



47
rej-

**Universidad Nacional Autónoma
de México**

**Facultad de Estudios Superiores
CUAUTITLAN**



**EL ILEO AISLADO DE COBAYO COMO MODELO PARA EVALUAR
LOS EFECTOS DE ALGUNOS SOLVENTES ORGANICOS**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A
ARACELI TORRES PEREZ

Director: Dra. Silvia L. Cruz Martín del Campo
Coasesor: M. en C. Luisa Martínez Aguilar



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

	Pág
RESUMEN	1
1. INTRODUCCION	
1.1 ANTECEDENTES	4
1.2 EFECTOS DE LOS SOLVENTES EN APARATOS Y SISTEMAS	5
1.3 METODOS DE ESTUDIO	7
1.3.1 Estudios en animales	
1.3.2 Estudios clínicos	
1.4 CARACTERISTICAS DE LA PREPARACION EXPERIMENTAL	12
1.4.1 Características histológicas	
1.4.2 Inervación intestinal	
1.4.3 Motilidad Intestinal	
-Control intrínseco muscular	
-Control extrínseco neural	
1.4.4 Características farmacológicas	
2. OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GENERAL	
2.2 OBJETIVOS PARTICULARES	
3. MATERIAL Y METODOS	20
-Animales	
-Fármacos, reactivos, colorantes	
-Extracción de los segmentos de intestino	

-Método general de exposición a solventes

3.1 ESTUDIOS FARMACOLOGICOS	23
3.1.1 Montaje de los segmentos intestinales	
3.1.2 Evaluación de los efectos de diferentes solventes para un tiempo fijo de exposición	
3.1.3 Evaluación de los efectos de diferentes proporciones de solvente	
3.1.4 Evaluación de los efectos de diferentes tiempos de exposición	
3.2 ESTUDIOS HISTOLOGICOS	25
3.2.1 Fijación de los segmentos	
3.2.2 Inclusión en parafina	
3.2.3 Obtención de cortes	
3.2.4 Tinciones	
Hematoxilina-Eosina	
Tinción rápida de Nissl	
Tinción tricrómica de Masson	
3.3 ANALISIS DE DATOS Y PROCEDIMIENTOS ESTADISTICOS	29
4. RESULTADOS	30
4.1 RESULTADOS FARMACOLOGICOS	
4.1.1 Efectos de diferentes solventes para un tiempo de exposición fijo (10 min)	
A. Sobre la actividad espontánea	
B. Sobre la respuesta a la estimulación	

eléctrica supramáxima	
C. Sobre la respuesta a nicotina	
4.1.2 Efectos de diferentes proporciones de xileno para un tiempo de exposición fijo	
A. Sobre la actividad espontánea	
B. Sobre la respuesta a la estimulación eléctrica supramáxima	
C. Sobre la respuesta a nicotina	
4.1.3 Efectos de diferentes tiempos de exposición para una proporción fija.	
A. Sobre la actividad espontánea	
B. Sobre la respuesta a la estimulación eléctrica supramáxima	
C. Sobre la respuesta a nicotina	
4.2 RESULTADOS HISTOLOGICOS	45
A. A nivel de la mucosa	
B. A nivel de la submucosa, la muscular externa y la serosa	
5. DISCUSION	47
6. CONCLUSIONES	53
7.REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	55

RESUMEN

Los solventes han sido extensamente estudiados para determinar sus efectos tóxicos y carcinogénicos en modelos animales y en estudios clínicos. En estos estudios se evalúan las respuestas conductuales y algunos parámetros fisiológicos e histológicos. Sin embargo, aún se desconoce mucho sobre sus mecanismos de acción y las relaciones dosis-respuesta y tiempo de exposición-respuesta. El objetivo de este trabajo fue determinar si el ileo aislado de cobayo (IAC) presenta una sensibilidad diferencial a la exposición de algunos solventes orgánicos (Tolueno, Xileno, Benceno y CCl_4), establecer las relaciones dosis-respuesta y tiempo de exposición-respuesta, y realizar un estudio histológico al IAC para determinar los efectos a nivel estructural.

Los solventes se administraron intraluminalmente por períodos controlados de tiempo. Los segmentos control se expusieron únicamente al vehículo (aceite de maíz) y los de prueba al solvente disuelto en aceite. Los segmentos control y los de prueba se sometieron a estudios farmacológicos e histológicos. Para el estudio farmacológico se registraron 3 respuestas: a) actividad espontánea; b) respuesta a la estimulación eléctrica supramáxima; y c) respuesta a una concentración estándar de nicotina ($5.6 \mu\text{M}$). Se establecieron 3 grupos experimentales. En el primero se evaluaron los efectos de los 4 solventes en una proporción 1:1 y para un tiempo de exposición de 10 min. En el segundo grupo se evaluaron los efectos de diferentes proporciones de xileno (0.25:1.75, 0.5:1.5, 1:1 y 1.75:0.25) para un tiempo fijo de exposición de 10 min. En el tercer grupo se evaluaron los efectos de diferentes tiempos de exposición (5, 10 y 15 min) para una proporción fija de xileno (0.5:1.5). Para el estudio histológico se evaluaron los efectos de diferentes proporciones de xileno (0.25:1.75, 1.75:0.25) para un tiempo fijo de exposición de 10 min y para una proporción fija de 0.25:1.75 durante 20 min. Los segmentos de ileo se procesaron de la manera siguiente: se fijaron en formol buffer al 10% por 24 hrs., se incluyeron en parafina, se obtuvieron cortes en microtomo de rotación y los cortes se tiñeron con hematoxilina-eosina, Nissl y Tricrómica de Masson.

Resultados farmacológicos. Todos los solventes produjeron un aumento importante de la actividad espontánea (contracciones mayores de 1 g en ausencia de estimulación eléctrica). El porcentaje de segmentos que presentó este comportamiento fue diferente para cada compuesto, siendo particularmente importante para el xileno (85%). El efecto aumentó en función tanto de la proporción del solvente (25% para la proporción más baja y 90% para la más alta) como del tiempo de exposición. Ninguno de los compuestos analizados tuvo efecto sobre la respuesta a la estimulación eléctrica supramáxima. La nicotina produjo un efecto bifásico característico en los segmentos control con una fase contráctil muy importante y una fase relajante menor. Los solventes produjeron disminución de las dos fases de la respuesta nicotínica siendo más importante el efecto inhibitorio sobre la relajación.

Esta respuesta fue dependiente tanto de la proporción como del tiempo de exposición.

Resultados histológicos. A nivel de la mucosa, la exposición a xileno no produjo ninguna alteración observable a nivel de microscopía óptica en la morfología general de las vellosidades, de las glándulas intestinales ni de las células caliciformes. Sin embargo, en los enterocitos se observaron las siguientes alteraciones: pérdida de los contornos celulares, alteración en la morfología nuclear y cambio en la afinidad a los colorantes. Las otras capas que forman parte de la mucosa, no presentaron cambios en su morfología. A nivel de la submucosa, la muscular externa y la serosa, estas capas no fueron afectadas por el solvente, al menos a nivel de microscopía óptica.

Los resultados obtenidos indican que el IAC es una preparación que puede resultar de gran utilidad para estudiar la toxicidad diferencial de diferentes solventes así como para el diseño de series experimentales que permiten conocer mejor sus mecanismos de acción.

1. INTRODUCCION

1.1 ANTECEDENTES

El hombre está en contacto con los solventes orgánicos o inhalables, en circunstancias tales como la exposición ocupacional o la inhalación voluntaria de productos comerciales y, menos frecuentemente, por su ingestión o absorción a través de la piel.

Los solventes orgánicos son los componentes básicos de productos comerciales como el thinner, el pegamento, la gasolina, el cemento, el resistol, etc. El abuso de estos productos puede causar dependencia hacia la sustancia inhalada, desarrollo de tolerancia a algunos de sus efectos y síndrome de abstinencia o supresión caracterizado por estados de ansiedad, depresión, irritabilidad, fatiga y falta de apetito (García Liñan, 1990). Estudios epidemiológicos indican que la población en México presenta una baja prevalencia en el uso de estas sustancias (véase la Encuesta Nacional de Adicciones 1990). Sin embargo, los grupos afectados son de gran interés ya que en su mayoría son hombres que iniciaron el uso de inhalables entre los 12 y 17 años de edad. Recientemente el Instituto Mexicano de Psiquiatría realizó un reporte acerca del consumo de drogas en el área metropolitana. Se trabajó con una muestra de 317 usuarios de drogas captados en Instituciones de Atención a la Salud durante el mes de junio de 1990. De esta muestra se encontró que la prevalencia de consumo de solventes alguna vez en la vida fué del 56%, y en el momento de la encuesta, del 34%. Según este estudio, los solventes fueron una de

las drogas más frecuentemente utilizadas por los consumidores captados en las instituciones de salud (Ortiz et al., 1991).

Los solventes también están presentes en ciertos ambientes industriales. Esta exposición afecta principalmente a los obreros que desempeñan su trabajo en la fabricación de pinturas, gomas, productos de limpieza, motores, pegamentos, tintas, etc.

1.2 EFECTOS DE LOS SOLVENTES EN APARATOS Y SISTEMAS

La exposición a solventes orgánicos tanto ocupacional como voluntaria afecta varios sistemas tales como el renal (Streicher et al., 1981), el cardiovascular (manifestado por arritmias cardíacas; Cunningham et al., 1987), el hepático (Marjot y McLeod, 1989), el hematopoyético (McMichael, 1988) y muy especialmente el sistema nervioso (SN). La exposición a concentraciones bajas de alquilbencenos (tolueno, xileno y benceno) se manifiesta como pérdida de la memoria, de la capacidad visual y psicomotora (Gupta et al., 1990), letargo, ataxia (McCormik et al., 1990), deterioro de las funciones cognitivas (Zur y Yule, 1990). La inhalación crónica de tolueno produce neuropatía óptica manifestada por ceguera (Kohriyama et al., 1989) y disfunción auditiva (Biscaldi et al., 1984). En la tabla 1.1 se enumeran algunos de los signos y síntomas más frecuentes producidos por inhalación voluntaria de varios productos que contienen tolueno (Pryor et al., 1978).

TABLA 1.1 Signos y síntomas más frecuentes asociados a la inhalación de tolueno

I. EXPOSICION AGUDA

1. Periodos cortos de pérdida de memoria
2. Inestabilidad emocional.
3. Deficiencias de las funciones cognitivas.
4. Lenguaje desarticulado.
5. Ataxia en el ancho del paso.
6. Tambaleo al caminar.
7. *Nistagmus*.
8. Pulsación o temblor ocular.
9. Temblor.

