

Nº 142
251



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**EFFECTO DEL TOLUENO EN EL DESARROLLO NEURONAL
DE CRIAS DE RATA WISTAR CUYAS MADRES FUERON
EXPUESTAS A INHALACION CRONICA DURANTE LA
ETAPA DE GESTACION O DURANTE LA ADOLESCENCIA.**

T E S I S

P R E S E N T A :

MARIA LUISA ROMERO VILLENA

PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

MEXICO 1992.

FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE.

	RESUMEN	1
I	INTRODUCCION	2
II	GENERALIDADES	4
1)	DE LOS DISOLVENTES Y SUS EFECTOS	6
2)	DEL TOLUENO	8
	a) PROPIEDADES FISICAS	8
	b) PROPIEDADES QUIMICAS	9
	c) OBTENCION Y PREPARACION	10
	d) TOXICIDAD	11
3)	DESCRIPCION DEL SISTEMA NERVIOSO	12
4)	LA RATA COMO MODELO BIOLÓGICO	20
5)	TECNICAS	21
	A) IMPREGNACION ARGENTICA	
	B) GOLGI	
III	HIPOTESIS Y OBJETIVO	22
IV	MATERIAL Y METODO	23
V	RESULTADOS	27
VI	COMENTARIOS	30
VII	BIBLIOGRAFIA	34

RESUMEN

El tolueno es una sustancia neurotóxica, presente en pinturas, lacas, barnices, tintas y diluyentes como el tiner. Son productos de fácil acceso para la población lo que ocasiona el abuso, con fines de intoxicación, provocando graves problemas de salud pública (40). Su inhalación en edades tempranas puede afectar de manera adversa al sistema nervioso central (2,4), de ahí el interés por investigar las alteraciones microscópicas en el cerebro de crías cuyas madres se han sometido a inhalación de tolueno durante la gestación o bien en etapa adolescente.

Para la realización de este trabajo, se formaron cuatro grupos de ratas Wistar: dos testigos y dos tratados con tolueno, se les dió tratamiento con tolueno a un grupo adolescente de 70 días de edad y a un grupo gestante de 90 días de edad, los grupos testigos de 90 días de edad, uno fué el control de inhalación de aire.

Los animales de experimentación fueron expuestos a vapores de tolueno individualmente a una dosis de 0.45 ml/día/3 semanas. Se sacrificaron las crías de las hembras tratadas y de los testigos a los 14 y 21 días de edad por perfusión intracardiaca, las muestras de encéfalo fueron procesadas por la técnica de Golgi (54) para poner en evidencia las neuronas piramidales de la capa V de la corteza visual a las que se les determinó su morfología por el grado de ramificación dendrítica de acuerdo con el método de anillos concéntricos de Sholl (59). Los resultados se analizaron estadísticamente.

I INTRODUCCION.

La intoxicación por tolueno produce lesiones poco perceptibles cuando se aspira en pequeñas dosis bien sea en corto o largo tiempo, pero si los periodos de inhalación cobran intensidad y se prolongan entonces los pacientes muestran sintomas mentales criticos , especialmente cerebelosos (8,20,26, 32,36,52,) cambios estructurales a nivel bioquimico (4,5,6,15,24, 66) los cuales persisten tiempo después aún cuando no hay contacto con la sustancia tóxica.(43,53)

En animales de experimentación se describe alteraciones en el metabolismo de monoaminas relacionadas con insomnio parcial, hiperactividad e hiperdipsia (1); decremento en el peso corporal, cerebro y corteza cerebral con ligero incremento del ácido fosfatídico (en ratas expuestas a vapores de tolueno y xileno durante 30 a 90 días) (30). Alteraciones en la constante de disociación de receptores específicos a serotonina (6) y receptores alfa y beta adrenérgicos y modificaciones en la concentración de serotonina dopamina y noradrenalina (68). Asi como lesiones en la vaina de mielina con edema , abombamiento y destrucción por lisis despues de inhalar 135 ml de tiner (en el curso de 90 días) (2). Se reporta también alteraciones neuronales en la corteza cerebral, núcleo caudado, hipotálamo, y corteza cerebelar, cuyas células se caracterizan por tener pequeños nucleolos con pérdida de su estructura reticular y decremento marcado en su componente granular normal, disminución de pericromatina fibrilar y de ribosomas en

ratas jóvenes que inhalaron tiner 100 ppm durante 20 sesiones (62).

La inhalación crónica de tiner o tolueno, produce alteraciones microscópicas, como son neuronas piramidales con tallo acanalado, neuronas pignóticas y degeneradas e hipertrofia neurofibrilar, entre otras (10). Se señala decremento en el peso corporal y el hígado, en crías de rata de 1 a 7 días y de 21 y 56 días postnatales, al exponerlas a vapores de tolueno a 80, 500 y 1000 ppm (24). Se describe también decremento en la actividad de la enzima $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPasa}$ y alteración en la conducta de aprendizaje en ratas que inhalaron tolueno en forma crónica (4,5).

Pese a que se han realizado diversos trabajos que dan información del daño provocado por los disolventes orgánicos en el sistema nervioso central en animales de experimentación y estudios en seres humanos, en la literatura revisada no se encontraron datos acerca de sus efectos en descendientes de animales que han inhalado tolueno. Por lo que, el propósito de esta investigación, es encontrar datos que nos den información morfométrica acerca de los posibles cambios neuronales resultantes en crías de rata hembra sometidas a inhalación de tolueno durante su etapa juvenil o durante su embarazo.

El presente informe relata los hallazgos encontrados en las intersecciones de las neuronas piramidales de la capa V de la corteza visual mediante el empleo de la técnica de Golgi y la variación del peso corporal de las crías.

II GENERALIDADES.

La ingestión de sustancias que alteran el ánimo ha sido un hábito común en la mayor parte de las sociedades , el consumo de disolventes no es la excepción; se hace referencia a la inhalación de vapores desde la época del oráculo de Delfos. Por otro lado, la amplia disponibilidad y la gran variedad de los disolventes potencialmente inhalables hace suponer que la inhalación de estos compuestos no ha sido en el pasado una práctica aislada. Sin embargo, actualmente se observa una gran preocupación legítima de la sociedad, por el consumo de estas sustancias.(40).

La inhalación de sustancias con efectos psicotróficos no sólo es causa de preocupación por su extensión, sino también por la población a la que afecta, principalmente a los niños y jóvenes en la etapa de desarrollo físico y emocional ; por los evidentes efectos físicos y psicológicos adversos que ésta produce en el rendimiento escolar y por su relación con conductas de tipo delictivo. Su amplia disponibilidad y bajo precio los hace accesible a un gran número de individuos, sin embargo, la inegable utilidad de estos productos, tanto para la medicina como para la industria y el hogar, dificulta la restricción de su venta.

Los inhalables se absorben por los pulmones, pues aunque el tracto respiratorio es largo, la absorción es rápida y llega al cerebro sin pasar por el hígado, por lo que no están expuestos a la acción de las enzimas desintoxicadoras, esto ocurre cuando se aspiran en pequeñas dosis, bien sea en corto o largo tiempo; pero si los periodos de inhalación cobran intensidad y se prolongan, entonces se pueden presentar alteraciones en diferentes organos de la economía como hígado, testiculo, aparato urinario, incluso afectar al sistema nervioso central. (16,20,43)

Generalmente producen efectos en el sistema nervioso central similares a los de otras sustancias sedantes e hipnóticas. A dosis pequeñas pueden producir un estado de intoxicación similar al que se experimenta con el alcohol pero a menudo acompañado por distorsiones sensoriales y perceptuales temporales y en algunos casos, por delirio de grandeza. Estos efectos pueden dar origen a conductas extrañas que son perjudiciales para el usuario y para los demás. Las dosis progresivas pueden producir sueño y anestesia. (4, 19, 22, 25, 61)

1) DISOLVENTES ORGANICOS.

Los disolventes orgánicos son productos químicos muy útiles en el comercio e industrias , su función es disolver o dispersar sustancias orgánicas naturales o sintéticas que normalmente no son solubles en agua , se aplican para hacer soluciones o en forma de recubrimientos , disuelven materiales resinosos, adhesivos, tintas de impresión o recubrimientos orgánicos.

Existen solventes activos o co-solventes como el metanol, etanol, n propanol, ciclohexanol, metil ciclohexanol entre otros. y disolventes latentes o diluyentes como hexano, heptano, benceno, tolueno, xileno, queroxeno nafta gasolina y tiner.

Una propiedad importante de los solventes de este tipo es su velocidad de evaporación causante de la inhalación involuntaria , de ahí que los solventes sean inhalables.

