha sido probado en animales expuestos a disolventes y consideramos interesante evaluarlo por el papel protector que podría tener frente a los efectos del tolueno.

Tabla 5. Mecanismo de acción de la minociclina

Mecanismo de acción	Efectos	Neuroprotección
<i>Unión a la subunidad ribosomal 30S</i>	impide la interacción del ARN mensajero con el ARN de transferencia y por tanto la síntesis proteica	acción antibiótica
<i>Quelante de los iones zinc</i>	efecto inhibitorio sobre la expresión y actividad de las metaloproteasas de matriz de membrana (MMP)	efectos protectores sobre la vasculatura
<i>Atrapa radicales libres comparables al alfa-tocoferol</i>	Capacidad antioxidante al interferir con la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs)	antioxidante
<i>Acción directa sobre los complejos enzimáticos que conducen a la generación de EROs</i>	Capacidad antioxidante al interferir con la producción de EROs	antioxidante
<i>Efecto directo sobre la expresión de genes implicados en la producción de EROs (p. ej. COX-2 y NOSi)</i>	Capacidad antioxidante al interferir con la producción de EROs	antioxidante
<i>Capacidad de bloquear la activación de la microglía</i>	Capacidad antioxidante al interferir con la producción de EROs Capacidad de bloquear la síntesis de citocinas	antioxidante y antiinflamatorio
<i>Activa la vía de señalización PI3K/Akt</i>	Protege a las células frente a distintos estímulos apoptóticos.	citoprotector
<i>Bloquea la activación de p38 MAPK</i>	p38 MAPK interviene en distintas respuestas inflamatorias en células diversas, entre las que se incluye la microglia.	Antiinflamatorio y neuroprotector
<i>Bloquea la unión de NFκB al ADN y previene la degradación de la subunidad inhibitoria IκBa</i>	Reduce la translocación de NFκB al núcleo, lo que supone una reducción en la actividad transcripcional.	Modula expresión de proteínas implicadas en la inflamación
<i>Bloquea la regulación positiva de p53</i>	Inhibe la expresión génica encargada de reprimir el crecimiento y promover la muerte celular en respuesta a múltiples formas de estrés celular.	antiapoptótico

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1 Justificación

Si bien existen evidencias de los efectos del tolueno sobre las propiedades intrínsecas de las neuronas de algunas áreas cerebrales y se conocen las consecuencias de la exposición a tolueno en algunos procesos de neuroinflamación, no se han realizado estudios sistemáticos que evalúen condiciones de exposición crónica tipo abuso a este disolvente.

En cuanto al ciclohexano, estudios preclínicos han demostrado que no comparte un perfil de efectos conductuales con el tolueno, lo cual sugiere que tiene menor potencialidad de abuso, pero no se han realizado estudios acerca de los efectos de exposiciones crónicas a concentraciones altas sobre procesos de neuroinflamación, propiedades estructurales o funcionales de las neuronas en regiones cerebrales específicas.

Con base en estos antecedentes, el propósito de este trabajo es comparar los efectos del tolueno y el ciclohexano sobre diferentes respuestas electrofisiológicas e inflamatorias, de acuerdo con las siguientes hipótesis:

2.2 Hipótesis

- La exposición repetida a una concentración alta de tolueno incrementará la excitabilidad de las células piramidales de la corteza prefrontal y su actividad sináptica espontánea. El ciclohexano no tendrá efecto o será menor al del tolueno.
- La exposición repetida una concentración alta de tolueno producirá neuroinflamación. El ciclohexano no tendrá efecto o será menor que a la del tolueno.
- La minociclina administrada conjuntamente al tratamiento de tolueno disminuirá: a) la hiperexcitabilidad de las células piramidales de la corteza prefrontal; b) la neuroinflamación; y c) el deterioro cognitivo producido por el tolueno en pruebas conductuales.

3. OBJETIVOS

Los objetivos generales de este proyecto fueron:

- Evaluar si una exposición tipo abuso de tolueno o ciclohexano, durante dos semanas, en la etapa de la adolescencia, cambia las propiedades electrofisiológicas de las células piramidales de la corteza medial prefrontal y/o produce neuroinflamación.
- Determinar si la minociclina, como inhibidor del proceso de neuroinflamación, es capaz de prevenir algunos de estos procesos.

Para el cumplimiento de estos objetivos generales, se plantean los siguientes objetivos particulares:

1. Evaluar la actividad eléctrica de células piramidales de la capa V de la corteza medial prefrontal (CPFm) con la técnica de patch clamp (whole-cell) en rebanadas de cerebro de ratas adolescentes expuestas crónicamente a tolueno o ciclohexano.
2. Cuantificar la expresión de ARNm de mediadores inflamatorios (IL-1 β , y TGF- β) mediante la técnica de PCR en tiempo real.
3. Observar mediante inmunofluorescencia la posible activación de la microglía (con un marcador específico como el Iba1) y de los astrocitos (con el marcador GFAP) después de la exposición crónica de tolueno o ciclohexano en ratas adolescentes.
4. Evaluar la actividad cognitiva con dos pruebas conductuales asociadas al procesamiento de la información en la CPFm: la prueba de evitación pasiva y el reconocimiento de objeto novedoso.
5. Evaluar el efecto del tratamiento con la minociclina en los animales expuestos crónicamente al tolueno y/o ciclohexano, mediante las técnicas mencionadas en los objetivos 1-4.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Animales

Se utilizaron ratas Wistar macho adolescentes, de los días postnatales (PN) 22-35, con acceso libre a agua y comida, mantenidas en condiciones de temperatura controlada (22 ± 2 °C) y ciclo de luz-obscuridad invertido. Los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado de los Animales de Laboratorio del Cinvestav (CICUAL, protocolos 0101-14 y 0090-14) que están de acuerdo con la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999 para el uso y cuidado de los animales de laboratorio.

4.2. Exposición a disolventes

La exposición a tolueno (1000 ppm, 4000 ppm y 8000 ppm) o ciclohexano (8000 ppm) se realizó durante 30 min, dos veces al día, con 6 horas de intervalo entre cada exposición, durante 10 días (5 días consecutivos por dos de descanso) a lo largo del periodo PN 22-35. La concentración de los disolventes se eligió con base en datos obtenidos en la literatura y en investigaciones de nuestro laboratorio que muestran que son relevantes para producir claros efectos conductuales (Gerasimov et al., 2002; M. T. Rivera-García et al., 2015; Williams et al., 2005). Los animales se expusieron en una cámara de exposición estática de 27 l. Esta cámara es una jarra cromatográfica con una tapa de acrílico que cierra herméticamente. La tapa tiene puertos de inyección en la parte externa, y en su parte interna, un ventilador cuyas aspas proyectan hacia la cámara. Bajo las aspas del ventilador se coloca un papel filtro sobre una malla metálica. En el papel se coloca el disolvente líquido a través de una jeringa que se introduce por los puertos de inyección. El ventilador favorece la evaporación rápida y dispersión del disolvente en la cámara (Figura 10).

El volumen de disolvente a inyectar para obtener una determinada concentración se calculó mediante la ecuación de los gases ideales para sistemas estáticos cerrados (Moseley et al., 1971; Nelson, 1971):

$$Vl = \frac{(PM)(C_{ppm})(Vs)}{d} * \frac{P(10)^{-6}}{RT}$$

Dónde: V_I = Volumen del disolvente a inyectar en la cámara (ml); PM = Peso molecular del disolvente (g/mol); C_{ppm} = Concentración deseada (ppm); V_s = Volumen de la cámara de exposición (L); D = Densidad del disolvente (g/mL); P = Presión atmosférica (atm); R = Constante de los gases; T = Temperatura (K).

Las concentraciones nominales se confirmaron usando un detector de fotoionización (PhoCheck Tiger, Ion Science, LTD, Cambs, Reino Unido). Las concentraciones reales variaron desde el primero y el trigésimo minuto después de la inyección de la siguiente manera: para una concentración teórica de 1000 ppm = desde 1220 hasta 922; para 4000 ppm = de 4559 a 3580; para 8000 ppm = de 8192 a 7504 (figura 9).

4.3. Diseño experimental

Se establecieron 4 grupos experimentales en función del tratamiento: 1) el grupo control que fueron animales expuestos a aire durante 30 min en la cámara utilizando el mismo protocolo que los grupos experimentales; 2) grupos independientes expuestos a 1000 ppm, 4000 ppm o 8000 ppm de tolueno; 3) el grupo expuesto a 8000 ppm de ciclohexano; y 4) el grupo expuestos a 8000 ppm del tolueno y que conjuntamente a ello recibieron un tratamiento de minociclina (50 mg/kg i.p. durante 10 días) que fue administrada 5 minutos después de la segunda exposición diaria de tolueno.

Para cada uno de los tratamientos, se hicieron experimentos para evaluar: a) las propiedades intrínsecas y la actividad espontánea en células piramidales de la CPFm, b) la expresión de citocinas pro- y anti- inflamatorias en CPFm; c) la inmunoreactividad para GFAP e Iba-1; d) la latencia de paso (s), en el modelo de evitación pasiva; y e) el índice de reconocimiento en la prueba de reconocimiento de objeto novedoso como se describe en las secciones siguientes.

En la figura 11 se observa un diagrama que representa los 10 días de exposición a los disolventes con o sin tratamiento de minociclina, así como el día de experimentos electrofisiológicos y recolección de tejidos (día 11) y la evaluación de pruebas conductuales (habitación en el día 9 o 10 dependiendo de la prueba conductual, entrenamiento al día 10 sólo en el caso de la prueba de evitación pasiva y evaluación al día 11).

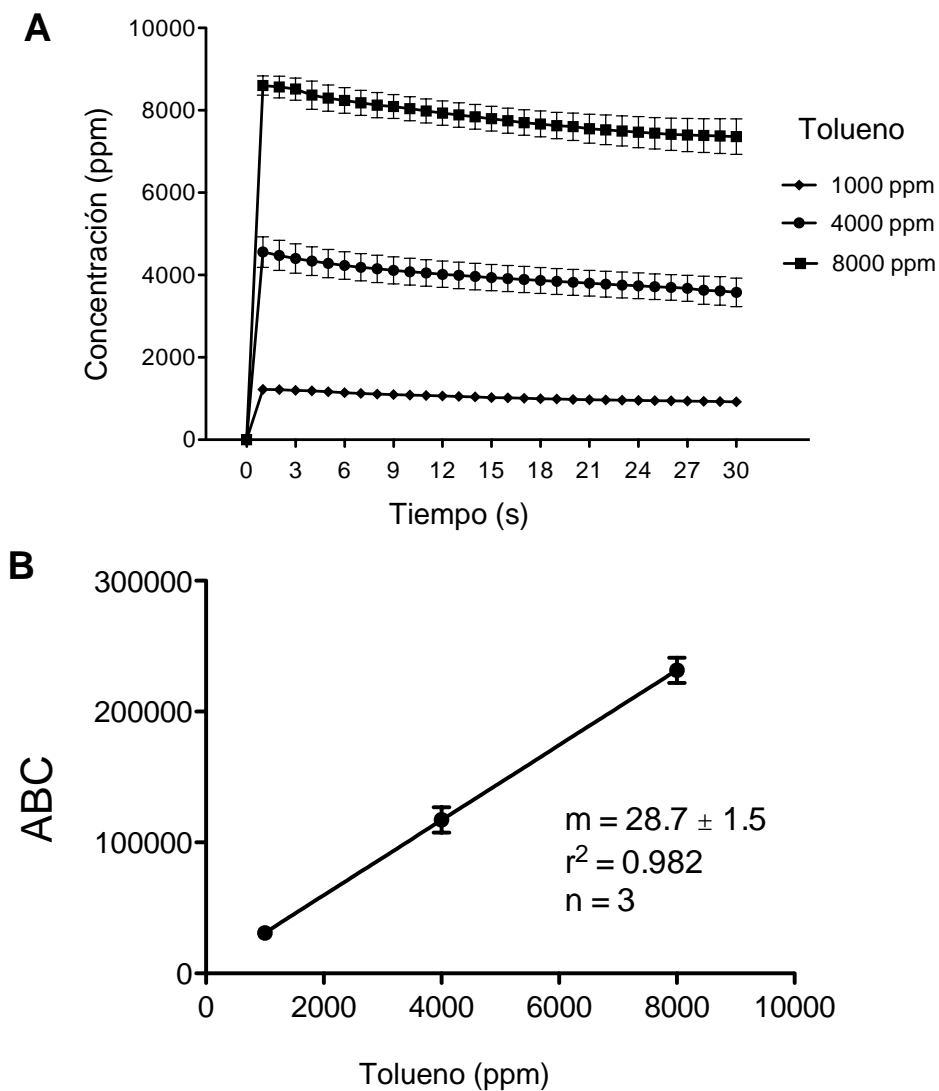


Figura 9. Curva de calibración de las concentraciones de tolueno. A) Curso temporal de las concentraciones de tolueno detectadas en la cámara de exposición con un detector de fotoionización (PhoCheck Tiger, Ion Science, LTD, Cambs, Reino Unido). B) Regresión lineal correspondiente al área bajo la curva (ABC) de los valores en A.

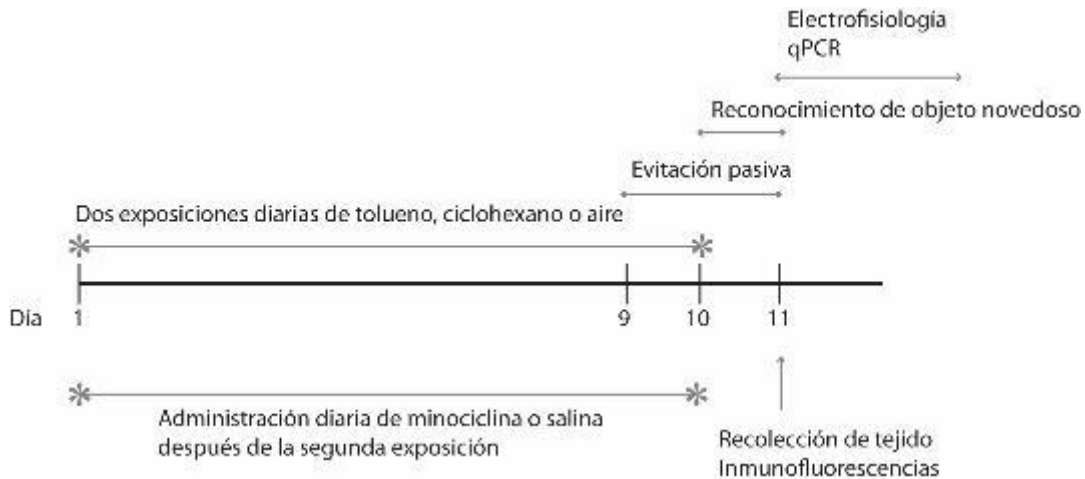


Figura 10. Esquema del diseño experimental

4.4. Registro electrofisiológico de células con técnica de Patch Clamp

4.4.1 Obtención y preparación de rebanadas

Las ratas se anestesiaron con pentobarbital (65 mg/kg i.p). Se sacrificaron por decapitación se removió el cerebro y se obtuvieron dos bloques de tejido que tuvieran a la corteza medial prefrontal. Se fijaron a la platina de un vibratomo Leica VT1000 S y se obtuvieron rebanadas coronales de 385 μm de espesor a 4°C. Las rebanadas se incubaron por 30 min a 35°C y al menos durante 1 h a temperatura ambiente en solución de incubación con la siguiente composición (en mM): 125 NaCl, 2.0 KCl, 1.2 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 10 glucosa, 1 CaCl₂, y 6 MgCl₂, bajo burbujeo constante de O₂ (95%)/CO₂ (5%). En una cámara de registro se colocó una rebanada, donde se perfundió a flujo constante (3-6 ml/m) y se mantuvo bañada en líquido cefalorraquídeo artificial (LCRA), con la siguiente composición (en mM): 125 NaCl, 3 KCl, 1.25 Na₂HPO₄, 25 NaHCO₃, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 glucosa. Los fármacos utilizados se disolvieron en la solución de registro (LCRA) y se perfundieron en la cámara de registro.

Las neuronas piramidales de la capa V de la CPFm se identificaron visualmente por video-microscopía infrarroja y óptica diferencial de interferencia de alto contraste. Se utilizaron pipetas de borosilicato con una resistencia de 4-8 M Ω . Una vez que se logró hacer el sello

adecuado en una neurona, se aplicó una serie de protocolos para determinar diferentes propiedades electrofisiológicas, a saber: resistencia de entrada (R_n), potencial de membrana en reposo (PMR), actividad sináptica espontánea (ASE), frecuencia de disparo neuronal y cinética del potencial de acción (PA).

4.4.2 Determinación de las propiedades intrínsecas

- Curva I-V. Utilizando la técnica de fijación de corriente (*current clamp*) se inyectaron pulsos cuadrados de corriente de 1200 ms de duración, partiendo desde -120 mV con incrementos de 30 pA hasta que la célula alcanzó el umbral de disparo de potenciales de acción. Con este primer experimento se determinaron las propiedades pasivas de las neuronas como lo son la R_n , el PMR y el nivel de rectificación de la curva.
- Determinación de la corriente reobase. La corriente reobase es la corriente mínima necesaria para generar una respuesta dada; en este caso, potenciales de acción. Para este experimento se inyectaron pulsos cuadrados de corriente de 1200 ms de duración en incrementos de 20 pA hasta que la célula alcanzó el umbral de disparo de potenciales de acción.
- Determinación de la frecuencia de disparo de PA. Se aplicaron pulsos cuadrados de corriente despolarizantes de 1200 ms a intensidades crecientes de 20 pA. Con este protocolo determinamos posibles alteraciones en la frecuencia de disparo de ráfagas de potenciales de acción.
- Cinética del PA. Para este experimento se aplicó un pulso cuadrado de corriente de 2 a 5 ms de duración, a una intensidad de corriente suficiente para evocar un potencial de acción. Se analizaron diversas fases del disparo como lo son el tiempo de subida, tiempo de bajada, duración, amplitud y fase de repolarización (postpotencial hiperpolarizante).

4.4.3 Determinación de la actividad sináptica espontánea (ASE)

Utilizando la técnica de fijación de voltaje (*voltage clamp*) se registró la ASE por 2.5 minutos continuos. La ASE representa la transmisión sináptica basal de los circuitos neuronales. Los parámetros que analizamos fueron la frecuencia y la amplitud de los

eventos sinápticos en cada una de las condiciones experimentales. Para determinar alteraciones de la transmisión glutamatérgica, se bloqueó la transmisión gabaérgica mediante la perfusión de bicuculina (10 μ M) (antagonista competitivo de los receptores GABA_A). Para el caso de las alteraciones en la transmisión gabaérgica, se bloqueó la transmisión glutamatérgica con ácido quinurénico (2 mM) y se registró la actividad sináptica espontánea inhibitoria.

4.5. Inmunofluorescencia

Los animales se perfundieron con paraformaldehído al 4%, y se obtuvieron los cerebros que fueron post fijados en una solución de paraformaldehído frío durante 24 h. Posteriormente se trasladaron a una solución de sacarosa al 30% por un periodo no mayor de 48 h. Se obtuvieron cortes coronales de 25 μ m de espesor de la región de la CPFm usando un criostato Leica CM 1510-3. Cada laminilla se incubó con una solución de bloqueo durante 2 h (suero bovino con albúmina (BSA) al 3%, suero de burro al 3%, Triton al 0.3%) y se incubó durante la noche a temperatura ambiente dentro de una cámara húmeda con los anticuerpos primarios anti GFAP (1:500) e Iba-1 (1:500) que fueron diluidos en una solución de incubación (suero de burro al 1%, Triton 0.1%). Se realizaron tres lavados con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) durante 10 min. Después, se incubaron las rebanadas durante 2 h a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios que contenían un fluoróforo conjugado, Alexa fluor 488 (1:800) y Dylight 550 (1:200). Las características de los anticuerpos primarios y secundarios utilizados se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Anticuerpos usados para la técnica de inmunofluorescencia

Anticuerpos primarios	Especie	Anticuerpos secundarios	Especie	Fluoróforo conjugado al anticuerpo secundario
Anti-GFAP (Abcam ab7260)	conejo	Anti- conejo (molecular probes A-21206)	burro	Alexa fluor 488 (verde)
Anti- Iba1 (Abcam ab5076)	cabra	Anti- cabra (molecular probes A-11057)	burro	Dylight 550 (rojo)

Las rebanadas se montaron en los portaobjetos con 20 μ l de Vectashield con DAPI (marcador nuclear). Las laminillas se observaron en un microscopio confocal (LSM 800 Airyscan, Zeiss). Se cuantificó la media de fluorescencia en pixeles de un área de 360,000 μ m² con el programa *Image Processing and Analysis in Java* (Image J) del National Institutes of Health (NIH).