II. EXPOSICION CRONICA.

1. Neuropatía óptica.
2. Pérdida del sentido del olfato.
3. Disminución auditiva unilateral o bilateral.
4. Atrofia en tallo cerebral, cerebelar.
5. Dilatación y ensanchamiento de ventrículos, especialmente en corteza frontal y temporal.

A pesar de conocer algunos de los efectos de los solventes, aún se desconoce mucho acerca de sus mecanismos de acción así como de las relaciones entre la dosis, el tiempo de exposición y las respuestas biológicas. Los efectos de estos agentes a diferentes niveles del SN, pueden explicarse por su naturaleza altamente lipofílica, por lo que actúan a nivel de membrana y no a nivel de receptores específicos (Alberts, 1983). Esta propiedad también explica su rápida distribución en órganos ricos en lípidos como el cerebro, el hígado y las glándulas adrenales. Las membranas están formadas por una bicapa lipídica en donde se encuentran ciertos sistemas enzimáticos. En presencia de moléculas polares, como los solventes orgánicos, la conformación y la actividad de las enzimas puede modificarse (Roelofsen, 1981; Lenaz, 1978). Recientemente,

Edelfors y Ravn-Jonsen (1989) han reportado que la exposición aguda de tolueno produce una disminución en la actividad de la ATPasa de Ca^{++}/Mg^{++} sin cambios en la fluidez membranal. Estos estudios son antecedentes importantes para determinar los mecanismos de acción de los solventes. En cuanto a los estudios experimentales sobre las alteraciones de la actividad eléctrica del SN, diversos investigadores (Guzman et al., 1975; Alcaraz et al 1977) sugieren que los solventes tienen acción específica sobre el sistema límbico (Contreras et al., 1979). La acción neurotóxica de los solventes orgánicos se manifiesta como efectos nocivos en el SN en su estructura, en su función o en ambos. Estos efectos se dividen convencionalmente en agudos y crónicos. Se ha propuesto que algunos de los efectos asociados a la exposición aguda se deben a la incorporación de moléculas del solvente dentro de la membrana de la célula nerviosa, modificando así la transferencia iónica (Savolainen, 1977). Por otro lado, se ha propuesto que los efectos de la exposición crónica pueden deberse a que los solventes necesitan ser biotransformados para eliminarse, obteniéndose metabolitos que pueden ser más tóxicos que el solvente original (Allen, 1979; Goetz, 1985).

1.3 METODOS DE ESTUDIO

Los solventes se han estudiado extensamente para evaluar su potencialidad tóxica y carcinogénica, para conocer sus propiedades, determinar sus posibles secuelas neurológicas y lo que los hace objeto de abuso para el hombre. Los efectos de los solventes se

estudian básicamente de 2 maneras: una es mediante modelos animales y la otra a través de estudios clínicos.

1.3.1 Estudios en animales

Para conocer los efectos de los solventes se han utilizado diversas especies, animales de diferente sexo y edad y diferentes métodos de exposición. En estos estudios se evalúan las respuestas conductuales y algunos parámetros fisiológicos e histológicos.

Los modelos conductuales son de dos tipos: AUTOADMINISTRACION COMPULSIVA (Drug Self Administration) y DISCRIMINACION DE FARMACOS (Drug Discrimination). Los de autoadministración consisten en poner a los animales en contacto con la sustancia de estudio de la que se piensa que provoca un efecto de recompensa probablemente por sus propiedades farmacológicas (Schuster et al., 1969). En estos estudios, el animal necesita desplegar una conducta, por ejemplo apretar una palanca, para recibir una dosis de fármaco. Este modelo se ha aplicado para estudiar la dependencia psicológica producida por diferentes sustancias psicotrópicas. Para los solventes, se han utilizado monos, demostrándose que estos animales se autoadministran cloroformo en condiciones controladas de laboratorio (Yanagita et al., 1970).

El otro modelo conductual, el de discriminación de fármacos, utiliza el patrón único de los eventos internos causados por un agente químico como estímulo para entrenar animales para obtener una respuesta en presencia del agente (por ejemplo apretar la palanca derecha) y una respuesta en su ausencia (apretar la palanca

izquierda) (Stolerman y Shine, 1989). Con este modelo se ha encontrado que los animales entrenados para distinguir entre los efectos de barbitúricos (depresores del SN) y el vehículo, manifiestan una elección significativa de la conducta asociada a la exposición al fenobarbital después de haber estado expuestos al tolueno (Ress et al., 1987). Estos experimentos sirvieron de base para considerar a los solventes como depresores del SN central.

Otros modelos incluyen animales que se exponen a los solventes por medio de diferentes vías de administración durante un tiempo determinado para posteriormente evaluar parámetros histológicos, hematológicos, fisiológicos y del sistema motor y sensorial. Entre estos últimos se incluye la evaluación de la fuerza motora, la locomoción, la respuesta de pérdida repentina de apoyo y el balance sensorimotor (Pryor et al., 1983).

La vía de administración más utilizada es la inhalación. Algunos estudios representativos de este tipo son los realizados con: TOLUENO (Ghosh et al., 1990; Huang et al., 1990; Mattson et al., 1990; Kiriu et al., 1990), CCL₄ (Toskulkae et al., 1990), BENCENO (Keller y Snyder, 1988) y ETANOL-XILENO (Wisniewsk et al., 1989). En estos estudios se encuentran grandes variaciones en los protocolos por lo que es difícil obtener información concluyente. Por ejemplo, se utilizan concentraciones que van desde 5 hasta 10,000 ppm y tiempos de exposición desde 15 min hasta 90 días. Sin embargo, en los diversos estudios parece haber acuerdo en que los solventes alteran importantemente el sistema motor y sensorial.

Otra vía de exposición menos utilizada es la oral. En algunos estudios se mezclan los solventes con el agua para beber o se emplean tubos estomacales para su administración. En estos casos se observan también grandes variaciones en los protocolos experimentales, tanto en los rangos de concentración como en los tiempos de exposición (Hsieh et al., 1990; Cai y Mehendale, 1990; Raunio et al., 1990; Rithidech et al., 1988). Otras vías menos empleadas son la dérmica, tanto en humanos como en animales, (McDougal et al., 1990) con rangos de concentración de 200 a 60,000 ppm; y la vía intraperitoneal (Chadwick et al., 1988).

La variabilidad está presente en los protocolos que utilizan diferentes concentraciones, tiempos de exposición y vías de administración. Probablemente, esto ha influido para que en la mayoría de las investigaciones con modelos animales no se haya encontrado una clara relación dosis-efecto entre la exposición a solventes y sus consecuencias neurológicas, excepto para la ototoxicidad (Pryor et al., 1984) y la neuropatía producida por hexacarbonos (Howd et al., 1983).

1.3.2 Estudios clínicos

La mayoría de los estudios clínicos se ha enfocado a la exposición crónica a niveles bajos de solventes simulando la exposición ocupacional de los obreros.

En los estudios clínicos se han empleado algunos solventes como el TOLUENO (Foo et al., 1990; Baelum, et al., 1990) y el M-XILENO (Glasser et al., 1990); con rangos de concentración de 13 a

80 ppm, con tiempos de exposición promedio de 4 hrs. En estos estudios, se han evaluado diferentes parámetros, tanto conductuales como fisiológicos, (Rosenberg et al., 1988; Meulenbelt et al., 1990; Foo et al., 1990; Zur y Yule, 1990; Armianov y Khalkova, 1988). De esta manera, se ha determinado la mayoría de los efectos que causan los solventes orgánicos en el hombre (véase tabla 1), entre los que destacan pérdida de la memoria, ataxia, neuropatía óptica y disfunción auditiva. Sin embargo, en la investigación clínica también se dificulta la determinación de una relación exacta de dosis-efecto debido a que en el hombre intervienen otros factores difíciles de controlar como el uso de otras drogas, la nutrición, el uso de mezclas de solventes más que de sustancias individuales y el historial de los inhaladores (Jakobsen et al., 1989). Existen reportes en la literatura que indican que la mayoría de los efectos de los solventes son reversibles, ya que los individuos se recuperan completamente después de una abstinencia prolongada (Wiedman et al., 1987).

La revisión bibliográfica pone de manifiesto que el estudio de los solventes orgánicos podría enriquecerse si se tuviera un enfoque diferente. En los diferentes métodos, tanto en modelos animales como en estudios clínicos, se han logrado determinar los efectos en diferentes aparatos y sistemas. Sin embargo, el estado actual del conocimiento exige continuar con los estudios farmacológicos a los solventes, como a toda sustancia que es capaz de afectar a los organismos vivos, con el fin de conocer con mayor profundidad los mecanismos de acción involucrados. En el presente

proyecto se propone al Ileo Aislado de Cobayo (IAC) como modelo experimental para estudiar los efectos de los solventes. Es claro que los resultados obtenidos con esta preparación no serían extrapolables a los efectos de la inhalación en el hombre. Sin embargo, el IAC, por sus características, resulta potencialmente muy interesante para conocer un poco más de los efectos y mecanismos de acción de los solventes orgánicos.

1.4 CARACTERISTICAS DE LA PREPARACION EXPERIMENTAL

El IAC es una preparación experimental de músculo liso que permite el control de muchas variables ambientales como el pH, la temperatura, la dosis y el tiempo de exposición. Estas últimas dos variables son particularmente importantes para el caso de los solventes ya que permiten establecer las relaciones dosis-respuesta y tiempo de exposición-respuesta. Entre las respuestas que se pueden evaluar están la actividad espontánea del músculo liso, la respuesta a la estimulación eléctrica supramáxima de los nervios colinérgicos y la respuesta a fármacos específicos.

1.4.1 Características histológicas

La estructura del tracto gastrointestinal varía de región en región, sin embargo hay algunas características comunes a todo el tejido, la figura 1.1 muestra la organización general de la pared intestinal. Se reconocen cuatro capas principales: la mucosa, la submucosa, la muscular externa y la serosa.

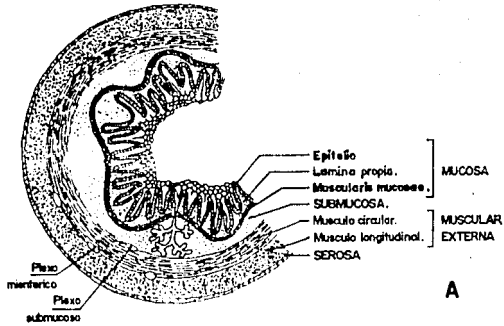


Fig.4.1 Dibujo esquemático de la estructura general del tracto gastrointestinal (A). Fotomicrografía de un corte de íleo de cobayo donde se observa la estructura general (B). Tricórnica Masson 100x.