Practicamente todas las sustancias inhalables con efectos psicotrópicos son hidrocarburos solventes volátiles, obtenidos del petróleo y del gas natural. Hay muchas sustancias susceptibles de abuso que se clasifican en los siguientes grupos:

- a) hidrocarburos (benceno, tolueno, hexano, heptano)
- b) hidrocarburos clorados (tetracloruro de carbono)
- c) esterés
- d) cetonas
- f) éteres

Los productos terminales que contienen sustancias cuya inhalación puede producir efectos psicotrópicos son; aditivos, aerosoles, adelgazadores, barnices, removedores, tintas para calzado y desmanchadores para cueros, textiles y plásticos.

El tiner es una mezcla de varios disolventes activos, latentes o diluyentes de alta, media, o baja velocidad de evaporación entre ellos el tolueno se encuentra en porcentaje variable dependiendo de la calidad del tiner; la mayor parte de los disolventes que lo constituyen, son derivados del petróleo o son productos petroquímicos refinados. En el comercio los tiner se clasifican en términos de calidad alta, media y baja por lo que su costo y calidad es variable

La forma más común de uso de los disolventes es el tiner, el análisis cromatográfico de diferentes muestras revela el contenido y proporción de sus componentes (cuadro 1).

CUADRO 1

COMPONENTES DE 3 MUESTRAS DE TINER

acetona	2.0	9.0	3.0
benceno	0.5	8.0	25.0
butanol	0.0	13.0	0.0
hexano	9.0	8.0	7.0
heptano	5.0	0.0	0.0
metanol	25.0	9.0	15.0
tolueno	42.0	49.0	50.0
xileno	0.5	1.0	0.0
otros	16.0	3.0	0.0
AUTOR	*	**	***

Análisis cromatográfico de diferentes muestras de tiner, donde se revela el contenido y proporción de sus componentes, según diversos autores.

- * Lorenzana (34)
- ** Barroso (2)
- *** Costero (10)

2) TOLUENO

Su nombre químico es metil benceno o fenil metano, su fórmula condensada $C_6H_5-CH_3$ o C_7H_8 .

Se encuentra en el alquitran de hulla y en el gas de las coquerías, de ahí es obtenido industrialmente. Fue aislado por primera vez del bálsamo de tolú; se obtiene del fraccionamiento del petróleo. Es materia prima de extraordinario interés para la industria y punto de partida para la síntesis de numerosos compuestos orgánicos, resulta imprescindible en la industria de materias colorantes, en la fabricación de explosivos como el (TNT) trinitrotolueno, en la industria de barnices y pinturas (por su gran poder disolvente), en la fabricación de sacarina, en la preparación de ácido benzóico y benzaldehído y como disolvente y diluyente. Tiene efecto narcótico en altas concentraciones. (42)

PROPIEDADES FISICAS.

El tolueno es un líquido transparente, incoloro, de olor parecido al benceno, volátil (su nivel de saturación en el aire es 112 g/m^3) inflamable, de peso molecular 92.13, formado por 91.25 % de carbono y 8.75 % de hidrógeno; su densidad 0.866 g/cm^3 , su punto de ebullición es 110.6 grados Celcius, y el punto de fusión - 95.0 grados Celcius.

Es soluble en agua (535 mg/l), miscible en alcohol, cloroformo, éter, acetona, ácido acético glacial y disulfuro de carbono. (42)

PROPIEDADES QUIMICAS.

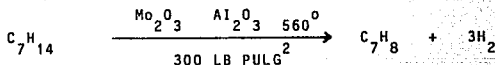
Es un contaminante común del ambiente, en áreas urbanas la Organización Mundial de la Salud (OMS), reporta que en el aire se encuentra en una proporción de 0.0001 a 0.204 mg/m³, en el agua de beber de 0 a 0.1 mg/litro, en el agua de lluvia de 0.001 a 0.015 mg/litro (67). Es combustible si se expone al calor, moderadamente explosivo cuando se expone a la flama o reacciona con mezclas de ácido sulfúrico y ácido nítrico, con óxido nítrico, perclorato de plata, fluoruro de bromo, fluoruro de uranio; moderadamente venenoso cuando se calienta ya que emite humos irritantes, puede reaccionar vigorosamente con material oxidante (31,56,57).

TRANSFORMACION METABOLICA DEL TOLUENO.

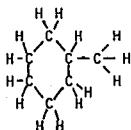
Se sabe que de la dosis inhalada del 25 al 40% es excretada por los pulmones y el resto es convertido a ácido benzóico, conjugado con glicina a ácido hipúrico y excretado por riñón, una mínima parte menor del 1% es hidroxilada a orto, meta y para cresol que son secretados como glucurónidos conjugados.(67)

OBTENCION DEL TOLUENO.

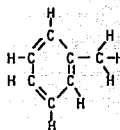
El tolueno se obtiene por reformación catalítica (deshidrogenación) a partir del petróleo, que es rico en ciclo alcanos (naftenos) o compuestos alifáticos.



METIL CICLOHEXANO

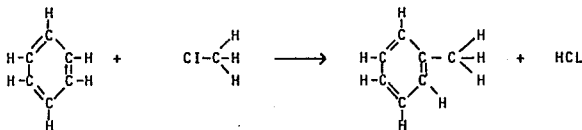
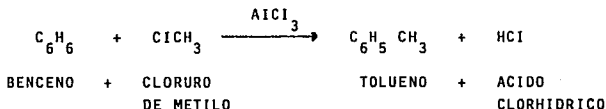


TOLUENO



METODO DE PREPARACION.

Se prepara a partir del benceno por alquilación de Friedel-Crafts (Método descubierto en 1877) que consiste en la unión de cadenas laterales alquílicas con anillos aromáticos.



TOXICIDAD DEL TOLUENO.

Los límites permitidos para la exposición ocupacional establecidos por la OMS (67) van del rango de 200 a 750 mg/m³ /8hs/día/40 hs a la semana.

Es moderadamente tóxico por inhalación y vía subcutánea, existen datos donde se reporta que es mutagénico (11,18, 32) irritante de ojos y piel (27).

Por piel se absorbe de 14 a 23 mg/cm² /h, después de la absorción el tolueno se distribuye rápidamente encontrándose la mayor concentración en el tejido adiposo, seguido por la médula osea, glándulas suprarrenales, riñón, hígado, cerebro y sangre (67).

La inhalación de 200 ppm de tolueno, durante ocho horas, puede causar incoordinación; a altas concentraciones mayor de 800 ppm estos efectos se incrementan y se presentan poco tiempo después.

En casos que reportan envenenamiento por tolueno, el efecto puede ser narcótico; la víctima atraviesa por un estado de intoxicación que lo puede llevar a estado de coma. (44)

El envenenamiento crónico describe anemia, leucopenia que se debe a hiperplasia en médula osea, efectos que no son muy severos; los presentan personas que trabajan comúnmente con tolueno (16,38). Inhalaciones entre 200 y 500 ppm producen náuseas, irritación en ojos, pérdida del apetito, dolor de cabeza, lasitud, deterioro en la coordinación

3) EL SISTEMA NERVIOSO .

El sistema nervioso asegura la regulación de todos los procesos vitales en el organismo y su relación con el medio exterior . Anatomicamente y desde un punto de vista metodológico el sistema nervioso se divide en central y periférico. Al sistema nervioso central pertenecen el encéfalo y la médula espinal, y al periférico los ganglios nerviosos, los troncos y las terminaciones (13) .

DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO.

El esbozo del sistema nervioso central humano aparece en el embrión presomítico , durante la tercera semana del desarrollo debido a que el complejo cordomesodérmico, constituido por tres categorías de mesodermo , el axial o notocordal, el cefálico y el somítico o paraxial , liberan evocadores (sustancias químicas que actúan como hormonas morfogénicas), responsables de inducir al neuroectodermo a diferenciarse en la placa neural de contorno periforme, con la región cefálica más amplia que la caudal, flanqueada por dos bandas de neuroectodermo que darán origen a las crestas neurales. (fig 1 y 2).