4.6. Evaluación de la expresión de citocinas por qPCR

Para evaluar la expresión de IL-1 β y TGF- β se recolectó la región PL de la CPFm de rebanadas obtenidas para los registros electrofisiológicos. El tejido se homogenizó y el ARN total fue extraído de aproximadamente 25 mg de tejido de rata con Trizol (Invitrogen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras de ARN fueron tratadas con DNasa Turbo (Ambion) para eliminar cualquier contaminación con ADN genómico.

A partir de 400 ng de ARN total, se realizó la retrotranscripción utilizando el RevertAid cDNA synthesis Kit (Fermentas, Lithuania) para ARNm. La cuantificación de IL-1 y TGF- β se hizo por qPCR utilizando el TaqMan master mix TM con sondas TaqMan para cada citocina. El gen de referencia utilizado para este estudio fue la actina. El equipo utilizado fue Pikoreal 96 (Thermo scietific). Los resultados fueron analizados por el método $2^{\Delta\Delta C_t}$ (Livak and Schmittgen, 2001).

4.7 Prueba de evitación pasiva

La prueba de evitación pasiva permite estudiar la memoria a corto y largo plazo y el aprendizaje adquirido. En esta prueba, el animal se condiciona con un estímulo aversivo y posteriormente se valora si recuerda esa experiencia (Kameyama et al., 1986). El aparato que se utiliza tiene dos compartimentos (9 x 15 x 32 cm, cada uno), uno claro con paredes de acrílico transparentes otro oscuro con paredes opacas, separados entre sí por una puerta automática. En el compartimento claro hay una luz de 60 watts enfocando directamente al animal, mientras que en el oscuro hay un circuito cerrado capaz de producir pequeñas

descargas eléctricas. El animal tiende naturalmente a desplazarse a los espacios oscuros ya que la luz directa es un estímulo aversivo.

La prueba comenzó con una sesión de habituación que consistió en colocar al animal en el compartimento iluminado de espaldas a la compuerta y dejarlo explorar durante 30 s, después de los cuales, se abrió la puerta y se le permitió entrar al compartimento oscuro. Una vez que el animal ingresó, se cerró la compuerta y se le permitió permanecer allí 10 s, transcurridos los cuales, se regresó a su caja.

El segundo día, 30 minutos después de la segunda exposición diaria a aire, tolueno o ciclohexano, se introdujo al animal al compartimento iluminado y 30 s después se abrió la compuerta para permitir el paso al compartimento oscuro. Una vez que entró el animal, la compuerta se cerró y 3 s después se aplicó una descarga eléctrica de 0.8 mA durante un segundo. Diez segundos después, se regresó la rata a su caja.

El tercer día se colocó al animal en la parte iluminada durante 30 s y se abrió la puerta para medir la latencia de paso al compartimento oscuro y se mantuvo abierta durante 5 min. Se estableció una latencia de 300 s para los animales que permanecieron en el compartimento iluminado (Kameyama et al., 1986).

4.8 Prueba de reconocimiento de objeto novedoso (modificada)

La prueba de reconocimiento de objeto novedoso consiste en evaluar la capacidad del animal de reconocer un objeto nuevo, para ello se cuantifica el tiempo que pasa explorando un objeto que no conoce versus un objeto familiar (Barker et al., 2007). Esta prueba involucra dos regiones muy importantes: la corteza entorrinal y la corteza prefrontal.

La prueba modificada que elegimos para este estudio está diseñada para evaluar la memoria de orden temporal. Esta memoria ha sido asociada en mayor medida al adecuado funcionamiento de la corteza prefrontal más que el de la corteza entorrinal (Barker et al., 2007). Debido a que nuestro estudio se centró en la evaluación de la corteza prefrontal decidimos utilizar esta prueba para conocer los cambios en ella. La prueba consiste en colocar al animal en una caja de acrílico de 44 x 34 x 20 cm con dos objetos idénticos y permitirle que los explore libremente durante 5 min, después de los cuales, se regresa a su

caja. Una hora después, se vuelve a colocar a la rata en la misma área con otros dos objetos idénticos, pero diferentes a los primeros para que los explore durante 5 min. Finalmente se dejan pasar dos horas y se repite el procedimiento para medir el tiempo acumulado que el animal explora ambos objetos. De manera natural, el animal explora el objeto familiar 1 más tiempo puesto que el objeto familiar 2 es más reciente y lo recuerda mejor (Barker et al., 2007).

El índice de discriminación se calcula:

$$\text{Índice de discriminación} = \frac{\text{Objeto familiar 1} - \text{Objeto familiar 2}}{\text{Tiempo total de exploración}}$$

4.9 Análisis estadístico

Los datos se analizaron con el programa GraphPad PRISM 5.0 y Sigma Plot 12.0. Se realizaron pruebas t de Student para datos no pareados, ANOVA de una vía seguida de prueba pos hoc Dunnet o Dunn, ANOVA de dos vías seguida de una prueba pos hoc Dunnet o Dunn de acuerdo a las características del conjunto de datos analizado. Las pruebas utilizadas se especifican en cada pie de figura.

5. RESULTADOS

5.1 Resultados electrofisiológicos

5.1.1 Características electrofisiológicas de las neuronas piramidales de la corteza medial prefrontal

Las neuronas piramidales registradas en la CPFm fueron clasificadas por su tipo de disparo. El 78.21% de las neuronas registradas en animales control presentó un patrón de disparo regular (DR), el 10.26%, de ráfaga intrínseca (RI) y el 11.54%, de disparo adaptativo (AD). Estas proporciones fueron similares en las neuronas de animales expuestos a tolueno o ciclohexano (Figura 11). En consecuencia, para los siguientes experimentos, elegimos las neuronas piramidales de disparo regular (DR) por ser las más abundantes en todas las condiciones experimentales.

5.1.2 La exposición repetida al tolueno modifica las propiedades pasivas de la membrana de manera concentración dependiente

Las células de animales expuestos a 1000 ppm y 4000 ppm de tolueno no mostraron diferencias significativas en ningún parámetro evaluado (PMR, Rn, tau, reobase y curva I-V). Sin embargo sí se observó una tendencia dependiente de la concentración y a 8000 ppm, el tolueno aumentó la Rn ($F_{(3,88)} = 0.43$; $p = 0.73$) redujo la constante de tiempo membranar ($F_{(3,88)} = 11.9$; $p < 0.001$) y disminuyó la corriente reobase ($F_{(3,88)} = 9.7$; $p < 0.001$). En cuanto a la curva IV, la concentración más alta de tolueno aumentó la rectificación membranar en respuesta a los pulsos negativos de corriente (figura 12). Con base en estos resultados, la concentración de 8000 ppm fue la que se utilizó en los experimentos posteriores.

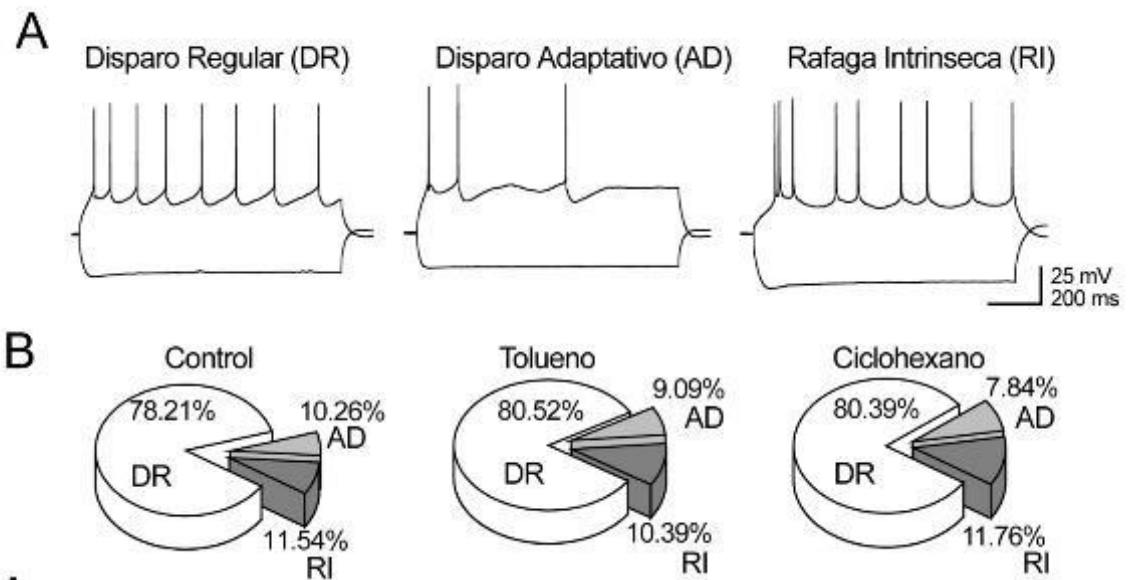


Figura 11. Patrón de disparo. A) Registros electrofisiológicos de células control que presentan tres tipos de disparo: disparo regular (DR), disparo adaptativo (AD) y ráfaga intrínseca (RI). B) Gráficas de pastel que representan la proporción de los patrones de disparo registrados en las células control y con tratamiento. Prueba exacta de Fischer $p > 0.05$.

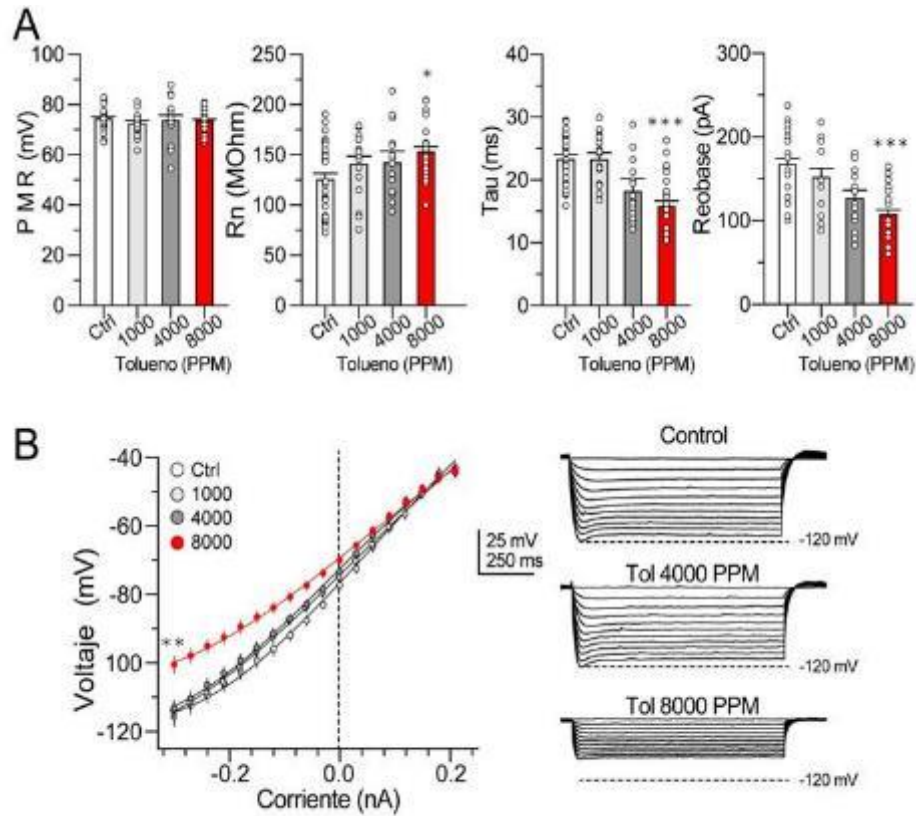


Figura 12. Propiedades pasivas de membrana de neuronas piramidales en la capa V de la CPFm de ratas adolescentes tratadas con diferentes concentraciones de tolueno. A) Gráficas de barras (media \pm E.E y datos individuales) que representan las propiedades pasivas de animales control y de animales tratados con diferentes concentraciones de tolueno. RMP: potencial de membrana en reposo; Rn: resistencia de entrada, tau: constante de tiempo y la corriente rebase de las neuronas de control ($n_{\text{células}} / \text{animales} = 30/10$); de neuronas de animales expuestos con 1000 ppm de tolueno ($n_{\text{células}} / \text{animales} = 16/5$), 4000 ppm de tolueno ($n_{\text{células}} / \text{animales} = 16/5$) u 8000 ppm de tolueno ($n_{\text{células}} / \text{animales} = 30/10$). * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$; ANOVA; prueba de Dunnett. B) Gráfica que representa el promedio de la curva I-V, para neuronas de control ($n_{\text{células}} / \text{animales} = 20/10$) y neuronas de animales expuestos con 1000 ppm de tolueno ($n_{\text{células}} / \text{animales} = 16/5$), 4000 ppm de tolueno ($n_{\text{células}} / \text{animales} = 16/5$) o 8000 ppm de tolueno ($n_{\text{células}} / \text{animales} = 20/10$). Cada punto representa la media \pm E.E ** $P < 0.01$; Prueba t de Student. Los paneles de la derecha muestran los trazos representativos de la parte negativa de la curva I-V representando la parte rectificadora de la curva IV con diferentes concentraciones de tolueno.

5.1.3 La exposición repetida al tolueno, pero no al ciclohexano, modifica las propiedades pasivas de la membrana

La exposición repetida a 8000 ppm de tolueno modificó parámetros de las propiedades pasivas de la membrana, pero la exposición repetida con ciclohexano no generó efectos importantes. El PMR de las células fue el único parámetro evaluado que fue constante y no presentó modificaciones importantes en ninguna de las condiciones evaluadas ($F_{(2,87)}=0.66$; $P=0.52$). La R_n , que se obtuvo calculando la pendiente de la porción lineal de la curva I-V, mostró una disminución significativa en células de animales expuestos al tolueno ($F_{(2,87)}=0.6$; $P=0.55$). También, el tolueno disminuyó la constante de tiempo ($F_{(2,87)}=21.3$; $P<0.001$) y la corriente reobase de las neuronas ($F_{(2,87)}=18.2$; $P<0.001$).

La figura 13 permite comparar los efectos de la concentración más alta de tolueno con la misma concentración de ciclohexano (8000 ppm) sobre las propiedades pasivas de la membrana. El ciclohexano no tuvo ningún efecto, sobre las propiedades pasivas, pero logró modificar la parte negativa de la curva IV, a diferencia del tolueno que, como ya se mencionó en la descripción de la figura anterior, aumentó la resistencia de entrada, disminuyó la constante de tiempo membranar y la corriente reobase, y produjo rectificación de la curva IV.

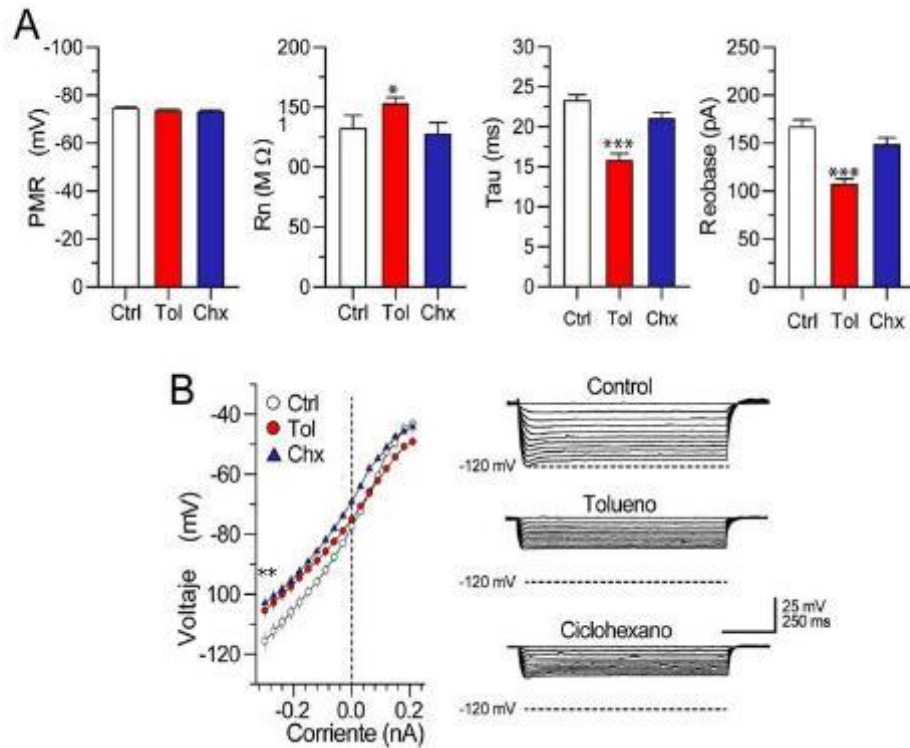


Figura 13. Propiedades pasivas de membrana de neuronas piramidales en la capa V de la CPFm de ratas adolescentes tratadas con tolueno y ciclohexano. A) Efectos sobre el potencial de membrana en reposo (PMR), la resistencia de entrada (Rn), la constante de tiempo (tau) y la corriente reobase de neuronas de animales control ($n_{\text{células}} / \text{animales} = 30/10$); de neuronas de animales expuestos a 8000 ppm de tolueno ($n_{\text{células}} / \text{animales} = 30/10$), y de animales expuestos a 800 ppm de ciclohexano ($n_{\text{células}} / \text{animales} = 30/10$). Las barras representan la media \pm E.E * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$; ANOVA; prueba de Dunnett. B) Gráfica que representa el promedio \pm E.E de la curva I - V. Los trazos constituyen la parte rectificadora de la curva IV.

5.1.4 La exposición crónica al tolueno y al ciclohexano produce cambios en la cinética del potencial de acción

Se determinaron los efectos del tolueno y del ciclohexano sobre las propiedades cinéticas del PA. Se observó que la amplitud, el tiempo de caída y la duración disminuyeron significativamente en los animales expuestos a ambos disolventes. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

También, evaluamos el efecto del tolueno y ciclohexano en el umbral de PA analizando las gráficas de fases (phase plot) individuales de los PA consecutivos, obtenidos con estimulación a 140 pA durante 1200 ms. En condiciones control, las gráficas muestran un umbral de PA estable (Figura 14B). En contraste, en las rebanadas con exposición crónica a tolueno disminuyó el umbral de disparo de las células. Esta observación fue corroborada con otro protocolo que consistió en estimular a la neurona a través de una rampa despolarizante. Con este protocolo pudimos observar que las neuronas de los animales expuestos al disolvente dispararon, en promedio, 10 mV antes que los controles y en el caso del ciclohexano el umbral de disparo no se modificó con respecto al control (Figura 14 C).