La mucosa es la capa más interna de la pared intestinal. Su superficie está dispuesta a manera de pliegues que se proyectan hacia la luz del intestino y que reciben el nombre de vellosidades. Entre los puntos de inserción de las vellosidades se observan orificios donde desembocan las glándulas tubulares de Lieberkuhn (ver fig. 1.1). La mucosa está formada a su vez por tres capas: un revestimiento epitelial, una lámina propia de soporte y una capa delgada doble de músculo liso que se conoce como muscular de la mucosa o *musculares mucosae*.

El epitelio de la mucosa es cilíndrico simple formado por dos tipos de células, secretorias y absorbentes. Las células que se encuentran en mayor número son las células intestinales prismáticas de absorción. En menor cantidad se encuentran las secretorias que son la células absorbentes y las de Paneth. Las células absorbentes también se conocen con el nombre de enterocitos. Presentan núcleos esféricos de cromatina extendida, aparato de Golgi bien desarrollado, abundantes cisternas de retículos endoplásmico rugoso y liso, y mitocondrias. La superficie apical de la membrana plasmática está dispuesta formando numerosas microvellosidades paralelas que se conocen como la chapa estriada (Ham, 1975). A nivel de microscopía óptica se observan con claridad los núcleos y los límites celulares.

La segunda capa de la mucosa es la lámina propia (ver fig. 1.1). Esta capa está formada por tejido conectivo laxo ordinario. Es rica en glándulas y contiene nódulos linfáticos y capilares.

La muscular de la mucosa es una capa formada a su vez por dos estratos delgados de fibras musculares lisas. En la capa interna del músculo, las fibras están dispuestas circularmente; y en la externa longitudinalmente.

La submucosa es la capa que une la mucosa con la capa muscular externa. Está constituida por tejido conectivo laxo, glándulas submucosas y vasos sanguíneos. En contacto con la muscular externa, se encuentra una pequeña red nerviosa conocida como el plexo submucoso o de Meissner.

La muscular externa consta de dos capas de células musculares lisas: una capa circular interna y una capa longitudinal externa. Entre ambas capas se halla el plexo mientérico o de Auerbach.

La serosa o adventicia es la capa más externa del intestino. Está formada por tejido conectivo laxo con gran cantidad de células adiposas, vasos sanguíneos y linfáticos, y por epitelio pavimentoso simple.

1.4.2 Inervación intestinal

El íleo esta inervado fundamentalmente por el SN parasimpático a través del nervio vago. Las fibras parasimpáticas preganglionares llegan hasta los ganglios. El plexo de Auerbach contiene los ganglios y se encuentra entre la capa circular y la capa longitudinal de la muscular externa. El neurotransmisor que liberan las fibras preganglionares es la acetilcolina y los receptores ubicados en las fibras posganglionares son nicotínicos. En el músculo liso, la acetilcolina actúa predominantemente en receptores

muscarínicos (Taylor, 1986). En la preparación de IAC se conservan intactas las fibras posganglionares parasimpáticas y las preganglionares sólo conservan sus axones.

1.4.3 Motilidad intestinal

A la capa muscular le corresponde la mayor parte de la función propulsora del aparato digestivo. Los diversos tipos de acción que esta capa lleva a cabo y su control son muy complejos.

Las células musculares lisas, como todas las células musculares, pueden ser excitadas química, eléctrica y mecánicamente. Las células musculares contienen proteínas contráctiles, y a diferencia de las neuronas, poseen un mecanismo contráctil que es activado por el potencial de acción (Ganong, 1988).

La contracción del músculo liso depende de varios factores entre los que se incluyen las propiedades intrínsecas de las células musculares lisas, la actividad de los nervios que constituyen los plexos, la influencia de nervios simpáticos y parasimpáticos y agentes químicos.

A) Control intrínseco muscular

El músculo liso, a diferencia de otros tipos de músculos, se caracteriza por presentar inestabilidad en el potencial de membrana y por el hecho de tener actividad espontánea. La actividad espontánea es el resultado de las contracciones del íleo reguladas por los cambios de potencial en el músculo liso. Los cambios de potencial de membrana están presentes aun si el intestino no se

contrae (Ganong, 1988). Mediante estudios electrofisiológicos se han registrado dos tipos de actividad eléctrica espontánea. Una donde los cambios del potencial son lentos y no hay contracción y que se conoce como ondas lentas o "Ritmo Eléctrico Básico". La otra actividad eléctrica se caracteriza por cambios de potencial rápido. Estos cambios están asociados a la contracción y se les conoce como potenciales de acción o potenciales espiga (Berne y Levy, 1986). Se ha encontrado una relación entre estos dos tipos de actividad eléctrica: los potenciales espiga sólo ocurren en la fase de cambio positivo de la onda lenta. Las ondas lentas del músculo liso se generan en las células musculares lisas, especialmente del músculo longitudinal. Para explicar el mecanismo de estas ondas se han propuesto dos teorías. La primera menciona la existencia de una bomba electrogénica de Na^{++} que abre y cierra periódicamente. La segunda dice que hay cambios periódicos de iones particularmente de Na^{++} y Ca^{++} . Los potenciales espiga se generan en las células musculares lisas. Estos potenciales son rápidas depolarizaciones y repolarizaciones de la membrana celular del músculo liso. Los requerimientos iónicos para estos cambios de potencial en la fase de depolarización son en gran parte de Ca^{++} (Wood, 1983).

B) Control extrínseco neural

El control extrínseco neural de la contracción del músculo liso está dado fundamentalmente a través del plexo mientérico. El plexo mientérico está organizado en nodos que se interconectan. En las células ganglionares del plexo se encuentran las terminaciones de las fibras parasimpáticas preganglionares colinérgicas y los

somas y terminaciones de las neuronas parasimpáticas postganglionares que inervan el músculo liso. Las células pueden ser estimuladas eléctrica y químicamente y producir una respuesta. La estimulación eléctrica transmural del íleo de cobayo activa los nervios colinérgicos para liberar acetilcolina y así causar contracción del músculo longitudinal (Berne y Levy, 1986).

1.4.4 Características farmacológicas

Existen agentes químicos que estimulan o inhiben la contracción del músculo liso. La mayoría de estos agentes actúan a nivel de receptores. En esta preparación se han encontrado receptores para varias sustancias como: morfina, sustancia P, histamina, serotonina y para las más conocidas acetilcolina, adrenalina, nicotina y muscarina (Burks et al., 1983). En este proyecto, se utilizó la nicotina que es un agente que estimula los receptores colinérgicos nicotínicos, lo que se traduce en la liberación de acetilcolina (Ach) y, en última instancia, en la contracción del músculo liso.

2. OBJETIVOS

Los objetivos que se plantearon al inicio de este proyecto fueron los siguientes:

2.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar si el IAC es un modelo adecuado para el estudio de los efectos de algunos solventes orgánicos (TOLUENO, XILENO, CCL, Y BENCENO).

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

2.2.1 Determinar si la preparación del fíleo presenta una sensibilidad diferencial a la exposición de estos solventes, utilizando como indicadores las siguientes respuestas:

a) actividad espontánea; b) respuesta a la estimulación eléctrica supramáxima y c) la respuesta a una dosis estándar de nicotina $5.6\mu\text{M}$.

2.2.3 Establecer las relaciones dosis-respuesta y tiempo de exposición-respuesta para el solvente que presente los efectos más severos sobre las respuesta mencionadas en el objetivo anterior.

2.2.4 Realizar un estudio histológico a los segmentos de fíleo expuestos al solvente utilizado en el objetivo 2.2.3.

3. MATERIALES Y METODOS

-Animales. Se trabajó con cobayos macho (600-900g de peso corporal), los cuales se sacrificaron con un golpe en la nuca.

-Fármacos utilizados:

A. Solventes: TOLUENO (Merck), XILENO (90% de isómeros, Merck), CCL₄ (Baker) y BENCENO (Merck).

B. Vehículo: ACEITE DE MAIZ.

C: Fármaco de referencia: NICOTINA (base libre, Sigma)

-Reactivos utilizados:

Acetato de sodio (Baker)
Acido acético glacial (Merck)
Acido clorhídrico conc (Merck)
Acido fosfomolibdico (Monterrey)
Acido fosfotungstico (Sigma)
Acido picrico (Baker)
Alcohol absoluto (Merck)
Alcohol al 96% (Merck)
Carbonato de litio (Merck)
Formol 37-40% (Merck)
Gelatina Q.P. (Baker)
Hierro (III) cloruro 6H₂O (Merck)
Parafina (Reichert-Jung)
Resina sintética (Sigma)
Xilol (Merck)

- Colorantes utilizados:

Anilina azul (Merck)
Eosina amarillenta (Sigma)
Escarlata Briebrich (Sigma)
Fuchsina ácida (Sigma)
Hematoxilina (Merck)
Violeta de cresilo (Sigma)

-Extracción de los segmentos intestinales. A partir de la válvula ileocecal del cobayo se extrajo un segmento de íleo de aproximadamente 40 cm de longitud y se colocó en una caja de Petri conteniendo solución Krebs burbujeada con gas carbógeno (95% O₂ / 5% CO₂) a temperatura ambiente. Se descartaron los primeros 10 cm de la porción terminal del íleo y el segmento restante se dividió en 4 segmentos de 6 a 8 cm de longitud. El contenido intestinal se removió con un émbolo de vidrio y se cortaron los residuos de mesenterio. Para garantizar la limpieza de los segmentos se lavaron intraluminalmente con 10 ml de solución Krebs. El material de disección, excepto tijeras, se trabajó recubierto con algodón humedecido en Krebs. La composición de la solución Krebs es la siguiente:

	mM
Dextrosa	12.2
Citrato de colina	0.01
NaCl	118
NaHCO ₃	25
KCl	4.75
KH ₂ PO ₄	1.25
MgSO ₄	0.108
CaCl ₂	2.5

-Método general de exposición a solventes. De los 4 segmentos extraídos del animal se formaron 2 grupos. El grupo control, donde los segmentos se expusieron únicamente al vehículo y el otro grupo de prueba, que se expusó al solvente disuelto en el vehículo. Tanto el vehículo como el solvente se administraron intraluminalmente en un volumen total de 1 ml. Los segmentos se cerraron anudando ambos extremos con hilo para conservar el volumen administrado. Después

del tiempo de exposición determinado (5, 10 ó 20 min), se cortaron los extremos anudados para vaciar el contenido. Posteriormente cada segmento de 8 cm se dividió en dos segmentos menores de 2 a 3 cm cada uno, para continuar con los estudios farmacológicos ó con los estudios histológicos como se describe en la secciones siguientes.