La placa neural es un epitelio engrosado, constituido por células alargadas, con núcleos colocados a diferentes niveles y

DESARROLLO DEL TUBO NEURAL

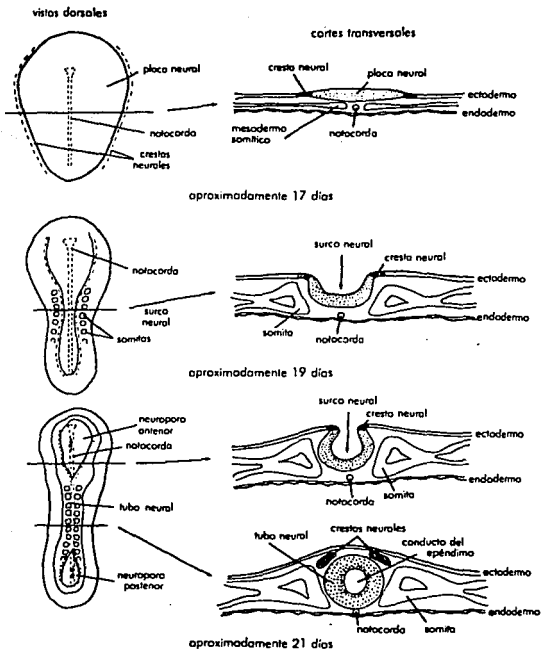


Fig. 1 Desarrollo del Sistema Nervioso (Marquez Orozco)(37)

HISTOGENESIS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

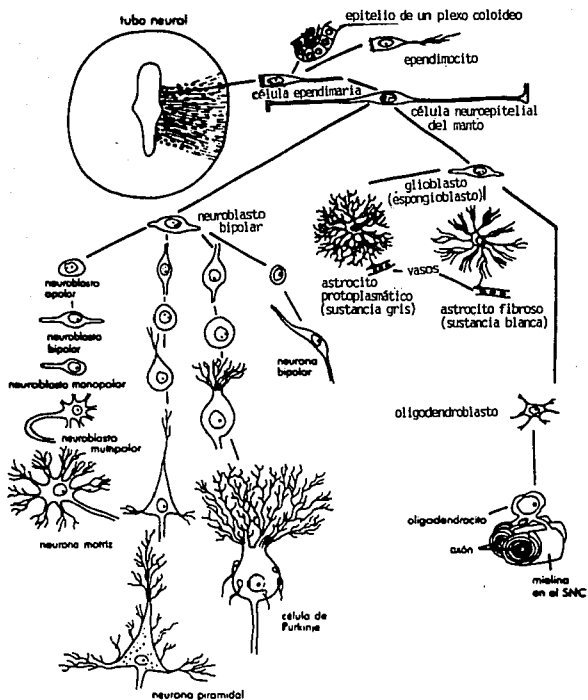


Fig. 2 Desarrollo del Sistema Nervioso (Marquez Orozco)(37)

membranas muy delgadas. Cuando la placa neural alcanza su máximo espesor empieza a invaginarse en sentido longitudinal, adquiriendo el aspecto de una zapatilla al desarrollarse el primordio del surco neural, el cual se profundiza paulatinamente hasta que , al principio de la cuarta semana cuando el embrión tiene siete pares de somitas , sus bordes se fusionan para formar el tubo neural, a la altura del cuarto al sexto par de somitas, a partir de este momento el cierre del tubo neural, progresará en sentido cefálico y caudal (37).(fig 1 y 2)

MECANISMOS QUE INTERVIENEN EN EL CIERRE DEL TUBO NEURAL.

Las células neuroepiteliales inicialmente cuboides, presentan en su citoplasma microtúbulos y microfilamentos dispersos al azar. Estos se organizan al elongarse las células de la placa neural y durante la formación del surco neural ; de tal manera que los microtúbulos , al adquirir una orientación paralela al eje mayor de las células neuroepiteliales las induce a aumentar su longitud. Los filamentos de actina colocados en el borde apical, se unen a los desmosomas que ponen en contacto a las células mediante la espectrina, proteína constitutiva de sus membranas plasmáticas y van reduciendo su ápice , al actuar como la jareta de una bolsa, provocando primero la formación del surco neural y más tarde la del tubo neural.

DESARROLLO DE LAS CAVIDADES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

La región cefálica de la placa neural es más amplia y antes de que se cierre el tubo, por crecimiento diferencial de sus paredes, forma el esbozo de las futuras vesículas cerebrales primitivas; el procencéfalo o cerebro anterior, el mesencéfalo o

cerebro medio y el rombencéfalo o cerebro posterior. En cambio la región caudal, que formará la médula espinal, es de menor amplitud y mantiene un ritmo de crecimiento similar en toda su longitud (11, 37).

Al momento del nacimiento quedan terminados prácticamente la proliferación y la diferenciación de las neuronas corticales. Durante la ontogénesis postnatal no ocurren cambios fundamentales en la composición de la corteza sino que el desarrollo es continuado por maduración y crecimiento de las ramificaciones dendríticas y axonales de las neuronas así como de un aumento de las sinapsis.

ENCEFALO.

Aquí se distingue la sustancia gris y la blanca, la mayor parte de la sustancia gris del encéfalo se aloja en la superficie del cerebro y el cerebelo, formando su corteza, el resto de la sustancia gris forma los numerosos núcleos del tronco cerebral.

CORTEZA CEREBRAL.

Dentro de las funciones de la corteza cerebral están la de regular la mayoría de los patrones conductuales que relacionan al organismo con el medio ambiente, ya que es la responsable de la percepción y el entendimiento de las sensaciones aplicadas a la superficie corporal como la visión, la audición y actividades motoras complejas como la reflexión subjetiva del mundo externo y de las formas de adaptación al medio ambiente. (65). Por estas razones es importante el estudio anatómico de los elementos finos que procesan información que llega del exterior. Se sabe que la

corteza cerebral posee áreas donde se pueden reconocer características morfológicas del sustrato neuronal una de ellas es el Área 17 o corteza visual primaria (Krieg, 1946) (29). (fig 3)

La corteza cerebral está representada por el extracto de sustancia gris con un grosor de cerca de 3 mm en el humano. Posee distintas porciones que se distinguen unas de otras por su disposición y estructura celular. Según su organización se divide en lámina interna y lámina externa de la siguiente manera:

lámina externa

- a) capa I plexiforme o molecular.
- b) capa II piramidales pequeñas o granulosa externa.
- c) capa III piramidales medianas o piramidal externa.
- d) capa IVa piramidales estrelladas.
- e) capa IVb células estrelladas.

lámina interna

- f) capa V células grandes piramidales y profundas.
- g) capa VI polimorfa células grandes con pocas espinas.

LOCALIZACION DE LA CORTEZA VISUAL.

Se encuentra dentro de la región occipital del hemisferio cerebral. Krieg, en 1946 dió una descripción y definió el Área 17 como visual primaria o estriada caracterizada por tener paquetes de neuronas pequeñas dentro de la capa IV siendo esto una característica común con otras áreas sensoriales de la corteza. El Área 17 está limitada medialmente por el Área 18 y lateralmente por el Área 18a formando estas dos la corteza periestriada.

La corteza visual está formada por seis capas, a

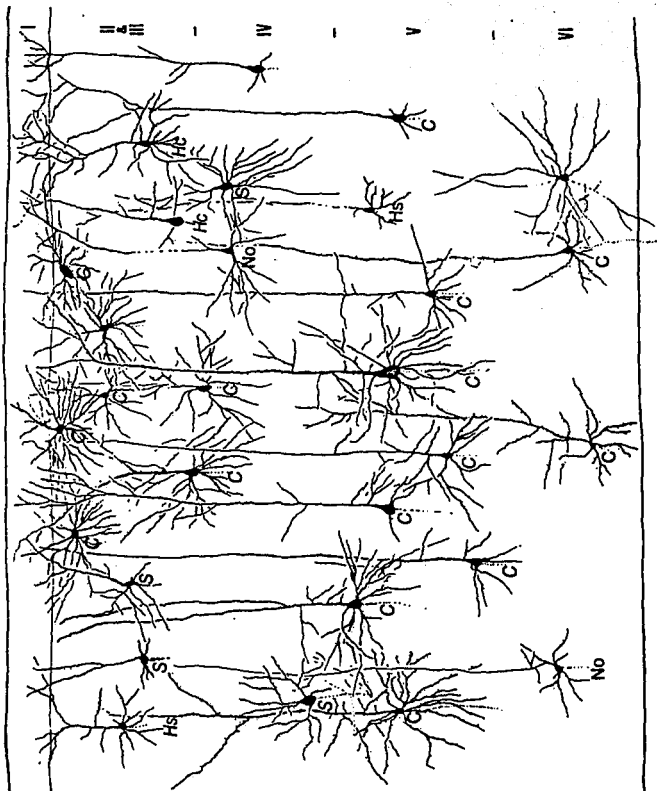


Fig. 2¹. Dibujo con cámara lúcida ilustrando la distribución y morfología de varios tipos celulares inyectando peroxidasa de rabano en la corteza visual de la rata. C, compleja; S, simple; Hc, compleja hipercompleja; Hs, simple hipercompleja; No, no orientadas. (Según Parnavelas y col., 1963).

