

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS
DIVISIÓN DE CIENCIAS VETERINARIAS
POSTGRADO INTERINSTITUCIONAL EN CIENCIAS PECUARIAS**



**“EFECTOS BENÉFICOS DEL ACEITE DE OLIVA EN LA CORTEZA
CEREBRAL DE RATAS SOMETIDAS A INTOXICACIÓN
SUBCRÓNICA CON TOLUENO, ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO
DE LA POBLACIÓN MICROGLIAL”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
BIOL. CARMEN CECILIA GÓMEZ RODILES**

**DIRECTOR: DR. JOAQUÍN GARCÍA ESTRADA
ASESORES: DR. JACINTO BAÑUELOS PINEDA
DRA. MA. SONIA LUQUÍN DE ANDA**

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., Julio de 2004



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISION DE CIENCIAS VETERINARIAS

COORDINACIÓN DE POSGRADO



COORDINACIÓN DE POSGRADO DE LA
DIVISION DE CIENCIAS VETERINARIAS
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
PRESENTE.

Por este conducto nos permitimos enviar la VERSION FINAL DE LA TESIS que desarrolló la pasante de Maestría en el Posgrado en Ciencias Pecuarias, de la Universidad de Guadalajara, **Biol. Carmen Cecilia Gómez Rodiles**, cuyo título es:

"EFECTOS BENEFICOS DEL ACEITE DE OLIVA EN LA CORTEZA CEREBRAL DE RATAS SOMETIDAS A INTOXICACION SUBCRONICA CON TOLUENO, ANALISIS INMUNOHISTOQUIMICO DE LA POBLACION MICROGLIAL"

Trabajo dirigido por: **Dr. Joaquín García Estrada**.

Los que suscriben la presente avalan esta versión, la cual fue revisada y reúne los requisitos teóricos y metodológicos necesarios.

ATENTAMENTE

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal. a 01 Marzo del 2004

REVISOR

DRA. MA. SONIA LUQUIN DE ANDA

REVISOR

DR. CARLOS BEAS ZARATE

REVISOR

DR. JOAQUÍN GARCÍA ESTRADA

REVISOR

DRA. ESTHER ALBARRÁN RODRIGUEZ

REVISOR

DR. JACINTO BAÑUELOS PINEDA

c.c.p. Archivo

CONTENIDO

	Página
Índice de abreviaturas.	i
Listado de cuadros.	iv
Listado de figuras.	v
Resumen.	Vi
Diseño experimental.	Vii

I. ANTECEDENTES.	1
1. Efectos generales de los inhalantes.	3
2. Tolueno.	4
2.1 Generalidades.	4
2.2 Toxicocinética del tolueno.	5
2.3 Metabolismo del tolueno.	6
2.4 Efectos de la exposición subcrónica al tolueno.	8
2.5 Tolueno y desarrollo de dependencia.	8
2.6 Efectos depresivos del tolueno.	9
2.7 Tolueno y desarrollo de estrés oxidativo.	10
2.8 Efecto del tolueno sobre membranas neuronales.	12
3. Aceite de oliva.	14

3.1	Composición química del aceite de oliva extra virgen.	14
3.2	Importancia de la utilización del aceite de oliva.	18
3.3	Funciones de los ácidos grasos esenciales.	18
4.	Microglia.	20
4.1	Origen de las células microgliales.	22
4.2	Activación microglial tras daño.	23
4.3	Disparadores moleculares de la activación microglial.	24
4.4	Proliferación microglial.	25
4.5	Actividad citotóxica de la microglia.	26
4.6	Acción neurotrófica de la microglia activada.	27
5.	Corteza cerebral.	28
5.1	Importancia del estudio de la corteza prefrontal.	28
II.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	30
III.	JUSTIFICACIÓN.	31
IV.	HIPÓTESIS.	32
V.	OBJETIVO GENERAL.	33
VI.	OBJETIVOS PARTICULARES.	33
VII.	MATERIAL Y MÉTODOS.	34
7.1	Procedimiento General.	34

7.2	Cuantificación de triglicéridos en suero.	36
7.3	Evaluación de daño neurotóxico.	37
7.3.1	Prueba de equilibrio en cilindro giratorio.	37
7.4	Efectos emocionales posintoxicación.	38
7.4.1	Prueba exploratoria en campo abierto (<i>Open field test</i>). . .	38
7.5	Registro de peso corporal.	39
7.6	Registro del peso cerebral.	39
7.7	Marcaje de la población microglial.	41
7.7.1	Procedimiento general.	41
	a) Preparación de tejidos para inmunohistoquímica.	41
7.7.2	Inmunotinción para microglia.	42
	a) Desparafinado y rehidratación de tejidos.	42
	b) Desenmascarado electroquímico.	42
	c) Bloque de peroxidasas endogenas.	42
	d) Incubación en cationes.	43
	e) Eliminación de fondo.	43
	f) Incubación con isolectina B4.	43
7.7.3	Análisis cuantitativo de la población microglial.	44
VIII.	RESULTADOS.	46

8.1	Signos clínicos.	46
8.2	Triglicéridos séricos.	47
8.3	Prueba de equilibrio en cilindro giratorio.	48
8.4	Conducta exploratoria en campo abierto (<i>open field test</i>).	48
8.5	Peso corporal tras intoxicación esófago-gástrica con tolueno.	53
8.6	Peso cerebral.	56
8.7	Descripción histológica de células microgliales.	57
8.8	Densidad microglial.	60
IX.	DISCUSIÓN.	62
9.1	Signos clínicos.	62
9.2	Triglicéridos séricos.	63
9.3	Equilibrio en cilindro giratorio (<i>rotarod test</i>).	64
9.4	Actividad locomotriz en campo abierto.	65
9.5	Peso corporal.	67
9.6	Peso cerebral.	68
9.7	Población microglial.	70
X.	CONCLUSIONES.	75
XI	BIBLIOGRAFÍA.	76

AGRADECIMIENTOS

A las personas:

Dr. Joaquín García Estrada, Director de tesis, por su participación en la dirección del trabajo de investigación, por el apoyo material y logístico y por sus valiosas aportaciones para la elaboración del manuscrito producto de éste trabajo.

Dr. Jacinto Bañuelos Pineda, Asesor de tesis, quien brindo todas las facilidades para que éste trabajo llegara a termino y por sus importantes comentarios, y observaciones acertadas que contribuyeron al enriquecimiento de la tesis.

Dra. Sonia Luquín de Anda, Asesora de tesis, por facilitar los medios necesarios para la elaboración del trabajo de investigación.

Por último, quiero agradecer muy especialmente al jurado revisor y evaluador del trabajo por sus importantes aportaciones y observaciones, y por darme las facilidades para poder presentar el trabajo de tesis que acredita mi formación como Maestro en Ciencias.

A las Instituciones:

Al Posgrado Interinstitucional en Ciencias Pecuarias, por proporcionar los medios necesarios para la adquisición de los elementos formativos, destrezas y habilidades necesarios para cumplir con el perfil del estudiante del programa de maestría.

A la Universidad de Guadalajara, especialmente a Laboratorio de Morfofisiología del Departamento de Medicina Veterinaria de la División de Ciencias Veterinarias del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias por las facilidades brindadas en la elaboración del trabajo de investigación.

Al Centro de Investigación Biomédica de Occidente del Instituto Mexicano del Seguro Social por brindar las facilidades para llevar a cabo el trabajo de investigación.

Quiero plasmar un muy especial agradecimiento a mis hijos, Jacinto Uriel y Cecilia Valeria por su paciencia y resignación durante mis largas ausencias ya que han tenido que prescindir de mi tiempo y atenciones aún cuando han estado enfermos, convalecientes o cuando han obtenido sus primeros logros y no he estado para verlos. A ellos dedico el presente trabajo.

A mi madre, Ma. de Jesús Rodiles de Gómez quien abnegadamente me ha ayudado con el cuidado de mis hijos y les ha brindado el cariño y paciencia que no les he podido dar de tiempo completo y sin la cual no podría haber realizado el trabajo de investigación para la obtención del grado de Maestría.

A mi hermana Blanca Estela Gómez quien me ha dado su apoyo, paciencia, esfuerzo y dedicación en el cuidado de mis hijos. Gracias a ella por ayudarme a alcanzar mi meta.

Mi agradecimiento muy especial a mi esposo, quien a sido mi fuente de inspiración y motivación para no arrojar la toalla en los momentos mas difíciles y por darme el apoyo, la dirección y tiempo necesarios para llevar a cabo el proyecto de investigación que hoy llega a su culminación.

Agradecimiento a todas las personas que de alguna u otra manera me han ayudado a la elaboración del trabajo de investigación plasmado en este documento.

A todos...

¡Gracias!