3.1 ESTUDIOS FARMACOLOGICOS

3.1.1 Montaje de los segmentos intestinales

Se colocaron 2 segmentos de 2 a 3 cm en cámaras de temperatura controlada (36°C). Cada cámara se trabajó con 50 ml de solución Krebs burbujeada constantemente con gas carbógeno a pH 7.4. Los segmentos se montaron en electrodos verticales de Nichrome, con un extremo fijado al tapón de la cámara y con el otro a un transductor isométrico de tensión (Grass FT 03) conectado a un polígrafo Grass modelo 7D, para registrar la actividad contráctil del músculo longitudinal. Una vez montados los segmentos, se aplicó una tensión inicial de 1g y se registraron las siguientes respuestas:

-Registro de la actividad espontánea y de la respuesta a la estimulación eléctrica supramáxima. Después de aplicar la tensión inicial, se dejó un período de estabilización de treinta minutos para observar la actividad espontánea. Posteriormente se aplicó una estimulación eléctrica supramáxima de 20 Volts con pulsos cuadrados de 1 ms de duración con una frecuencia de 0.1 Hz.

-Registro de la respuesta de referencia de nicotina. Después de la estimulación eléctrica, se aplicó una concentración de referencia

estándar de nicotina $5.6\mu\text{M}$ (veáse Cruz et al., 1991). Cinco minutos antes de la administración de nicotina se suspendió la estimulación eléctrica. La respuesta de nicotina se registró por diez minutos. Posteriormente se reinició la estimulación eléctrica.

3.1.2 Evaluación de los efectos de diferentes solventes para una dosis y un tiempo de exposición fijos

Para este apartado, los dos grupos de segmentos, tanto el control como el de prueba, se expusieron durante un período fijo de 10 min. Los solventes se administraron en una proporción solvente:aceite 1:1. En el volumen total administrado (1 ml) 0.5 ml son de solvente y 0.5 ml de vehículo.

3.1.3 Evaluación de los efectos de diferentes proporciones de solvente

Para esta sección, se evaluaron los efectos del xileno con las siguientes condiciones: a) para el grupo control y el de prueba, los segmentos se expusieron durante un período fijo de 10 min; y b) el xileno se administró en las proporciones 0.25:1.75, 0.5:1.5, 1:1, 1.75:0.25.

3.1.4 Evaluación de los efectos de diferentes tiempos de exposición

En este apartado, también se evaluaron los efectos del xileno con las siguientes condiciones: a) para los dos grupos, se trabajaron los tiempos de exposición: 5, 10 y 20 min; y b) el xileno se administró en una proporción fija de 0.5:1.5.

3.2 ESTUDIOS HISTOLOGICOS

Los segmentos para este estudio se prepararon como se indica en la sección donde se describe extracción de los segmentos intestinales, utilizando también como grupo control segmentos de íleo fresco y como grupo de prueba segmentos expuestos a xileno. El xileno se administró en las siguientes condiciones: a) con el tiempo de exposición de 10 min y en las proporciones 0.25:1.75 y 1.75:0.25; y b) con un tiempo de exposición de 20 min y en una proporción de 0.25:1.75.

3.2.1 Fijación de los segmentos

Los segmentos de cada grupo se fijaron en formol buffer al 10% durante 24 hrs. Posteriormente se lavaron en agua corriente durante 1 hr para eliminar el exceso de fijador.

3.2.2 Inclusión en parafina

Los segmentos lavados se colocaron en un procesador de tejidos American Optical modelo T/b 8000. En este procesador se llevaron a cabo los siguientes pasos de la inclusión. La deshidratación que consiste en remover el agua del tejido por medio de un agente deshidratante en concentraciones crecientes. Para este caso se trabajó con alcohol etílico y se empezó con concentraciones al 70%, 80% 96% y 100%. Se efectuaron 2 cambios en cada concentración con duración de 1 hr. La impregnación o aclaramiento consiste en substituir el alcohol deshidratante por un disolvente de la parafina. En este paso se utilizaron 2 cambios de xilol por

periodos de 1 hr. La preinclusión en parafina, que consiste en sumergir los tejidos aclarados en parafina fundida a una temperatura de 56°C . Para este paso se realizaron 2 cambios con duración de 1 hr. Al termino del último baño en parafina, los segmentos se sacaron del procesador de tejidos para realizar la inclusión. En la inclusión, los segmentos preincluidos se colocaron en moldes de cartón que contenían la parafina fundida para obtener los bloques (Gaviño et al., 1984). Los segmentos se orientaron de 2 formas para cada grupo: una para hacer cortes transversales y otro para longitudinales.

3.2.3 Obtención de cortes

Los bloques se delimitaron con una navaja para darles forma y quitar el exceso de la parafina. Posteriormente, cada bloque se fijó por calentamiento a una placa vertical móvil conservando la orientación inicial del segmento. Esta placa se colocó en un microtomo de rotación American Optical modelo 800. Los cortes se hicieron de 6 micras de espesor y se colocaron en una solución de gelatina al 0.7% a una temperatura de 48 a 55°C, para extenderlos y adherirlos a un portaobjetos. Posteriormente se dejaron secar a temperatura ambiente.

3.2.3 Tinciones

Los métodos de coloración permiten hacer visibles los componentes de los tejidos y diferenciarlos unos de otros. Para

este estudio se realizaron 3 técnicas de tinción: Hematoxilina-eosina, Nissl y Tricrómica de Masson (Luna, 1968).

Para efectuar cada tinción, se eliminó la parafina con xilol. Los cortes se rehidrataron haciéndolos pasar por una serie de soluciones alcohólicas de graduación decreciente, hasta llegar a agua.

A) Hematoxilina-Eosina

Esta tinción es la más utilizada en los estudios histológicos, con la cual podemos observar núcleos (en azul) y citoplasma (en rosa). El procedimiento a utilizar fue el siguiente:

-Colocar los cortes desparafinados e hidratados en hematoxilina de Harris durante 20 min.

-Lavar con agua corriente por 3 min.

-Sumergir en alcohol ácido 3 veces.

-Lavar con agua corriente por 1 min.

-Sumergir en LiHCO_3 , 5 veces.

-Lavar con agua corriente durante 10 min.

-Colocar en eosina durante 2 min.

-Deshidratar en alcohol al 96% (2 cambios de 2 min), para remover el exceso de eosina, y posteriormente en alcohol absoluto (2 cambios de 5 min).

-Aclarar en xilol (2 cambios de 5 min).

-Finalmente montar los cortes con resina sintética

B) Tinción rápida de Nissl

Esta tinción es ampliamente utilizada en la neurohistología, la cual se utilizó para observar las neuronas ganglionares de los plexos nerviosos intestinales. El procedimiento a utilizar fue el siguiente:

- Colocar los tejidos desparafinados e hidratados en una solución de violeta de cresilo durante 10 min.

- Sumergir 3 veces en solución buffer y después en alcohol al 70%.

- Deshidratar en concentraciones ascendentes de alcohol empezando por 80, 96 y 100% (2 cambios en cada alcohol por 2 min).

- Aclarar en xilol (2 cambio por 2 min).

- Por último montar los cortes con resina sintética.

C) Tinción tricrómica de Masson.

Con esta técnica se pueden diferenciar varios componentes del tejido como son: núcleos (morado a negro), citoplasma (violáceo), fibras musculares (rojo) y tejido conectivo (azul). El procedimiento a utilizar fue el siguiente:

- Colocar los cortes desparafinados e hidratados en solución Bouin durante 1 hr a 56°C.

- Enfriar y lavar en agua corriente hasta que desaparezca el color amarillo.

- Enjuagar con agua destilada y se colocar en una solución de Hematoxilina-Fe de Weigert durante 5 min.

- Lavar con agua corriente por 10 min.

-Enjuagar con agua destilada y colocar en una solución de escarlata Biebrich y fuchsina durante 2 min.

-Lavar con agua destilada y colocar en una solución ác. fosfomolibdico y ác. fosfotungstico durante 10 min.

-Colocar en una solución de anilina azul por 5 min y después 3 min en ác. acético glacial al 1%.

-Deshidratar en alcohol al 96% y 100% y aclarar con xilol, con 2 cambios para cada caso.

-Finalmente montar los cortes con resina sintética.

3.3 ANALISIS DE DATOS Y PROCEDIMIENTOS ESTADISTICOS

Los valores obtenidos de los estudios farmacológicos se expresan como la media \pm el error estándar de los datos. La comparación entre dos medias de diferentes grupos (el grupo control con el grupo de prueba) se hizo con la t de Student para datos no pareados. La comparación entre los valores de diferentes grupos control se hizo con un análisis de varianza de 1 vía (ANAEVA).

4. RESULTADOS

4.1 RESULTADOS FARMACOLOGICOS

Las respuestas consideradas para este análisis fueron la actividad espontánea, la respuesta a estimulación eléctrica supramáxima (twitch) y la respuesta a 5.6 μM de nicotina.

4.1.1 Efectos de diferentes solventes para un tiempo fijo de exposición (10 min)

A. Sobre la actividad espontánea

En los segmentos del grupo control, la actividad espontánea se caracterizó por un patrón contráctil basal de ondas lentas con la presentación esporádica de pequeñas espigas menores de 1 g (trazo superior de la fig. 4.1). De los segmentos control estudiados, sólo 1 de 160 presentó contracciones mayores de 1 g. En los segmentos de prueba, la actividad intrínseca aumentó considerablemente manifestándose como contracciones espontáneas mayores de 1 g (trazo inferior de la fig. 4.1), Este incremento se observó con todos los solventes analizados en este estudio.

La figura 4.2 muestra el porcentaje de segmentos que presentaron contracciones mayores de 1 g para cada solvente. El xileno fué el que tuvo mayor efecto; el 85% de los segmentos expuestos a este solvente presentaron un incremento de la actividad espontánea.

B. Sobre la respuesta a estimulación eléctrica supramáxima

En los segmentos de los grupos control, las contracciones resultantes fueron de 3.1 g en promedio con valores desde 2.8 g

REGISTROS MUESTRA

ACTIVIDAD ESPONTANEA

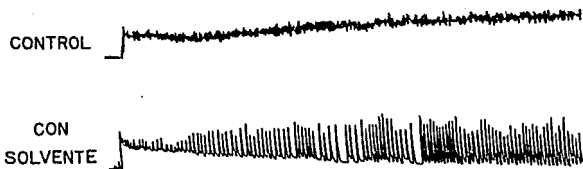


Figura 4.1 Ejemplos de registros de polígrafo donde se observa la actividad espontánea de un segmento control y de uno expuesto durante 10 min a una proporción xileno:aceite 1:1. En el segmento expuesto al solvente se observan contracciones espontáneas en ausencia de estimulación eléctrica.