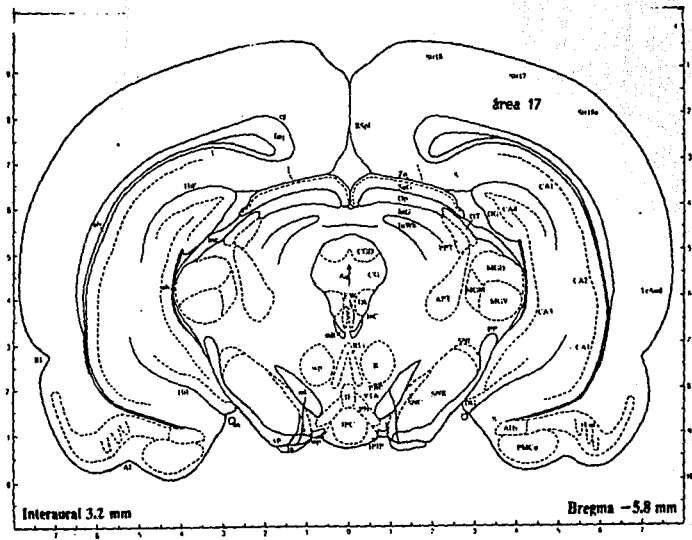


FIG. 3 LOCALIZACION DEL AREA 17 SEGUN PAXINOS. (47)

continuación se describen:

Capa I , molecular o plexiforme formada por fibras paralelas a la superficie derivadas de los axones y las dendritas de las neuronas piramidales de las capas inferiores. Contiene neuronas grandes con ramificaciones horizontales y neuronas no piramidales pequeñas.

Capa II

La capa II posee muchas neuronas piramidales pequeñas con cuerpos celulares redondos o en forma de huso, contiene además células piramidales inclinadas horizontalmente y células bipolares .

La capa III comparte con la capa II neuronas con cuerpos celulares de forma similar, tamaño y densidad de paquetes.

La capa IV , las neuronas chicas se encuentran en paquetes compactos y pequeños por eso su nombre de granulosa; las células piramidales son de dos tipos: células piramidales de tamaño medio y células piramidales pequeñas con cuerpo celular esférico u ovoide de 11 a 8 micras de tamaño y dendrita apical delgada de 1 a 2 micras de diámetro con pocas espinas.

En la capa V , los cuerpos celulares son grandes o periformes comunes en la mitad inferior de la capa V de dendrita apical gruesa de 4 a 5 micras que asciende a través de la corteza hasta las capas II y III ramificándose en un penacho terminal; de las dendritas apicales salen ramificaciones laterales que pasan horizontal y oblicuamente a través de la capa V y VI. Se encuentran también células piramidales de tamaño medio, de cuerpo celular piramidal u ovoide de dendrita apical más delgada y menor

número de espinas. El citoplasma de la dendrita está dominado por microtúbulos orientados paralelamente a lo largo de la dendrita y es más pálido que el del pericarión. Se encuentran células bipolares, células invertidas y cuerpos celulares de neuronas multipolares y bifurcadas.

El 95% de la población de la capa VI son neuronas de tamaño mediano o pequeño de cuerpo celular ovoide elongado horizontalmente o en forma de pirámide con dendritas de 2 micras de diámetro que solo llegan hasta la capa IV ; se encuentran células bipolares. La capa VIb presenta neuronas no piramidales con o sin espinas.

LA NEURONA.

Las neuronas tienen la propiedad de responder a las alteraciones del medio ambiente en que se encuentran con un estímulo excitatorio o bien inhibitorio produciendo modificaciones en la diferencia de potencial eléctrico existente entre las superficies externa e interna de la membrana celular.

La neurona está formada por un cuerpo celular o pericarión que contiene al núcleo con función trófica y receptora, del pericarión parten prolongaciones especializadas en la función de recibir estímulos del medio ambiente de células epiteliales o de otras neuronas. La mayoría de las células nerviosas posee numerosas dendritas que aumentan considerablemente la superficie celular para la captación de estímulos llamados dendrodendríticos por efectuarse entre dendrita y dendrita.

Las dendritas de muchas clases de neuronas poseen además una gran cantidad de pequeñas proyecciones sobre su superficie,

llamadas espinas dendríticas cuya especialización consiste en la recepción de contactos sinápticos.

El axón o cilindroeje nace de la estructura piramidal del cuerpo celular (cono de implantación), es una prolongación especializada en la conducción de estímulos que transmite información ya sea entre neuronas o bien a otras células efectuándose la llamada sinapsis, esta puede ser axoaxónica, axosomática o axodendrítica. La porción final del axón es ramificada y termina en la célula siguiente en forma de botones terminales. Los axones de mayor grosor transmiten impulsos más rápidamente que los delgados, ambos pueden estar cubiertos por mielina. Los impulsos nerviosos se transmiten de una neurona a otra en sitios morfológicamente identificados llamados sinapsis, cuando los axones llegan a dendritas forman sinapsis axodendríticas, cuando las terminaciones axónicas llegan a un cuerpo celular son sinapsis axosomáticas y cuando terminan en otro axón son axoaxónicas.

NEURONAS PIRAMIDALES.

Las neuronas piramidales presentan un cuerpo triangular u ovoide, tienen dendritas apicales y basales. Las dendritas apicales se dirigen hacia la superficie de la piamadre donde se ramifica en un penacho terminal, de ella también se forman dendritas oblicuas. Las dendritas basales o primarias se originan del cuerpo de la neurona y se extienden hacia arriba o hacia abajo.

MADURACION DE LAS NEURONAS PIRAMIDALES.

En 1886 Camilo Golgi descubrió que las células de axón corto (Golgi tipo II) se ramifican dentro de la corteza, Cajal agrega más información encontrando que seguían un curso horizontal y Retzius las llamó células horizontales de Cajal. En 1846 Kolliner las designó fibras aferentes.

La secuencia de maduración de las diferentes capas del Área 17 se inicia en las capas I y V (Miller 1981) así se tiene que el desarrollo de las células piramidales es más temprano que el de las no piramidales. Durante la maduración se pueden observar tres incrementos significativos. Antes de los 13 días de edad el número de espinas es menor de 20 en segmentos de 50 micras y tanto las dendritas basales como las apicales son cortas. A los 14 días de edad hay un incremento abrupto en el número de espinas y las ramificaciones son abundantes, hecho que coincide con la apertura de los ojos. A partir de los 21 días de edad se estabiliza el crecimiento, ya que es alcanzada la madurez neuronal y está indicada por la presencia de dendritas basales extensas y la ultraestructura del cuerpo celular. Otra característica es el aumento de espinas sobre la dendrita apical.

4) LA RATA COMO MODELO ANIMAL.

La rata es elegida por la mayoría de los investigadores para estudios de neuroanatomía, nutrición, endocrinología, conducta y genética entre otras áreas. Por su fácil manejo y características reproductivas. Desde el punto de vista microscópico, la arquitectura de la corteza cerebral es parecida a la de varios mamíferos, por lo que la hace un modelo ideal para estudios experimentales; por ejemplo, en la rata la división celular se detiene a los 21 días cuando la rata infante asume su existencia independiente, su cerebro está completamente lleno en cuanto a células nerviosas se refiere. La corteza cerebral de la rata es plana, delgada, sin circunvoluciones y sus neuronas están dispuestas en estratos delimitados. Además de la rata, otros mamíferos como el mono, el ratón, el gato presentan una estratificación similar a la del humano.

(14)

5) TECNICAS

TECNICAS DE IMPREGNACION ARGENTICA.

El empleo de las impregnaciones argentícas ha impulsado notablemente los conocimientos en el área de la neurología experimental. Estas técnicas permiten observar con cierto detalle el contorno de algunas neuronas, facilitando el estudio del tamaño del cuerpo neuronal, grosor de dendritas basales y apicales longitud de las mismas, grado de ramificación y frecuencia de espinas dendríticas entre otras características morfológicas. Lo más notable es la oportunidad de seguir de manera continua grandes distancias de proyecciones neuronales gracias a su selectividad (58).

TECNICA DE GOLGI.

El término Golgi se ha hecho genérico para un grupo de métodos de investigación sobre preparaciones de tejido neuronal con sales de cromato y dicromato en equilibrio, seguidas por exposición de iones metálicos pesados como la plata o el mercurio.

El método básico fué inicialmente descubierto por el anatomista Camilo Golgi en el siglo pasado, tiene la ventaja que unicamente se impregna una de cada cien neuronas, lo que lo hace ideal para estudios morfométricos (58)

HIPOTESIS

El tolueno administrado a los progenitores en diversas etapas de maduración, afectará el desarrollo ulterior de las neuronas corticales de sus críos.

OBJETIVO

Determinar las alteraciones neuronales en la corteza cerebral de ratas lactantes cuyas madres inhalaban tolueno durante la gestación o durante su adolescencia.

IV MATERIAL Y METODO.

Se estudiaron 96 crias de 12 ratas hembra de la cepa Wistar, 9 de ellas de 90 dias de edad consideradas como adultas y 3 de 70 dias de edad consideradas en etapa juvenil, obtenidas del bioterio de la Unidad de Investigación en Salud Infantil del Instituto Nacional de Pediatría, mantenidas con libre consumo de alimento y agua, con horario de luz oscuridad de 12 horas, temperatura ambiental entre 20 y 22 °C y humedad relativa de 50%. Se colocaron en jaulas individuales hasta el momento del apareamiento en que se pasaron a jaulas familiares, donde se colocaron tres hembras con un macho durante una semana.

Los animales jóvenes y adultos fueron repartidos en cuatro grupos de la siguiente manera:

Tres ratas adultas para el grupo testigo (T) no recibió tratamiento.