ÍNDICE ABREVIATURAS

ac	Anticuerpo
AChEasa	Enzima acetilcolinesterasa
ADN	Ácido desoxiribunucleico
AGE	Ácidos grasos esenciales
AGM	Ácido graso monoinsaturado
AGPI	Ácidos grasos poliinsaturados
AGPICL	Ácidos grasos poliinsaturados de cadena largar
AO	Aceite de oliva
AO-AO	Aceite de oliva más aceite de oliva
AO-D	Aceite de oliva más dieta convencional
AO-T	Aceite de oliva más tolueno
ARA	Ácido araquidónico
ARN	Ácido ribunucleico
ASV	Abuso de sustancias volátiles
ATP	Adenosín trifosfato
ATPasa	Adenosin trifosfatasa
ATSDR	Agency for toxic substances and disease registry
ATV	Área tegmental ventral
CCA	Conducta en campo abierto
CGRP	Péptido relacionado con el gen para calcitonina
CI	Control intacto
cm	Centímetro
CPF	Corteza prefrontal
CSF	Factor estimulante de colonias (citocinas)
CYP	Citocromo P
DA	Dopamina
DAB	3,3'- diaminobencidina
DHA	Ácido decosaheaxaenoico
DMS	Diferencia mínima significativa
EA	Enfermedad de Alzheimer
EP	Enfermedad de Parkinson
EP	Enfermedad de Parkinson
EPA	Environmental protection agency
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FE	Fosfatidiletanolamina
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FI	Fosfatidilinositol
FLasa	Fosfolipasa
FLM	Fosfolípidos de membrana
FN	Factor nuclear
g	Gramo
GM-CSF	Factor estimulante de colonias -granulocitos y macrófagos)
GSH	Glutation

h	Hora
H ₂ O ₂	Peroxido de hidrógeno
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HNE	4-hidroxinonenal
HSDB	Hazardous Substances Data Bank
IARC	International Agency for Research on Cancer
IL	Interleucina
INF	Interferón
IOOC	International olive oil council
Ip	Intraperitoneal
IPCS	International programme on chemical safety
iv	Intravenosa
LD ₅₀	Dosis letal media
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LPS	Lipopolisacáridos
LSD	Dietilamida del ácido lisérgico
LTP	Potenciación a largo plazo
mARN	Ácido ribonucleico mensajero
MCM	Medio condicionado de microglías
mCPF	Corteza prefrontal medial
M-CSF	Factor estimulante de colonias (macrófagos)
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MRI	Imágenes de resonancia magnética
NA	Noradrenalina
NDIC	National drug intelligence center
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NIOSH	National institute for occupational safety and health
NPY	Neuropéptido-Y
NSE	Enolasa neuronal específica
NTP	National toxicology program
NTP	National toxicology program
O ₂ ^{•-}	Anión súperoxido
-OH	Radical hidroxilo
ON	Oxido nítrico
PAFG	Proteína ácida fibrilar glial
PB	Amortiguador de fosfatos
PGn	Pasminógeno
PK	Proteincinasa
PLC	Fosfolipasa C
ppm	Partes por millón
PVN	Núcleo paraventricular hipotalámico
RC	Receptor del complemento
RfD	Dosis de letal de referencia
R-NMDA	receptores <i>N</i> -metil-D-aspartato
rpm	Revoluciones por minuto
SH	Sulfidrilo
SN	Sistema nervioso

SNC	Sistema nervioso central
SOD	Súperoxido dismutasa
T-AO	Tolueno más aceite de oliva
TBARS	Ácido tiobarbitúrico
TCADA	Texas commiccion on alcohol and drug abuse
TGC	Triglicéridos
TNF	Factor necrótico tumoral
TNT	Trinitrotolueno
TOL	Tolueno
VEH	Vehículo

LISTADO DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Contenido de ácidos grasos del aceite de oliva.	15
2	Contenido de esteroides del aceite de oliva.	18
3	Relación de los diferentes grupos experimentales.	35
4	Porcentaje de animales muertos tras intoxicación con tolueno.	46

LISTADO DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura del tolueno.	4
2	Metabolismo del tolueno.	7
3	Balance entre generación de ERO y sistemas antioxidantes.	12
4	Microglia en el desarrollo y en cerebro adulto.	22
5	Respuesta microglial tras lesión de nervios.	24
6	Moléculas que generan la activación microglial.	26
7	Prueba de equilibrio en rodillo giratorio.	38
8	Actividad locomotriz en campo abierto.	40
9	Estrategia de cuantificación de la población microglial.	45
10	Concentración de TGC séricos (periodo de intoxicación).	47
11	Desempeño en cilindro giratorio tras intoxicación con tolueno.	50
12	Tiempos promedios de permanencia en cilindro giratorio.	51
13	Actividad locomotriz en campo abierto (ensayo 1).	52
14	Actividad locomotriz en campo abierto (ensayo 2).	53
15	Peso corporal etapa de intoxicación.	54
16	Peso corporal etapa de recuperación.	55
17	Peso cerebral periodo de intoxicación.	56
18	Morfología de la población microglial en CPF de rata.	58
19	Densidad de células de microglia en CPF de rata.	59
20	Densidad microglial en corteza prefrontal de rata.	61

RESUMEN

El propósito principal de este estudio consistió en analizar si el aceite de oliva (AO) produjo efectos neuroprotectores en ratas adultas sometidas a intoxicación subcrónica con tolueno, mediante pruebas conductuales y análisis de reactividad microglial **Metodología:** 80 ratas Sprague-Dawley de 250-280 g de peso se dividieron en: Control intacto (CI; n=15), vehículo (VEH; n=15), ratas intoxicados por administración esófago-gástrica con tolueno (TOL; n=25) y las que recibieron aceite de oliva (AO) por la misma vía 30 min antes del tolueno, (AO-T; n=25) cada 24 h durante 10 días, la dosis inicial de tolueno fue de 0.5 mg/kg y se incrementó hasta 2g/kg/día, los animales CI y VEH recibieron agua destilada o AO, respectivamente. Treinta minutos después de administrar las dosis, los animales TOL y AO-T realizaron la prueba de equilibrio en rodillo giratorio, en 10 animales de cada grupo se cuantificaron triglicéridos séricos (TGC) los días 5 y 10 de la fase de intoxicación, se registró el peso corporal todos los días del estudio y al finalizar el periodo de intoxicación se pesó el cerebro (n=5). Durante los 20 días siguientes, cada uno de los grupos TOL y AO-T se dividieron en dos subgrupos; TOL [TOL y T-AO]; AO-T [AO-D y AO-AO] que recibieron solo dieta a base de nutrículos o que fueron suplementados con aceite de oliva y, en los días 20 y 28 se analizó conducta exploratoria en campo abierto (*open field test*) durante 3 min por 3 días consecutivos. **Resultados:** Solo se encontraron elevados los niveles de triglicéridos (TGC) en los grupos VEH y TOL vs CI día 5 ($p<0.05$). En la prueba de equilibrio en cilindro giratorio en los grupo TOL y AO-T mostraron diferencias significativas ($p<0.05$). En la prueba de campo abierto los grupos TOL y AO-T mostraron hiperactividad ($p<0.05$) con defecación y micción aumentadas, en contraste, los grupos VEH y AO-AO presentaron lo opuesto vs CI. El peso cerebral de animales TOL vs CI se encontró disminuido ($p<0.05$), sin embargo, VEH mostró aumento significativo ($p<0.05$). Los grupos TOL y AO-T redujeron su peso corporal a los 10 días de intoxicación ($p<0.05$) y el grupo VEH lo incrementó. Los grupos AO-D y AO-AO tuvieron una mejor recuperación de su peso en comparación con TOL y T-AO ($p<0.05$). Al finalizar el estudio se encontró aumentada la población de microglia en todos los estratos corticales de ratas intoxicadas con tolueno, sin embargo solo hubo diferencias significativas en la comparación del estrato superior de todos los grupos vs CI ($p<0.05$). **Conclusión:** La suplementación con AO previa a intoxicación con tolueno y durante la etapa de recuperación produjo efectos benéficos; menor daño neuroconductual, recuperación acelerada del peso corporal y menor población de células de microglia, a los 30 días de haber suprimido la exposición al solvente.

I. ANTECEDENTES

El abuso de inhalantes con el propósito de alcanzar un estado de euforia es empleado por numerosos niños y jóvenes como respuesta de escape a su realidad (Pres y Done, 1967; Leal y col., 1978; Chadwick y col., 1990; AAP, 1996; Tenenbein y col., 1996). El abuso de inhalantes se conoce también como *abuso de sustancias volátiles (ASV)*, "sniffing" o "huffing" y es una práctica que se ha extendido mundialmente (Kerner, 1988; Tenenbein y col., 1996; Wilkins-Haug, 1997). Aunque los inhalantes son usados principalmente por los jóvenes, existen algunos factores que pueden aumentar la susceptibilidad a desarrollar dependencia, tales como la edad, género, grupo étnico, factores comunitarios, relación familiar, adaptación escolar, adaptación social, problemas emocionales, problemas de educación y, lo mas importante, por presión de los amigos (Oetting y col., 1988; Kerner, 1988; Tenenbein y col., 1996; Trotter, 1999).