Tabla 7. Parámetros del PA

Amplitud (mV)				
	1° PA	5° PA	10° PA	ANOVA de una vía
Ctrl	75 ± 1.1	73.2 ± 1.4	71.2 ± 1.6 *	F _(2,32) = 4.1; p = 0.0243
Tol	67.9 ± 1.7 ⁺	65.5 ± 2.2 ⁺	61.6 ± 2.3*** ⁺⁺	F _(2,32) = 8.3; p= 0.0018
Chx	66.8 ± 2.4 ⁺⁺	65.4 ± 2.2 ⁺	62.6 ± 2.1*** ⁺⁺	F _(2,32) = 5.5; p= 0.0086
	F _(2,44) = 5.9; p= 0.005	F _(2,44) = 5.3; p= 0.009	F _(2,44) = 7.1; p= 0.002	
Tiempo de subida (normalizado)				
Ctrl	100 ± 4.2	89.6 ± 4.4 ***	84.3 ± 4.2 ***	F _(2,32) = 67.7; p= <0.0001
Tol	90.4 ± 5	77.9 ± 3.9 **	69.4 ± 4.1*** ⁺	F _(2,32) = 20.6; p= <0.0001
Chx	86.8 ± 4.4	78.9 ± 3.9 ***	74.9 ± 4.1 ***	F _(2,32) = 25.5; p= <0.0001
	F _(2,44) = 2.4; p= 0.099	F _(2,44) = 2.5; p= 0.093	F _(2,44) = 3.1; p= 0.05	
Tiempo de bajada (normalizado)				
Ctrl	100 ± 4	83.2 ± 5.4 ***	81.3 ± 5.4 ***	F _(2,22) = 27.5; p= <0.0001
Tol	81.9 ± 5.4 ⁺	69.1 ± 4.4 ⁺⁺⁺	60.7 ± 4.2*** ⁺⁺	F _(2,22) = 40.6; p= <0.0001
Chx	77.2 ± 4.3 ⁺⁺	64.4 ± 3.9*** ⁺	57.5 ± 3.8*** ⁺⁺	F _(2,22) = 28.9; p= <0.0001
	F _(2,33) = 6.9; p= 0.003	F _(2,33) = 4.5; p= 0.018	F _(2,33) = 8; p= 0.001	
Duración media (ms)				
Ctrl	1.1 ± 0.04	1.33 ± 0.06***	1.36 ± 0.6 ***	F _(2,30) = 54.5; p= <0.0001
Tol	1.13 ± 0.04	1.29 ± 0.05 **	1.47 ± 0.05 ***	F _(2,30) = 29.2; p= <0.0001
Chx	1.19 ± 0.06	1.51 ± 0.08 ***	1.7 ± 0.09*** ⁺⁺	F _(2,30) = 34.7; p= <0.0001
	F _(2,43) = 0.82; p= 0.44	F _(2,43) = 3.3; p= 0.04	F _(2,43) = 6.3; p= 0.003	

+p<0.05; ++ p<0.01; +++ p< 0.001; vs Control (Ctrl), ANOVA de una vía seguida de una prueba Dunnett. *p<0.05; ** p<0.01; *** p< 0.001; vs 1^{er} PA, ANOVA de medidas repetidas seguido por una prueba de Dunnett.

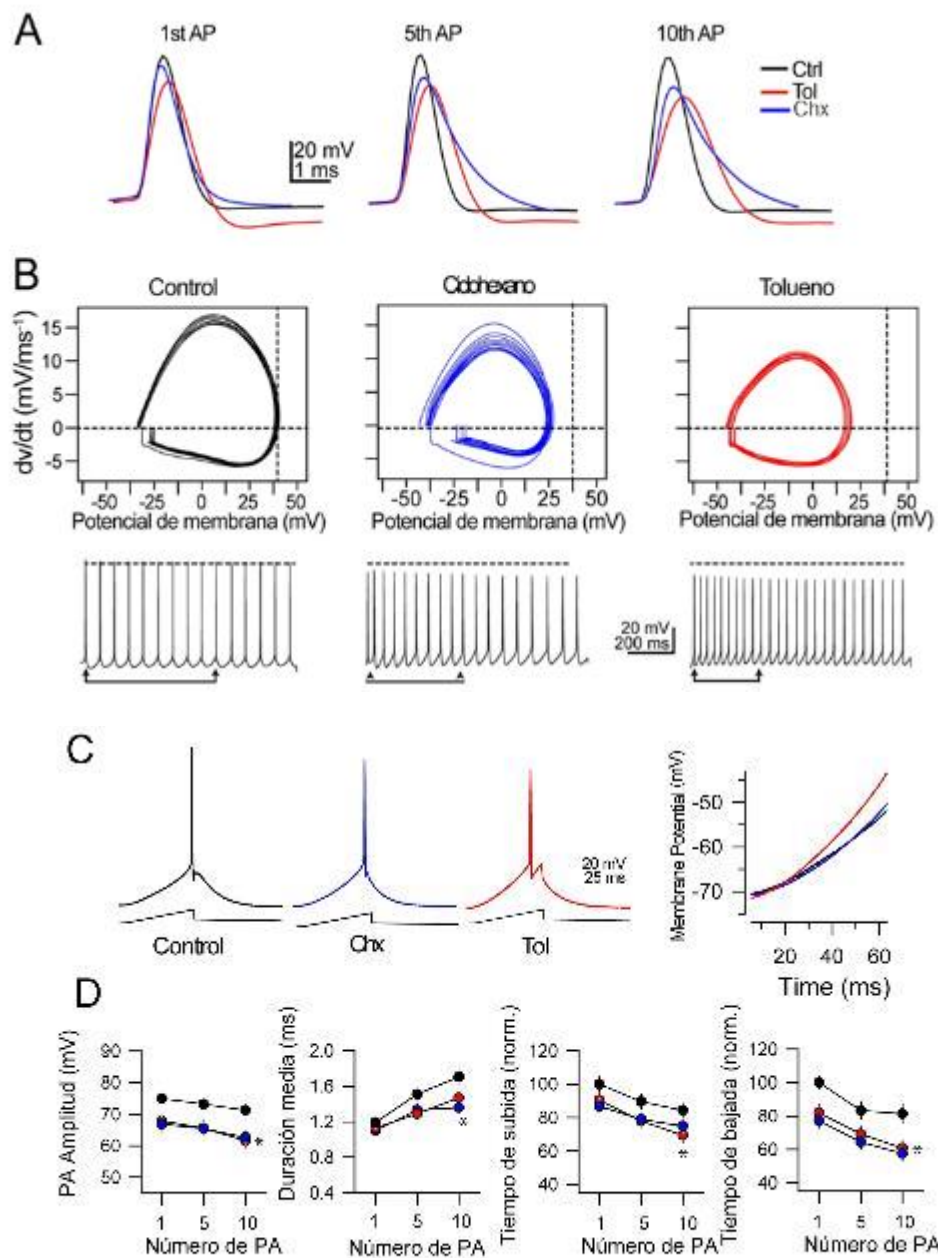


Figura 14. Cinética del PA y umbral de disparo. A) Trazos representativos de los PA. B) La derivada de voltaje con respecto al tiempo frente al voltaje muestra la cinética del potencial de acción de la ráfaga representada en la parte inferior. C) Trazos representativos de un protocolo de rampa despolarizante. D) Gráficas que representan la amplitud, el tiempo de subida, el tiempo de bajada y la duración de los potenciales de acción con diferentes exposiciones de animales control ($n_{\text{células}} / \text{animales} = 30/10$); de neuronas de animales expuestos a 8000 ppm de tolueno ($n_{\text{células}} / \text{animales} =$

30/10), y de animales expuestos a 800 ppm de ciclohexano ($n_{\text{células}} / \text{animales} = 30/10$). Los puntos representan el promedio \pm E.E * $P < 0.05$, ANOVA; prueba de Dunnett.

5.1.5 La exposición crónica al tolueno incrementa la frecuencia de disparo de las neuronas piramidales

Para examinar la frecuencia de disparo, las neuronas piramidales se mantuvieron en modalidad de current-clamp a -70 mV y se aplicaron pulsos cuadrados de corriente (0-300 pA en pulsos crecientes de 20 pA, con una duración de 1200 ms). El tratamiento crónico del tolueno y ciclohexano aumentó el número de PA por unidad de tiempo en respuesta a la inyección de pulsos de corriente crecientes (Figura 15A). Sin embargo, la diferencia estadísticamente significativa sólo se observó en el grupo de animales expuestos al tolueno ($F_{(2,87)} = 23.3$; $p < 0.001$). La exposición al tolueno también aumentó la frecuencia instantánea de las neuronas piramidales ($F_{(2,87)} = 27.4$; $p < 0.001$) como se muestra en la figura 15B.

5.1.6 La exposición crónica al tolueno pero no al ciclohexano disminuye la corriente post hiperpolarizante

La corriente post hiperpolarizante está compuesta por tres fases: rápida, media y lenta. Está regulada por canales de K^+ dependientes de Ca^{++} y determina la frecuencia de disparo de las células. Su análogo en current clamp es el post potencial hiperpolarizante que es una conductancia que nos habla del mismo fenómeno. Para evaluar el post potencial hiperpolarizante se utilizó un protocolo para cuantificar la amplitud y el área de la conductancia generada después de un estímulo de corriente. La exposición crónica al tolueno disminuyó la amplitud ($F_{(2,57)} = 9.46$; $p < 0.001$) y el área ($F_{(2,57)} = 4.38$; $p < 0.05$) del post potencial hiperpolarizante (Figura 4A), en particular se observó un decremento en la fase lenta de esta conductancia con la exposición al tolueno y los cambios no fueron significativos con la exposición al ciclohexano.

Con la finalidad de caracterizar mejor los efectos del tolueno, se administró UCL 2077, un bloqueador de los canales que regulan la fase lenta de la corriente. Se observó, como se esperaba, que el UCL 2077 disminuyó el área y la amplitud de la corriente en animales control. Sin embargo, en rebanadas de animales expuestos al tolueno este efecto no se

presentó puesto que la fase lenta de la corriente post hiperpolarizante ya estaba inhibida (figura 16B y C).

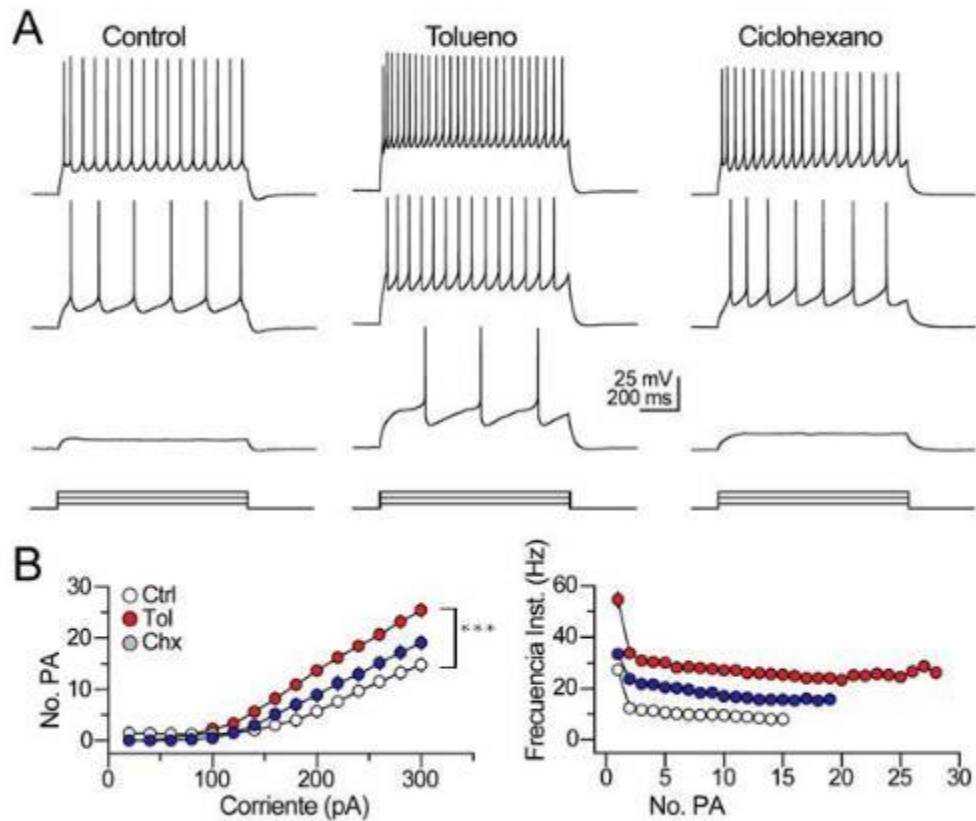


Figura 15. Frecuencia de disparo. A) Registros electrofisiológicos representativos obtenidos con pulsos cuadrados de corriente de 100 pA, 200 pA y 300 pA. B) Gráficas que representan el número de PA con respecto a la corriente inyectada y frecuencia instantánea para cada espiga de animales control ($n_{\text{células}} / \text{animales} = 20/8$); de neuronas de animales expuestos a 8000 ppm de tolueno ($n_{\text{células}} / \text{animales} = 20/8$), y de animales expuestos a 8000 ppm de ciclohexano ($n_{\text{células}} / \text{animales} = 20/8$). Los puntos representan el promedio \pm E.E *** $P < 0.001$, ANOVA; prueba de Dunnett.

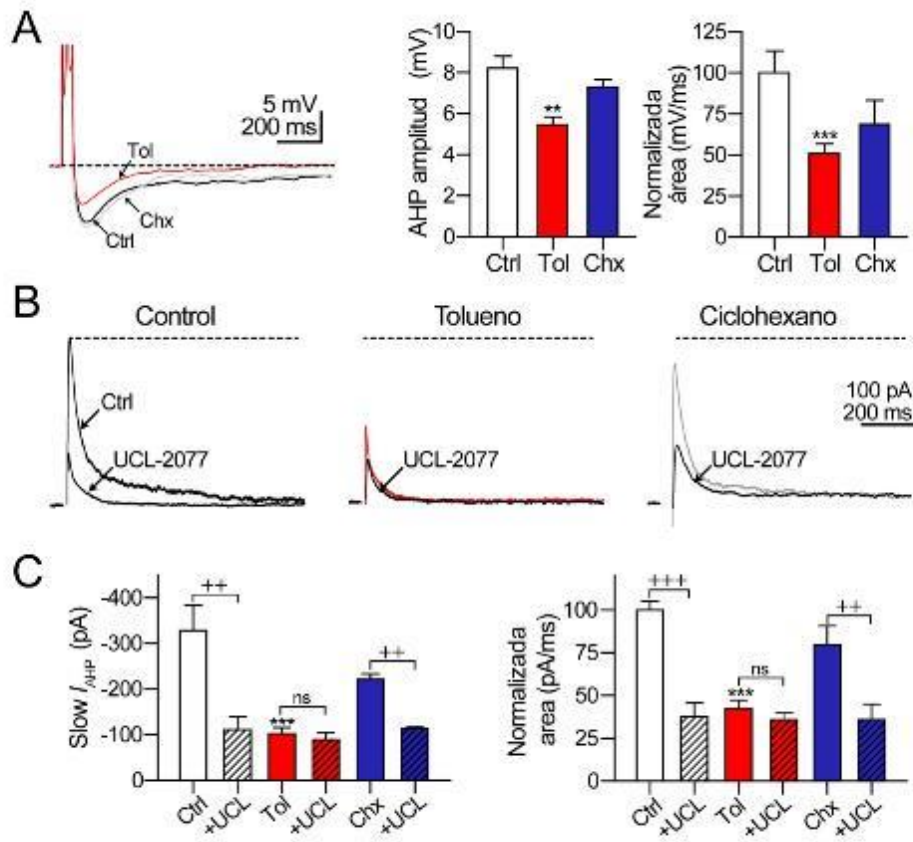


Figura 16. Corriente post hiperpolarizante y post potencial hiperpolarizante. A) Registros electrofisiológicos representativos del postpotencial hiperpolarizante. Se representa en gráficas el área y la amplitud de la conductancia de animales control ($n_{\text{células}} / \text{animales} = 20/10$); de neuronas de animales expuestos a 8000 ppm de tolueno ($n_{\text{células}} / \text{animales} = 20/10$), y de animales expuestos a 8000 ppm de ciclohexano ($n_{\text{células}} / \text{animales} = 20/10$). Las barras representan el promedio \pm E.E ** $p < 0.01$, *** $p < 0.01$ ANOVA de una vía, prueba de Dunnett. B) Trazos representativos de la corriente hiperpolarizante con el bloqueador UCL 2077. C) Gráficas que representan la amplitud y el área con diferentes exposiciones de animales control ($n_{\text{células}} / \text{animales} = 20/10$); de neuronas de animales expuestos a 8000 ppm de tolueno ($n_{\text{células}} / \text{animales} = 20/10$), y de animales expuestos a 800 ppm de ciclohexano ($n_{\text{células}} / \text{animales} = 20/10$). Las barras representan el promedio \pm E.E *** $P < 0.001$, ANOVA de medidas repetidas; prueba de Dunnett. ++ $p < 0.01$, +++ $P < 0.001$, t de Student de datos pareados.

5.1.7 La exposición crónica al tolueno, pero no al ciclohexano, incrementa la actividad sináptica espontánea

Para evaluar la ASE se consideró la amplitud y la frecuencia de las corrientes registradas a un potencial de -70 mV. La exposición repetida a tolueno aumentó el número de eventos sinápticos espontáneos y la amplitud, mientras que el ciclohexano no tuvo efecto (Amplitud: $H = 66.7$; $p < 0.001$; Frecuencia: $H = 49.2$; $p < 0.001$). El efecto de los disolventes sobre la ASE se muestra en la figura 17. Para evaluar si esta actividad era de naturaleza excitadora o inhibidora se usaron dos diferentes fármacos para antagonizar la actividad de los receptores que median estas respuestas.

Cuando se perfundió bicuculina en el medio (10 μM) para registrar sólo la actividad glutamatérgica, se observó que se incrementó el número de eventos sinápticos pero no la amplitud en condiciones control. En las células de animales expuestos al tolueno no se modificaron ni la amplitud ni el número de eventos. En células de animales expuestos al ciclohexano, la aplicación de bicuculina disminuyó el número eventos sinápticos.

Se perfundió ácido quinurénico (2 mM) para evaluar la actividad gabaérgica ya que este fármaco es un potente inhibidor de los receptores ionotrópicos glutamatérgicos. Se observó que en las células control disminuyó la amplitud y el número de eventos sinápticos. En cuanto a las células de animales expuestos al tolueno disminuyó también el número y la amplitud de los eventos sinápticos. En el caso del ciclohexano, sólo disminuyó el número de eventos sinápticos.

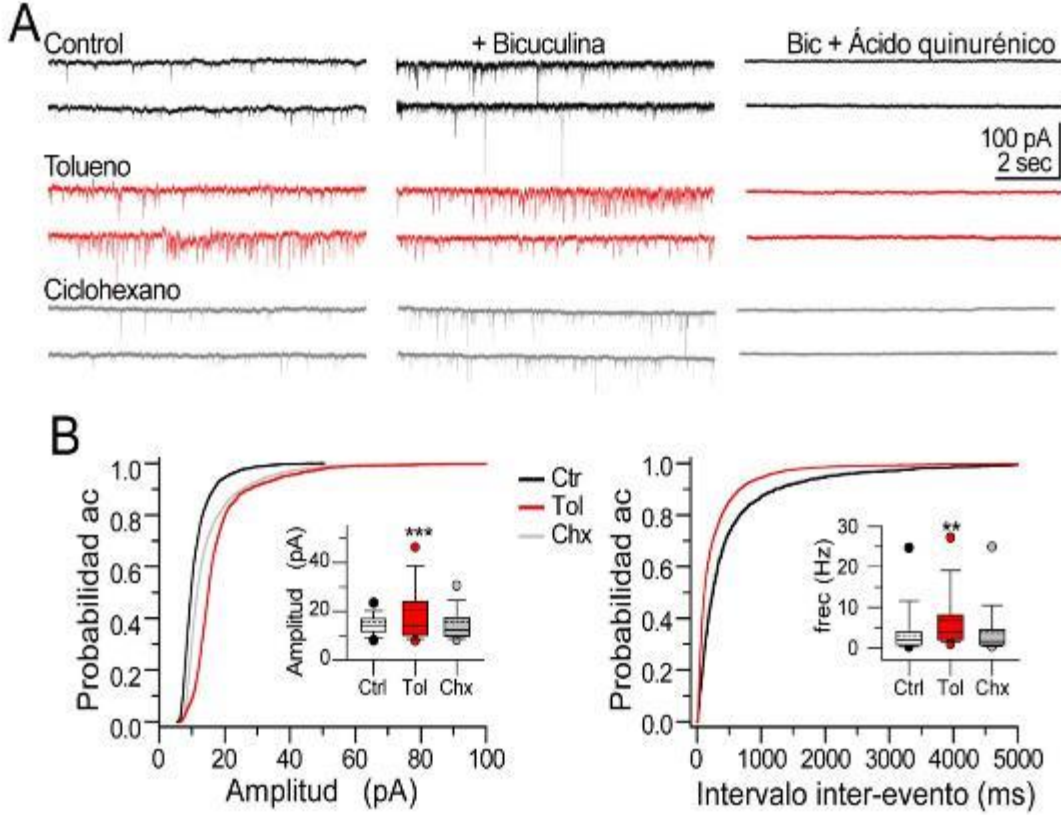


Figura 17. Actividad eléctrica espontánea. A) Trazos representativos de la actividad sináptica espontánea en condiciones control ($n_{\text{células}} / \text{animales} = 12/6$); de neuronas de animales expuestos a 8000 ppm de tolueno ($n_{\text{células}} / \text{animales} = 12/6$), y de animales expuestos a 8000 ppm de ciclohexano ($n_{\text{células}} / \text{animales} = 12/6$), con bicuculina y con ácido quinurénico. B) Gráficas que representan la amplitud de los eventos sinápticos espontáneos y el intervalo interevento. Cada gráfico de caja representa la media, la mediana, los valores mínimos y máximos, *** $p < 0.0001$ Kolmogorov- Smirnov.