Tres ratas adultas para el grupo testigo del control de aire (C) se trató como a los grupos experimentales pero no inhalaron tolueno.

Tres ratas adultas para el grupo gestante (G) se le dió tratamiento con tolueno durante la gestación.

Tres ratas jóvenes para el grupo adolescente (A) se le dió tratamiento con tolueno antes de la gestación.

DISENO EXPERIMENTAL.

LOTES QUE INHALARON TOLUENO

RATAS ADOLESCENTES DE 70 DIAS DE EDAD

RATAS ADULTAS DE 90 DIAS DE EDAD

LOTES TESTIGO

RATAS ADULTAS DE 90 DIAS DE EDAD

Los animales experimentales fueron sometidos a inhalación de vapores de tolueno (grado reactivo Merck) a una concentración de 0.105 mg/cm^3 en un frasco vitrolero, a una temperatura ambiental de 22°C y una presión atmosférica de 560 mm de Hg dejándose evaporar durante cinco minutos; posteriormente se introdujo al animal durante 15 minutos una vez cada 24 horas durante 3 semanas.

OBTENCION DE LAS MUESTRAS.

Las camadas se ajustaron a ocho crías en el momento del nacimiento, 24 crías para cada grupo, de las cuales la mitad se sacrificó a los 14 días de edad y la otra mitad a los 21 días de edad. Las crías fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (50 mg/kg de peso corporal). Se perfundieron por vía intracardiaca con una solución de formol fosfatos al 10%, pH 7.2, 0.1 Molar. Inmediatamente se procedió a extraer el cerebro, del cual se obtuvieron bloques del área visual de 2mm de grosor que fueron tratados, según la técnica de Golgi Rápida (54). Se estudiaron

338 neuronas impregnadas y completas que se encontraron en la capa V de la corteza visual de los 4 grupos estudiados; 170 neuronas de crios de 14 días de edad que corresponden a 47 del grupo testigo, 39 del grupo testigo de aire, 36 del grupo adolescente y 48 del grupo gestante; y 168 neuronas de crios de 21 días de edad, 37 del grupo testigo, 43 del grupo testigo de aire, 46 del grupo adolescente y 42 del grupo gestante.

Se analizaron; peso corporal de las crias y el número de intersecciones dendríticas sobre ocho círculos concéntricos de 25 micras de distancia entre sí, de acuerdo con el método de Sholl (59) fig 4. La cuantificación se realizó por un observador estandarizado y marcando las preparaciones de los cuatro lotes con números aleatorios con el fin de que se desconociera su condición experimental.

Los datos fueron tratados estadísticamente, aplicando análisis de varianza de una entrada de Fisher (3) ya que los grupos son independientes, se ajustaron a una distribución normal, previa comprobación de homogeneidad de varianzas por medio de la ji cuadrada de Bartlett y habiendo determinado el valor de F para cada variable para contrastar los cuatro grupos del experimento, a un nivel de significancia de 0.05.

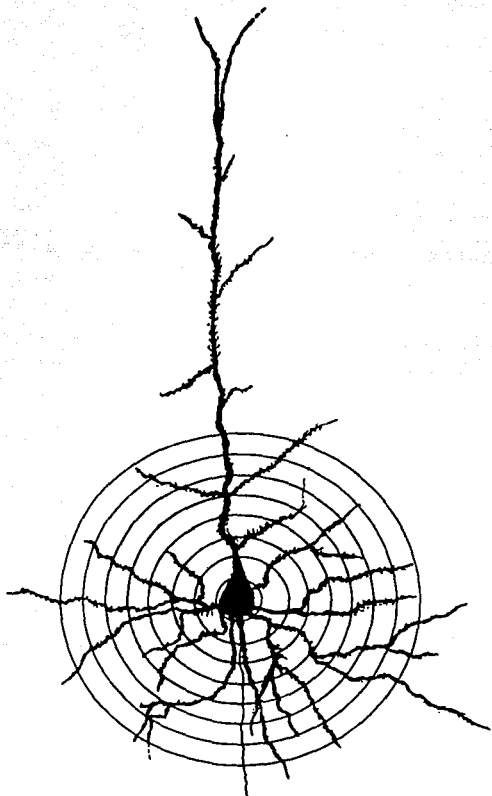


Fig. 4 Dibujo con cámara lúcida de una neurona piramidal de la capa V de la corteza visual, sobrepuesta con círculos concéntricos (40X)

TECNICA DE GOLGI RAPIDA.

La muestra obtenida se mantuvo por 48 horas en una solución buffer de fosfatos formol al 10% y por 72 horas en una solución de tetróxido de osmio al 0.2% y dicromato de potasio al 2.4%. Pasado este tiempo se transfirió a una solución de nitrato de plata al 0.75% durante una semana y a temperatura ambiente. Ya impregnado el tejido se inició la deshidratación en cambios graduales de alcoholes desde 50% a 96% y alcohol-eter 1:1 para su inclusión en nitrocelulosa donde se hicieron cambios graduales de aumento de concentración hasta 30%, la polimerización se realizó con vapores de cloroformo para poder realizar el corte. Se obtuvieron cortes en el microtomo de deslizamiento de 90 micras de grosor y se deshidrataron en alcoholes graduales de 70%, 80%, 90%, y 96% y cambios en mezclas 1:1 de alcohol absoluto-propanol, propanol, propanol-terpineol, terpineol, terpineol-xilol y xilol, montadas con resina sintética (54).

V RESULTADOS.

Las observaciones de las ratas durante el periodo de 15 minutos de inhalación con tolueno mostraron, incremento gradual de movimientos respiratorios, de vibrisas y contracciones bruscas de la caja torácica, aumento de lagrimeo y secreción nasal, pérdida total del equilibrio y movimientos voluntarios, notable hipersensibilidad a estímulos sonoros y mecánicos. El periodo de recuperación en promedio fué de 15 minutos y se caracterizó por movimientos respiratorios cada vez más constantes y lentos; recuperación gradual de movimientos voluntarios, al principio con desplazamiento reptante, rascado de nariz, desplazamiento en círculos hasta concluir en marcha normal, las secreciones nasales se hicieron menos evidentes.

PESO CORPORAL (cuadro 2 , gráfica 1)

El promedio del peso corporal de los grupos que inhalaron tolueno es ligeramente menor que los grupos testigos con una diferencia que corresponde al 13% entre los valores extremos y una desviación estandar que va de 1.16 a 1.36 entre los cuatro grupos a los 14 días de edad; en tanto que a los 21 días de edad la diferencia es del 10% entre los valores extremos y la desviación estandar varia de 1.4 a 2.0 .

Al practicar el análisis de varianza a los 14 y 21 días de edad, el peso corporal de los grupos que inhalaron tolueno fué ligeramente menor, encontrándose diferencias estadísticamente

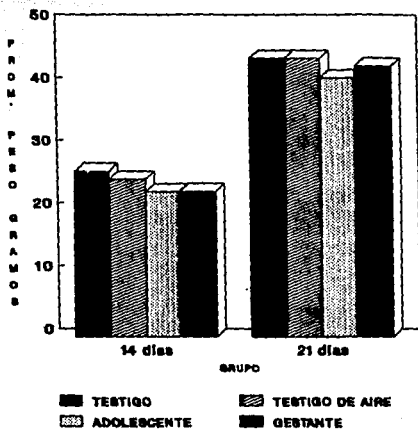
CUADRO 2.

ANALISIS DE VARIANZA DE LOS PESOS CORPORALES DE CRIOS DE 14 Y 21 DIAS DE EDAD DE RATAS WISTAR QUE INHALARON TOLUENO, DURANTE LA GESTACION (G)† DURANTE LA ADOLESCENCIA (a)*, Y TESTIGOS DE AIRE (C)*, TESTIGO (T)*

EDAD DIAS	GRUPOS DE COMPARACION	SUMA DE CUADRADOS	F	VALOR P
14	T+C VS a+G	81.1	39.98	0.0000001
	T VS C	9.9	4.90	0.03
	a VS G	0	0	N.S.
21	T+C VS a+G	69.2	18.10	0.0001
	T VS C	1.1	0.29	N.S.
	a VS G	21.1	6.20	0.02

*n = 12

PROMEDIO DEL PESO CORPORAL DE CRIOS DE 14 Y 21 DIAS DE EDAD



GRAFICA 1

significativas cuando se compararon con los grupos testigo. Al comparar los grupos testigo entre sí, no se encontraron diferencias significativas. Sólo se encontraron diferencias significativas a los 21 días de edad entre los grupos que inhalaban tolueno.

ESTUDIO DE LAS DENDRITAS.

La figura 5 muestra los dibujos con cámara lácida de cuatro neuronas de 14 días de edad, una de cada grupo.