El uso de inhalantes esta relacionado con problemas de disfunción familiar, alcoholismo y uso de drogas, y está marcado por conflictos y desordenes familiares (Gutiérrez y col., 1978; Leal y col., 1978; Albaugh y Albaugh, 1979; Carlini-Cotrim y Carlini, 1988; Zur y Yule, 1990). Aunque muchos factores pueden afectar la susceptibilidad de los jóvenes para el uso de inhalantes, el estrés por la presión de grupo es casi siempre el disparador que desencadena el abuso de inhalantes, ya que para ser aceptado por los amigos o para pertenecer a un grupo o "banda", se debe iniciar en el uso de las drogas (Dworkin y Stephens, 1980). El modelo cultural es otro factor que puede contribuir al uso de inhalantes entre los jóvenes. Por ejemplo, se sabe que el uso de inhalantes en los niños de la calle de México y Brasil, en proporción, es favorecido por un modelo, más que por factores de presión (Trotter, 1999; Cruz-Martín del Campo y Torres, 2002).

La popularidad en el uso de solventes se debe a su accesibilidad, bajo costo, menores efectos secundarios, se puede obtener legalmente, ofrece una satisfacción rápida, es decir, desencadena efectos eufóricos que hacen "sentir bien" a quien los usa, su posesión se puede justificar mas fácilmente que en el caso del alcohol o marihuana, el uso entre los jóvenes es cuestión de moda, es

genial ("cool") y desencadena adicción muy sutilmente (Huang y col., 1989; TCADA, 1997; Nazarian y Connolly, 2002; Cruz-Martín del Campo y Torres, 2002).

Existen cientos de productos comerciales para uso industrial o doméstico que pueden ser inhalados durante el ASV. Por ejemplo, los solventes industriales de mayor uso en México son los cementos (tricloroetileno, tetracloroetileno); pegamentos (tolueno, acetato de etilo y varias acetonas), el thíner (destilados de petróleo, benceno, acetona, tricloroetileno, tetracloroetileno) y removedores de barniz o pintura (acetona, tolueno, benceno, cloruro de metileno). De hecho, existen mas de 1000 productos de uso doméstico que despiden este tipo de emanaciones (Allen, 1979; Goetz, 1985; EPA, 1990).

Las sustancias que pueden ser utilizadas como inhalantes se subdividen en tres categorías:

- a) *Solventes volátiles*. Líquidos que se vaporizan a la temperatura ambiente cuando se dejan descubiertos. Se les puede encontrar en el diluyentes de pintura, gasolina, líquido de corrección, marcadores de punta de fieltro, esmalte de uñas, quitaesmalte y pegamentos (cemento de goma).
- b) *Aerosoles*. Sustancias que se usan por aspersion y que contienen propelentes y solventes como el tolueno, el cual es utilizado con más frecuencia en los aerosoles. Entre los aerosoles más utilizados se incluyen los desodorantes, productos para el cabello, productos de cocina, protectores textiles y las pinturas de color plata y oro.
- c) *Gases*. Entre los más comúnmente utilizados se encuentran los refrigerantes y los anestésicos médicos. Los usuarios a menudo inhalan los gases que se encuentran en los encendedores de butano, equipos de aire acondicionado, y tanques de propano. Los anestésicos médicos, como el éter, el cloroformo, y el óxido nitroso también son objetos de abuso. El óxido nitroso, llamado también gas hilarante, es el que se usa indebidamente con mayor frecuencia.
- d) *Nitritos*. Es un grupo de sustancias químicas entre las que se incluyen el nitrito de ciclohexílico, amílico y butílico. Estos son empleados principalmente por adultos para aumentar las sensaciones sexuales más que para lograr un efecto eufórico. Se les puede encontrar como pequeñas cápsulas selladas y

enmalladas que se rompen para liberar las emanaciones. Por el ruido que hacen estas cápsulas al estallar se les llama "*poppers*" o "*snappers*". El nitrato butílico se distribuye en pequeños frascos y al igual que los anteriores se pueden conseguir en librerías para adultos, en tiendas y por Internet (NDIC, 2002).

1. Efectos generales de los inhalantes.

La exposición a inhalantes produce un efecto eufórico inmediato similar al de las bebidas alcohólicas. Inicialmente se pueden presentar excitación seguida de somnolencia, mareo, agitación y/o desinhibición. Las sustancias químicas que se encuentran en los solventes volátiles, aerosoles y gases producen algunos efectos secundarios como mareos, alucinaciones, delirios, beligerancia, apatía, y falta de tino. Algunas horas después, puede presentarse una especie de "cruda": dolor de cabeza, desorientación e incoordinación muscular. La exposición crónica también desencadena pérdida de peso, debilidad muscular, falta de atención, irritabilidad y depresión (Steicher, y col., 1981; NDIC, 2002; Rosenberg, 2002).

El abuso crónico puede producir daños severos y, algunas veces, irreversibles al corazón, hígado, riñones, pulmones y cerebro. El daño cerebral se puede manifestar con cambios de personalidad, disminución de las funciones cognitivas, pérdida de memoria y dificultad para hablar (Rosenberg, 2002). Los consumidores de inhalantes pueden morir como resultado del abuso prolongado o a consecuencia de una sola inhalación. La llamada "*muerte súbita por inhalación*" puede sobrevenir minutos después de usar inhalantes a causa del desarrollo de arritmia cardíaca, inhibición vagal, depresión respiratoria y/o anoxia (Steicher y col., 1981; Steffee y col., 1996; Raikhlin-Eisenkraft y col., 2001).

El solvente más comúnmente utilizado por su amplia distribución y fácil acceso y bajo costo es el tolueno, se le puede encontrar en productos de uso doméstico como pinturas en spray, removedores de pinturas, productos de limpieza y correctores líquidos entre otros. Por otra parte, el tolueno es utilizado directamente como solvente para superficies, recubrimientos, grasas, aceites y

resinas, es empleado en la elaboración de tintas para impresión, manufactura de poliuretano para autos, muebles y calzado, y como producto base para la elaboración de benceno y trinitrotolueno (TNT) (IARC 1988). Los remanentes del tolueno son utilizados por la industria en la elaboración de tintas, esmaltes para uñas y síntesis de químicos orgánicos (EPA, 1984; HSDB, 1999).

2. Tolueno.

2.1 Generalidades.

Es un compuesto que pertenece a la familia de compuestos aromáticos alquénicos, es el más simple de los alquilbencenos (metilbenceno). Tiene propiedades físicas esencialmente similares a las de cualquier hidrocarburo. Es insoluble en agua, pero es soluble en disolventes no polares, como éter, tetracloruro de carbono y ligroína y es menos denso que el agua (Morrison y Boyd, 1990). La fórmula del tolueno es $C_6H_5CH_3$ (Fig.1), su punto de fusión es de $-95^\circ C$, su punto de ebullición es de $111^\circ C$ y su densidad relativa es de 0.879 a $20^\circ C$. Es ampliamente utilizado para la síntesis de otros productos químicos y drogas, y su importancia toxicológica se debe a que se produce en grandes cantidades para su aplicación industrial como disolvente de lípidos, de lo que resulta un gran riesgo potencial para la salud humana (Martín y Slapper, 2001).

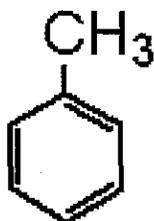


Figura 1. Estructura del tolueno.

Debido a sus propiedades físicas y químicas, el tolueno es altamente volátil, lo que provoca que sea expelido fácilmente a la atmósfera, razón por la cual la inhalación es la principal vía de exposición. En el ambiente, la concentración promedio de tolueno puede variar significativamente, aunque por datos recabados

durante el año de 1990 en los EE.UU. se reportó una concentración media de $20 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (75 ppb) con un intervalo de $0.23\text{-}750 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (0.9-2812 ppb), con el factor de conversión: $1 \text{ ppm (en aire a } 25 \text{ }^\circ\text{C)} = 3.76 \text{ mg}/\text{m}^3$ y $1 \text{ mg}/\text{m}^3 = 0.266 \text{ ppm}$ (EPA, 1993). Aunque la concentración máxima permisible del tolueno es de 100 ppm, con el siguiente factor de conversión: $1 \text{ ppm} = 4.35 \text{ mg}/\text{m}^3$ (Gupta y col., 1990). En el aire, el tolueno se combina con oxígeno para formar benzaldehído y cresol, los cuales ejercen un efecto adverso a la salud (ATSDR, 2000).