5.1.8 El tratamiento con minociclina bloquea el efecto de la exposición crónica al tolueno sobre la excitabilidad intrínseca de las neuronas de la corteza

Con el propósito de analizar el papel de la neuroinflamación en los efectos del tolueno administramos minociclina (50 mg/kg i.p.) que es un inhibidor de la activación glial y de la traslocación al núcleo de NF-kB implicado en la síntesis de moduladores pro inflamatorios como la IL-1 β .

El tratamiento de minociclina en los animales expuestos a tolueno bloqueó los efectos del tolueno, evitó los efectos electrofisiológicos, neuroinflamatorios y conductuales del tolueno. En esta sección se presentan los resultados electrofisiológicos.

En cuanto a las propiedades pasivas de la membrana, la minociclina evitó los cambios en la pendiente, en la rectificación de la curva I/V, bloqueó la disminución en la tau y de la corriente reobase que se observó con la exposición repetida a tolueno 8000 ppm. Además, la corriente mínima necesaria para generar potenciales de acción se restablece una vez que los animales fueron sometidos al tratamiento con minociclina, es decir, que el tratamiento con minociclina incrementa la corriente reobase y por lo tanto se requiere más corriente para generar PA, lo que hace menos excitables a estas células (Figura 18). El PMR no mostró cambios bajo ninguna condición experimental analizada.

Por otro lado, el tratamiento con minociclina reduce de manera significativa el incremento en el número de PA observado en los animales expuestos al tolueno, este efecto se observa en la figura 19A.

En la figura 20 se puede observar que la administración de minociclina por sí sola es capaz de incrementar la amplitud y la duración media del PA; además, los animales expuestos a tolueno y que concomitantemente recibieron el tratamiento de minociclina también mostraron incremento de la amplitud y de la duración media del PA.

Por otra parte, el tratamiento con minociclina impide que se presente la dramática reducción del post potencial hiperpolarizante que se observa tras la exposición crónica con el tolueno. En este análisis observamos que tanto el área como la amplitud se restablecen a parámetros control como se muestra en la figura 21.

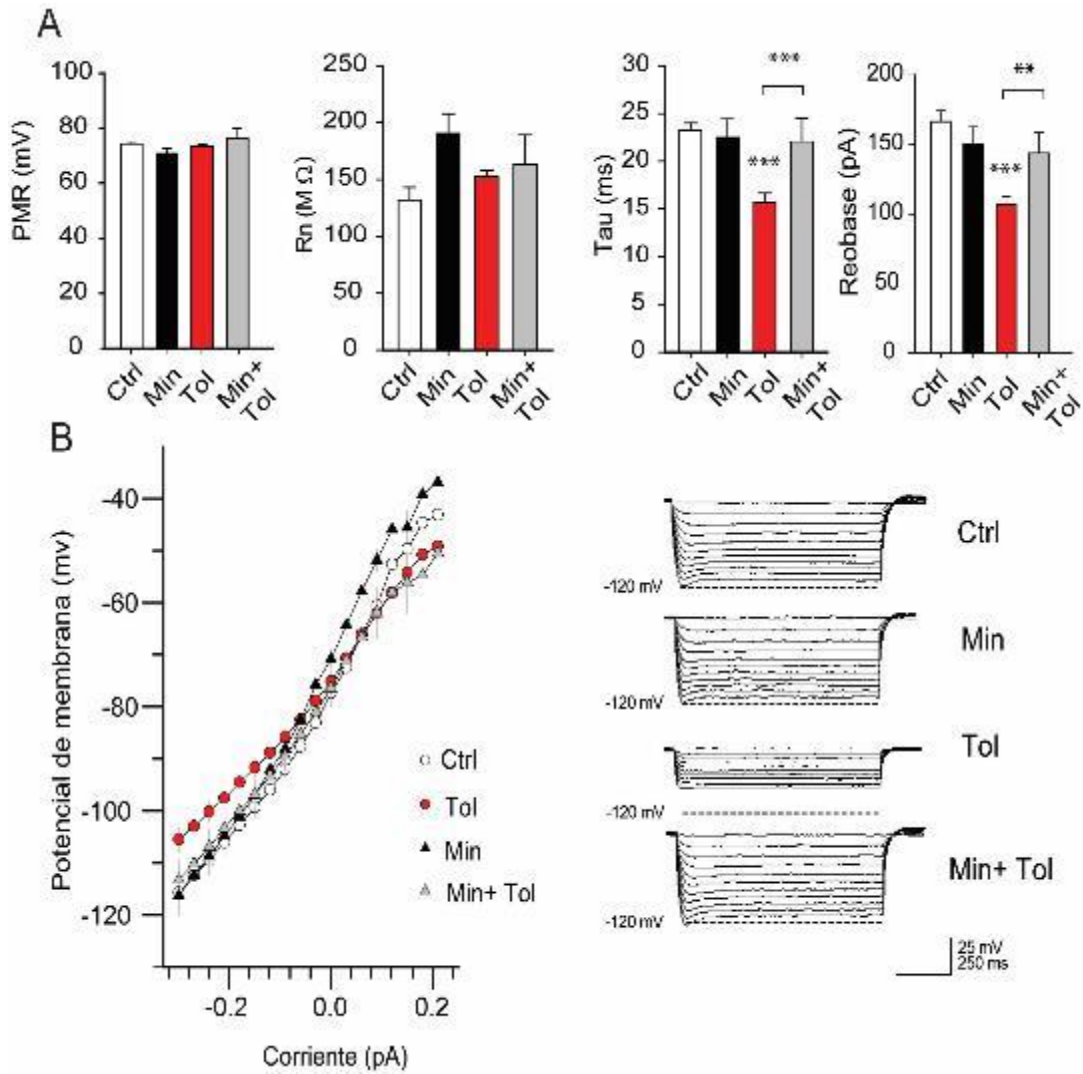


Figura 18. Curva I/V y propiedades pasivas de la membrana con el tratamiento de minociclina. A) Gráficas de barras que representan el promedio \pm E.E del PMR, Rn, Tau y Reobase de animales control (aire + sol. Salina 0.9%) $n_{\text{células}} / \text{animales} = 10/5$, de animales con minociclina (aire+ 50 mg/kg minociclina) $n_{\text{células}} / \text{animales} = 10/5$; expuestos a 8000 ppm de tolueno (tol 8000 ppm+ sol. Salina 0.9%) $n_{\text{células}} / \text{animales} = 10/5$ y animales que recibieron exposiciones de tolueno 8000 ppm más tratamiento con minociclina 50 mg/kg $n_{\text{células}} / \text{animales} = 10/5$. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; ANOVA; prueba de Dunnet B) Gráfica y registros electrofisiológicos obtenidos de un protocolo de curva I/V. Las barras representan el promedio \pm E.E ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ prueba de Dunnet.

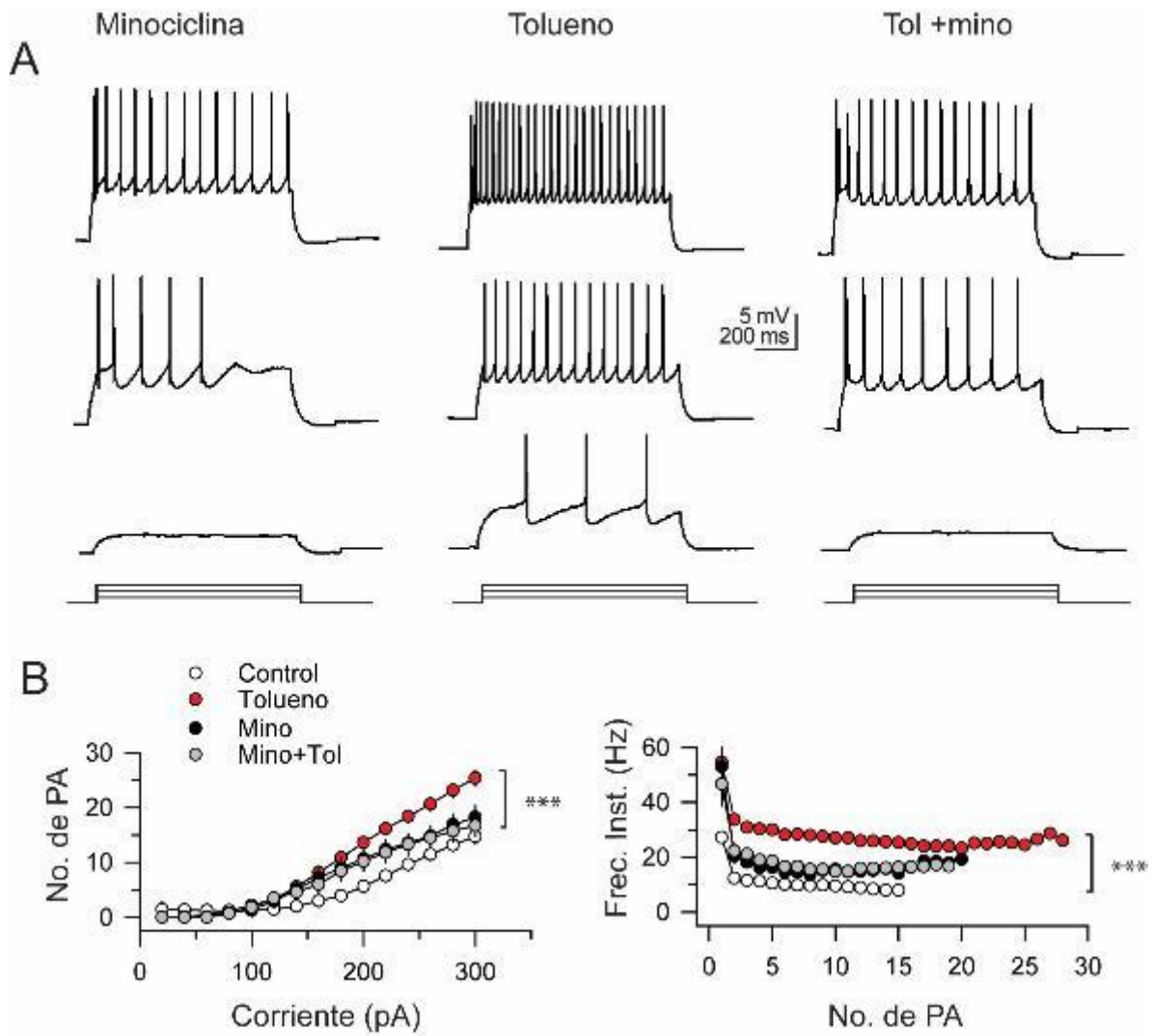


Figura 19. Frecuencia de disparo con el tratamiento de minociclina. A) Registros electrofisiológicos que representan la frecuencia de disparo en condiciones control con minociclina, y registros de animales con exposición crónica de tolueno y tolueno más el tratamiento de minociclina. B) Gráfica que muestra el número de potenciales de acción con respecto a la corriente inyectada todos los grupos tuvieron una $n_{\text{células}} / \text{animales} = 10/5$ *** $p < 0.001$, ANOVA, prueba de Dunnet.

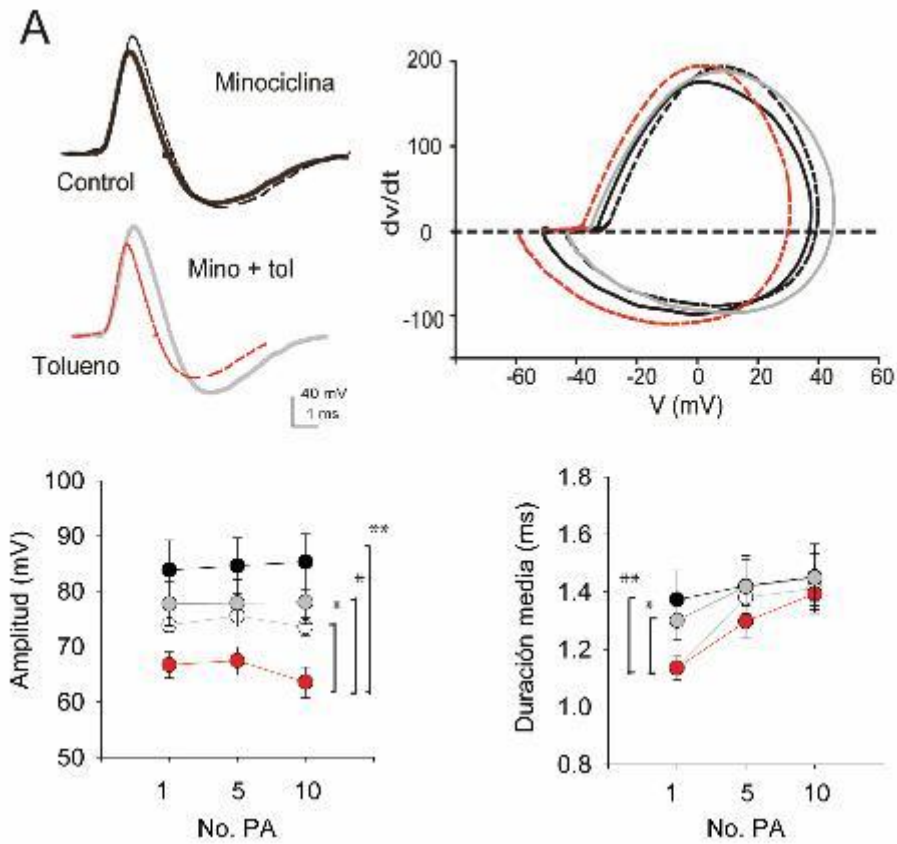


Figura 20. Cinética del potencial de acción y umbral de disparo con el tratamiento de minociclina. A) Potencial de acción de célula control en línea sólida negra y con minociclina en línea punteada, con tratamiento de tolueno línea punteada en color rojo, con minociclina y tolueno en gris . En el lado derecho la derivada del voltaje con respecto al tiempo contra el voltaje que nos muestra la cinética del potencial de acción. B) Gráficas que representan la amplitud y duración total de los potenciales de acción con las diferentes exposiciones ($n_{\text{células}} / \text{animales} = 10/5$). Los puntos representan el promedio \pm E.E. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ANOVA de una vía, prueba de Dunnet.

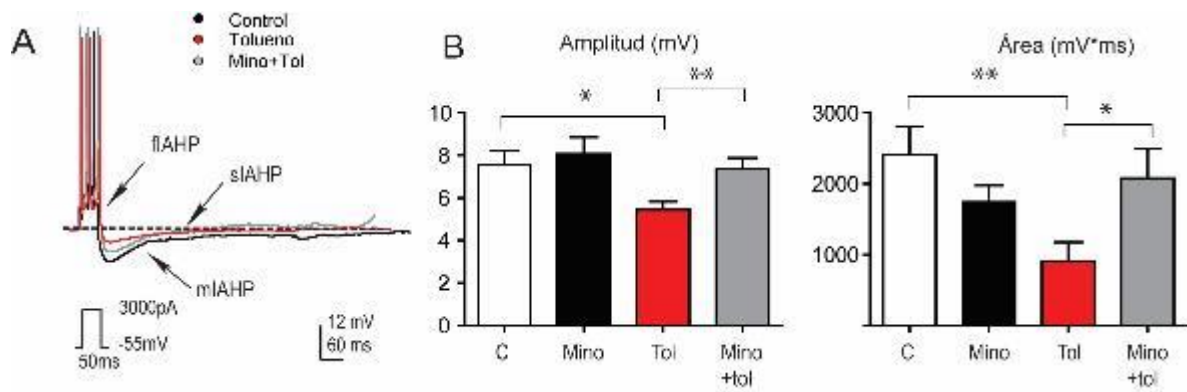


Figura 21. Postpotencial hiperpolarizante con el tratamiento de minociclina. A) Registros electrofisiológicos del postpotencial hiperpolarizante (I_{AHP} por sus siglas en inglés). B) Gráficas que representan la amplitud y el área de los postpotenciales hiperpolarizantes ($n_{\text{células}} / \text{animales} = 10/5$). Las barras representan el promedio \pm E.E. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ANOVA de una vía, prueba de Dunnet.

5.2 Resultados de inmunofluorescencia

Los resultados del análisis de la inmunofluorescencia de la región PL de la CPFm mostraron que las ratas (PN35) sin tratamiento presentan un alto nivel basal de fluorescencia para los marcadores de microglía (Iba-1 en rojo) y astrocitos (GFAP en verde). A continuación se describen los resultados para los grupos expuestos a los disolventes.

5.2.1 La exposición crónica a tolueno pero no al ciclohexano incrementa la expresión de GFAP e Iba-1 en la región PL de la CPFm y el tratamiento con minociclina evita este incremento

En el grupo de los animales expuestos repetidamente a 8000 ppm de tolueno se observó mayor inmunoreactividad a GFAP e Iba-1, no así en los animales expuestos al ciclohexano (Iba-1: $F_{(4,22)} = 113.3$; $P < 0.0001$; GFAP: $F_{(4,22)} = 20.11$; $P < 0.0001$).

La alta inmunoreactividad presentada con la exposición crónica a tolueno tanto para GFAP como para Iba-1 disminuyó de manera significativa en las preparaciones obtenidas de animales tratados con minociclina (Iba-1: $F_{(4,22)} = 113.3$; $P < 0.0001$; GFAP: $F_{(4,22)} = 20.11$; $P < 0.0001$) como se muestra en la figura 22.