En el cuadro 3 se muestran los valores obtenidos al practicar el análisis de varianza a los 14 días de edad; al comparar los grupos tratados contra los testigo se encontraron diferencias significativas en los últimos cuatro círculos; al comparar los grupos testigo entre sí hubo diferencias significativas en los círculos 1,2,5,6 y 7.

La gráfica 2 muestra el promedio de intersecciones dendríticas de neuronas de crías de rata Wistar de 14 días de edad en función del número de círculos, de los grupos tratados; y testigo.

La figura 6 muestra los dibujos con cámara lácida de 4 neuronas de 21 días de edad, una de cada grupo.

En el cuadro 4 se muestran los valores obtenidos al aplicar el análisis de varianza a los 21 días de edad. Al comparar los grupos tratados contra los grupos testigo se encontraron diferencias significativas en todos los círculos; al comparar entre sí los grupos tratados se encontraron diferencias significativas en los círculos 2 al 7; al comparar los grupos



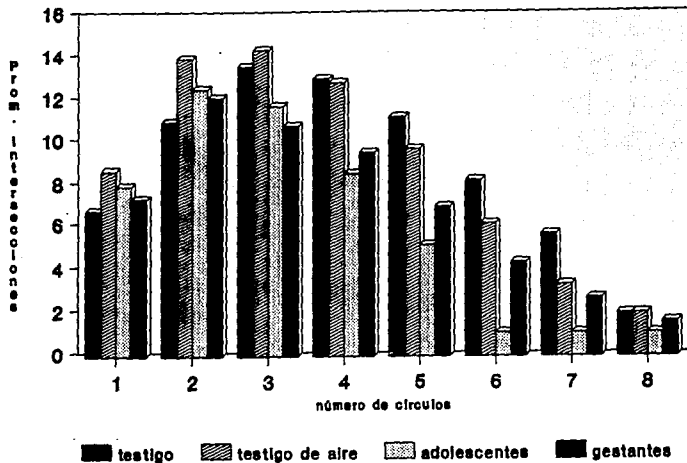
Fig. 5 Dibujos con cámara lúcida de neuronas piramidales de la capa V de la corteza visual de crios de rata Wistar de 14 días de edad. (T) testigo, (C) testigo de aire, (A) adolescente, (G) gestante.

CUADRO 3

ANALISIS DE VARIANZA DEL NUMERO DE INTERSECCIONES DENDRITICAS DE CRIOS DE RATA WISTAR DE 14 DIAS DE EDAD, HIJOS DE RATAS QUE INHALARON TOLUENO DURANTE LA ADOLESCENCIA O LA GESTACION, CAMPANA (TESTIGO DE AIRE) Y TESTIGO

NUMERO DE CIRCULO	ADOLESCENTE + GESTANTE VS TESTIGO + CAMPANA		ADOLESCENTE n = 36 VS GESTANTE n = 48		TESTIGO n = 47 VS CAMPANA n = 39	
	F	P	F	P	F	P
1	0.03	N.S.	2.50	N.S.	24.02	0.000001
2	1.92	N.S.	0.35	N.S.	10.47	0.0014
3	27.38	0.000001	2.70	N.S.	3.06	N.S.
4	84.68	0.000001	2.70	N.S.	0.53	N.S.
5	104.91	0.000001	8.87	0.0033	6.08	0.0145
6	72.02	0.000001	18.59	0.000027	8.31	0.0044
7	94.79	0.000001	17.27	0.000051	40.91	0.000001
8	203.32	0.000001	4.60	0.033	0	N.S.

INTERSECCIONES DENDRITICAS DE NEURONAS DE CRIOS DE 14 DIAS DE EDAD



GRAFICA 2

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

testigo entre si hubo diferencias en los circulos 1 al 5 y 8.

La gráfica 3 muestra el promedio de intersecciones dendríticas de neuronas de crías de rata de 21 días de edad, en función del número de circulos de los grupos que inhalaron tolueno y testigo.

PRINCIPALES HALLAZGOS OBTENIDOS.

Diferencias entre los grupos intoxicados durante la adolescencia o la gestación.

A los 14 días de edad.

- Menor peso corporal en los dos grupos tratados.
- Menor número de intersecciones dendríticas en los últimos cuatro circulos.

A los 21 días de edad.

- Menor peso corporal en el grupo de crías de madres intoxicadas durante la adolescencia.
- Menor número de intersecciones dendríticas en los circulos 2 al 7.

Diferencias entre los grupos testigo.

A los 14 días de edad.

- Menor peso corporal en el grupo testigo de aire.
- Menor número de intersecciones dendríticas excepto en los circulos 3 y 4.

A los 21 días de edad.

- Menor número de intersecciones dendríticas excepto en los circulos 6 y 7.

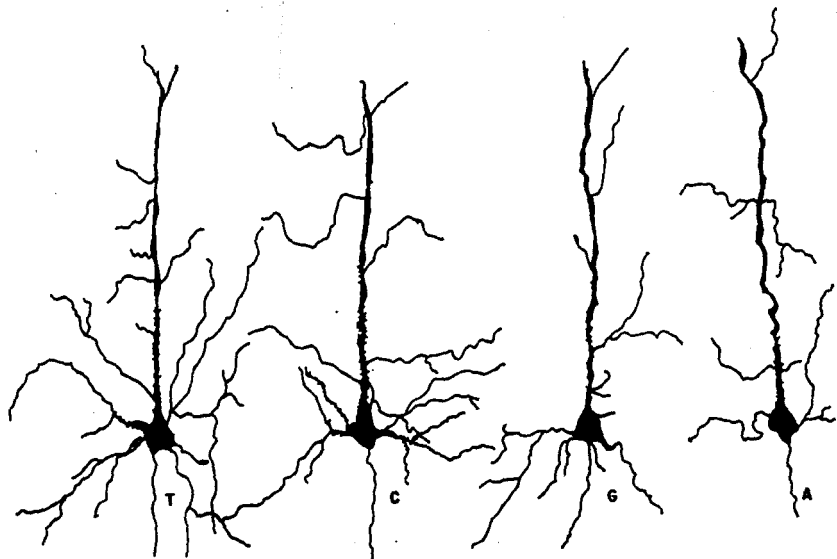


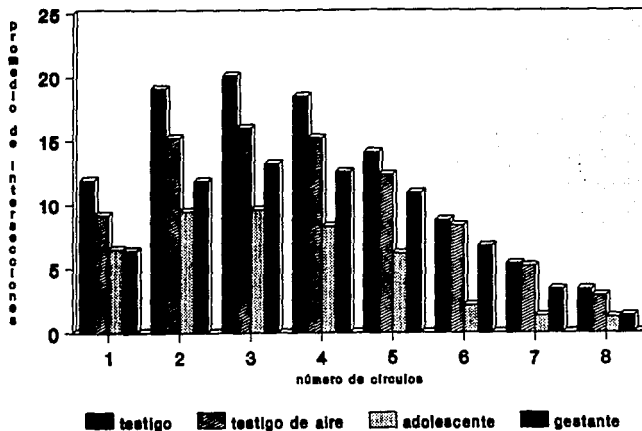
Fig. 6 Dibujos con cámara lócida de neuronas piramidales de la capa V de la corteza visual de críos de rata Mistar de 21 días de edad. (T) testigo, (C) testigo de aire, (A) adolescente, (G) gestante

CUADRO 4

ANALISIS DE VARIANZA DEL NUMERO DE INTERSECCIONES DENDRITICAS DE CRIOS DE RATA WISTAR DE 21 DIAS DE EDAD, HIJOS DE RATAS QUE INHALARON TOLUENO DURANTE LA ADOLESCENCIA O LA GESTACION, CAMPANA (TESTIGO DE AIRE) Y TESTIGO

NUMERO DE CIRCULO	ADOLESCENTE + GESTANTE VS TESTIGO + CAMPANA		ADOLESCENTE n = 46 VS GESTANTE n = 42		TESTIGO n = 37 VS CAMPANA n = 43	
	F	P	F	P	F	P
1	219.60	0.000001	0.13	N.S.	48.37	0.000001
2	231.00	0.000001	15.76	0.0001	42.30	0.000001
3	217.52	0.000001	35.17	0.000001	40.31	0.000001
4	204.45	0.000001	46.95	0.000001	24.98	0.000001
5	109.76	0.000001	58.73	0.000001	7.77	0.0059
6	294.03	0.000001	82.30	0.000001	0.57	N.S.
7	117.41	0.000001	29.64	0.000001	0.09	N.S.
8	155.90	0.000001	0.03	N.S.	4.39	0.037

INTERSECCIONES DENDRITICAS DE NEURONAS DE CRIOS DE 21 DIAS DE EDAD



GRAFICA 3

VI COMENTARIOS.