2.2 Toxicocinética del tolueno.

El tolueno se absorbe rápidamente por los pulmones y el tracto gastrointestinal y en mucho menor grado por piel (Wallen, 1986; McDougal, 1990; Morgan y col., 1991; EPA, 1992; Ameno y col., 1992; Tsuruta, 1996). La absorción a través de los pulmones depende del volumen de respiración, la concentración en el aire, tiempo de exposición, coeficiente de partición sangre/aire, transporte en sangre, solubilidad en los tejidos y el metabolismo, aunque se ha calculado que el porcentaje promedio de exposición varía entre 0.16 y 1.6 mg/min, y el porcentaje promedio de tolueno que se absorbe por inhalación es del 85-90 % (Carlsson, 1982; Mølhav y Pedersen, 1984; Faust, 1994; Tsuruta, 1996). Por otro lado, la absorción de tolueno a través de tracto gastrointestinal es del 100 % (Faust, 1994).

Tras la absorción, el tolueno se distribuye a través de todo el cuerpo; se acumula principalmente en tejido adiposo y tejidos con alto contenido lipídico y ampliamente irrigados, entre los que se incluyen hígado y cerebro. Tras un episodio de inhalación a altos niveles de tolueno, se le puede encontrar en la grasa corporal, médula ósea, nervios espinales, médula espinal y materia blanca cerebral (Bergman, 1979; Wallen, 1986; Alberts y col., 1983; Peterson y Sarvesvaran, 1983). Por otra parte, cuando se han ingerido altas concentraciones de tolueno, se pueden depositar en hígado, seguido de páncreas, cerebro, corazón, grasa corporal y líquido espinal (Gospe y Calaban, 1988; Ameno y col., 1989; Korsak y col., 1992).

2.3 Metabolismo del tolueno.

En el organismo, el tolueno se metaboliza en el hígado mediante oxidaciones sucesivas en sistemas secuenciales de enzimas oxidantes (Fig. 2). Inicialmente, el tolueno se hidroxila y se transforma en alcohol benzílico por medio del citocromo P450 (CYP's); posteriormente el alcohol benzílico se oxida a benzaldehído por las alcohol deshidrogenasas; y subsecuentemente, se transforma en ácido benzoico mediante las aldehído deshidrogenasas. El ácido benzoico se puede conjugar con glicina para formar ácido hipúrico (principal metabolito urinario) o puede reaccionar con ácido glucurónico para formar benzoil glucurónido (ATSDR, 1999), y mediante hidroxilaciones posteriores se pueden originar los metabolitos minoritarios *o-cresol* y *p-cresol* (Toftgard y col., 1982; EPA, 1990; Monster, 1993; Kim y col., 1997).

Tras exposición a tolueno sucede adaptación hepática de la síntesis de enzimas oxidativas que participan en su metabolismo, cuya inducción se incrementa durante las primeras 2 a 10 h tras la exposición. Estas enzimas comprenden los citocromos; CYP2E1 y CYP1A2/1, en humanos expuestos a bajas concentraciones de tolueno, y las isozimas CYP2C8 y CYP2B6 a exposiciones elevadas de tolueno (Nakajima y Wang, 1994; Kim y col., 1997; Yuan y col., 1997).

En ratas, las principales isozimas hepáticas relacionada con el metabolismo del tolueno son CYP2C11/6, la cual alcanza altas concentraciones y en orden decreciente CYP1A1/2, CYP2A1, CYP2B1/2, CYP2C6, y CYP2E1 (Nakajima y Wang, 1994). Consecuentemente, la actividad de estas enzimas sobre el tolueno desencadena una elevada producción de sus respectivos metabolitos, el *o*, y *p-cresol* (Nakajima y col., 1993; Yuan y col., 1997; Kim y col., 1997; Ernstgard y col., 1999). Las isozimas CYP2B6 y CYP2E1 catalizan la formación de *p-cresol* (11-12% del total de metabolitos), y CYP1A2 cataliza la formación de *o-cresol* (22%) y de *p-cresol* (35%) (Nakajima y Wang, 1994; Yuan y col., 1997).

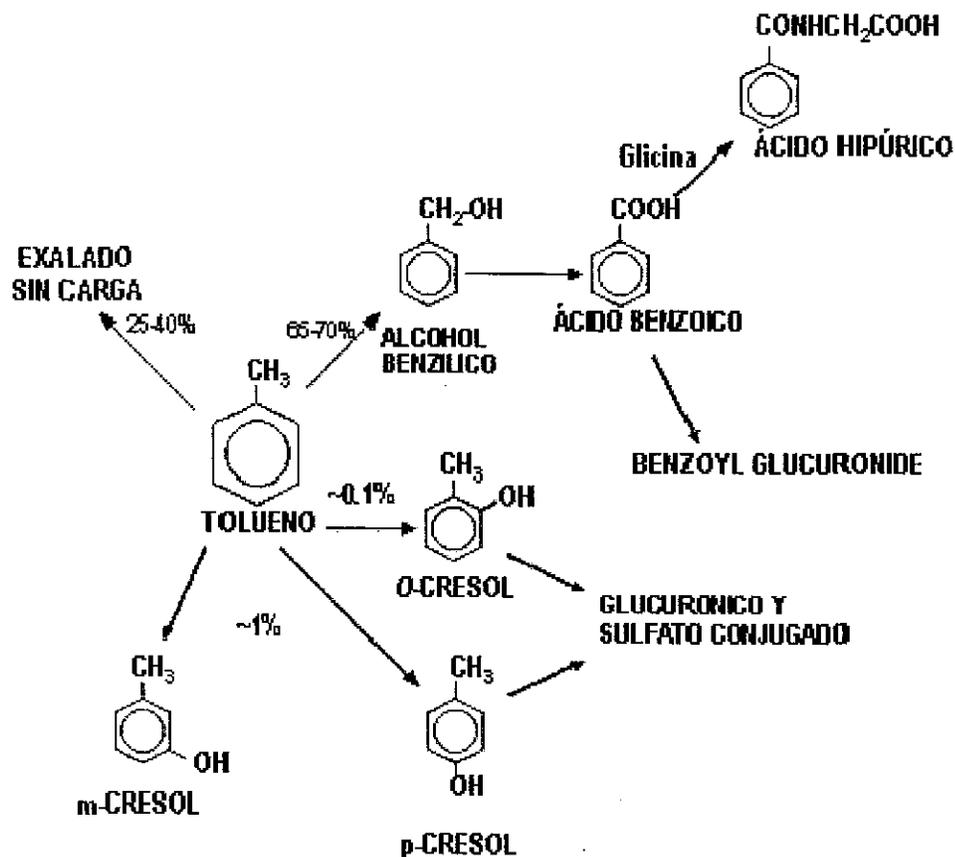


Figura 2. Metabolismo del tolueno

Factores como el sexo y la edad de los animales influyen en la inducción de P450 por tolueno. En general, el efecto inductivo es más potente en animales jóvenes que en viejos, y en machos con respecto a las hembras. Aunque en neonatos expuestos a tolueno se presentan cambios significativos en la inducción de P450, ya que éstos dependen principalmente de la actividad de monooxigenasas durante los estadios tempranos del desarrollo, de ahí que el efecto es leve en ratas menores de 3 semanas de edad (Toftgard y col., 1982; Nakajima y Wang, 1994; Nakajima y col., 1997).

2.4 Efectos de la exposición subcrónica al tolueno.

Ratas expuestas experimentalmente a intoxicación subcrónica con tolueno desarrollan excitación, ataxia, incoordinación y gradualmente presentan signos de depresión (Kishi y col., 1988; Kishi y Miyake 1990; Kishi y col., 1993), la actividad diurna espontánea aumenta de un 50-60%, sufren alteraciones de equilibrio en pruebas de cilindro de equilibrio y periodos cortos de latencia en pruebas de laberinto en T (Ikeda y col., 1981; Korsak y col., 1992).

La exposición de larga duración a niveles bajos-moderados de tolueno puede desencadenar cansancio, debilidad, confusión, comportamiento similar al estado de embriaguez, pérdida de la memoria, náusea, pérdida del apetito e hipoacusia (Toftgard y col. 1982; Stumph, 1985), mientras que la exposición a niveles elevados de tolueno en corto plazo puede producir mareo, aturdimiento, somnolencia, pérdida del conocimiento y en casos extremos la muerte (Korsak y col., 1992; ATSDR. 2000).

Ratas expuestas experimentalmente a intoxicación subcrónica con tolueno presentan daño severo a sistema nervioso central (SNC) evidenciado por alteraciones neuroconductuales y neuroquímicas, tales como narcosis, disfunción en la actividad del tren posterior (NIOSH, 1988; Aydın y col., 2002; Berenguer y col., 2003) y disminución del aprendizaje espacial y memoria (Pryor, 1991; von Euler y col., 1993), así como aumento de la actividad locomotriz espontánea (Pryor y col., 1983; von Euler y col., 1993; Martín y Slapper, 2001; Wiaderna y Tomas, 2002).