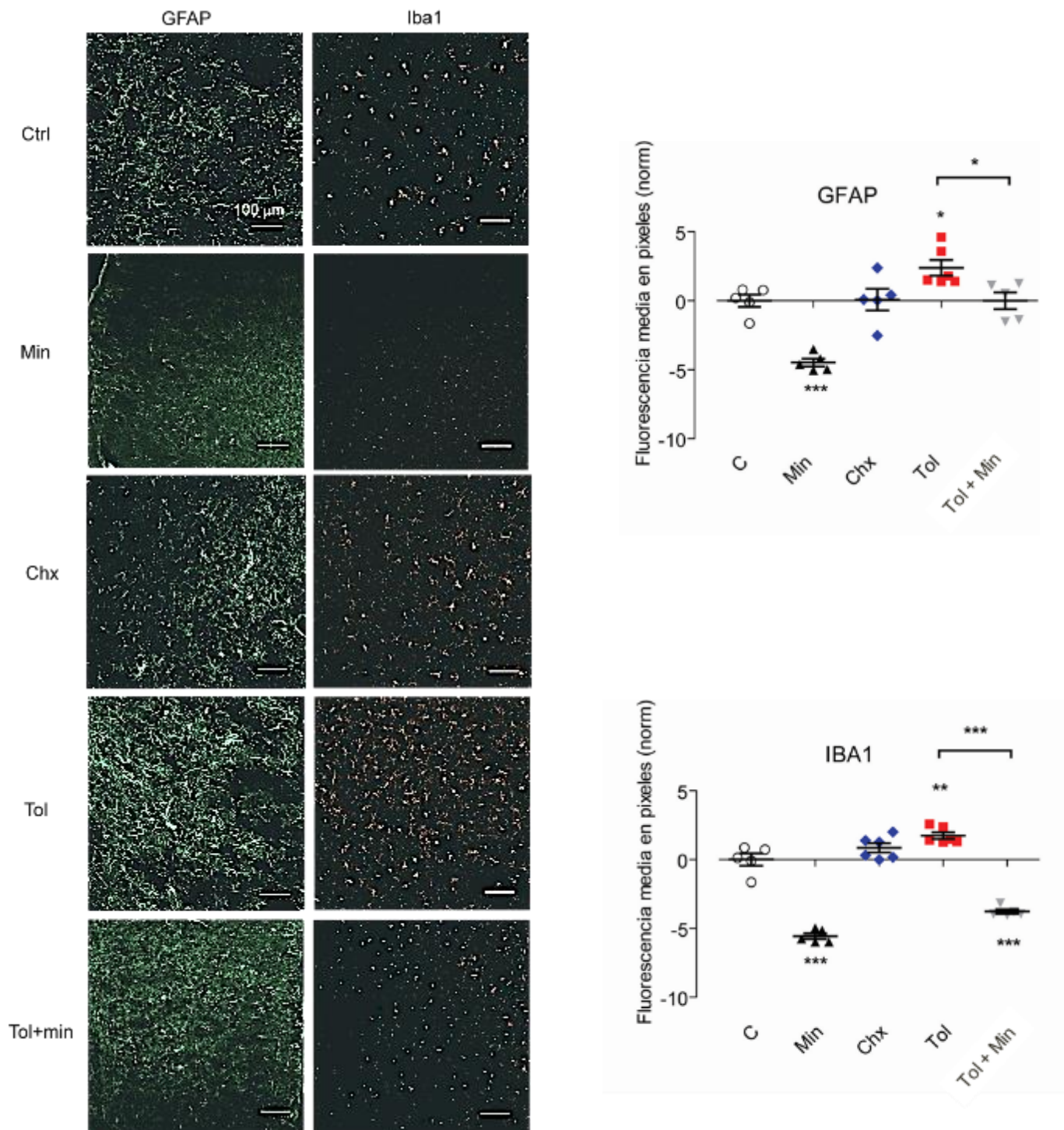


Figura 22. Inmunofluorescencia de Iba-1 y GFAP en la región PL de la CPFm. A) Imágenes confocales de microglía y astrocitos de animales expuestos crónicamente a 8000 ppm de tolueno (Tol) n=5 y ciclohexano (Chx) n=5 y con los tratamientos controles con minociclina (Min) (50 mg/kg) n=5 y expuestos a tolueno con minociclina (Tol+Min) n=5. B) Densidad de la inmunoreactividad de GFAP e Iba-1 representada como fluorescencia media en pixeles (normalizada) para los grupos expuestos a los disolventes. Los puntos representan cada experimento y las líneas el promedio \pm E.E. *p<0.05; ** p< 0.01; ***p< 0.001 ANOVA de una vía, prueba de Tukey.

5.3 Resultados de PCR en tiempo real

5.3.1 El tratamiento con minociclina bloquea el efecto de la exposición crónica al tolueno sobre la expresión de IL-1 β en la CPFm

Se evaluó, mediante qPCR, la expresión de IL-1 β y TGF- β en la región PL de la CPFm de las ratas expuestas únicamente a tolueno y a tolueno con minociclina.

El tolueno incrementó la expresión relativa de IL-1 β y este efecto se previno con minociclina. Por otro lado, la expresión de TGF- β mostró una pequeña disminución con el tratamiento de tolueno, sin embargo la administración de minociclina logró incrementar su expresión y además logró revertir la disminución mostrada por el tolueno (IL-1: $F_{(3,8)} = 14.57$; $P = 0.0013$; TGF- β : $F_{(3,8)} = 11.43$; $P = 0.0029$).

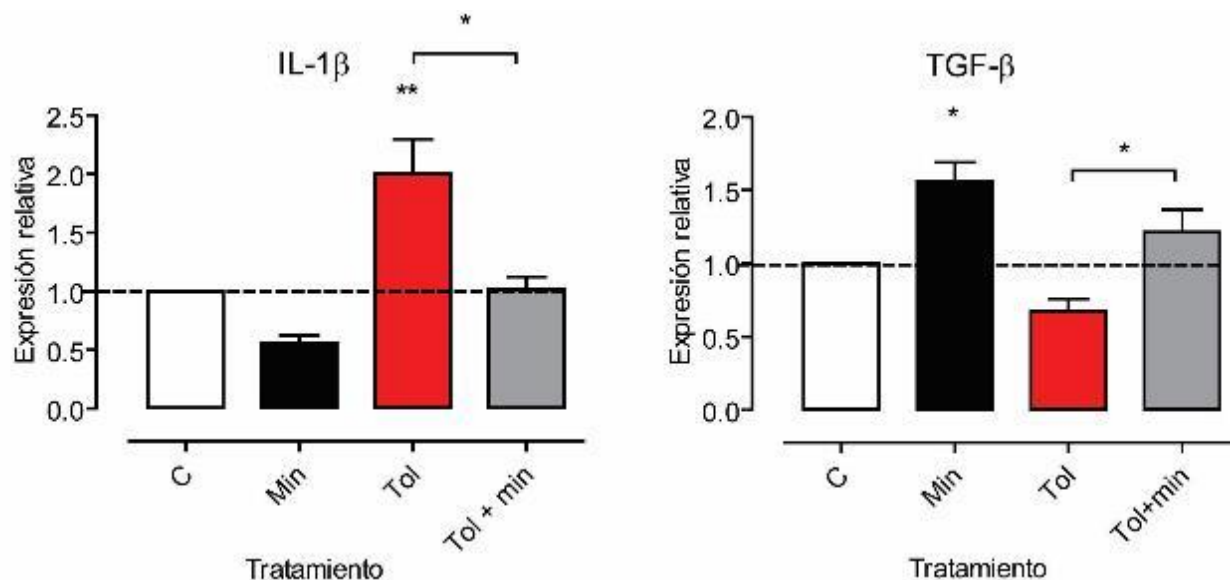


Figura 23. Expresión relativa de IL-1 β y TGF- β en la corteza prefrontal de la mPFC de ratas adolescentes. Perfil de expresión de IL-1 β y TGF- β con la exposición crónica al tolueno, con el tratamiento de minociclina (50 mg/kg) y con la exposición al tolueno simultánea al tratamiento con minociclina (50mg/kg). Los valores de expresión relativa se normalizaron contra actina.

5.4 Evaluación conductual

En una evaluación general de las condiciones de los animales tratados, observamos que sólo los animales expuestos a 8000 ppm de tolueno manifestaron algunos efectos similares a los depresores del SNC, incluida la ataxia y disminución de la coordinación locomotriz (Beyer et al., 2001; Rees y otros, 1987; Williams et al., 2005). Además, los animales presentaron sacudidas de cabeza (head twitch) y postura de cuerpo aplanado durante las sesiones de exposición (Cruz et al., 2016; Rivera-García et al., 2015). Se observó ataxia grave el primer día de exposición en concordancia con otras investigaciones (Beyer et al., 2001); y en las sesiones de exposición posteriores se observó una tolerancia a este efecto. Después de 8 días de exposición repetida de 8000 ppm-tolueno, los animales exhibieron hiperactividad cuando se colocaron en las cámaras de exposición. En este estudio no se encontraron cambios en el peso corporal de los animales (Williams et al., 2005), y se observaron signos de irritación (nariz y ojos) en todos los animales expuestos a tolueno.

5.4.1 El tratamiento con minociclina bloquea el efecto de la exposición crónica al tolueno sobre el deterioro cognitivo

La exposición crónica al tolueno deterioró de manera significativa el proceso de aprendizaje en la prueba de evitación pasiva, disminuyendo la latencia del paso a la zona oscura (Figura 24). El tratamiento con minociclina aumentó de manera parcial la latencia de paso de los animales expuestos crónicamente al tolueno, lo que muestra un efecto protector de la minociclina como se observa en la figura 24 ($F_{(4,45)} = 12.60$; $p < 0.0001$).

También observamos que la exposición repetida al tolueno disminuyó de manera significativa el índice de reconocimiento de objeto novedoso relacionado con el proceso de memoria de orden temporal en la prueba de reconocimiento de objeto novedoso modificada y este efecto se evitó con la administración de minociclina, (figura 24) ($F_{(4,45)} = 25.02$; $p < 0.0001$).

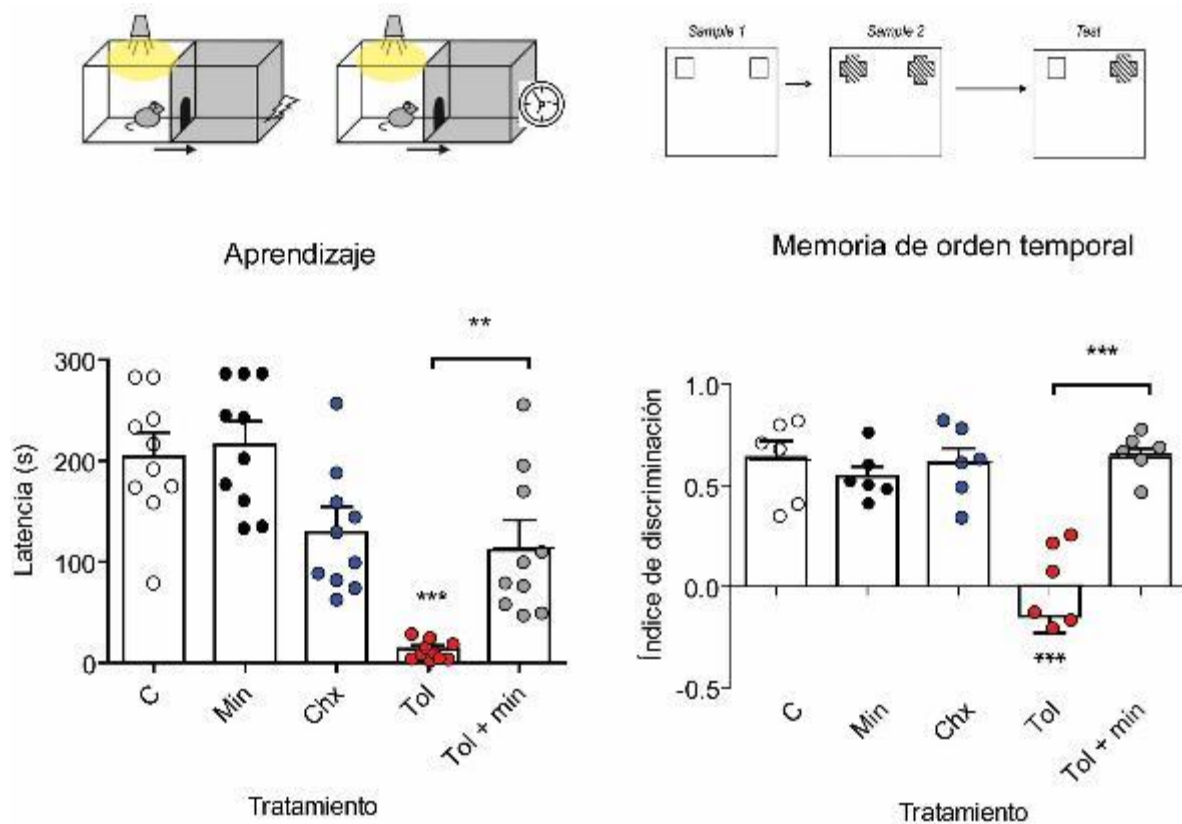


Figura 24. Efecto del tolueno, del ciclohexano y del tratamiento con minociclina sobre el aprendizaje y la memoria temporal. A) Prueba de evitación pasiva, n=10 para todos los grupos. Las barras representan el promedio ± E.E, y los puntos representan cada experimento. B) reconocimiento de objeto novedoso, n= 6 para todos los grupos. Las barras representan el promedio ± E.E, y los puntos representan cada experimento, *p< 0.05; ** p<0.01; *** p<0.001; ANOVA de una vía, prueba de Tukey.

6- DISCUSIÓN

En este trabajo exploramos los efectos de la exposición repetida a concentraciones altas de dos diferentes disolventes, tratando de reproducir un patrón de exposición tipo abuso en ratas adolescentes sobre las propiedades intrínsecas de las neuronas piramidales de la capa V de la CPFm y algunos marcadores de neuroinflamación en la misma región.

Los principales hallazgos del presente estudio se resumen a continuación:

La exposición repetida a 8000 ppm de tolueno produjo: (1) modificación de las propiedades pasivas de la membrana de neuronas piramidales de la capa V de la región PL de la CPFm. (2) Incremento en la frecuencia de disparo de las neuronas. (3) Disminución la amplitud, duración media, el tiempo de subida y el tiempo de bajada del potencial de acción. (4) Disminución el post potencial hiperpolarizante y el umbral de disparo de las neuronas. (5) Incremento del número de eventos sinápticos espontáneos mediados por actividad glutamatérgica y la amplitud de los mismos. (6) Incremento la expresión de GFAP e Iba-1 en CPFm. (7) Incremento de la expresión relativa de IL-1 β en CPFm. (8) Deterioro del aprendizaje y de la memoria temporal.

La exposición repetida a 8000 ppm de ciclohexano produjo: (1) cambios en la rectificación de la curva IV y (2) disminución de la duración y el tiempo de baja del PA

Todos los efectos observados con la exposición crónica de tolueno se evitaron por el tratamiento con minociclina.

En conjunto, estos resultados muestran que el tolueno induce un incremento en la excitabilidad en las neuronas de la CPFm así como un proceso de neuroinflamación más evidente en comparación con el ciclohexano, y que un inhibidor de la activación de los procesos neuroinflamatorios, como la minociclina es capaz de bloquear los efectos del tolueno y posiblemente de prevenirlos. El proceso de neuroinflamación desencadenado por la exposición repetida al tolueno está relacionado con el deterioro en el aprendizaje observado en la prueba de evitación pasiva y con el incremento de la excitabilidad celular de las neuronas piramidales de la CPFm de ratas adolescentes. A continuación se discuten estos resultados.

6.1 Efectos de la exposición crónica al tolueno y ciclohexano en las propiedades intrínsecas de las neuronas piramidales

En reportes previos de los efectos agudos del tolueno en las neuronas piramidales de la capa V de la CPFm de ratas, se ha demostrado que al perfundir este disolvente a través del LCRa que baña a la rebanada de cerebro en diferentes concentraciones (0.1, 0.3 y 1 mM) se presenta un efecto inhibitor importante, con una disminución de la frecuencia de disparo, de la actividad sináptica espontánea y de la excitabilidad neuronal (Beckley and Woodward, 2011b). Este reporte es consistente con el mecanismo de acción del tolueno, como antagonista no competitivo de los receptores NMDA y modulador alostérico positivo del receptor GABA_A (Balster, 1998; Bowen et al., 1996; Cruz et al., 2000; Filley et al., 2004; MacIver, 2009). Sin embargo, nuestros hallazgos señalan que tras el consumo prolongado y a concentraciones altas de tolueno la excitabilidad neuronal aumenta, y esto se debe a las adaptaciones neuronales que conlleva esta exposición que se discuten más adelante. En el caso del ciclohexano, hasta donde tenemos conocimiento, no existen reportes sobre sus efectos sobre las propiedades intrínsecas de las neuronas. Tampoco está claro cuáles son sus efectos sobre distintos sistemas de neurotransmisión. Suponemos que su mecanismo de acción es diferente al del tolueno porque no produce los mismos efectos conductuales (Armenta-Resendiz, Tesis de maestría, 2013; Cruz et al., 2016). Por esas razones, no es sorprendente que sus efectos electrofisiológicos tampoco sean los mismos. Es interesante, sin embargo observar que el ciclohexano; sí logró cambiar algunos parámetros del potencial de acción como el tiempo de caída y duración que discutiremos más adelante. También se observó un aumento en la frecuencia de disparo pero no fue significativo.

Uno de los hallazgos de nuestro trabajo fue que el tolueno produjo un aumento de la resistencia de entrada de las células y una disminución de la constante de tiempo membranal que son propiedades pasivas determinadas por el área de las neuronas, la densidad de los canales y la apertura y cierre de los mismos (Kandel et al., 2013). Estudios morfológicos han encontrado una disminución del tamaño de las neuronas piramidales de la corteza e hipocampo y menor ramificación dendrítica en animales expuestos crónicamente al tolueno a concentraciones de 5000 – 6000 ppm 10 min al día por 10 días en etapas adolescentes (Pascual et al., 2011; Pascual and Bustamante, 2010). Con base en estos

hallazgos es posible sugerir que en los animales expuestos a tolueno evaluados en nuestro estudio se produjo un cambio en la superficie y en el área total de las neuronas asociados al aumento de la resistencia de entrada y de la tau membranar observados. En este sentido, nuestros resultados electrofisiológicos con el tratamiento de minociclina bloquearían la aparición de estos cambios en las propiedades pasivas de la membrana, lo que sería congruentes con el efecto citoprotector de la minociclina (Jordán et al., 2006). En lo que respecta al ciclohexano, dado que no encontramos cambios en las propiedades pasivas de la membrana, es posible suponer que probablemente no tiene efectos crónicos que se traduzcan en cambios en el tamaño de las neuronas o en el número y funcionalidad de canales iónicos.

En este estudio también encontramos que el tolueno incrementó significativamente la frecuencia de disparo de las neuronas piramidales de la corteza. Algunos estudios relacionados con el estudio de la frecuencia de disparo en la CPFm han demostrado que los incrementos en las concentraciones de diferentes neurotransmisores, entre ellos dopamina y serotonina, aumentan la frecuencia de disparo en neuronas piramidales (Benekareddy et al., 2010; Marek and Aghajanian, 1998; Satake et al., 2008). En relación con las concentraciones de serotonina y dopamina, existen trabajos que señalan que tras la exposición al tolueno se incrementa la concentración de ambos neurotransmisores en diferentes áreas cerebrales incluida la CPFm; sin embargo, este efecto es transitorio, ya que con las exposiciones repetidas los niveles de estos neurotransmisores regresan a valores basales (Rivera-García et al., 2015).

El incremento en el disparo neuronal observado con las exposiciones de tolueno a 8000 ppm estuvo acompañado por un incremento de conductancias de potasio rectificadoras entrantes y una disminución del componente lento del post potencial hiperpolarizante. Está bien establecido que la modulación de conductancias subumbrales cercanas al PMR son las principales responsables de las propiedades pasivas y la excitabilidad de las neuronas. Nuestros resultados también respaldan la idea de que el tolueno modula las conductancias activas cercanas de PMR; probablemente, conductancias de potasio salientes. Es importante destacar que la modulación de las corrientes de potasio por tolueno ha sido reportada previamente en ovocitos (Del Re et al., 2006). Sin embargo, si la exposición repetida al tolueno modula las corrientes de potasio en las neuronas centrales, es un problema que

requiere una mayor investigación. Por otro lado, el análisis de las curvas I-V mostró que la exposición a 8000 ppm de tolueno aumenta la rectificación en la parte negativa de la curva. Este rango de voltaje corresponde al potencial de membrana al cual el potasio rectifica o es entrante. Los rectificadores están activos en la corteza prefrontal de los roedores (Day, 2005), lo que sugiere que el tolueno modula los canales rectificadores entrantes de potasio. Importantly, varios canales de potasio, incluidos los rectificadores entrantes en la corteza, se ha demostrado que se modulan por la exposición crónica al alcohol, cocaína y tolueno.