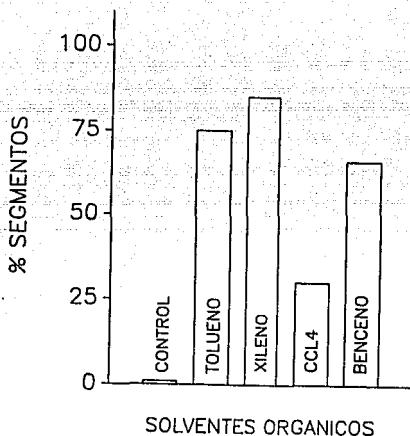


Figura 4.2 Porcentaje de segmentos que presentaron aumento en la actividad espontánea considerada como la aparición de contracciones mayores de 1 g en ausencia de estimulación eléctrica. El grupo control corresponde al de segmentos no expuestos a solvente. Los grupos de prueba se expusieron durante 10 min a una proporción de solvente:aceite 1:1. Para todos los grupos n=20.

hasta 3.3 g. Los segmentos de prueba no presentaron diferencias significativas con respecto a los controles. Es decir, el tratamiento con solventes no modificó la respuesta a la estimulación eléctrica supramáxima. (tabla 1).

TABLA 4.1 Efectos de la exposición de solventes en una proporción 1:1 durante 10 min sobre la respuesta a la estimulación eléctrica supramáxima

CONTROL	3.3 ± 0.2	2.9 ± 0.1	3.3 ± 0.2	3.1 ± 0.2
C/SOLVENTE	3.5 ± 0.2	2.9 ± 0.1	3.0 ± 0.2	2.8 ± 0.1
	TOLUENO	XILENO	BENCENO	CCl ₄

No se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos control (ANADEVA), ni entre las respuestas obtenidas en los segmentos expuestos a solventes con respecto a sus grupos control (t de Student). Para todos los grupos n=20.

C. Sobre la respuesta a nicotina

En los segmentos de los grupos control, la dosis de nicotina empleada (5.6µM) produjo un efecto bifásico con una fase contráctil predominante y una fase relajante menor (trazo superior de la fig. 4.3). En esta respuesta, los segmentos de los grupos de prueba presentaron un efecto inhibitorio de las dos fases, siendo mucho más importante la inhibición de la fase de relajación. La figura 4.4. muestra los resultados. Como puede observarse, la disminución de la fase contráctil sólo fué significativamente diferente para el tolueno y el xileno (19.2 ± 5.1 y 32.4 ± 5.4% respectivamente), mientras que hubo una disminución significativa de la fase de relajación para el tolueno, el xileno y el CCl₄ (52.1 ± 8, 70.6 ± 4.3 y 23.6 ± 5.6% respectivamente).

REGISTROS MUESTRA

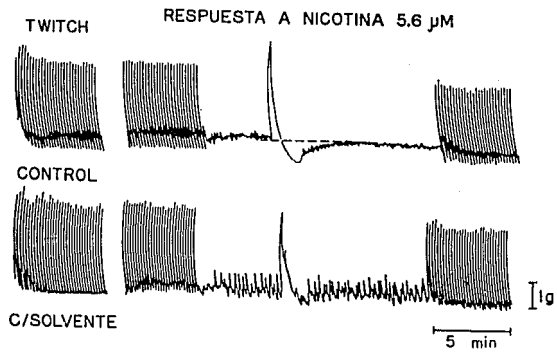


Figura 4.3 Ejemplos de registros de polígrafo donde se observa la respuesta a la estimulación eléctrica supramáxima (twitch) y la respuesta a la nicotina 5.6 μM en un segmento control (trazo superior) y en uno expuesto durante 10 min a una proporción xileno:aceite 1:1 (trazo inferior).

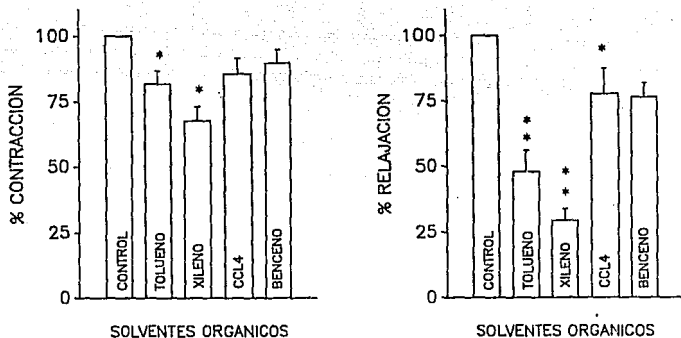


Figura 4.4 Efecto de la exposición durante 10 min a diferentes solventes administrados en una proporción 1:1 solvente:aceite sobre la respuesta a nicotina $5.6 \mu\text{M}$. La gráfica de la derecha representa el efecto sobre la fase contráctil de la respuesta nicotínica y la de la izquierda el efecto sobre la fase de relajación. En ambas gráficas, la respuesta control se consideró como el 100%. Cada barra representa el promedio \pm el error estándar. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, t de Student. Para todos los grupos $n=20$.

4.1.2 Efectos de diferentes proporciones de xileno para un tiempo de exposición fijo

A partir de los resultados obtenidos con los cuatro solventes, se observó que el xileno fué el que presentó los efectos más severos en las respuestas analizadas, por lo que se estudiaron los efectos de diferentes proporciones de xileno:aceite para un tiempo de exposición fijo de 10 min. Se obtuvieron los siguientes resultados:

A. Sobre la actividad espontánea

La exposición a xileno produjo un aumento en la actividad espontánea manifestado como contracciones mayores de 1g en ausencia de estimulación eléctrica. El efecto sobre la actividad espontánea aumentó en función de la proporción de xileno, de tal manera que con la proporción más alta utilizada, el 90% de los segmentos presentó contracciones mayores de 1g. Los resultados se observan en la figura 4.5.

B. Sobre la respuesta a la estimulación eléctrica supramáxima

Con las diferentes proporciones analizadas, los segmentos de prueba no presentaron diferencias significativas con respecto a los controles (tabla 4.2).

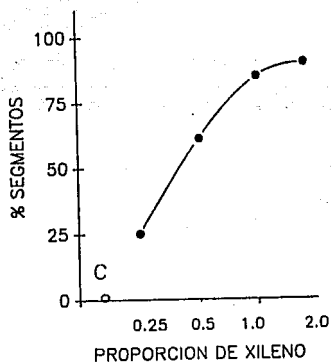


Figura 4.5 Efecto de la exposición durante 10 min a proporciones crecientes de xileno sobre la actividad espontánea. En el eje de las ordenadas se grafica el porcentaje de segmentos que presentaron contracciones mayores de 1 g en ausencia de estimulación eléctrica. El círculo vacío corresponde al grupo control. Los círculos llenos corresponden a los grupos tratados con las siguientes proporciones solvente:aceite 0.25:1.75, 0.5:1.5, 1:1, 1.75:0.25. Para todos los grupos n=20.

TABLA 4.2 Efectos de la exposición durante 10 min de diferentes proporciones de xileno sobre la respuesta a la estimulación eléctrica supramáxima.

CONTROL	2.8 ± 0.2	3.3 ± 0.2	2.9 ± 0.1	3.1 ± 0.2
C/XILENO	3.0 ± 0.1	3.5 ± 0.2	2.9 ± 0.1	3.0 ± 0.1
(Proporción)	0.25:1.75	0.50:1.50	1.00:1.00	1.75:0.25

No se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos control (ANADEVA), ni entre las respuestas obtenidas en los segmentos expuestos a solventes con respecto a sus grupos control (t de Student). Para todos los grupos n=20.

C. Sobre la respuesta a nicotina

Los efectos de diferentes proporciones de xileno sobre la respuesta a nicotina se muestran en la figura 4.6. La gráfica de la derecha muestra los efectos sobre la fase contráctil de esta respuesta, mientras que la de la izquierda muestra los efectos sobre la fase de relajación. Como puede observarse, la respuesta a nicotina disminuyó en función de la proporción de xileno utilizada. La proporción más baja (0.25:1.75) no tuvo efecto ni sobre la fase contráctil ni sobre la fase de relajación. Las proporciones mayores inhibieron tanto la contracción como la relajación siendo mucho más importante este último efecto.

4.1.3 Efectos de diferentes tiempos de exposición para una proporción fija de xileno

Para este apartado se estudiaron los efectos de diferentes tiempos de exposición de una proporción fija xileno:aceite 0.50:1.50. Se obtuvieron los siguientes resultados:

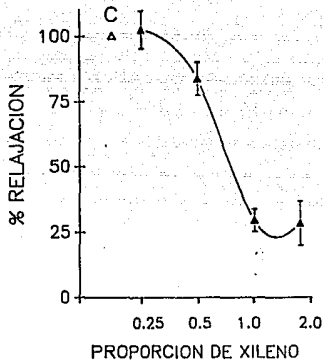
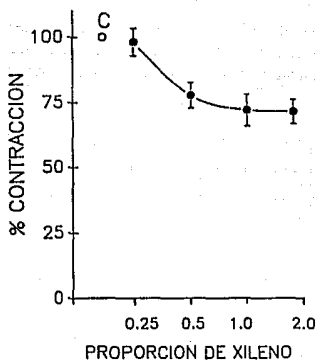


Figura 4.6 Efecto de la exposición durante 10 min a proporciones crecientes de xileno sobre la respuesta a nicotina $5.6 \mu\text{M}$. La gráfica de la derecha representa el efecto sobre la fase de contracción de la respuesta nicotínica y la de la izquierda sobre la fase de relajación. En ambas gráficas, la respuesta control (C) se consideró como el 100%. Los puntos y los triángulos representan el valor promedio \pm el error estándar de 20 determinaciones.

A. Sobre la actividad espontánea

La exposición al xileno también produjo un aumento en la actividad espontánea manifestado por contracciones mayores de 1 g en ausencia de estimulación eléctrica. La figura 4.7. muestra la relación tiempo de exposición-efecto. Como puede observarse, el efecto sobre la actividad espontánea aumentó en función del tiempo de exposición.