2.5 Tolueno y desarrollo de dependencia.

El tolueno al igual que otros solventes ejerce acción específica sobre el sistema límbico; que es la parte del sistema nervioso que media las conductas naturales que son básicas para la supervivencia, tales como la alimentación, la ingesta de líquidos, la conducta sexual y la conducta materna. En términos generales, la activación del sistema límbico por diferentes estímulos lleva a la repetición y al reforzamiento de la conducta que lo activa, lo cual se observa

claramente no sólo con los disolventes, sino también con la gran mayoría de los fármacos que generan adicción como etanol, barbituratos y benzodiazepinas (Guzmán, 1975; Alcaraz y col., 1973).

Según lo reportado por Riegel y French, (2002) y Gerasimov y col. (2002), el desarrollo de dependencia sucede cuando se ha producido reforzamiento mediado por alteración en la actividad de neuronas dopaminérgicas del área mesolímbica y corteza prefrontal.

2.6 Efectos depresivos del tolueno.

La exposición a tolueno también puede ejercer efectos farmacológicos depresivos del SNC al igual que el de otras drogas de abuso (Evan y Balster, 1991; Cruz y col., 1998; Ronald, 2001) mediante inhibición de la actividad de los receptores *N*-metil-D-aspartato (R-NMDA) de manera dosis dependiente (Cruz y col., 1998).

De acuerdo a lo reportado por Cruz y colaboradores (1998), el tolueno puede ejercer efectos inhibitorios sobre el R-NMDA a concentraciones muy bajas de exposición (100 μ M). Específicamente, el tolueno ejerce sus efectos sobre la subunidad NR1/2B, la cual es aproximadamente diez veces más sensible al tolueno que la subunidad NR1/2A o NR1/2C. Esta subunidad se expresa abundantemente en neuronas del cerebro anterior de individuos jóvenes (durante el desarrollo embrionario y neonatal) y conforme el individuo madura, el subtipo NR1/2B es substituido por el subtipo NR1/2A o NR1/2C (Monyer y col., 1994; Cruz y col. 1998; Woodward, 2000). Esto tiene importantes implicaciones, ya que los R-NMDA, están relacionados a funciones importantes del sistema nervioso (SN) entre las que se pueden numerar:

1. Modulación de plasticidad sináptica.
2. Maduración de circuitos nerviosos (establecimiento de conexiones funcionales) durante el desarrollo, y en el adulto.
3. Activación y consolidación de sinapsis mediante mecanismos de plasticidad.

4. Potenciación a largo plazo (LTP), que es la base de los procesos de aprendizaje y procesos de formación de memoria episódica, un tipo de memoria que permite recordar experiencias vividas (Wenzel y col., 1997).

Lo expuesto anteriormente, tiene importantes implicaciones desde el punto de vista de la salud pública, ya que el abuso de inhalantes entre niños y adolescentes —cuando el receptor NR1/2B es predominante en el cerebro—, se ha convertido en una práctica común en todo el mundo (Flanagan y Ives, 1994; Cruz y col., 2000). El efecto del tolueno sobre el desarrollo de inhibición significativa en la función del receptor NMDA en niños, jóvenes o fetos expuestos durante la preñez, se manifiesta con deficiencias neuroconductuales, funcionales y anatómicas del cerebro (Wenzel y col., 1997; Cruz y col., 2000) similares a las que se presentan en el *síndrome de alcohol fetal* (Cruz y col., 1998; 2000; Ronald y col., 2001).

2.7 Tolueno y desarrollo de estrés oxidativo.

Tras la exposición a tolueno, se puede inducir aumento significativo en la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) a partir de hígado y cerebro, esto debido a la oxidación de alcohol benzílico o benzaldehído, en reacciones catalizadas por CYP-450 y aldehído deshidrogenasas (Chapman y col., 1990; Mattia y cols., 1991; Smith-Kielland y Ripel, 1993; Baydas y col., 2003), aunque en SN el benzaldehído, es el metabolito que desencadena un aumento importante en la generación de radicales hidroxilo a partir de la reacción de Haber-Weiss catalizada por Fe^{++} (Mattia y col., 1993a). Además, Mattia y colaboradores (1991), sugieren que el benzaldehído contribuye de manera importante al desarrollo de neurotoxicidad por tolueno.

La producción de ERO sucede de manera dosis-dependiente y se han encontrado niveles relativamente elevados tras exposición a concentraciones muy bajas de tolueno (Mattia y col., 1993a), por ejemplo, en cerebelo de ratas inyectadas intraperitonealmente (ip) a dosis de 0.5, 1.0 y 1.5 g/kg se ha observado la generación gradual de ERO, aunque el hipocampo y estriado son especialmente

sensibles a los efectos del tolueno y sus efectos oxidativos se pueden continuar hasta 24 h post-exposición debido a que el tolueno estimula la generación tisular sistémica de ERO (Mattia y col., 1993b).

Las ERO generadas tras exposición a tolueno pueden ejercer efectos depresivos sobre los niveles de glutatión (GSH) en hígado y ciertas regiones del cerebro (Mattia y col. 1993a; Halifeoglu y col., 2000; Dundarz y col., 2003), lo cual es especialmente importante debido a que el GSH desempeña un papel importante en la protección contra ERO (Mattia y col., 1993a; Halifeoglu y col., 2000) ya que es un importante antioxidante intracelular que protege contra una gran variedad de diferentes especies oxidantes, lo cual es de vital importancia para proteger a las células contra daño oxidativo (Gutteridge y Halliwell, 2000)

Los disturbios en la homeostasis del glutatión desencadenan estrés oxidativo y consecuentemente, daño neuronal (Schulz y col., 2000). Cabe hacer notar que en sistemas biológicos constantemente se genera una gran variedad de ERO por ejemplo, en cerebro se generan ERO a partir de la actividad de mitocondrias, óxido nítrico sintasa, metabolismo del ácido araquidónico, xantina oxidasas, monoamino oxidasas y CYP-P450, las cuales tienen diferentes sitios de formación, función fisiológica, reactividad y vida media biológica. En correspondencia, las células cerebrales sanas poseen altas concentraciones de enzimas y moléculas pequeñas antioxidantes (Fig. 3) entre las que se incluyen superóxido dismutasa (SOD), SOD/Mn, glutatión peroxidasa y catalasas, así como pequeñas moléculas de GSH, ácido ascórbico, vitamina E y buen número de flavonoides dietarios (Schulz y col., 2000).

El estrés oxidativo describe una condición en la cual las defensas antioxidantes son insuficientes para mantener niveles bajos de ERO debido a la excesiva producción de ERO y/o pérdida de defensas antioxidantes (Fig. 3). Por otra parte, la disminución en los niveles de GSH y el daño oxidativo constituyen sistemas de señalización temprana que desencadena eventos apoptóticos y muerte celular (Kane y col., 1993) por ejemplo, la disminución rápida de GSH induce apoptosis mediada por Fas (proteína membranal de la familia de TNF) (Nagata, 1997; van den Dobbelen y col., 1996; Bojes y col., 1997).

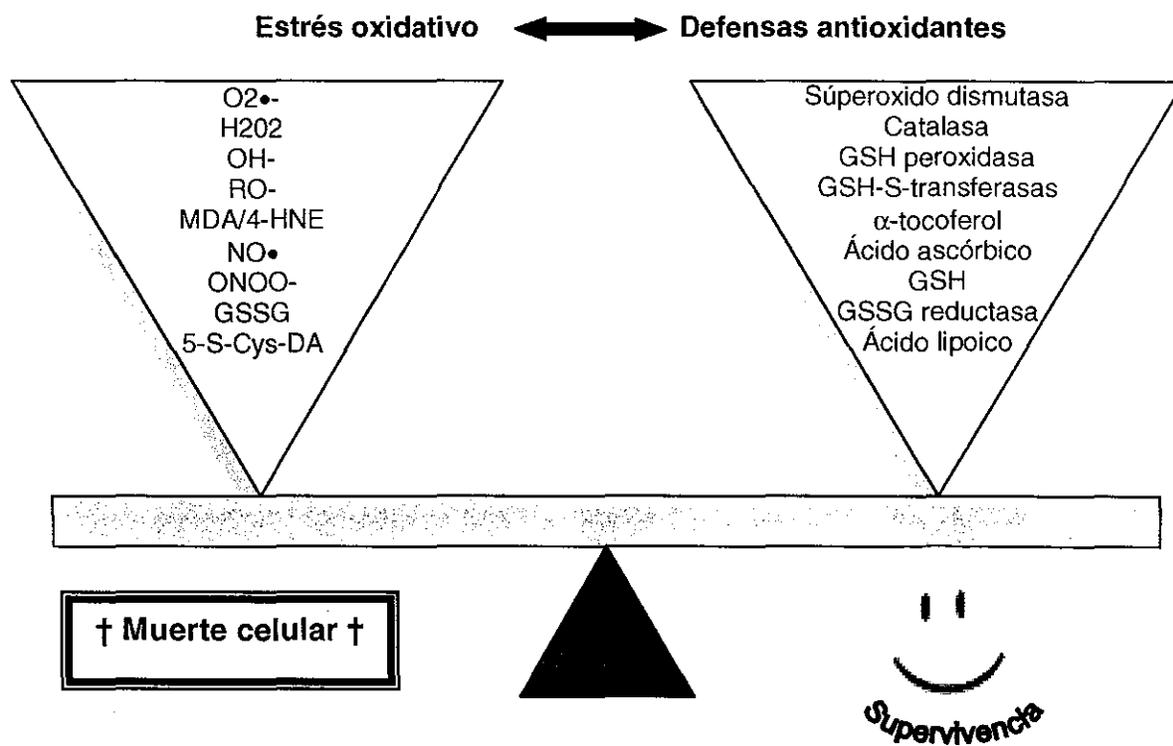


Figura 3. Balance entre generación de ERO y sistemas antioxidantes. El desbalance entre ambos sistemas, la producción excesiva de ERO (izq) o defensa antioxidante reducida (der) desencadena estrés oxidativo (Tomado de Schulz y col., 2000).