En este estudio también se observó que el tolueno y el ciclohexano disminuyen el tiempo de bajada y la duración del PA. La fase de repolarización del PA depende de las conductancias de potasio dependientes de voltaje (Kv) (Kandel et al., 2013; S Kourrich et al., 2015b). Una disminución del tiempo de bajada y de la duración del PA se debe al incremento en la función de canales Kv de tipo A. Ambos disolventes disminuyen el tiempo de bajada y la duración del PA por lo tanto podría estar incrementando la función de los canales Kv. Este fenómeno se ha reportado en procesos como apoptosis, estrés oxidativo, neurotoxicidad, neuroinflamación y envejecimiento, donde hay un aumento en la actividad de canales Kv y disminución de la fase de repolarización (Panama et al., 2011; Pannaccione et al., 2005).

6.2 Efecto de la neuroinflamación en la excitabilidad intrínseca de las neuronas

Existen reportes sobre el incremento en la frecuencia de disparo de neuronas en hipocampo y corteza causado por la neurotoxicidad que se presenta con el incremento de la concentración de glutamato extracelular, el aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno y la secreción de interleucinas proinflamatorias de macrófagos, en caso de inflamación periférica, o de la microglía en SNC (Balez et al., 2016; Chen et al., 2011; Devinsky et al., 2013; Flake et al., 2005; Harriott et al., 2006; M Pascual et al., 2014; Wu et al., 2015; Yoshimura and de Groat, 1999). En el caso del tolueno se ha reportado que hay un proceso neurotóxico importante que incluye marcadores de estrés oxidativo, apoptosis y disminución en la neurogénesis en hipocampo (Al-Ghamdi et al., 2004; Paez-Martinez et al., 2013; Sarma et al., 2011). Así mismo el metabolismo de este disolvente

produce altos niveles de especies reactivas de oxígeno y de estrés oxidativo (ASTDR, 1997; Edelfors et al., 2002; Kodavanti et al., 2011). Otros reportes indican que el tolueno podría ser un agente proinflamatorio, ya que exposiciones ocupacionales (5, 50 o 500 ppm, 6 horas diarias por 5 días a la semana en un total de 6 semanas) incrementan la expresión de citocinas como TNF y del receptor TLR4 así como de NF-kB (Tin Tin Win-Shwe et al., 2011) en el hipocampo. Estos factores en conjunto podrían ser los responsables de los cambios en la excitabilidad celular observados después de la exposición repetida al tolueno, ya que un incremento en la excitabilidad neuronal asociado a la neuroinflamación también se ha observado con otros compuestos neurotóxicos como el alcohol con el que comparte mecanismo de acción el tolueno (Abernathy et al., 2010). En el caso del ciclohexano su metabolismo ha sido reportado como metabolismo de fase 2, es decir, por conjugación con ácido glucorónico (Luttrell, 2010) que no resulta ser oxidante. Si bien, se desconoce su mecanismo de acción, no se descarta la posibilidad de que este disolvente también cause neurotoxicidad, aunque hay pocos reportes sobre sus efectos neurotóxicos y pro-inflamatorios, en ellos es necesaria una exposición más prolongada (30 días) y a concentraciones mayores para observar cambios (9,000 ppm) (Campos-Ordóñez et al., 2015; Lammers et al., 2009).

Existe evidencia que muestra el papel de la neuroinflamación como desencadenante del fenómeno de 'derrame' de glutamato en el espacio extrasináptico. Este fenómeno está dado por el glutamato liberado de las células gliales en combinación con la disminución de la capacidad de los transportadores gliales para amortiguar y despejar glutamato (McCullumsmith and Sanacora, 2015). Esto conlleva a la activación de receptores extrasinápticos NMDA y conduce a la hiperexcitabilidad celular, a la atrofia de las espinas dendríticas y a la pérdida de la integridad sináptica, lo que finalmente resulta en pérdida neuronal (Hardingham and Bading, 2010; Malarkey and Parpura, 2008). Una de las principales modificaciones que se deriva la exposición crónica al tolueno es el incremento en la densidad de los receptores NMDA en particular la subunidad N2B (Williams et al., 2005), y esto se ha asociado a su mecanismo de acción como antagonista de estos mismos receptores, ya que existen reportes que muestran un aumento y redistribución homeostática de los receptores AMPA y NMDA en respuesta al bloqueo subcrónico de los receptores NMDA (Wang and Gao, 2012). Por otro lado, existe evidencia que relaciona a la IL-1 β con

incremento en la actividad del receptor NMDA en especial la subunidad N2B así como en el incremento de su expresión (Vezzani and Viviani, 2015). También hay investigaciones en las que se observa el papel modulador del glutamato sobre el NF- κ B inducible en neuronas, ya que se activa a través del receptor NMDA y también es capaz de regular la expresión de estos canales (O'Neill and Kaltschmidt, 1997). Por ello, es lógico pensar que el mecanismo de acción del tolueno y su neurotoxicidad modifican en conjunto la homeostasis glutamatérgica y la densidad de los receptores NMDA que podría explicar la excitabilidad celular elevada que encontramos en este trabajo.

Para conocer el papel de estos factores neuroinflamatorios, así como la modulación de la excitabilidad celular a través de la IL-1 β y del NF- κ B se evaluó el efecto del tratamiento con minociclina que es un inhibidor tanto del proceso de neuroinflamación como del transporte de NF- κ B al núcleo (Dean et al., 2012). Se ha reportado que la minociclina protege contra la excitotoxicidad mediada por NMDA (González et al., 2007; Tikka and Koistinaho, 2001), además, evita la proliferación de células microgliales y la liberación incrementada de IL-1 β y óxido nítrico inducida por NMDA en cultivos de microglia puros (Tikka and Koistinaho, 2001). Congruente con nuestra hipótesis, este tratamiento resultó ser eficaz para bloquear los efectos del tolueno sobre la excitabilidad celular, por lo que suponemos que los cambios que observamos en la excitabilidad intrínseca de estas neuronas tras la exposición repetida al tolueno, pudieran estar asociados a la neurotoxicidad y a la neuroinflamación que desencadenan un desequilibrio en la neurotransmisión glutamatérgica.

En modelos animales de inflamación periférica se ha evaluado la excitabilidad intrínseca de las neuronas de la CPFm y se ha reportado que tras un proceso de inflamación se incrementa la frecuencia de disparo en las neuronas (Xiao *et al.*, 2015). Por otro lado, algunas citocinas proinflamatorias, como la IL-1 β y el TNF, incrementan la excitabilidad neuronal en general. Ambas citocinas incrementan la actividad de canales de Na⁺ y particularmente la IL-1 β inhibe corrientes gabaérgicas en neuronas hipocampales e interactúa con receptores glutamatérgicos potenciando las corrientes mediadas por NMDA (Schafers and Sorkin, 2008). La IL-1 β también está implicada en el incremento en la expresión de receptores NMDA en especial la subunidad N2B. En relación con esto evaluamos la concentración de IL-1 en la CPFm y observamos que incrementa su expresión

con la exposición a tolueno y este efecto se bloquea con el tratamiento de minociclina. Este tratamiento resultó ser eficaz también para la reducción de la frecuencia de disparo y para excitabilidad neuronal en general.

Otro resultado de nuestro estudio es que con la exposición repetida a tolueno existe una disminución en la duración del potencial de acción, en el tiempo de bajada y en el post potencial hiperpolarizante. Estos tres parámetros están regulados por canales de K^+ dependientes de voltaje y canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} . Se ha reportado que el tolueno bloquea canales BK que son canales mixtos ya que se activan tanto con voltaje como por calcio (Del Re et al., 2006); y por otro lado, se ha descrito que las citocinas inflamatorias como la IL-1 β , producen un bloqueo de corrientes inducidas por canales de potasio (Vezzani and Viviani, 2015). Cuando inhibimos la activación de la microglía y de los astrocitos con la administración de minociclina, disminuyó la expresión de IL-1 β , Iba1 y GFAP en la CPFm y en nuestros registros electrofisiológicos también pudimos observar que se evitó el efecto del tolueno en los parámetros de amplitud, duración, tiempo de subida y bajada y disminución del postpotencial hiperpolarizante, siendo evidente la participación de la neuroinflamación en la regulación de la excitabilidad celular y en la cinética del PA.

6.3 Efectos del tolueno y del ciclohexano sobre la fluidez membranal

Durante la década de los 80 y 90 fue muy popular la idea de que los disolventes modificaban la fluidez membranal y de ahí se derivaban sus efectos, a esto se le conoce como la hipótesis de la fluidez membranal. En el caso del alcohol se han encontrado pruebas de que produce una perturbación membranal con altas concentraciones (casi letales (Harris and Hitzemann, 1981)). Sin embargo, esta hipótesis quedó relegada tras observar que el alcohol y disolventes como el tolueno tienen blancos moleculares de acción específicos y mecanismos más complejos (Allan and Harris, 1986; Beckstead et al., 2000; Cruz et al., 1998; López-Rubalcava et al., 2000; Lovinger and Zhou, 1994; Wang and Gustafson, 1994). La fluidez membranal ha sido correlacionada con actividad enzimática y con funciones de transporte de iones. Un incremento en la fluidez de membranal activa la bomba Na^+K^+ y modifica la homeostasis del ion K^+ que se logra a través del funcionamiento adecuado de los canales pasivos de K^+ y de la bomba Na^+K^+ (Eckert et al.,

2011; Thalhammer et al., 1993). Estos procesos están relacionados con el mantenimiento del potencial de membrana en reposo. Nosotros observamos que tras la exposición crónica con concentraciones tipo abuso de tolueno o ciclohexano no se modificó el potencial de membrana reposo, por lo tanto, no parece haber una afectación importante de la fluidez membranal. Un estudio donde se probó ciclohexano (10 y 20 nM) en tejido hepático se observó que disminuye la anisotropía de manera dependiente de la concentración lo que modifica la elasticidad, la viscosidad y la temperatura de las membranas pero no presentó disminución en la actividad de la ATPasa Na^+K^+ (Thalhammer et al., 1993). Estos estudios nos muestran que si bien existe un efecto de los disolventes sobre las membranas, es necesaria la exposición extrema para lograr modificaciones tales que se pudieran observar en la fisiología de las neuronas, por lo que suponemos que los cambios observados en este trabajo están asociados a cambios y remodelaciones en la neurotransmisión y en otros procesos como la neuroinflamación dados por la cronicidad del consumo y no a procesos de fluidez o cambios membranales.

6.4 Efectos del tolueno y el ciclohexano sobre el proceso de neuroinflamación

En nuestros resultados encontramos que la exposición crónica al tolueno incrementa la expresión de IL-1 β , y que dicho incremento se previene al administrar un tratamiento de minociclina (50 mg/kg i. p.) durante 10 días. Estos resultados son coherentes con lo que esperábamos encontrar pues existían antecedentes de que el tolueno a concentraciones ocupacionales (5-50 ppm) ya inducía un incremento en la expresión de varios mediadores inflamatorios y la activación del receptor TLR4 (Win-Shwe et al., 2011; Win-Shwe et al., 2012), y esperábamos que la minociclina bloqueara el efecto sobre la expresión IL-1 β inducido por el tolueno. En este trabajo también evaluamos la expresión de TGF- β que es un péptido multifuncional que controla la proliferación, la diferenciación y otras funciones en muchos tipos de células. También regula las acciones de muchos otros factores de crecimiento peptídicos y determina una dirección positiva o negativa de sus efectos. Su marcada capacidad para mejorar la formación del tejido in vivo y su acción supresora en los linfocitos T y B, sugieren aplicaciones como agente antiinflamatorio o inmunosupresor (Sporn et al., 1986). Sin embargo, en este estudio no encontramos cambios significativos en

la expresión de TGF- β con la exposición repetida a 8000 ppm de tolueno, lo cual podría indicar que el tolueno no activa el fenotipo M2 de la microglía, pero se necesitaría más investigación al respecto.

Con el fin de observar la participación de las células gliales medimos la fluorescencia de los marcadores Iba-1 y GFAP encontrando que, de manera basal, la expresión de ambos marcadores se encontraba aumentada. Este resultado podría deberse a que durante la adolescencia, la CPF experimenta el segundo mayor período de desarrollo con una poda sináptica a gran escala (Kolb et al., 2012; Nemati and Kolb, 2012). Con relación a esto se ha observado una clara diferencia entre la microglía adolescente y la microglía adulta siendo la primera más hipertrófica y abundante (Staci D. Bilbo et al., 2012; Brenhouse and Schwarz, 2016). Aunque la inmunoreactividad basal se encontraba incrementada, logramos ver que con la exposición crónica al tolueno se incrementaba aún más la inmunoreactividad para GFAP e Iba-1, para el ciclohexano observamos solo un pequeño incremento en la inmunoreactividad a Iba-1. Este incremento de GFAP presentado únicamente por los grupos expuestos al tolueno, pudiera estar asociado al aumento de la frecuencia de disparo y de la excitabilidad neuronal que reportamos, ya que los astrocitos son los principales reguladores de la liberación y recaptura extracelular de glutamato y participan directamente en las sinapsis. Esta actividad incrementada o astrogliosis que encontramos en la región PL de la CPFm sugiere la participación astrocítica en el incremento de la excitabilidad del circuito evidenciada por el aumento de la actividad sináptica espontánea.

6.5 Efectos de la neuroinflamación asociada a la exposición crónica de tolueno en el deterioro cognitivo

Los cambios que encontramos en las neuronas piramidales de la CPFm podrían estar asociados a los déficits cognitivos relacionados al consumo crónico de tolueno que han sido reportados en estudios clínicos (Lubman et al., 2008) y en modelos animales. Algunos de estos déficits más notables son la disminución de la capacidad de atención, de la memoria de trabajo, de la memoria a corto y largo plazo (Huerta-Rivas et al., 2012; Win-Shwe and Fujimaki, 2012), y deterioro del aprendizaje (Baydas et al., 2005; Dick et al., 2014; Huerta-Rivas et al., 2012; Miyake et al., 1983; Montes et al., 2017; Shigeta et al., 1986; von Euler

et al., 1993; Wada et al., 1988). Con base en estos antecedentes y en nuestros resultados evaluamos con la prueba de evitación pasiva, parámetros de la fase de aprendizaje de animales que fueron expuestos a los disolventes y otros que recibieron el tratamiento de minociclina. De manera congruente con nuestra hipótesis, encontramos que la inhibición del proceso de neuroinflamación en ratas expuestas al tolueno logró disminuir el deterioro cognitivo de manera parcial en esta prueba. También decidimos utilizar una prueba que no tuviera un componente aversivo por lo que utilizamos la prueba de reconocimiento de objeto novedoso modificada que permite conocer el estado de la memoria de trabajo del animal. Además, en esta prueba modificada la principal conducta observada está asociada a la CPFm más que a cualquier otra estructura cerebral (Barker et al., 2007). Observamos que el tolueno disminuyó el índice de reconocimiento del objeto más reciente y que posiblemente se deba a alteraciones en la atención o en la memoria temporal. Dado que este efecto se evitó con el tratamiento de minociclina, es lógico suponer que la activación del proceso de neuroinflamación inducido por el tolueno puede tener un efecto deletéreo en áreas específicas como la CPFm. En este sentido, existen estudios que demuestran que la neuroinflamación inducida por LPS altera las ejecuciones en estas pruebas de memoria debido a las modificaciones neuronales que se desencadenan por la liberaciones de mediadores inflamatorios y la activación glial (de Pablos et al., 2006; Henry et al., 2008). Es necesario hacer estudios específicos para analizar los posibles mediadores de este efecto.

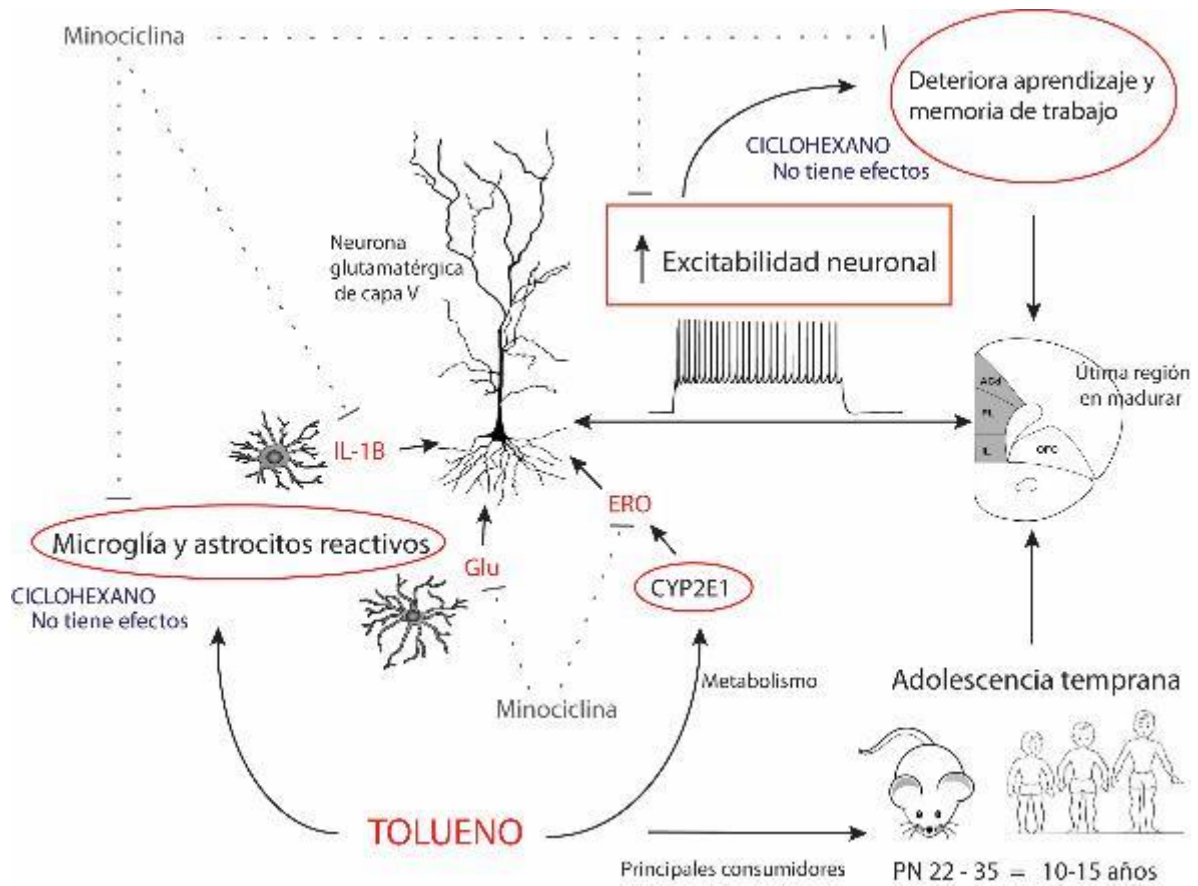


Figura 25. Esquema que resume los principales hallazgos de este estudio. Los efectos neuroinflamatorios y neurotóxicos del tolueno incrementan la excitabilidad intrínseca y a su vez inducen deterioro del aprendizaje y la memoria de orden temporal (memoria de trabajo); además el ciclohexano que tiene un perfil farmacológico diferente no induce ninguno de estos efectos. La minociclina, que impide la síntesis de citocinas y otros mediadores que inducen excitotoxicidad, previno todos los efectos deletéreos causados por las exposiciones al tolueno.

7. CONCLUSIONES

Del presente estudio podemos concluir los siguientes puntos:

- 1) La exposición repetida al tolueno, pero no al ciclohexano, modifica las propiedades pasivas de la membrana y esta modificación no puede ser explicada con las hipótesis de la fluidez membranal, sino que se debe a un proceso más complejo que se deriva de la neuroinflamación que produce.
- 2) La exposición repetida al tolueno incrementa la frecuencia de disparo y la excitabilidad celular, así como el deterioro cognitivo en la prueba de evitación pasiva y reconocimiento de objeto novedoso modificada como resultado del incremento de la activación glial y de la liberación de IL-1 β en la región PL de la CPFm.
- 3) Nuestros resultados muestran que el tolueno induce un incremento en la excitabilidad en las neuronas piramidales de la capa V de la región PL de la CPFm de manera más significativa que el ciclohexano, y que un inhibidor de la activación de la vía NF- κ B, como la minociclina, es capaz de bloquear sus efectos y posiblemente de prevenirlos. Estos procesos inflamatorios están relacionados con el deterioro en el aprendizaje y la memoria de trabajo, así como con el incremento de la excitabilidad celular de las neuronas piramidales de la CPFm de ratas adolescentes.