Los resultados indican que la inhalación de tolueno durante la etapa adolescente o durante el embarazo afecta el peso corporal de la descendencia, así como los procesos de maduración de las ramificaciones dendríticas de las neuronas piramidales de la capa V de la corteza visual de los animales que inhalaron tolueno, ya que estos aunque siguen el patrón de desarrollo dendrítico de los grupos testigo y el indicado por otros investigadores (41, 45, 48), quienes señalan decremento en las dendritas basales cuando estas se alejan del cuerpo celular siendo más abundantes entre las 50 y 100 micras. En el presente trabajo, los resultados de intersecciones de los grupos experimentales quedan por debajo de los grupos testigo, siendo más evidentes a los 21 días de edad.

Aunque no se siguió el peso corporal de la madre durante la exposición a vapores de tolueno en la adolescencia o la gestación, en las crías si hubo diferencias significativas del peso corporal a los 14 y 21 días de vida postnatal, sin embargo está correspondiente a un porcentaje menor del 15%. Los investigadores que se avocan a determinar estados nutricionales (Winick 1976) indican que un déficit del 40% en el peso corporal se puede considerar debido a desnutrición por lo que la falta de peso en las crías se puede deber a una disminución en la ingesta alimenticia provocada probablemente por la acción del tolueno.

El número de intersecciones dendríticas medidas en ocho círculos concéntricos presenta una tendencia general a reducirse en casi todos los círculos a los 14 y 21 días de edad, tanto del grupo intoxicado durante la adolescencia como del intoxicado durante la gestación, cuyas curvas de ramificaciones dendríticas mostraron un retardo en la maduración con respecto a las presentadas por los grupos testigos, incluso el grupo adolescente de 21 días de edad se comporta como las curvas descritas para 14 días, lo que podría deberse a un efecto residual del solvente que se manifieste a largo plazo. Se ha tratado de determinar el mecanismo de acción del tolueno, se especula acerca de su inespecificidad, quizá su propiedad lipofílica actúe sobre la bicapa lipídica de las membranas celulares impidiendo la formación de dendritas provocando cambios morfológicos.

Durante la embriogénesis las aferencias monoaminérgicas inervan a la neocorteza y exhiben una organización pionera neural, además de presentar una influencia neurotrófica sobre el desarrollo neuronal(14,26,46). Probablemente los resultados se deban a una disminución de estas aferencias.

El patrón de maduración dendrítica ocurre durante las primeras tres semanas de vida postnatal (41,45) y estas van a sufrir cambios durante la vida del animal o presentar modificaciones por alteraciones del medio ambiente, variando las características de las neuronas que aparecen en etapas tempranas del desarrollo neuronal, retardando la maduración de los sistemas aferentes específicos que inervan a la corteza, evitando que las estructuras postsinápticas maduren y no se presente la

influencia inductiva para que se realice la sinápsis.

De acuerdo con esto, una posible explicación de la disminución del número de ramificaciones dendríticas, radicaría en retardo de la maduración de las inervaciones noradrenérgicas y de las vías talamocorticales específicas que se extienden a la altura de la capa V de la corteza visual.

Los datos aquí presentados no son específicos para la acción del tolueno, ya que otros autores han encontrado respuestas semejantes en animales sometidos a otras condiciones experimentales. Por ejemplo, han descrito disminución del número de ramificaciones dendríticas en animales sometidos a aislamiento (23,63) y en animales desnutridos (10, 55).

Aún no hay antecedentes acerca del efecto del tolueno sobre la estructuración de la corteza cerebral de los descendientes de madres jóvenes y adultas, existen, sin embargo, datos de descendientes de animales sometidos a desnutrición en etapa pregestacional, gestacional y durante la lactancia reportando alteraciones en células multipolares, fusiformes y ovoides (6), datos sobre la influencia del estrés en la descendencia como variación en los niveles de catecolaminas, neurotransmisores y pesos cerebrales (49,50) y en estudios realizados en animales descendientes de madres sometidos a estrés por inmovilización.

Aunque el tolueno y otros solventes actúan sobre el sistema nervioso central, hasta ahora no es posible responder, si las interacciones de sus efectos son directamente sobre las proteínas o sobre el medio fosfolípido de las membranas neuronales que

rodean a la proteína, que interactúan dinámicamente para facilitar los cambios conformacionales en estos componentes proteínicos de la membrana celular(60, 61). Se cree que en éstas interacciones toman el lugar de los lípidos en la membrana basado en que el tolueno es altamente degradador de los lípidos(28), o alterna con las proteínas de la membrana(17, 18).

La inespecificidad de la acción de los disolventes orgánicos que incluyen también a los anestésicos inhalables, se basan en las propiedades fisico-químicas que tienen de ser lipofílicos y con diversa potencia anestésica (39). Esta característica que presentan los disolventes orgánicos inhalables y que se cree interactúa sobre la bicapa lipídica de las membranas biológicas, es de sospechar que no solamente son afectadas las células del sistema nervioso central, sino todas las células del organismo. De acuerdo con este contexto, se sugiere que exista un indicador bioquímico, cuando hay una inhalación crónica de solventes que la población humana usa para experimentar efectos psicológicos.

Las diferencias encontradas entre los grupos testigo se debe a la variación de las condiciones experimentales ya que el grupo testigo de aire inhala aire en un espacio reducido semejando las condiciones de los grupos tratados, alterando con esto las condiciones ambientales lo que sugiere que haya probablemente un efecto por hipoxia que se manifieste en una disminución en el número de intersecciones como lo indican los valores de F de los cuadros 3 y 4.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1.- ARITO H, Y COL.: Partial insomnia, hyperactivity and hyperdipsia induced by repeated administration of toluene in rats. *Toxicology*, 37:1-2(99-110),1985.

2.-BARROSO-MOGUEL R, VILLEDA J: Experimental neuropathy produced in rats with industrial solvents(thinner). *Archivos Medicos (Méx.)*, 20:(53-60), 1989.

3.-CASTILLA-SERNA L, CRAVIOTO M J. Estadística simplificada. Editorial Trillas. (352-370) México 1991.

4.-CASTILLA-SERNA L, Y COL. Chronic but not acute toluene inhalation reduce the Na+K+ ATPase specific activity in rat brain. *Neurotoxicology* (en prensa) . Resúmenes del Congreso Mundial de Salud Mental. Cd México (248-249) 1991.

5.-CASTILLA-SERNA L, RODRIGUEZ P A, CRAVIOTO MJ: Influencia de la inhalación crónica de vapores de tolueno sobre el condicionamiento operante en el laberinto en T de escape a choque eléctrico. *Archivos de Investigación Médica (IMSS)*,22:(295-303),1991.

6.-CELANI MF, FUXE K, AGNATI LF, ANDERSON K: Effect of subacute treatment with toluene on central monoamine receptor in rats. Reduced affinity in 3H-5HT binding sites and spiperone binding sites to dopamine receptors in rat. *Toxicology Letters*, 17:(275-281),1983.

7.-CINTRA L, DIAZ-CINTRA S: Efecto de la desnutricion proteica en los nucleos rafe dorsal, locus coeruleus y en las celulas no piramidales de la corteza visual de la rata. Revista Chilena de Nutrición, 13 (76-82),1985.

8.-COLOTLA VA, LORENZANA JIMENEZ M, RODRIGUEZ R, Toward a behavioral toxicology of paint thinner. Neurobehavioral Toxicology, 2 : (31-36), 1980.

9.-CORDERO ME, DIAZ G, ARAYA J: Neocortex development during severe malnutrition in the rat. American Journal Clinical Nutrition, 29(358-365),1976.

10.-COSTERO I, BARROSO-MOGUEL R: Alteraciones microscópicas encontradas en el sistema nervioso central de gatos y ratas albinas relacionables con la intoxicación experimental por inhalación de solventes industriales(tolueno y tiner). Cuadernos Científicos CEMESAN (Méx.), 8:91-122,1978.

11.-DIAZ-CINTRA S, ORTEGA NA: Histogénesis y morfogénesis en el sistema nervioso central. Ontogenia Neural. Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas. UNAM México, (129-148),1991.

12.-DONNER,M.Genetic effects of in vivo exposure to toluene. Mutation Research 85 (293-294) 1981.

13.-ELISEIEV V.G., AFANASIEV I.A., YURIMA N.A. Histologia Ed Mir Moscú , capitulo Xll 1983.

14.-FELTEN DL, HALLMAN H, JONSSON G: Evidence for a neurotrophic role of naradrenaline neurons in the postnataldevelopment of rats cerebral cortex. Journal Neurocience, 11:(119-135), 1982.

15.-FOX, JG. COHEN, BJ. LOEN, FM. Biology and diseases of rats. Laboratory animal medicine. Academic Press INC. 91-101 USA 1984.

16.-FRANCO G Y COL.: Conjugated serum bile acid concentrations in workers exposed to low doses of toluene and xylene. British Journal of Industrial Medicine 46:(141-142), 1989.

17.-FRANKS NP, LIEB WR: Mapping of general anesthetic target sites provide a molecular basis for cutoff effects. Nature(Lond), 316:349-351, 1985.