El SNC, es especialmente vulnerable a daño oxidativo debido a que el cerebro consume grandes cantidades de oxígeno, contiene altas cantidades de lípidos y es relativamente pobre en defensas antioxidantes en comparación con otros tejidos (Metodiawa y Koska, 2000).

El estrés oxidativo puede ejercer sus efectos sobre las membranas biológicas alterando los sistemas de transporte iónico, así como la fluidez membranal.

2.8 Efecto del tolueno sobre membranas neuronales.

El estrés oxidativo desencadenado tras exposición a tolueno puede ejercer sus efectos sobre las membranas celulares, lo que puede alterar la composición y

función de las células cerebrales (LeBel y Bondy, 1991). Se ha reportado que en ratas expuestas a dosis única (1g/kg/1h/i.p) de tolueno, se puede provocar una reducción significativa en los niveles basales de fosfolípidos de membranas (FLM) de hasta un 35% y la fluidez de membranas se puede incrementar significativamente (LeBel y Schatz, 1990; Edelfors y col., 2002).

LeBel y Schatz (1990), reportaron que el lípido sobre el cual ejerce sus efectos el tolueno es fosfatidiletanolamina (FE). Este fosfolípido se disminuye debido a que el tolueno estimula la actividad de enzimas fosfolipasas C (FLasa C), específicas para FE, lo cual ocasiona aumento en la fluidez de regiones membranales muy específicas; Es decir, el tolueno provoca fluidificación solo de la monocapa externa (Lebel y Schatz, 1990; Edelfors y col., 2002), y consecuentemente, la función neuronal se altera. Por ejemplo, se observa disfunción en la actividad de algunas enzimas membranales como Na^+/K^+ -adenosin trifosfatasa (ATPasa) (20-30%, 15-30 min), mientras que, ATPasa dependiente de Mg^{++} y Ca^{++} no se alteran (LeBel Schatz, 1990).

Otros autores han demostrado que la fluidez de membranas expuestas a tolueno se presenta de manera lineal, al igual que la disminución en la actividad de enzimas acetilcolinesterasas (AChEasa). En contraste, la actividad de enzimas ATPasas disminuye de manera dosis-dependiente debido quizás a la alteración en la relación lípido/proteína (Korpela y Tahti 1988, Korpela, 1989; Edelfors y Ravn-Jonsen, 1990; Engelke y col., 1992).

Además, los cambios que desencadena el tolueno sobre la composición lípidica de las membranas propician aumento de las concentraciones intracelulares de Ca^{++} , alteración de la función de receptores para dopamina (DA) y neurotensina (von Euler y col., 1988; 1990), y disminución en la afinidad a su ligando de receptores β -adrenérgicos de corteza cerebral de ratas (Fuxe y col., 1987). Asimismo, la exposición a tolueno desencadena reducción de noradrenalina (NA) en la porción dorsal del puente (*nucleus coeruleus*) y de DA en hipotálamo y porción ventral del cerebro medio rico en sustancia nigra (Bjornaes y Naalsund, 1988; Kiriu y col., 1990); disminución de acetilcolina en hipocampo de ratas expuestas a dosis elevadas de tolueno (Honma, 1983) y,

afecta neuronas monoaminérgicas del cerebro, particularmente serotoninérgicas, al igual que algunos alucinógenos; como la dietilamida del ácido lisérgico (LSD) lo que da como resultado el llamado "*síndrome de serotonina*" (Yamawaki y Sarai, 1982; Celani y col., 1988).

Recientemente, ha aumentado el número de reportes que involucran a los radicales libres derivados de una gran cantidad de eventos patológicos en el desarrollo de neurotoxicidad, muerte celular por apoptosis y desordenes degenerativos y también ha aumentado el número de reportes en los que se propone la utilización de agentes terapéuticos antioxidantes para prevenir el daño y la muerte neuronal (Metodiewa y Koska, 2000). Algunos de los productos más comúnmente utilizados para prevenir el daño oxidativo a SNC incluyen la utilización de alimentos naturales, vitaminas, hierbas y otros suplementos dietarios (Cameron y Rosenfeld, 2002). Por esta razón, la utilización de aceite de oliva (AO) para aminorar el daño tisular por exposición a tolueno puede ser una alternativa viable ya que el aceite de oliva contiene triglicéridos (TGC), ácidos grasos libres de glicerol y otros elementos que tienen capacidad antioxidante (Kiritsakis, 1998; 1999; Rabovsky y Cuomo, 1999).

3. Aceite de oliva.

3.1 Composición química del aceite de oliva extra virgen.

El aceite de oliva está constituido principalmente por ácidos grasos monoinsaturados (AGM), entre éstos ácidos grasos destaca el oleico por ser el más abundante, seguido por el linoleico (vitamina F) y el tocoferol (vitamina E). El ácido oleico participa en la reducción de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y aumenta la concentración de lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Kafatos, 1995; Kushi y col., 1995; Aparicio y col., 1997; IOOC, 1999).

De acuerdo a la cantidad y calidad de ácidos grasos que contienen los aceites de oliva varia su clasificación por ello, de acuerdo a la norma CODEX STAN 33 (2001), los aceites de oliva se clasifican en: a) aceite de oliva virgen; b)

aceite de oliva refinado y; c) aceite refinado de orujo de aceituna. En el cuadro 1 se presenta la composición de ácidos grasos del AO.

El aceite de oliva extra virgen contiene tres tipos de ácidos grasos:

- Saturados (palmítico)
- Monoinsaturados (oleico)
- Poliinsaturados (linoleico y linolénico).

Con respecto a otras grasas vegetales, el aceite de oliva contiene menor porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI).

Los AGPI se caracterizan por presentar menos estabilidad en los metilenos (-CH₂) situados entre dobles enlaces no adyacentes, lo que favorece la oxidación y formación de radicales libres. Mientras que, el ácido oleico, mayoritario en el aceite de oliva, es menos propenso a oxidarse (Kiritsakis, 1987; 1999).

Cuadro 1. Ácidos grasos presentes en el aceite de oliva extra virgen (tomado de Kiritsakis, 1987).

Ácido graso	Instauraciones	% m/m de ésteres de metilo
Ácido láurico	(C 12:0)	No detectable
Ácido mirístico	(C 14:0)	<0.1
Ácido palmítico	(C 16:0)	7.5 – 20.0
Ácido palmitoleico	(C 16:1)	0.3 - 3.5
Ácido heptadecanoico	(C 17:0)	<0.5
Ácido heptadecenoico	(C 17:1)	<0.6
Ácido esteárico	(C 18:0)	0.5 – 5.0
Ácido oleico	(C 18:1)	55.0 – 83.0
Ácido linoleico	(C 18:2)	3.5 – 21.0
Ácido linolénico	(C 18:3)	<1.0
Ácido araquídico	(C 20:0)	<0.8
Ácido behénico	(C 22:0)	<0,3
Ácido erúcico	(C 22:1)	No detectable
Ácido lignocérico	(C 24:0)	<1,0

Además, el aceite de oliva contiene un residuo insaponificable, constituido por clorofilas y carotenos (provitamina A), responsables del color del aceite que puede variar del amarillo claro al verde oscuro. También contiene vitaminas K y E

que actúan como antioxidantes naturales. Es importante destacar que el aceite de oliva carece de colesterol, pero representa una fuente de energía, vitaminas y ácidos grasos esenciales (Tateo y col., 1993; Rana y Kumar, 1994).