B. Sobre la respuesta a la estimulación eléctrica supramáxima

Con los diferentes tiempos de exposición analizados, los segmentos de prueba no presentaron diferencias significativas en esta respuesta con respecto a los segmentos control (tabla 4.3).

TABLA 4.3 Efectos de diferentes tiempos de exposición para una proporción fija de xileno 0.50:1.50 sobre la respuesta a la estimulación eléctrica supramáxima

CONTROL	3.2 ± 0.3	3.3 ± 0.2	3.2 ± 0.1
SOLVENTE	3.2 ± 0.2	3.5 ± 0.2	3.1 ± 0.2
(Tiempo)	5 min	10 min	20 min

No se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos control (ANADEVA), ni entre las respuestas obtenidas en los segmentos expuestos a solventes con respecto a sus grupos control (t de Student). Para todos los grupos n=20.

C. Sobre la respuesta a nicotina

Los efectos de diferentes tiempos de exposición al xileno sobre la respuesta producida por nicotina 5.6 µM se muestran en la figura 4.8. La gráfica a la derecha muestra los efectos sobre la

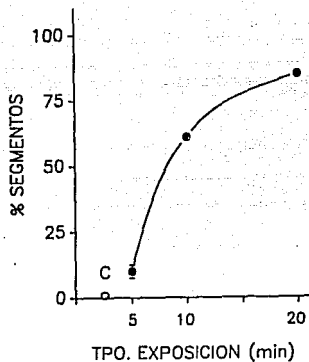


Figura 4.7 Efecto de diferentes tiempos de exposición a una proporción 1:1 de xileno:aceite sobre la actividad espontánea. En el eje de las ordenadas se grafica el porcentaje de segmentos que presentaron contracciones mayores de 1 g en ausencia de estimulación eléctrica. El círculo vacío corresponde al grupo control. Los círculos llenos corresponden a los grupos tratados con xileno durante 5, 10 y 20 min. Para todos los grupos n=20.

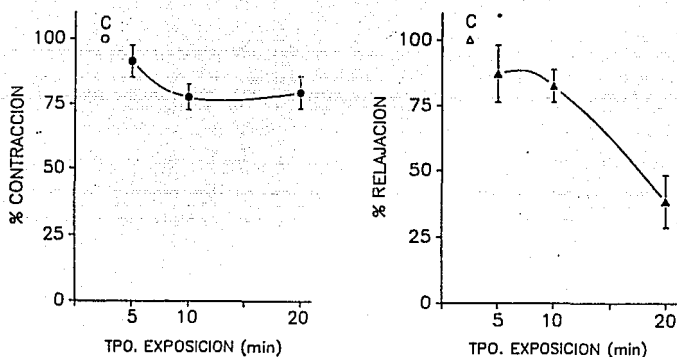


Figura 4.8 Efecto de diferentes tiempos de exposición a una proporción 1:1 de xileno:aceite sobre la respuesta a nicotina $5.6 \mu\text{M}$. La gráfica de la derecha representa el efecto sobre la fase de contracción de la respuesta nicotínica y la de la izquierda sobre la fase de relajación. En ambas gráficas, la respuesta control (C) se consideró como el 100%. Los puntos y los triángulos representan el valor promedio \pm el error estándar de 20 determinaciones.

fase contráctil de esta respuesta, mientras que la de la izquierda muestra los efectos sobre la fase de relajación. Como puede observarse, la respuesta a la nicotina disminuyó en función del tiempo de exposición empleado. El tiempo más corto (5 min) no tuvo efecto ni sobre la fase contráctil ni sobre la fase de relajación. Con los tiempos de exposición más largos se observó una inhibición de las dos fases de la respuesta a nicotina siendo más importante la observada sobre la fase de relajación.

4.2 RESULTADOS HISTOLOGICOS

Con base en los resultados obtenidos con los estudios farmacológicos, se determinó que el xileno fué el solvente que produjo mayores trastornos fisiológicos en el IAC. Para determinar si estos cambios se acompañaban de alteraciones estructurales, se hicieron comparaciones de cortes histológicos de ileos expuestos a xileno con cortes de ileos normales. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

A) A nivel de la mucosa:

La figura 4.9. muestra un corte histológico de un segmento de ileo control (A) y de uno expuesto a una proporción alta de xileno:aceite (B). Como puede observarse, la exposición a xileno, aún en las proporciones más altas, no produjo ninguna alteración observable a nivel de microscopía óptica en la morfología general de las vellosidades, de las glándulas intestinales o de las células caliciformes. Sin embargo, en los enterocitos, que fueron las células que estuvieron en contacto directo con el solvente, sí se encontraron alteraciones. La parte inferior de la figura 4.9 muestra un corte histológico a gran aumento del epitelio de las vellosidades en un segmento control (C) y en uno tratado con xileno (D). En éste último se observan las siguientes alteraciones:

- Pérdida de los contornos celulares de los enterocitos,
- Alteración en la morfología nuclear, y
- Cambio en la afinidad a los colorantes (el citoplasma se vuelve más acidófilo).



A



B



C



D

Fig. 4.9 Fotomicrografías de cortes de íleo de cabayo donde se observan las diferentes capas de la mucosa en un segmento control (A) y en uno expuesto durante 10 min. a una proporción xileno:aceite 1:75 0 25 (B). Tinción Itracrómica Masson 100x. Las fotomicrografías inferiores muestran el epitelio de las velocidades del íleo control (C) y del expuesto a xileno (D). Hematoxilina-Eosina 1000x.

Las alteraciones sobre las células absorbentes o enterocitos, se observaron en todos los segmentos expuestos al xileno. La figura 4.10 muestra cortes histológicos de un segmento control (A), de uno expuesto durante 10 min a una proporción baja de xileno (B), de uno expuesto el mismo tiempo a una proporción alta del solvente (C), y de otro expuesto a una proporción baja de xileno durante 20 min (D). Como puede observarse, aunque las alteraciones aparecieron desde las proporciones más bajas, fueron más evidentes con las proporciones altas y con los tiempos de exposición más prolongados.

Las otras capas que forman parte de la mucosa, la lámina propia y la muscular de la mucosa, no presentaron cambios en su morfología.

B) A nivel de la submucosa, la muscular externa y la serosa:

Por ser estas las capas más externas, no fueron afectadas por el solvente, al menos a nivel de las estructuras observadas con microscopía óptica. Cabe hacer notar que el plexo mientérico, que se encuentra entre las capas musculares más externas de la pared intestinal, no presentó cambios en su morfología. En la figura 4.11 se puede observar la aparente integridad de las neuronas presentes en el íleo de cobayo, tanto en los segmentos control (A) como en los segmentos de prueba (B).

Es importante mencionar que los íleos expuesto a las proporciones más altas de xileno, y a los tiempos más largos de exposición, se vuelven más lábiles y cambian sus características tintoriales.

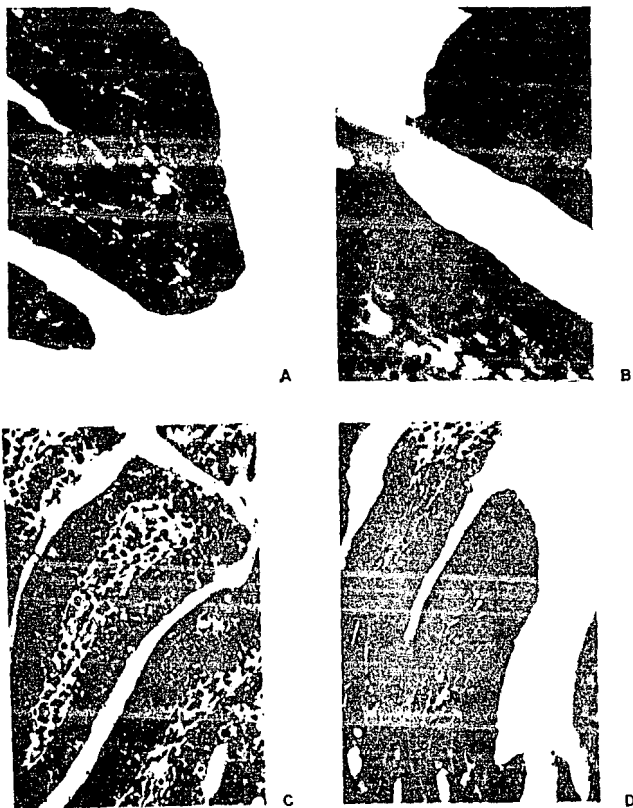
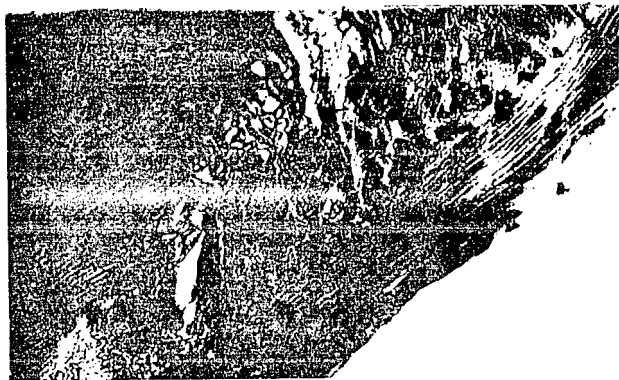
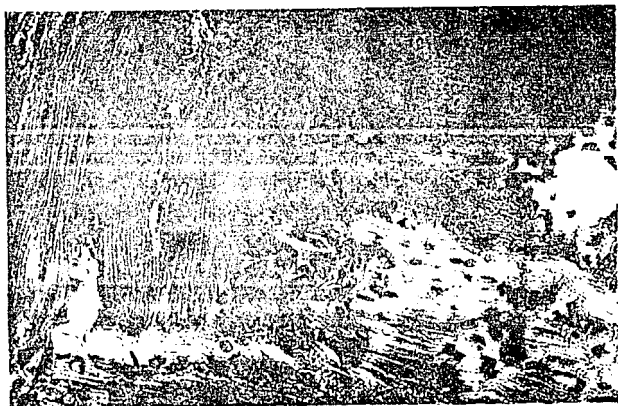


Fig. 4.10 Fotomicrografías de cortes longitudinales de ñeo de caballo donde se observa la morfología de las células absorbentes de un segmento control (A) y de segmentos expuestos durante 10 min. a diferentes proporciones de xileno:acetilo (0,25:1,75, B, 1,75:0,25, C) y a una proporción 0,25:1,75 durante 20 min (D). Hematoxilina-Eosina 250x



A



B

Fig. 4.11 Fotomicrografías de cortes de íleo de cobayo donde se observa el plexo mientérico o de Auerbach de un segmento con control (A) y de un segmento expuesto durante 10 min. a una proporción xileno:aceite 1.75:0.25 (B). Hematoxilina-Eosina $\times 250$

5. DISCUSION

Los modelos animales han servido para estudiar los efectos de diversas sustancias, entre las que se encuentran los solventes orgánicos. Con estos modelos se han logrado determinar varios de sus efectos sobre diferentes aparatos y sistemas. En la mayoría de los protocolos, los animales se exponen a concentraciones conocidas del solvente en cámaras de inhalación. En algunos casos, se monitorea continuamente la concentración del solvente en estas cámaras (Huang et al., 1989; Dyer et al., 1984) lo que permite un mejor control de las condiciones de experimentación. Sin embargo, salvo por algunas excepciones (Contreras et al., 1979), estos estudios no proporcionan la dosis inhalada o ingerida por el animal expuesto. En la mayoría de los protocolos reportados en la literatura no se tiene un buen control de la dosis y del tiempo de exposición por lo cual ha sido difícil determinar las relaciones dosis-respuesta y tiempo de exposición-respuesta.