18.-FRANKS NP, LIEB WR: Anesthetic on the mind. Nature(Lond.), 328:113-114, 1987.

19.-FUXE K, MARTINE G, VON EULER L, AGNATI F, HANSON T: Effect of subacute treatment with toluene on cerebro-cortical alpha and beta adrenergic receptors. Acta Physiologica Scandinavica, 130:307-311, 1987.

20.-GAD-EL-KARIM MM, HARPER BL, LEGATOR MS.: Modifications in the myeloclastogenic effect benzene in mice with toluene, phenobarbital, 3-methylcholanthrene, araclor 1254 and SKF-525A. Mutation Research 135:(225-243), 1984.

21.-GRABSKI MD: Toluene sniffing producing cerebellar degeneration. American Journal of Psychiatry, 11(8):(461-462), 1961.

22.-GREENBURG L, MAYERS MR, HEIMANN H, MOSKOWITZ S.: The effects of exposure to toluene in industry. The Journal of the American Medical Association, 118(8): (573-578), 1942.

23.-GREENOUGH WT, JURASKA JM: Experience induced changes in brain fine structure: their behavioral implications. In Han MN, Dudek B, ed. Development and evolution of brain size; behavioral implications. New York: Academic Press, (295-320),1979.

24.-HANSSON T, PETERSSON BM, ENERTH P, GUSTAFSSON J-A: Neonatal exposure to toluene: Effects on the development of liver microsomal cytochrome P-450 and serum hormone levels in the rat. Toxicology, 37:(39-50),1985.

25.-HORMES JT, FILLEY CM, ROSENBERG NL.:neurologic sequelae of chronic solvent vapor abuse. Neurology, 36:(698-702),1986.

26.-JONSSON G, KASAMATSU T: Maturation of monoamine neurotransmitters and receptors in cat occipital cortex during postnatal critical period. Experimental Brain Research, 50:(449-458),1983.

27.-KEANE JR.: Toluene optic neuropathy. Annals of Neurology, 4 (4):(390).1978.

28.-KORPELA M, TAHTI H: The effect of in vitro and in vivo toluene exposure on rat erythrocyte and synaptosome membrane integral enzymes. Pharmacology Toxicology, 63:30-32,1988.

29.-KRIEG,W.J.S. Connection of the cerebral cortex. Journal Comparative Neurology, 84:(221-333),1946.

30.-KYRKLUND T, KJELLSTAND P,HAGLID K: Brain lipid change in rats exposed to xilene and toluene. Toxicology, 45:(123-133), 1987.

31.-LENGA R E : The sigma aldrich library of chemical Safety edition 1 Edited by Robert E Lenga (1714)

- 32.-LEWIS J, MORITZ D, MELLIS L, Long-term toluene abuse. American Journal Psychiatry 138 3 : (368-370), 1981.
- 33.-LIANG JC, HSU TC, HENRY JE. :Cytogenetic assays for mitotic poisons the grasshopper embryo system for volatile liquids. Mutation Research, 113; (467-479), 1983.
- 34.-LORENZANA-JIMENEZ M, LABASTIDA C, CAPELLA S. MANGA GA. Determinación de la composición de valores muestras de tiner por cromatografía en fase de vapor. VIII Congreso Nacional de Farmacología Monterrey Nuevo León México 1984.
- 35.-LORENZANA-JIMENEZ M, SALAS M.: Neonatal effects of toluene on the locomotor behavioral development of the rat. Neurobehavioral Toxicology and Teratology ,5; (295-299), 1983.
- 36.-MALM G, LYNG-TUNELL.U. Cerebellar dysfunction related to toluene sniffing. Acta Neurology Scandinava 62: (188-190), 1980.
- 37.-MARQUEZ-OROZCO MC.: Bases morfológicas y fisiológicas del desarrollo del sistema nervioso. Aspectos comparativos y mecanismos de regulación de la ontogenia neural. Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas UNAM. México, (73-128), 1991.
- 38.-MATIKAINEN E., Autonomic nervous system dysfunction in workers exposed to organic solvents. Journal of Neorology. Neurosurgery and Psychiatry. V 48 (1021-1024), 1985.
- 39.-MATUBAYASI N, UEDA I: Is membrane expansion relevant to anesthesia , Mean excess volume. Anesthesiology, 59:541-546, 1983
- 40.-MEDINA M, Aspectos epidemiol[ogicos del uso de sustancias inhalables en la Republica Mexicana. Salud Mental V 10 N. 4 (11-19) 1987.

41.-MILLER M: Maturation of rats visual cortex. 1. A quantitative study of Golgi-impregnated pyramidal neurons. J Neurocytology, 10:(859-878),1981.

42.-MORRISON RT, BOYD RN, Química Orgánica. Fondo Educativo Interamericano, S.A. México 1970.

43.-NIELSEN HK.:Renal effects of acute exposure to toluene. A controlled clinical trial. Acta Medica Escandinava 218:(3):(317-321),1985.

44.-OETTINGEN WF, NEAL PA, DONAHUE DD: The toxicity and potential dangers of toluene. Journal of American Medical Association. 118(8):(579-584), 1942.

45.-PARNAVELAS JG, LIEBERMAN AR, WEBSTER KE:Organization of neurons in the visual cortex, area 17, of the rat. Journal Anatomic, 124: (305-319),1977.

46.-PARNAVELAS JG, MOISES HC, SPECIALE SG: The monaaminergic innervation of the rats visual cortex. Proc R Soc Lond B, 193; (319-329),1985.

47.-PAXINOS G, WATSON GH. :The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, Sydney, 1982.

48.-PETERS A:Neuronal organization in rat visual cortex. In Harrison RJ. Holmes R.Led. Progress in Anatomy. Cambridge Univ Press,1981:(95-119).

49.-PETERS DA: Prenatal stress: Effect on development of rat brain serotonergic neurons. Pharmacology Biochemistry Behavioral, 24(1377-1382),1985.

50.-PETROPOULUS EA, LAU C, LIAO CL: Neurochemical changes in the offspring of rats subjected to stressful condition during gestation. Experimental Neurology. 37(86-99),1972.

51.-REBERT CS, MATTEUCCI MJ, PRYOR GT. :Acute electrophysiologic effects of inhaled toluene on adult male Long-Evans rats. Pharmacology Biochemistry Behavior, 33:(157-165), 1989.

52.-REES DC, WOOD RW, LATIES VG. : Evidence of tolerance following repeated exposure to toluene in the rat. Pharmacology Biochemistry Behavior, 32:(283-291),1989.

53.-RON MA: The long-term sequelae of solvent abuse.En:World Health Organization.México, 1986.

54.-RUIZ MARCOS, SALA J. Efect of specific and non-specific stimuli on the visual and motor cortex of the rat. Brain Research 170 (61-69) 1979.

55.-SALAS M: Effects of neonatal food deprivation on cortical and dendritic development of the rat. Brain Research , 73(139-144),1974.

56.-SAX LEWIS. Hazardous chemicals desk reference (821-822).

57.-SAX N I. Dangerous properties of Industrial Materials. Sixth edition (2588) 1984.

58.-SCHEIBEL M.E. AND SCHEIBEL A. The methods of Golgi Neuroanatomic. Research Techniques (89-114) 1978.

59.-SHOLL DA Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices optical of the cats. Journal of Anatomy, 87:(387-407),1953.

60.-TRUDELL JR, PAYAN DG, CHIN HJ, COHEN EN: The antagonistic effect of an inhalation anesthetic and high pressure on the phase diagram of mixed dipalmitoyl-dimyristoylphosphatidylcholine bilayer. Proc Nat Acad Sci USA, 72:210-213,1975.

61.-UEDA I, KAMAYA H: Molecular mechanism of anesthesia. Anesth Analg, 63:929-945,1984.

62.-VAZQUEZ-NIN GH, Y COL: Early neuronal alterations caused by experimental thinner inhalation in young rats. Neurobehavioral Toxicology, 2:(25-30), 1980.

63.-VOLKMAR FR, GREENOUGH WT: Rearing complexity effects branching and dendrites of the visual cortex of the rats. Science, 30 (1445-1447).1972.

64.-VON EULER G, FUXE K, HANSSON T, BENEFENATI F, GUSTAFSSON J-A: Effects of subacute toluene exposure on protein phosphorylation levels in rat frontoparietal and striatal membranes. Acta Physiology Scandinava, 131:(113-118), 1987.

65.-WEISS L. GREEP R D. Histologia Mc Graw-Hill México,1977.

66.-WINICK M: Normal cellular growth of the brain. En: Malnutrition and brain development. Oxford, University Press, New York, (35-62), 1976.

67.-WORLD HEALTH ORGANITATION. Toluene enviromental health. Criterio 52 Génova, 1981.

68.-YAMAWAKI S, SEGAWA T, SARAL K: Effects of acute and chronic toluene inhalation on behavior and 3H-serotonin binding in rat brain. Life Science, 30:1977-2002,1982.