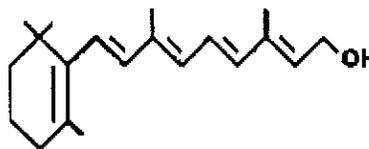
Otros elementos importantes que forman parte de la composición del aceite de oliva se enumeran a continuación:

- Hidrocarburos:

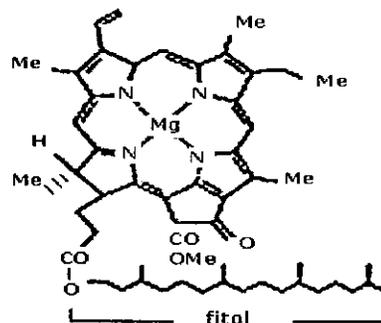
Escualeno: Potente inhibidor del oxígeno reactivo.



β -Caroteno: precursor de la vitamina A.

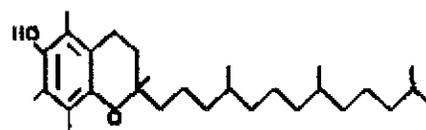


- Pigmentos no terpénicos: Clorofila.



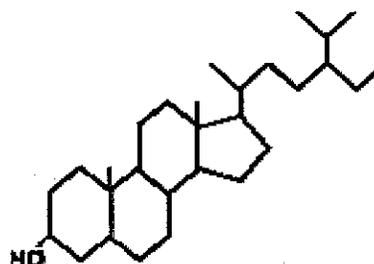
- Tocoferoles:

Vitamina E (150-300 ppm)

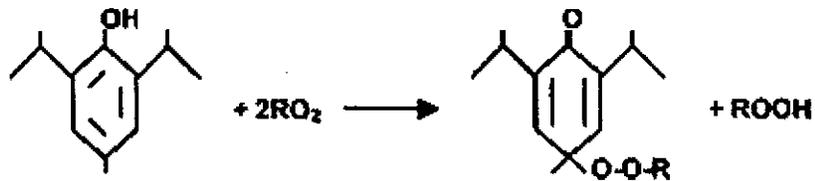


- Esteroles:

β -sistosterol: Compite con el colesterol en la absorción intestinal, evitando que se absorba el colesterol en el intestino.



- **Polifenoles:** Hidroxitirosol y oleuropeína.



Una peculiaridad de la fracción insaponificable del aceite de oliva es su mayor contenido de escualeno en comparación con otros aceites vegetales y su alto contenido de esteroides, casi exclusivamente de β -sitosterol, el cual, se ha demostrado que es un importante antioxidante en contraste; el aceite de orujo de aceituna contiene mas compuestos alcohólicos que los aceites de oliva vírgenes o refinados y su índice de yodo es, por tanto, mas bajo que el encontrado normalmente en los aceites de oliva vírgenes y refinados, y su punto de fusión más elevado (cuadro 2) (CODEX STAN 33, 2001; Aparicio y col., 1997; Rana y Kumar, 1994; IOOC, 1999).

Cuadro 2. Contenido de esteroides del aceite de oliva (Aparicio y col., 1997; IOOC, 1999; Kiritsakis, 1999).

	β -sitosterol	Campesterol	Colesterol
Aceite de oliva virgen	≥93	≤4.0	≤0.5
Aceite de oliva refinado			
Aceite de orujo de aceituna refinado			

3.2 Importancia de la utilización del aceite de oliva.

La importancia de la utilización del aceite de oliva radica en su contenido de antioxidantes y de ácidos grasos esenciales (AGE), principalmente los ácidos linoleico (18:2, n-6) y α -linolénico (18:3, n-3), ya que al metabolizarse en hígado dan lugar a la formación de cadenas más largas para formar ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPICL); con 20 y 22 carbonos, y cuatro, cinco o seis dobles enlaces que están representados por el ácido araquidónico (ARA) y el ácido decosaheptaenoico (DHA). Estos son los ácidos grasos que se encuentran en los fosfolípidos de las membranas del sistema nervioso, cerebro y eritrocitos (Crawford y col., 1976; Araya y col., 1999; Elvevoll y James, 2000). El cerebro está constituido por aproximadamente el 60% de lípidos estructurales y utiliza ARA y DHA para crecer, funcionar y preservar su integridad (Araya y col., 1999).

3.3 Funciones de los ácidos grasos esenciales.

Los AGE se asocian estrechamente a procesos vinculados al desarrollo del SNC, por lo que son abundantes en la materia gris de corteza cerebral, membranas sinápticas, mitocondriales y microsomales, aunque las mayores concentraciones de lípidos se encuentran en la corteza cerebral. En ésta región, los fosfolípidos corresponden al 22%, en el segmento externo de los fotoreceptores de la retina. El DHA constituye hasta el 60% de los lípidos, en estas dos estructuras destaca el alto contenido de DHA y ARA que ocupan el 50% del total de los ácidos grasos presentes (Mariane, 1998).

El tipo y la cantidad de grasa de una dieta modifica no sólo la concentración de lípidos en sangre, sino también la composición química de los lípidos constituyentes de las membranas celulares en los diversos tejidos (Tahin y col. 1981; Harris y Stahl 1983; Roach y col. 1993; Yaqoob y col. 1995). En el caso del AO, el ácido oleico, es el ácido graso monoinsaturado (AGM) más abundante y se ha comprobado que puede modificar la composición química y propiedades físicas de las membranas celulares (Thomson y col., 1986; Muriana y col., 1992) por ejemplo, trabajos efectuados por Martínez-Martos y sus colaboradores (1999), han mostrado que el ácido oleico puede afectar la actividad aminopeptidasa a nivel de corteza prefrontal de animales alimentados con una dieta enriquecida con 20% de AO. Los efectos inducidos por el ácido oleico, en diferentes niveles pueden ser:

- a) Modificación de la participación de aminopeptidasas en los procesos de comunicación intercelular de segundos mensajeros mediados por fosfatidilinositol (FI) y posteriormente por proteincinasa C (PKC).
- b) Modulación de los transportadores de aminoácidos en SN.
- c) Regulación de la actividad de neuropéptidos opiáceos.
- d) Mediación de los efectos de las hormonas esteroideas sobre astroglia (Strosznajder, 1984; Ando y col., 1984).

Inclusive se ha propuesto que las modificaciones en la composición de los ácidos grasos son responsables de la modificación funcional de membranas biológicas y de los procesos de transducción de señales celulares, una vez liberados de las membranas celulares (Strosznajder, 1984; Ando y col. 1984). Además, que la actividad fisiológica de los AGM podría tener algún efecto protector contra deficiencias de la capacidad intelectual, asociadas al envejecimiento (Martínez-Martos y col., 1999).

Lo anteriormente expuesto sugiere, que el consumo de AO puede contribuir en la disminución del daño oxidativo desencadenado tras exposición a tolueno ejerciendo efectos protectivos principalmente sobre proteínas membranales y ácidos grasos de la membranas celulares (Visioli y Galli, 2000).

Además, los efectos benéficos de la suplementación con AO, tras un periodo de intoxicación con tolueno se pueden evidenciar por la respuesta del SN a la lesión oxidativa desencadenada por tolueno, ya que cuando el tejido nervioso ha sufrido daño se desencadena la activación de células de microglia (Kato y Walz, 2000), las cuales despliegan cambios morfológicos y fisiológicos importantes, encaminados a reparar el tejido lesionado o bien, a fagocitar detritus de células dañadas (Graeber y Kreutzberg, 1994; Kreutzberg, 1996).

Estas células, generalmente presentan forma ramificada y una baja expresión de anticuerpos inmunológicos relevantes como el complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC-II) y moléculas de adhesión (Hickey y Kimura, 1988; McGeer y col., 1993; Kreutzberg, 1996; Beyer y col., 2000). Tras su activación, éstas células se transforman y adquieren morfología de células ameboides, incrementan su actividad fagocítica, aumentan la expresión *de novo* de MHC y moléculas de adhesión y sucede proliferación como reacción secundaria a los procesos patológicos que producen daño neuronal (Walton, 1997; Nakajima y col., 2003).

Estos eventos, son regulados mediante una delicada red de citocinas y factores de crecimiento que modulan la actividad inmunocompetente de estas células (Sawada y col., 1995; Hailer y col., 1998).

Por otro lado, se sabe que virtualmente, casi cualquier evento patológico en SN puede desencadenar la activación de éstas células que permanecen en estado quiescente (Giulian y col. 1994; Kreutzberg, 1996; Minghetti y Levi, 1998; Mertsch y col., 2001).

4. Microglía.

Estas células fueron descritas por primera vez por el español Pio Del Rio Hortega (1919) quien, en virtud de su origen (mesodermo), las llamo *mesoglias*. Son más pequeñas que el resto de las células gliales, tienen una densidad numérica baja, ramificación escasa y núcleo pequeño (Walton, 1997; Fawcett, 1995). Este tipo celular se distribuye de manera uniforme en todo el cerebro normal adulto,

constituyen aproximadamente del 5-20% de la población glial (Lawson y col., 1992).