En el presente trabajo se utilizó el IAC para estudiar los efectos de la exposición a solventes sobre diferentes respuestas. Esta preparación ha sido utilizada con éxito para el estudio de los efectos de una gran variedad de fármacos. En la actualidad se tiene bien caracterizada su fisiología, la existencia de receptores a diferentes sustancias, su estabilidad y muchos otros aspectos relativos a su utilidad como herramienta de estudio en diversos campos de la farmacología. Para los propósitos del presente trabajo, esta preparación presenta ventajas especiales. Como todo órgano aislado, permite el control de algunas variables ambientales

tales como la temperatura, el pH y la oxigenación. Además, para el caso particular de los solventes, la vía de exposición intraluminal permite tener un control de la dosis y del tiempo de exposición. Esta vía se escogió en lugar de la administración directa en las cámaras de órgano aislado porque los solventes no son solubles en el Krebs. Para disminuir la volatilidad y controlar la cantidad de solvente, se utilizó aceite de maíz como vehículo lo cual permitió establecer una relación entre la proporción utilizada de solvente y diferentes respuestas. A pesar de sus ventajas, la vía de administración propuesta aún no permite conocer la concentración absorbida por el IAC pero es una aproximación importante. En este sentido, se requieren análisis cuantitativos posteriores a la exposición para detectar la concentración de solvente en los segmentos de IAC.

Para evaluar los efectos de la exposición a solventes en la preparación experimental propuesta se analizaron 3 índices de funcionalidad: a) la actividad espontánea del músculo liso; b) la respuesta a la estimulación eléctrica supramáxima; y c) la respuesta a nicotina. La actividad espontánea se escogió por ser un proceso intrínseco del músculo liso. Las otras dos se escogieron por ser respuestas neurogénicas, las cuales permiten determinar los efectos a nivel de SN.

A partir de los resultados obtenidos en el presente estudio se pueden inferir algunos aspectos relacionados con los mecanismos de acción de los solventes analizados. Uno de los resultados más

claros es el aumento observado en la actividad espontánea. Esta actividad, es un proceso miogénico influenciado por la actividad neuronal. Resulta sorprendente que sustancias clasificadas como depresores del SN (Rees et al., 1987) tengan un efecto claramente excitatorio sobre células eléctricamente excitables. La determinación precisa de los mecanismos de acción sobrepasa los propósitos del presente trabajo, sin embargo, nuestros resultados sugieren que los solventes afectan probablemente los canales de Ca^{++} permitiendo una mayor entrada de este ión, puesto que la entrada del calcio extracelular desencadena el proceso de contracción en el músculo liso (Wood, 1983.) Estos datos son consistentes con la noción de que los solventes afectan los componentes lipídicos de las membranas plasmáticas.

La exposición a los solventes no afectó la respuesta a la estimulación eléctrica supramáxima o "twitch". Con base en los efectos observados sobre la actividad espontánea podría esperarse también un efecto excitatorio sobre esta respuesta ya que la estimulación eléctrica produce potenciales de acción en las neuronas del plexo mientérico, un aumento en la entrada de los iones de Ca^{++} extracelular a la terminal sináptica y la liberación de acetilcolina que se combina con receptores específicos musculares lo que finalmente desencadena la contracción del músculo liso. Probablemente el uso de una estimulación que es de por sí supramáxima no permita detectar ningún cambio en sentido excitatorio.

Contrariamente a lo observado en la actividad espontánea, los solventes estudiados produjeron una inhibición de la respuesta a la nicotina. Se tiene bien caracterizado que los solventes no actúan a nivel de receptores específicos sino que alteran las propiedades de los lípidos membranales (Savolainen, 1977; Lenaz et al. 1978; Roelofsen, 1981). Es posible suponer que la interacción de las moléculas de solvente con las membranas de las neuronas posganglionares parasimpáticas produce un cambio conformacional indirecto sobre los receptores nicotínicos. Convendría analizar otras respuestas farmacológicas mediadas por receptores para comprobar esta hipótesis.

El análisis farmacológico reveló una serie de características comunes a todos los solventes analizados. Todos ellos produjeron un aumento en la actividad espontánea, no tuvieron efecto sobre la respuesta a la estimulación eléctrica supramáxima y tuvieron un efecto inhibitorio sobre la respuesta a la nicotina. Sin embargo, es importante mencionar que cada solvente en particular presentó estas respuestas con intensidades variables lo que los hizo claramente distinguibles entre sí. Los datos del presente estudio ponen de manifiesto la utilidad del IAC para estudiar los efectos de los solventes orgánicos.

Con el propósito de analizar los posible cambios en la estructura de la preparación, se realizó un análisis histológico de

los segmentos expuestos a diferentes concentraciones del xileno que fue el solvente que tuvo mayor efecto sobre las respuestas analizadas. Para todas las condiciones estudiadas, la estructura de la pared del íleo no presentó cambios en su estructura general. Sin embargo, el xileno a las mayores proporciones y a los mayores tiempos de exposición sí afectó la capa más interna, la mucosa, que es la que estuvo en contacto directo con el solvente. Este efecto se manifestó por la pérdida de contornos celulares. El efecto sobre las membranas sólo se pudo evaluar de una manera indirecta observando los cambios en la morfología y disposición de las células absorbentes ya que a nivel de microscopía óptica no es posible observar con detalle esta estructura celular. Conviene mencionar que los cambios se observaron con las tres tinciones utilizadas. Otro hallazgo que vale la pena comentar aunque es muy difícil de evaluar cuantitativamente es que los segmentos expuestos al xileno presentaron una disminución en la afinidad a los colorantes, lo cual podría interpretarse como una probable lisis del retículo endoplásmico rugoso. Esta interpretación se basa en el hecho de que el retículo es un componente altamente basófilo.

En cuanto a las relaciones proporción:respuesta y tiempo de exposición respuesta cabe mencionar que la probabilidad de que las moléculas de solvente estuvieran en contacto con las membranas celulares de los segmentos de prueba fue menor para la proporción más baja y para el tiempo de exposición más corto por lo cual los efectos tanto farmacológicos como histológicos fueron menores o incluso similares a los de los segmentos control.

6. CONCLUSIONES

El análisis de las respuestas consideradas como índice de funcionalidad en el IAC (la actividad espontánea, el twitch y la respuesta a la nicotina) permitieron alcanzar el objetivo general de este proyecto, que fue evaluar al IAC como modelo para estudiar los solventes orgánicos. Con el presente estudio se logró determinar la sensibilidad diferencial de la preparación hacia los diferentes solventes analizados (tolueno, xileno, benceno y CCl₄) y las relaciones proporción-respuesta y tiempo de exposición-respuesta. Para poder explicar con mayor profundidad los efectos en las respuestas seleccionadas convendría continuar con los estudios en esta preparación variando algunas condiciones. Por ejemplo, para el caso de la respuesta a la estimulación eléctrica, convendría utilizar una estimulación que no fuera supramáxima para determinar si es que existe un efecto excitatorio. De igual manera, como ya se mencionó anteriormente, el presente trabajo se enriquecería con el análisis de otras respuestas mediadas por receptores específicos para determinar si los solventes tienen acción indirecta sobre estas respuestas. De los resultados presentados en este trabajo se concluye que el IAC es una preparación experimental útil para el estudio de los efectos y los mecanismos de acción de diferentes solventes orgánicos.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Alberts, B., Lewis, R. y Roberts, W.: *Molecular Biology of the Cell*. Edit. Garland. N.Y., pp 255-317, 1983.
2. Alcaraz, M., García-Castells, E. y Guzmán, C.: Efectos conductuales y electrográficos provocados por la inhalación aguda y crónica de tiner en el gato, En: *Inhalación voluntariade disolventes industriales*, editado por Contreras, C.M., Edit. Trillas, México, D.F., pp 88-103, 1973.
3. Allen, N.: Solvents and other industrial organic compounds, En: *Handbook of clinical neurology*, editado por Vinken, P.J. y Brung, G.W. EDS., vol 36, Elsevier, N. Y., pp 361-389, 1979.
4. Armianov, G. y Khalkova, Zh.: Experimental studies on changes in cerebral bioelectrical activity during combined exposure to benzene and tobacco smoke. *Probl-Khig*, 13:114-8, 1988.
5. Baelum, J., Lunkqvist, Q.R., Molhave L. y Andersen, N.T.: Human response to varying concentrations of toluene. *Int. Arch. Occup. Environ Health.*, 62 (1):65-71, 1990.
6. Berne y Levi: *Fisiología*. Edit. Médica Panamericana, Buenos Aires, pp 751-776, 1986.
7. Biscaldi, G.P., Mingard, M., Moglia, G. y Bossi, M.C.; Acute toluene poisoning electrophysiological and vestibular investigations. *Toxicol. Eur. Res.*, 3:271-273, 1981.
8. Cai, Z.W. y Mehendale, H.M.: Lethal effects of CCL₄ and its metabolism by mongolian gerbils pretreated with chlordecone, phenobarbital, or mirex. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 104 (3):11-20, 1990.
9. Chadwick, R.W., Copeland, M.F., Carlson, G.P., Trela, B.A. y Most, B.M.; Comparison of in vivo and in vitro methods for assessing the effects of repeated dosing with carbon tetrachloride on the hepatic drug-metabolizing enzyme system. *Toxicol-Lett.*, 44 (1-2):201-13, 1988.
10. Contreras, C.H., Gonzáles, E.T., Zarabozo, D. y Fernández-Guardiola, A.: Petit mal and grand mal seizures produced by toluene or benzene intoxication in the cat. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 46:290-301, 1979.
11. Cruz, S.L., Salazar, L.A. y Villarreal, J.E.: A Methodological basis for improving the reliability of measurements of opiate abstinence responses in the guinea-pig ileum made dependent in vitro. *J. Pharmacol. Methods*, 25:329-342, 1991.
12. Cunninhan, S.R., Dazell, G.W., McGirr, P. y Khan, M.M.:

Myocardial infraction and primary ventricular fibrillation after glue sniffing; Br. J. Ind. Med., 294:739-740, 1987.