En conclusión, hemos encontrado diferencias en las pruebas electrofisiológicas tras la exposición repetida al tolueno en parámetros que nos refieren una mayor excitabilidad celular. El ciclohexano resultó ser un disolvente que no afecta parámetros que se refieren a la excitabilidad intrínseca de las células; tuvo un efecto de aumento sobre la frecuencia de disparo, sin embargo no en la misma proporción que el tolueno.

Sobre el papel de la neuroinflamación en los procesos neuronales que se observan tras la exposición crónica de tolueno, nuestros hallazgos electrofisiológicos, moleculares y conductuales suponen una importante modulación de los efectos deletéreos del tolueno por la activación del proceso inflamatorio en el SNC. Con lo anterior podemos decir que nuestras hipótesis fueron corroboradas por nuestros resultados.

8. PERSPECTIVAS

Los resultados presentados en esta tesis presentan la posibilidad de ampliar la investigación en esta área por lo que las perspectivas que genera este proyecto son:

- Debido a que se observa un componente glutamatérgico incrementado sería pertinente analizar la actividad glutamatérgica después de exposiciones repetidas a concentraciones altas de tolueno, para ello será necesario cuantificar los niveles tisulares de glutamato ya sea mediante HPLC o microdialísis y también evaluar la expresión de los receptores NMDA y AMPA por western blot o PCR.
- De este proyecto se deriva la cuestión sobre la relación que existe entre los niveles de glutamato elevados, la neuroinflamación y la excitabilidad intrínseca, para ello se podría evaluar la participación de la IL-1 β en la activación, fosforilación o expresión de los receptores NMDA mediante técnicas como inmunofluorescencias, western blot, PCR.
- Ahora bien este proyecto es descriptivo por lo que permite pensar en un análisis más mecanístico sobre cómo la neuroinflamación producida por el tolueno modifica algunos parámetros específicos de la excitabilidad intrínseca. Para ello es necesario observar los cambios que la minociclina induce en los canales iónicos que participan en el mantenimiento de la cinética del PA y de la frecuencia de disparo. Se podrían aislar las corrientes de Na⁺ con bloqueadores de corrientes de K⁺ como apamina o TEA y viceversa aislar las corrientes de K⁺ con bloqueadores de canales de Na⁺ como TTX en animales que fueron expuestos al tolueno y tratados con minociclina.
- La concentración de ciclohexano probada en este trabajo, aunque fue elevada, quizá no es suficientemente alta para inducir efectos deletéreos, por lo que resultaría conveniente realizar una curva dosis-respuesta de diferentes concentraciones de ciclohexano para observar si los cambios observados son concentración dependiente y si concentraciones más elevadas pueden causar efectos similares al tolueno.

- Debido a que este trabajo se concentró en el análisis de las propiedades de células individuales sería interesante estudiar mediante electrofisiología de campo la actividad poblacional de neuronas con el tratamiento de minociclina para conocer los efectos de la inhibición de la inflamación en el circuito sináptico. Así como estudiar la LTP y LTD de animales expuestos a tolueno y ciclohexano.
- Nosotros observamos que la recuperación del tratamiento con minociclina fue parcial en la prueba de evitación pasiva que incluye un estímulo aversivo, por lo que, resultaría interesante estudiar el efecto del tolueno sobre la amígdala con estudios de electrofisiología in vivo con paradigmas que incluyan un condicionamiento aversivo.
- En este trabajo se observó que el tolueno modifica la IAHP por lo que sería relevante estudiar la activación y expresión de los canales BK y SK en las neuronas piramidales con exposiciones repetidas a tolueno para conocer cómo se afectan estas proteínas con el consumo crónico de tolueno y si son las responsables de los cambios en la IAHP ya que estos canales son los principales generadores de esta corriente. Esto podría ser con técnicas electrofisiológicas pero también con western blot o inmunofluorescencia.
- La adolescencia es un periodo crítico donde hay mucha actividad de las células de la glía por lo que algunos resultados pueden estar asociados a estos cambios del desarrollo por lo que sería pertinente analizar los mismos efectos que se estudiaron en este trabajo pero con ratas adultas para conocer si se presentan cambios neuronales a diferentes edades.
- Unas de las principales diferencias entre el tolueno y el ciclohexano es que el primero induce efectos psicoactivos y neurotoxicidad más severa que el otro, por lo que otra perspectiva que deja este trabajo es la de promover políticamente en nuestro país una regulación más estricta sobre la cantidad de tolueno que contienen los productos domésticos, escolares e industriales, que son accesibles para los jóvenes o promover la sustitución del tolueno por disolventes menos nocivos, como es el caso del ciclohexano que hasta el momento no ha mostrado un perfil adictivo como el tolueno.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A.K., 2006. *Inmunología celular y molecular*, quinta edi. ed. Elsevier.
- Abernathy, K., Chandler, L.J., Woodward, J.J., 2010. Alcohol and the Prefrontal Cortex. *Int. Rev. Neurobiol.* 91, 289–320.
- Agrawal, R.G., Hewetson, A., George, C.M., Syapin, P.J., Bergeson, S.E., 2011. Minocycline reduces ethanol drinking. *Brain Behav Immun* 25 Suppl 1, S165-9.
- Al-Ghamdi, S.S., Raftery, M.J., Yaqoob, M.M., 2004. Toluene and p-xylene induced LLC-PK1 apoptosis. *Drug Chem Toxicol* 27, 425–432.
- Allan, A.M., Harris, R.A., 1986. Gamma-aminobutyric acid and alcohol actions: neurochemical studies of long sleep and short sleep mice. *Life Sci* 39, 2005–2015.
- ASTDR, 1997. Toxicological profile for Toluene. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. U. S.
- Bale, A.S., Smothers, C.T., Woodward, J.J., 2002. Inhibition of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by the abused solvent, toluene. *Br. J. Pharmacol.* 137, 375–383.
- Bale, A.S., Tu, Y., Carpenter-Hyland, E.P., Chandler, L.J., Woodward, J.J., 2005. Alterations in glutamatergic and gabaergic ion channel activity in hippocampal neurons following exposure to the abused inhalant toluene. *Neuroscience* 130, 197–206.
- Balez, R., Steiner, N., Engel, M., Munoz, S.S., Lum, J.S., Wu, Y., Wang, D., Vallotton, P., Sachdev, P., O'Connor, M., Sidhu, K., Munch, G., Ooi, L., 2016. Neuroprotective effects of apigenin against inflammation, neuronal excitability and apoptosis in an induced pluripotent stem cell model of Alzheimer's disease. *Sci Rep* 6, 31450.
- Balster, R.L., 1998. Neural basis of inhalant abuse. *Drug Alcohol Depend.* 51, 207–214.
- Balster, R.L., Cruz, S.L., Howard, M.O., Dell, C.A., Cottler, L.B., 2009. Classification of abused inhalants. *Addiction* 104, 878–882.
- Barker, G.R.I., Bird, F., Alexander, V., Warburton, E.C., 2007. Recognition Memory for Objects, Place, and Temporal Order: A Disconnection Analysis of the Role of the

- Medial Prefrontal Cortex and Perirhinal Cortex. *J. Neurosci.* 27, 2948–2957.
- Baydas, G., Ozveren, F., Akdemir, I., Tuzcu, M., Yasar, A., 2005. Learning and memory deficits in rats induced by chronic thinner exposure are reversed by melatonin. *J Pineal Res* 39, 50–56.
- Baydas, G., Reiter, R.J., Nedzvetskii, V.S., Yaşar, A., Tuzcu, M., Ozveren, F., Canatan, H., 2003. Melatonin protects the central nervous system of rats against toluene-containing thinner intoxication by reducing reactive gliosis. *Toxicol. Lett.* 137, 169–174.
- Beckley, J.T., Woodward, J.J., 2013. Volatile solvents as drugs of abuse: focus on the cortico-mesolimbic circuitry. *Neuropsychopharmacology* 38, 2555–67.
- Beckley, J.T., Woodward, J.J., 2011a. The abused inhalant toluene differentially modulates excitatory and inhibitory synaptic transmission in deep-layer neurons of the medial prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology* 36, 1531–42.
- Beckstead, M.J., Weiner, J.L., Eger, E.I., Gong, D.H., Mihic, S.J., 2000. Glycine and gamma-aminobutyric acid(A) receptor function is enhanced by inhaled drugs of abuse. *Mol. Pharmacol.* 57, 1199–205.
- Benekareddy, M., Goodfellow, N.M., Lambe, E.K., Vaidya, V.A., 2010. Enhanced function of prefrontal serotonin 5-HT(2) receptors in a rat model of psychiatric vulnerability. *J Neurosci* 30, 12138–12150.
- Bilbo, S.D., Smith, S.H., Schwarz, J.M., 2012. A lifespan approach to neuroinflammatory and cognitive disorders: a critical role for glia. *J Neuroimmune Pharmacol* 7, 24–41.
- Binder, M.D., Heckman, C.J., Powers, R.K., 1993. How different afferent inputs control motoneuron discharge and the output of the motoneuron pool. *Curr Opin Neurobiol* 3, 1028–1034.
- Blakemore, S.-J., 2008. The social brain in adolescence. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 267–277.
- Bowen, S.E., Batis, J.C., Paez-Martinez, N., Cruz, S.L., 2006. The last decade of solvent research in animal models of abuse: Mechanistic and behavioral studies. *Neurotoxicol. Teratol.* 28.
- Bowen, S.E., Wiley, J.L., Balster, R.L., 1996. The effects of abused inhalants on mouse

- behavior in an elevated plus-maze. *Eur. J. Pharmacol.* 312, 131–136.
- Bowen, S.E., Wiley, J.L., Balster, R.L., 1996. The effects of abused inhalants on mouse behavior in an elevated plus-maze. *Eur J Pharmacol* 312, 131–136.
- Brenhouse, H.C., Schwarz, J.M., 2016. Immunoadolescence: Neuroimmune development and adolescent behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 70, 288–299.
- Burke, N.N., Fan, C.Y., Trang, T., 2016. Microglia in health and pain: impact of noxious early life events. *Exp Physiol* 101, 1003–1021.
- Campos-Ordonez, T., Zarate-Lopez, D., Galvez-Contreras, A.Y., Moy-Lopez, N., Guzman-Muniz, J., Gonzalez-Perez, O., 2015. Cyclohexane Produces Behavioral Deficits Associated with Astrogliosis and Microglial Reactivity in the Adult Hippocampus Mouse Brain. *Cell. Mol. Neurobiol.* 35, 503–512.
- Capuron, L., Miller, A.H., 2011. Immune system to brain signaling: neuropsychopharmacological implications. *Pharmacol Ther* 130, 226–238.
- Casano, A.M., Peri, F., 2015. Microglia: multitasking specialists of the brain. *Dev Cell* 32, 469–477.
- Casey, B.J., Jones, R.M., Hare, T.A., 2008. The adolescent brain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1124, 111–126.
- Casey, B.J., Trainor, R., Giedd, J., Vauss, Y., Vaituzis, C.K., Hamburger, S., Kozuch, P., Rapoport, J.L., 1997. The role of the anterior cingulate in automatic and controlled processes: a developmental neuroanatomical study. *Dev Psychobiol* 30, 61–69.
- Chan, W.Y., Kohsaka, S., Rezaie, P., 2007. The origin and cell lineage of microglia: new concepts. *Brain Res. Rev.* 53, 344–354.
- Chen, H.H., Lin, Y.R., Chan, M.H., 2011. Toluene exposure during brain growth spurt and adolescence produces differential effects on N-methyl-d-aspartate receptor-mediated currents in rat hippocampus. *Toxicol. Lett.* 205, 336–340.
- Cherry, J.D., Olschowka, J.A., O'Banion, M.K., 2014. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *J Neuroinflammation* 11, 98.
- Cole, K.S., Guttman, R., Bezanilla, F., 1970. Nerve membrane excitation without threshold.

Proc Natl Acad Sci U S A 65, 884–891.

Cruz, S., Rivera-Garcia, M., Woodward, J.J., 2014. Review of toluene action: clinical evidence, animal studies and molecular targets. *J Drug Alcohol Res.* 3, 1–15.

Cruz, S.L., Balster, R.L., Woodward, J.J., 2000. Effects of volatile solvents on recombinant N-methyl-D-aspartate receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Br J Pharmacol* 131, 1303–1308.

Cruz, S.L., Gauthereau-Torres, M.Y., Rivera-García, M.T., 2016. Structure-activity relationship for the anticonvulsant effects of organic solvents. *Neurotoxicology* 57, 121–127.

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. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 286, 334–40.

Cudmore, R.H., Turrigiano, G.G., 2004. Long-term potentiation of intrinsic excitability in LV visual cortical neurons. *J Neurophysiol* 92, 341–348.

Daoudal, G., Debanne, D., 2003a. Long-term plasticity of intrinsic excitability: learning rules and mechanisms. *Learn Mem* 10, 456–465.

Daoudal, G., Debanne, D., 2003b. Long-term plasticity of intrinsic excitability: learning rules and mechanisms. *Learn Mem* 10, 456–465.

de Pablos, R.M., Villarán, R.F., Argüelles, S., Herrera, A.J., Venero, J.L., Ayala, A., Cano, J., Machado, A., 2006. Stress Increases Vulnerability to Inflammation in the Rat Prefrontal Cortex. *J. Neurosci.* 26, 5709–5719. Dean, O.M., Data-Franco, J., Giorlando, F., Berk, M., 2012. Minocycline: therapeutic potential in psychiatry. *CNS Drugs* 26, 391–401.

Del Re, A.M., Dopico, A.M., Woodward, J.J., 2006. Effects of the abused inhalant toluene on ethanol-sensitive potassium channels expressed in oocytes. *Brain Res.* 1087, 75–82.

Devinsky, O., Vezzani, A., Najjar, S., De Lanerolle, N.C., Rogawski, M.A., 2013. Glia and

- epilepsy: excitability and inflammation. *Trends Neurosci* 36, 174–184.
- Diamond, A., Kirkham, N., Amso, D., 2002. Conditions under which young children can hold two rules in mind and inhibit a prepotent response. *Dev Psychol* 38, 352–362.
- Dick, A.L., Axelsson, M., Lawrence, A.J., Duncan, J.R., 2014. Specific impairments in instrumental learning following chronic intermittent toluene inhalation in adolescent rats. *Psychopharmacol.* 231, 1531–1542.
- Dick, F.D., 2006. Solvent neurotoxicity. *Occup. Environ. Med.*
- Dringen, R., 2000. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol* 62, 649–671.
- Eckert, G.P., Schaeffer, E.L., Schmitt, A., Maras, A., Gattaz, W.F., 2011. Increased brain membrane fluidity in schizophrenia. *Pharmacopsychiatry* 44, 161–162.
- Edelfors, S., Hass, U., Hougaard, K.S., 2002. Changes in markers of oxidative stress and membrane properties in synaptosomes from rats exposed prenatally to toluene. *Pharmacol Toxicol* 90, 26–31.
- Ekdahl, C.T., 2012. Microglial activation-tuning and pruning adult neurogenesis. *Front. Pharmacol.* 3 MAR, 1–9.
- Elston, G.N., Elston, A., Casagrande, V., Kaas, J.H., 2005. Pyramidal neurons of granular prefrontal cortex of the galago: Complexity in evolution of the psychic cell in primates. *Anat. Rec. - Part A Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* 285, 610–618.
- Euston, D.R., Gruber, A.J., McNaughton, B.L., 2012. The Role of Medial Prefrontal Cortex in Memory and Decision Making. *Neuron* 76, 1057–1070.
- Eyo, U.B., Murugan, M., Wu, L.J., 2017. Microglia-Neuron Communication in Epilepsy. *Glia* 65, 5–18.
- Filley, C.M., Halliday, W., Kleinschmidt-Demasters, B.K., 2004. The Effects of Toluene on the Central Nervous System. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 63, 1–12.
- Flake, N.M., Bonebreak, D.B., Gold, M.S., 2005. Estrogen and inflammation increase the excitability of rat temporomandibular joint afferent neurons. *J Neurophysiol* 93, 1585–1597.

- Fornazzari, L., Pollanen, M.S., Myers, V., Wolf, A., 2003. Solvent abuse-related toluene leukoencephalopathy. *J. Clin. Forensic Med.* 10, 93–95.
- Fornazzari, L., Wilkinson, D.A., Kapur, B.M., Carlen, P.L., 1983. Cerebellar, cortical and functional impairment in toluene abusers. *Acta Neurol. Scand.* 67, 319–329.
- Franco, R., Fernandez-Suarez, D., 2015. Alternatively activated microglia and macrophages in the central nervous system. *Prog Neurobiol* 131, 65–86.
- Frick, L.R., Williams, K., Pittenger, C., 2013. Microglial dysregulation in psychiatric disease. *Clin. Dev. Immunol.* 2013.
- Furlong, T.M., Duncan, J.R., Corbit, L.H., Rae, C.D., Rowlands, B.D., Maher, A.D., Nasrallah, F.A., Milligan, C.J., Petrou, S., Lawrence, A.J., Balleine, B.W., 2016. Toluene inhalation in adolescent rats reduces flexible behaviour in adulthood and alters glutamatergic and GABAergic signalling. *J. Neurochem.* 139, 806–822.
- Gerasimov, M.R., Collier, L., Ferrieri, A., Alexoff, D., Lee, D., Gifford, A.N., Balster, R.L., 2003. Toluene inhalation produces a conditioned place preference in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 477, 45–52.
- Gerasimov, M.R., Schiffer, W.K., Marsteller, D., Ferrieri, R., Alexoff, D., Dewey, S.L., 2002. Toluene inhalation produces regionally specific changes in extracellular dopamine. *Drug Alcohol Depend* 65, 243–251.
- Ginhoux, F., Lim, S., Hoeffel, G., Low, D., Huber, T., 2013. Origin and differentiation of microglia. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 45.
- Glebov, K., Löchner, M., Jabs, R., Lau, T., Merkel, O., Schloss, P., Steinhäuser, C., Walter, J., 2015. Serotonin stimulates secretion of exosomes from microglia cells. *Glia* 63, 626–634.
- González, J.C., Egea, J., Del Carmen Godino, M., Fernandez-Gomez, F.J., Sánchez-Prieto, J., Gandía, L., García, A.G., Jordán, J., Hernández-Guijo, J.M., 2007. Neuroprotectant minocycline depresses glutamatergic neurotransmission and Ca²⁺ signalling in hippocampal neurons. *Eur. J. Neurosci.* 26, 2481–2495.
- Gotohda, T., Tokunaga, I., Kubo, S.I., Morita, K., Kitamura, O., Eguchi, A., 2000. Effect of

- toluene inhalation on astrocytes and neurotrophic factor in rat brain, in: *Forensic Science International*. pp. 233–238. doi:10.1016/S0379-0738(00)00215-2
- Graeber, M.B., Streit, W.J., 2010. Microglia: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119, 89–105.
- Grassi-Oliveira, R., Honeycutt, J.A., Holland, F.H., Ganguly, P., Brenhouse, H.C., 2016. Cognitive impairment effects of early life stress in adolescents can be predicted with early biomarkers: Impacts of sex, experience, and cytokines. *Psychoneuroendocrinology* 71, 19–30.
- Guerri, C., Pascual, M., 2010. Mechanisms involved in the neurotoxic, cognitive, and neurobehavioral effects of alcohol consumption during adolescence. *Alcohol* 44, 15–26.
- Haley, T.J., 1987. Toluene. *Danger. Prop. Ind. Mater. Rep.* 7, 2–14.
- Hardingham, G.E., Bading, H., 2010. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: Implications for neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Neurosci.*
- Harriott, A.M., Dessem, D., Gold, M.S., 2006. Inflammation increases the excitability of masseter muscle afferents. *Neuroscience* 141, 433–442.
- Harris, R.A., Hitzemann, R.J., 1981. Membrane fluidity and alcohol actions. *Curr Alcohol* 8, 379–404.
- He, J., Crews, F.T., 2007. Neurogenesis decreases during brain maturation from adolescence to adulthood. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 86, 327–333.
- Henry, C.J., Huang, Y., Wynne, A., Hanke, M., Himler, J., Bailey, M.T., Sheridan, J.F., Godbout, J.P., 2008. Minocycline attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced neuroinflammation, sickness behavior, and anhedonia. *J. Neuroinflammation*.
- Hernandez-Rabaza, V., Cabrera-Pastor, A., Taoro-Gonzalez, L., Gonzalez-Usano, A., Agusti, A., Balzano, T., Llansola, M., Felipo, V., 2016. Neuroinflammation increases GABAergic tone and impairs cognitive and motor function in hyperammonemia by increasing GAT-3 membrane expression. Reversal by sulforaphane by promoting M2 polarization of microglia. *J Neuroinflammation* 13, 83.