13. Dyer, R.S., Muller, K.E., Janssen, R., Barton, C.N., Boyes, W.K. y Benignus, V.A.: Neurophysiological effects of 30 day chronic exposure to toluene in rats. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 6:363-368, 1984.
14. Edelfors, S. y Ravn-Jonsen, A.: The effect of toluene exposure for up to 18 months (78 weeks) on the (Ca²⁺/Mg²⁺) ATPase and fluidity of synaptosomal membranes isolated from rat brain. Pharmacol. Toxicol., 65:140-142, 1989.
15. Foo, S.C., Jeyaratnam, J. y Koh, D.: Chronic neurobehavioural effects of toluene. Br. J. Ind. Med., 47 (7):480-4, 1990.
16. Ganong, F.W.: Fisiología Médica. 11a. edición, Edit. El Manual Moderno, México, D.F., pp 63-65, 1988.
17. García Liñan, C.: Que son las drogas inhalables. Edit. Arbol S.A. de C.V.; México, 1990.
18. Gaviño, G., Juárez, J.C. y Figueroa, H.H.: Técnicas Biológicas Selectas de Laboratorio y de Campo, Edit. Limusa, México, D.F., 1984.
19. Ghosh, T.K., Copeland, R.L. Jr. y Pradjan, S.N.: Sensitivity of EEF in young rats to toluene exposure. Pharmacol. Biochem. Behav., 36 (4):779-85, 1990.
20. Glasser, R.A., Arnold, J.E. y Shulman, S.A.: Comparison of three sampling and analytical methods for measuring m-xilene on expired air of exposed human. Am. Ind. Hyg. Assoc. J., 51 (3):139-50, 1990.
21. Goetz, C.G.: Organic solvents, En: Neurotoxins in clinical practice editado por Goetz, C.G., Spectrum N. Y., pp 65-90, 1985.
22. Gupta, B.N., Kumar, P. y Srivastava, A.K.: An investigation of the neurobehavioral effects on workers exposed to organic solvents. J. Soc. Occup. Med., 40 (3):94-6, 1990.
23. Guzman, F.C.; Neurobiología del tiner: Alteraciones conductuales producidas a largo plazo. Cuad. Cient. CEMEF, México, 2:49-58, 1975.
24. Ham.: Histología, 7a. edición, Edit. Panamericana, México, 1975.
25. Howd, R.A., Rebert, C.S., Dickinson, J. y Pryor, G.T.: A

- comparison of the rates of development of functional hexane neuropathy in weanling and young adult rats; *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 5:63-68, 1983.
26. Hsieh, G.G., Parker, R.D., Sharma, R.P. y Hughes, B.J.: Subclinical effects of groundwater contaminants. III. Effects of repeated oral exposure to combinations of benzene and toluene on immunologic responses in mice. *Arch. Toxicol.*, 64 (4):320-8, 1990.
 27. Huang, J., Kato, K., Shibata, E., Hisanaga, N., Ono, Y. y Takeuchi, Y.; Effects of subacute toluene exposure on neuronal and glial marker proteins in rat brain. *Toxicology*, 61 (2):109-17, 1990.
 28. Jakobsen, B.L., Gyntelberg, F., Mikkelsen, S., Ryder, L.P. y Svejgaard, A. No HLA association in organic brain dysfunction due to solvents. *Acta. Neurol. Scan.* 79:515-516, 1989.
 29. Luna, L.G.: Manual of histologic staining methods of the armed forces Institute of Pathology. 3a. Edición, Mc Graw Hill, U.S.A., 1968.
 30. Keller, K.A. y Snyder, C.A.: Mice exposed in utero to 20 ppm benzene exhibit altered numbers of recognizable hematopoietic cells up to seven weeks after exposure. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 10 (2):224-32, 1988.
 31. Kiriu, T., Ameno, K., Fuke, C., Ameno, S. y Ijiri, I.; The distribution of toluene in the brain and its effects on the brain catecholamines in acute toluene poisoning. *Nippon. Hoigaku. Zasshi.*, 44 (1):25-33, 1990.
 32. Kohriyama, K., Hor, H., Murai, Y., Ninomiga, H. y Tsukamoto, Y.: Optic neuropathy induce by thinner sniffing. *Sangyo. Ika. Daigak. Zasshi.*, 11 (4):449-53, 1989.
 33. Lenaz, G., Curatola, G., Mazzanti, L. y Parent, G.: Biophysical studies on agents affecting the state of membrane lipids: Biochemical and pharmacological implications. *Molecular & Cellular Biochemistry*, 22 (1):3-33, 1978.
 34. Margot, R. y McLeon, A.A.: Chronic non-neurological toxicity from volatile substance abuse. *Human. Toxicol.*, 8:301-306, 1989.
 35. Mattsson, J.L., Gorzinski, S.J., Albee, R.R. y Simmer, M.A.: Evoked potential changes from 13 weeks of simulated toluene abuse in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 36 (3):683-9, 1990.
 36. Meulenbelt, J., Groot, G. y Savelkoul, T.J.: Two cases of

- acute toluene intoxication. *Br. J. Ind. Med.*, 47 (6):417-20, 1990.
37. McCormick, M.J., Mogabgab, E. y Adams, S.L.: Methanol poisoning as a result of inhalational solvents abuse. *Ann. Emerg. Med.*, 19 (6):639-42, 1990.
 38. McDougal, J.N., Jepson, G.W., Clewell, H.J., Gargas, M.L. y Andersen, M.E.: Dermal absorption of organic chemical vapors in rats and human. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 14 (2):299-308, 1990.
 39. McMichael, A.J.: Carcinogenicity of benzene, toluene and xylene; Epidemiological and experimental evidence. *IARC. Sci. Publ.*, 85:3-18, 1988.
 40. Ortíz, A., Sosa, R. y Rodríguez, E.: Características de la farmacodependencia en la ciudad de México. *Información clínica*, (8) 45-46, 1991.
 41. Pryor, G.T., Bingham, L.R. y Howd, R.A.: Behavioral toxicology in rats of a mixture of solvents containing substances subject to inhalation abuse by humans. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 45:252, 1978.
 42. Pryor, G.T., Dickinson, J., Feeney, E., y Rebert, C.S.: Transient cognitive deficits and high-frequency hearing loss in rats exposed to toluene. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 5:53-57, 1983.
 43. Pryor, G.T., Rebert, C.S., Dickinson, J. y Feeney, E.M.: Factors affecting toluene-induced ototoxicity in rats. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 6:223-228, 1984.
 44. Raunio, H., Liira, J., Elovaara., Riihimaki, V. y Pelkonen, O.: Cytochrome P450 isozyme induction by methyl ethyl ketone and m-xilene in rat liver. *Toxicol. Pppl. Pharmacol.*, 103 (1):175- 9, 1990.
 45. Rees, D.C., Knisely, J.S., Breen, T.J. y Balster, R. L.: Toluene, Halothane, 1,1,1-trichloroethane and oxazepam produce ethanol-like discriminative stimulus effects in mice. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 243:931-937, 1987.
 46. Rithidech, K., Au, WW., Ramanujam, V., Whorton, E. Jr. y Legator, M.: Persistence of micronuclei in peripheral blood normochromatic erythrocytes of subchronically benzene-treated male mice. *Environ. Mol. Mutagen.*, 12 (3):319-29, 1988.
 47. Roelofsen, B.: The (non) especificity in the lipid-requeriment of the calcium - and (sodium plus potassium)-transporting adenosine triphosphatases. *Life Sciencies* 29:2235-2247, 1981.

48. Rosenberg, N.L., Kleinschmidt-DeMasters, B.K., Davis, K.A., Deribach, J.N., Hormes, J.T. y Filley, C.M.: Toluene abuse causes diffuse central nervous system white matter changes. *Ann. Neurol.*, 23:611-614, 1988.
49. Savolainen, H.: Some aspects of the mechanism by which industrial solvents produce neurotoxic effects. *Chem. Biol. Interactions*, 18:1-10, 1977.
50. Schuster, C.R. y Thompson, T.I.: Self administration of and behavioral dependence on drugs. *Ann. Rev. Pharmacol.*, 9:483-502, 1969.
51. Stolerman, I.P. y Shine, P.J.: Trends in drug discrimination research analysed with a cross-indexed bibliography. *Psychopharmacology*, 86:1-11, 1985.
52. Streicher, H.Z., Gabow, P.A., Mos, A.H., Kono, D. y Kaehny, W.D.: Syndroms of toluene sniffing in adults. *Ann. Int. Med.* 94:758-762, 1981.
53. Taylor, P.: Receptores Agonistas, En: *Las bases farmacológicas de la terapéutica*, editado por Goodman y Gilman, Séptima edición, Edit. Médica Panamericana, pp 112-121, 1986.
54. Toskulkaeo, C., Nhongsang, J. y Glinsukon, T.: Potentiation of carbon tetrachloride induced hepatotoxicity by thinner inhalation. *J. Toxicol. Sci.*, 15 (2):75-86, 1990.
55. Wiedman, K.D., Powe, K.G., Wilson, J.L. y Hadley, D.M.: Recovery form chronic solvent abuse. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 50:1712-1713, 1987.
56. Wisniewska, J.M., Wronska, T., Jajte, J. y Jedlinska, U.: The effect of combined exposures to ethanol and xylene on rat hepatic microsomal monooxygenase activities. *Alcohol*, 6 (5): 347-52, 1989.
57. Wood, J.D.: Physiology of the enteric nervous system, En: *Physiology of the gastrointestinal tract*, editado por Johnson, L.R., vol 1, Raven Press, N.Y., pp 411-443, 1983.
58. Yanagita, T.S., Takahashi, K., Ishida, K. y Funamota, H.: Voluntary inhalation of volatile anesthetics and organic solvents by monkeys. *Jap. J. Clin. Pharmacol.*, 1:13-16, 1970.
59. Zur, J. y Yule, W.: Chronic solvent abuse 1. Cognitive secuelae. *Child. Care Health Dev.*, 16 (1):1-20, 1990.