- Herrera, A.J., Espinosa-Oliva, A.M., Carrillo-Jimenez, A., Oliva-Martin, M.J., Garcia-Revilla, J., Garcia-Quintanilla, A., de Pablos, R.M., Venero, J.L., 2015. Relevance of chronic stress and the two faces of microglia in Parkinson's disease. *Front Cell Neurosci* 9, 312.
- 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. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 102, 48–57.
- Hynes-Dowell, M., Mateu-Gelabert, P., Barros, H.M.T., Delva, J., 2011. Volatile substance misuse among high school students in South America. *Subst. Use Misuse* 46 Suppl 1, 27–34.
- Jordán, J., Aguirre, N., José, F., Gómez, F., 2006. Minociclina y neuroprotección : luces y sombras. *Actual. en Farmacol. y Ter.* 4, 260–263.
- Kameyama, T., Nabeshima, T., Kozawa, T., 1986. Step-down-type passive avoidance- and escape-learning method. Suitability for experimental amnesia models. *J Pharmacol Methods* 16, 39–52.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M., 1991. *Principles of neural science*, 3rd Intern. ed. Prentice-Hall International, London.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M., Siegelbaum, S., Hudspeth, A.J., 2013. *Principles of neural science*, 5th ed. McGraw-Hill, New York, NY ; London.
- Kitagami, T., Yamada, K., Miura, H., Hashimoto, R., Nabeshima, T., Ohta, T., 2003. Mechanism of systemically injected interferon-alpha impeding monoamine biosynthesis in rats: Role of nitric oxide as a signal crossing the blood-brain barrier. *Brain Res.* 978, 104–114.
- Kodavanti, P.R., Royland, J.E., Richards, J.E., Besas, J., Macphail, R.C., 2011. Toluene effects on oxidative stress in brain regions of young-adult, middle-age, and senescent Brown Norway rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 256, 386–398.
- Kolb, B., Mychasiuk, R., Muhammad, A., Li, Y., Frost, D.O., Gibb, R., 2012. Experience and the developing prefrontal cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 Suppl, 17186–

- Konishi, S., Hayashi, T., Uchida, I., Kikyo, H., Takahashi, E., Miyashita, Y., 2002. Hemispheric asymmetry in human lateral prefrontal cortex during cognitive set shifting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7803–7808.
- Kourrich, S., Calu, D.J., Bonci, A., 2015a. Intrinsic plasticity: an emerging player in addiction. *Nat Rev Neurosci* 16, 173–184. doi:10.1038/nrn3877
- Lammers, J.H.C.M., Emmen, H.H., Muijser, H., Hoogendijk, E.M.G., McKee, R.H., Owen, D.E., Kulig, B.M., 2009. Neurobehavioral effects of cyclohexane in rat and human. *Int. J. Toxicol.* 28, 488–97.
- Lenroot, R.K., Schmitt, J.E., Ordaz, S.J., Wallace, G.L., Neale, M.C., Lerch, J.P., Kendler, K.S., Evans, A.C., Giedd, J.N., 2009. Differences in genetic and environmental influences on the human cerebral cortex associated with development during childhood and adolescence. *Hum. Brain Mapp.* 30, 163–174.
- Leong, S.K., Ling, E.A., 1992. Amoeboid and ramified microglia: their interrelationship and response to brain injury. *Glia* 6, 39–47.
- Li, T., Zhang, S., 2016. Microgliosis in the Injured Brain: Infiltrating Cells and Reactive Microglia Both Play a Role. *Neuroscientist* 22, 165–170.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and. *Methods* 25, 402–408.
- 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-HT(1B) knockout and wild-type mice. *Behav. Brain Res.* 115, 85–94.
- 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 Alcohol Depend.* 70, 11–15.
- Lovinger, D.M., Zhou, Q., 1994. Alcohols potentiate ion current mediated by recombinant 5-HT₃RA receptors expressed in a mammalian cell line. *Neuropharmacology* 33, 1567–1572.
- Lubman, D.I., Yucel, M., Lawrence, A.J., 2008. Inhalant abuse among adolescents:

- neurobiological considerations. *Br J Pharmacol* 154, 316–326.
- Luttrell, W.E., Lyiza, C., 2010. Cyclohexane. *J. Chem. Heal. Saf.*
- Macht, V.A., 2016. Neuro-immune interactions across development: A look at glutamate in the prefrontal cortex. *Neurosci Biobehav Rev* 71, 267–280.
- MacIver, M.B., 2009. Abused inhalants enhance GABA-mediated synaptic inhibition. *Neuropsychopharmacology* 34, 2296–2304.
- Malarkey, E.B., Parpura, V., 2008. Mechanisms of glutamate release from astrocytes. *Neurochem. Int.*
- Male, D., Rezaie, P., 2001. Colonisation of the human central nervous system by microglia: the roles of chemokines and vascular adhesion molecules. *Prog Brain Res* 132, 81–93.
- Marek, G.J., Aghajanian, G.K., 1998. The electrophysiology of prefrontal serotonin systems: therapeutic implications for mood and psychosis. *Biol Psychiatry* 44, 1118–1127.
- Marshall, S.A., McClain, J.A., Kelso, M.L., Hopkins, D.M., Pauly, J.R., Nixon, K., 2013. Microglial activation is not equivalent to neuroinflammation in alcohol-induced neurodegeneration: The importance of microglia phenotype. *Neurobiol. Dis.* 54, 239–251.
- Mattei, D., Djodari-Irani, A., Hadar, R., Pelz, A., de Cossio, L.F., Goetz, T., Matyash, M., Kettenmann, H., Winter, C., Wolf, S.A., 2014. Minocycline rescues decrease in neurogenesis, increase in microglia cytokines and deficits in sensorimotor gating in an animal model of schizophrenia. *Brain Behav Immun* 38, 175–184.
- McCullumsmith, R.E., Sanacora, G., 2015. Regulation of Extrasynaptic Glutamate Levels as a Pathophysiological Mechanism in Disorders of Motivation and Addiction. *Neuropsychopharmacology.*
- Medina-Mora, M.E., Real, T., 2008. Epidemiology of inhalant use. *Curr. Opin. Psychiatry.*
- Meruelo, A.D., Castro, N., Cota, C.I., Tapert, S.F., 2017. Cannabis and alcohol use, and the developing brain. *Behav. Brain Res.* 325, 44–50.
- Miyake, H., Ikeda, T., Maehara, N., Harabuchi, I., Kishi, R., Yokota, H., 1983. Slow

- learning in rats due to long-term inhalation of toluene. *Neurobehav Toxicol Teratol* 5, 541–548.
- Montes, S., Solís-Guillén, R. del C., García-Jácome, D., Páez-Martínez, N., 2017. Environmental enrichment reverses memory impairment induced by toluene in mice. *Neurotoxicol. Teratol.* 61, 7–16.
- Moseley, Y.C., Manbeck, H.B., Barnes, G.L., Nelson, G.L., 1971. Controlled Atmosphere for Short-Duration Storage of Peanuts before Drying. *Trans. Asae* 14, 206–.
- Nelson, G.O., 1971. *Controlled Test Atmospheres.*
- Nemati, F., Kolb, B., 2012. Recovery from medial prefrontal cortex injury during adolescence: implications for age-dependent plasticity. *Behav Brain Res* 229, 168–175.
- O'Neill, Kaltschmidt, 1997. NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci.* 20, 252–258.
- Paez-Martinez, N., Flores-Serrano, Z., Ortiz-Lopez, L., Ramirez-Rodriguez, G., 2013. Environmental enrichment increases doublecortin-associated new neurons and decreases neuronal death without modifying anxiety-like behavior in mice chronically exposed to toluene. *Behav. Brain Res.* 256, 432–440.
- Panama, B.K., Latour-Villamil, D., Farman, G.P., Zhao, D., Bolz, S.S., Kirshenbaum, L.A., Backx, P.H., 2011. Nuclear factor κ b downregulates the transient outward potassium current I_{to} through control of KCHIP2 expression. *Circ. Res.* 108, 537–543.
- Pannaccione, A., Secondo, A., Scorziello, A., Cali, G., Tagliatela, M., Annunziato, L., 2005. Nuclear factor-kappaB activation by reactive oxygen species mediates voltage-gated K^+ current enhancement by neurotoxic beta-amyloid peptides in nerve growth factor-differentiated PC-12 cells and hippocampal neurones. *J Neurochem* 94, 572–586.
- Pascual, M., Pla, A., Minarro, J., Guerri, C., 2014. Neuroimmune activation and myelin changes in adolescent rats exposed to high-dose alcohol and associated cognitive dysfunction: a review with reference to human adolescent drinking. *Alcohol Alcohol* 49, 187–192.

- Pascual, M., Pla, A., Miñarro, J., Guerri, C., 2014. Neuroimmune activation and myelin changes in adolescent rats exposed to high-dose alcohol and associated cognitive dysfunction: A review with reference to human adolescent drinking. *Alcohol Alcohol.* 49, 187–192.
- Pascual, O., Ben Achour, S., Rostaing, P., Triller, A., Bessis, A., 2012. Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, E197-205.
- Pascual, R., Aedo, L., Meneses, J.C., Vergara, D., Reyes, Á., Bustamante, C., 2010. Solvent inhalation (toluene and n-hexane) during the brain growth spurt impairs the maturation of frontal, parietal and occipital cerebrocortical neurons in rats. *Int. J. Dev. Neurosci.* 28, 491–495.
- Pascual, R., Bustamante, C., 2010. Melatonin promotes distal dendritic ramifications in layer II/III cortical pyramidal cells of rats exposed to toluene vapors. *Brain Res.* 1355, 214–220.
- Pascual, R., Pilar Zamora-Leon, S., Perez, N., Rojas, T., Rojo, A., Jose Salinas, M., Reyes, A., Bustamante, C., 2011. Melatonin ameliorates neocortical neuronal dendritic impairment induced by toluene inhalation in the rat. *Exp Toxicol Pathol* 63, 467–471.
- Paus, T., Keshavan, M., Giedd, J.N., 2008. Why do many psychiatric disorders emerge during adolescence? *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 947–957.
- Prinz, M., Priller, J., 2014. Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. *Nat Rev Neurosci* 15, 300–312.
- Qi, J., Chen, C., Meng, Q.X., Wu, Y., Wu, H., Zhao, T.B., 2016. Crosstalk between Activated Microglia and Neurons in the Spinal Dorsal Horn Contributes to Stress-induced Hyperalgesia. *Sci Rep* 6, 39442.
- Ray, L.A., Roche, D.J.O., Heinzerling, K., Shoptaw, S., 2014. Opportunities for the development of neuroimmune therapies in addiction, 1st ed, *International Review of Neurobiology*. Elsevier Inc.
- Rivera-García, M.T., López-Rubalcava, C., Cruz, S.L., 2015. Preclinical characterization of toluene as a non-classical hallucinogen drug in rats: Participation of 5-HT, dopamine

- and glutamate systems. *Psychopharmacology (Berl)*. 232, 3797–3808.
- Rivera-García, M.T.M.T., López-Rubalcava, C., Cruz, S.L., 2015. Preclinical characterization of toluene as a non-classical hallucinogen drug in rats: Participation of 5-HT, dopamine and glutamate systems. *Psychopharmacology (Berl)*. 232, 3797–3808.
- Sarma, S.N., Kim, Y.J., Song, M., Ryu, J.C., 2011. Induction of apoptosis in human leukemia cells through the production of reactive oxygen species and activation of HMOX1 and Noxa by benzene, toluene, and o-xylene. *Toxicology* 280, 109–117.
- Satake, T., Mitani, H., Nakagome, K., Kaneko, K., 2008. Individual and additive effects of neuromodulators on the slow components of afterhyperpolarization currents in layer V pyramidal cells of the rat medial prefrontal cortex. *Brain Res.* 1229, 47–60.
- Schafers, M., Sorkin, L., 2008. Effect of cytokines on neuronal excitability. *Neurosci Lett* 437, 188–193.
- Schulz, D.J., 2006. Plasticity and stability in neuronal output via changes in intrinsic excitability: it's what's inside that counts. *J Exp Biol* 209, 4821–4827.
- Shigeta, S., Aikawa, H., Misawa, T., Yoshida, T., Momotani, H., Suzuki, K., 1986. Learning impairment in rats following low-level toluene exposure during brain development--a comparative study of high avoidance rats and Wistar rats. *Ind Heal.* 24, 203–211.
- Smith, N., 2010. Hidrocarburos aromaticos. *Encicl. salud y Segur. en el Trab.* 104–295.
- Sofroniew, M. V, Vinters, H. V, 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119, 7–35.
- Spear, L.P., 2000. Neurobehavioral Changes in Adolescence. *Curr. Dir. Psychol. Sci.* 9, 111–114.
- Sporn, M., Roberts, A., Wakefield, L., Assoian, R., 1986. Transforming growth factor-beta: biological function and chemical structure. *Science (80-.)*. 233, 532–534.
- Sturman, D.A., Moghaddam, B., 2011. The neurobiology of adolescence: Changes in brain architecture, functional dynamics, and behavioral tendencies. *Neurosci. Biobehav.*

Rev. 35, 1704–1712.

- Thalhammer, T., Kaschnitz, R., Mittermayer, K., Haddad, P., Graf, J., 1993. Organic solvents increase membrane fluidity and affect bile flow and K⁺ transport in rat liver. *Biochem Pharmacol* 46, 1207–1215.
- Tikka, T.M., Koistinaho, J.E., 2001. Minocycline provides neuroprotection against N-methyl-D-aspartate neurotoxicity by inhibiting microglia. *J Immunol* 166, 7527–7533.
- Tillar, R., Shafer, T.J., Woodward, J.J., 2002. Toluene inhibits voltage-sensitive calcium channels expressed in pheochromocytoma cells. *Neurochem. Int.* 41, 391–397.
- Uylings, H.B.M., Groenewegen, H.J., Kolb, B., 2003. Do rats have a prefrontal cortex? *Behav. Brain Res.*
- Vezzani, A., Viviani, B., 2015. Neuromodulatory properties of inflammatory cytokines and their impact on neuronal excitability. *Neuropharmacology* 96, 70–82.
- Villatoro, J. a, Cruz, S.L., Ortiz, A., Medina-Mora, M.E., 2011. Volatile substance misuse in Mexico: correlates and trends. *Subst. Use Misuse* 46 Suppl 1, 40–45.
- Villegas-Llerena, C., Phillips, A., Garcia-Reitboeck, P., Hardy, J., Pocock, J.M., 2015. Microglial genes regulating neuroinflammation in the progression of Alzheimer's disease. *Curr Opin Neurobiol* 36, 74–81.
- von Bernhardt, R., Heredia, F., Salgado, N., Munoz, P., 2016. Microglia Function in the Normal Brain. *Adv Exp Med Biol* 949, 67–92. doi:10.1007/978-3-319-40764-7_4
- von Euler, G., Ogren, S.O., Li, X.M., Fuxe, K., Gustafsson, J.A., 1993. Persistent effects of subchronic toluene exposure on spatial learning and memory, dopamine-mediated locomotor activity and dopamine D2 agonist binding in the rat. *Toxicology* 77, 223–232.
- Wada, H., Hosokawa, T., Saito, K., 1988. Repeated toluene exposure and changes of response latency in shock avoidance learning. *Neurotoxicol Teratol* 10, 387–391.
- Wang, H.X., Gao, W.J., 2012. Prolonged exposure to NMDAR antagonist induces cell-type specific changes of glutamatergic receptors in rat prefrontal cortex. *Neuropharmacology* 62, 1808–1822.

- Wang, W.Q., Gustafson, A., 1994. Erythrocyte lipid extraction in alcohol-chloroform systems: a comparative study. *Acta Chem Scand* 48, 753–758.
- Ward, R.J., Lallemand, F., De Witte, P., 2014. Influence of adolescent heavy session drinking on the systemic and brain innate immune system. *Alcohol Alcohol.* 49, 193–197.
- White, R.F., Proctor, S.P., 1997. Solvents and neurotoxicity. *Lancet* 349, 1239–1243.
- Williams, J.M., Stafford, D., Steketee, J.D., 2005. Effects of repeated inhalation of toluene on ionotropic GABA A and glutamate receptor subunit levels in rat brain. *Neurochem. Int.* 46, 1–10.
- Win-Shwe, T.T., Fujimaki, H., 2012. Acute administration of toluene affects memory retention in novel object recognition test and memory function-related gene expression in mice. *J. Appl. Toxicol.* 32, 300–304.
- Win-Shwe, T.T., Kunugita, N., Yoshida, Y., Fujimaki, H., 2011. Role of hippocampal TLR4 in neurotoxicity in mice following toluene exposure. *Neurotoxicol Teratol* 33, 598–602.
- Win-Shwe, T.T., Kunugita, N., Yoshida, Y., Fujimaki, H., 2011. Role of hippocampal TLR4 in neurotoxicity in mice following toluene exposure. *Neurotoxicol. Teratol.* 33, 598–602.
- Win-Shwe, T.T., Kunugita, N., Yoshida, Y., Nakajima, D., Tsukahara, S., Fujimaki, H., 2012. Differential mRNA expression of neuroimmune markers in the hippocampus of infant mice following toluene exposure during brain developmental period. *J. Appl. Toxicol.* 32, 126–134.
- Win-Shwe, T.T., Nakajima, D., Fujimaki, H., 2010. Can T-cell deficiency affect spatial learning ability following toluene exposure? *Neuroimmunomodulation* 17, 132–134.
- Wu, Y., Dissing-Olesen, L., MacVicar, B.A., Stevens, B., 2015. Microglia: Dynamic Mediators of Synapse Development and Plasticity. *Trends Immunol.* 36, 605–613.
- Yasugi, T., Kawai, T., Mizunuma, K., Kishi, R., Harabuchi, I., Yuasa, J., Eguchi, T., Sugimoto, R., Seiji, K., Ikeda, M., 1994. Exposure monitoring and health effect

studies of workers occupationally exposed to cyclohexane vapor. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 65, 343–50.

Yoshimura, N., de Groat, W.C., 1999. Increased excitability of afferent neurons innervating rat urinary bladder after chronic bladder inflammation. *J Neurosci* 19, 4644–4653.

Yuasa, J., Kishi, R., Eguchi, T., Harabuchi, I., Kawai, T., Ikeda, M., Sugimoto, R., Matsumoto, H., Miyake, H., 1996. Investigation on neurotoxicity of occupational exposure to cyclohexane: a neurophysiological study. *Occup. Environ. Med.* 53, 174–179.

Zhu, S., Stavrovskaya, I.G., Drozda, M., Kim, B.Y., Ona, V., Li, M., Sarang, S., Liu, A.S., Hartley, D.M., Wu, D.C., Gullans, S., Ferrante, R.J., Przedborski, S., Kristal, B.S., Friedlander, R.M., 2002. Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Nature* 417, 74–78.