Durante los estadios tempranos del desarrollo cerebral la microglia se presenta como células con morfología similar a macrófagos periféricos, muestran un cuerpo celular relativamente grande y procesos cortos, en estas condiciones se les conoce como "*microglia ameboide*". Se considera que su función esencial es fagocitar células extrañas y restos de células muertas (*detritus*), entre las que se incluyen las neuronas (Ling, 1979; Cuadros y Navascues, 2001).

Recientemente, se ha establecido que existen dos subtipos de microglia:

1. *Microglia parenquimal*: se presentan como células ramificadas distribuidas por todo el parénquima cerebral y constituyen una población permanente de células.
2. *Microglia perivascular*: estas células son reemplazadas periódicamente por células que derivan a partir de médula ósea y que estratégicamente se localizan en la lámina basal de los capilares venosos y en plexos coroideos (Hickey y Kimura, 1988; Santambrogio y col., 2001; Williams y col., 2001).

La diferencia básica entre estos dos tipos de microglia es que la microglia perivascular expresa abundantemente el antígeno CD45, en cambio la microglia parenquimal (*en reposo o inactiva*) lo expresa escasamente (Sedgwick y col., 1991). En procesos inflamatorios, la microglia inactiva responde por sobre-regulación de antígenos CD45, CD4 y MHC (complejo mayor de histocompatibilidad) clase I, y una población minoritaria de células responde aumentando la expresión de MHC clase II (Sedgwick y col., 1991). Además, se ha demostrado que la microglia en estado de reposo libera niveles bajos de factores de crecimiento; factor de crecimiento de fibroblasto (FGF) y factor de crecimiento nervioso (NGF) (Harada y col., 2002; Rajadhyaksha y Khan, 2002).

4.1 Origen de las células microgliales.

En general, se considera que las células microgliales tienen su origen a partir de monocitos periféricos que penetran a través de la barrera hematoencefálica e invaden el parénquima cerebral donde se diferencian en microglia ramificada madura (Fig. 4) (Ulvestad y col., 1994). En contraste a su origen monocitario, se ha propuesto la teoría del origen neuroectodermico de la microglia. Acorde a esta teoría la microglia tiene su origen a partir de glioblastos derivados de neuroectodermo (células madre) (Kitamura y col., 1984; Hao y col., 1991). Por trabajos realizados en roedores, recientemente se ha establecido que la microglia se origina tanto del neuroepitelio y de la médula ósea a partir del precursor CD45 de linaje mieloide, los cuales son precursores también de macrófagos y granulocitos (Santambrogio y col., 2001).

Células de la médula ósea adulta pueden ingresar al cerebro; y aunque la mayor parte de ellas se vuelven microglias, un pequeño porcentaje puede transformarse en astrocitos, evento desconocido en humanos (Bjorklund y Suendsen, 1999).

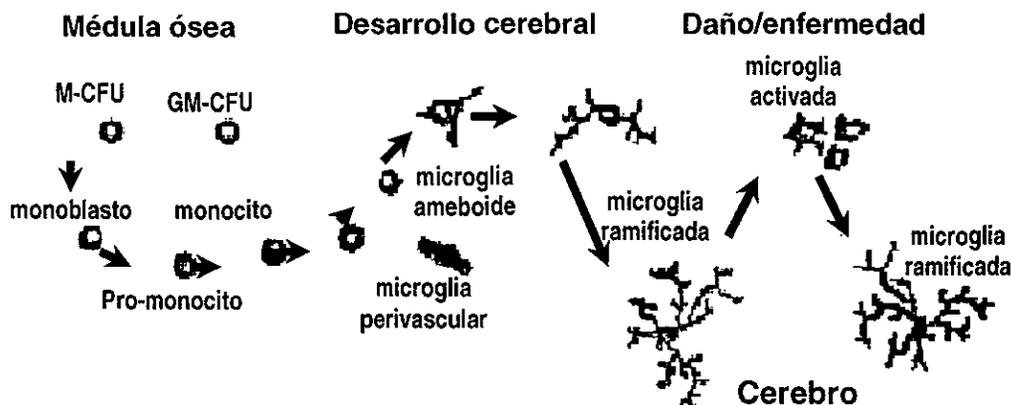


Figura 4. Microglia en el desarrollo y en cerebro adulto (Tomado de Nakajima y col., 2001).

Durante el desarrollo cerebral, la microglia ameboide es remplazada por microglia ramificada, la cual presenta un cuerpo celular pequeño y prolongaciones largas y ramificadas (Fig. 4). La microglia ramificada permanece en un estado funcionalmente inactivo y se le conoce como "*microglia en reposo*". Cuando el cerebro sufre daño o es afectado por alguna enfermedad la microglia ramificada se transforma a su estado activo "*microglia activada*" o "*microglia reactiva*", lo cual se caracteriza con retracción de sus procesos celulares, elongación del soma y proliferación celular en el área dañada (Streit y col., 1988; Zielasek y Hartung, 1996).

4.2 Activación microglial tras daño.

Cuando el cerebro es dañado o afectado por alguna enfermedad, la microglia ramificada (en reposo) se transforma a su estado de "microglia activada". Tras su activación, la microglia presenta una serie de cambios entre los que se encuentran la expresión de varios antígenos de membrana como el receptor del complemento (RC) 3, MHC clase I y clase II y la activación de la enzima 5'-nucleotidasa, la cual está asociada a la actividad funcional de la microglia (Streit y col., 1988; Streit y Colton, 1995; Salimi y Humpel, 2002). Posteriormente, la microglia activada prolifera en número alrededor de las células dañadas (Fig. 5). La microglia en estado activado se divide en OX42⁺ y Iba1⁺, de acuerdo a sus propiedades fagocíticas, y en estado no fagocítico en ED1⁻ (Fig. 4) (Streit y col., 1988; Streit, 1996; Graeber y col., 1998).

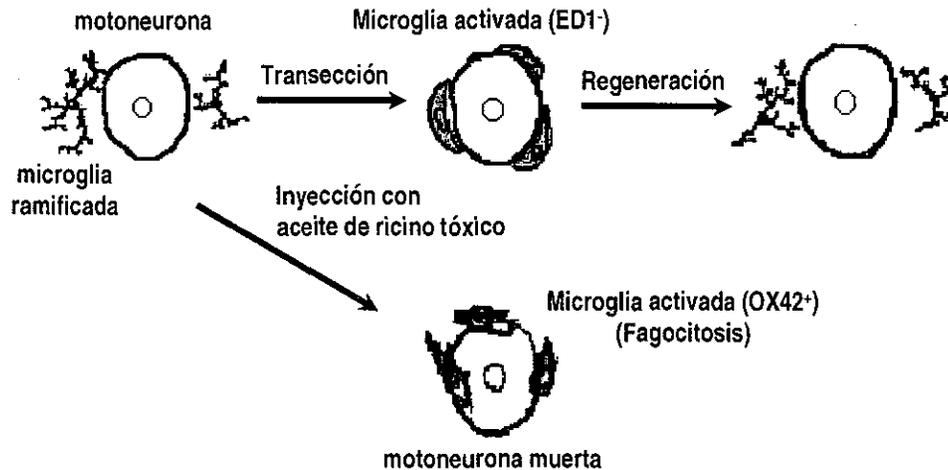


Figura 5. Respuesta microglia tras la transección del nervio facial e inyección con aceite de ricino (Tomado de Nakajima y col., 2001).

4.3 Disparadores moleculares de la activación microglial.

Los factores desencadenantes de la activación microglial se pueden agrupar en categorías como son:

1. Estimuladores no materiales. Cambios eléctricos derivados del daño neuronal y cambios iónicos en el microambiente neuronal.
2. Substancias biológicas activas. Se incluyen i) moléculas de bajo peso molecular; como pépticos y hormonas, y ii) factores de crecimiento o citocinas; entre las que se incluyen el factor estimulante de colonias (CSF) que incluye el factor estimulante de macrófagos (M-CSF) y el factor estimulante de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) (Raivich y col., 1991; Streit y Colton, 1995; Pfrieger y Barres, 1995). Mas recientemente, Nakajima y col., (2003) han publicado que la microglia puede ser activada por lipopolisacaridos (LPS) en un proceso mediado por PKC. A su vez, la activación de microglia por esta vía desencadena la inducción de factores dañinos como oxido nítrico (ON) y factor necrótico tumesófago-gástrica alfa (TNF- α) (Nakajima y col., 2003).

Tras lesión, se observa aumento en la expresión de receptores para M-CSF y GM-CSF, los cuales se inducen proliferación y transformación microglial. Se cree que estos CSFs son producidos y liberados por astrocitos de los alrededores (Raivich y col., 1991).

Existen otros activadores como el péptido relacionado con el gen para calcitonina (CGRP) y ATP (Priller y col., 1995), considerados como elementos derivados de neuronas en el modelo de nervio facial seccionado (Fig. 6). Los cuales inducen la transcripción de mRNA en microglia. Así mismo, el ATP puede inducir quimiotaxis (Honda y col., 2001), liberación de plasminógeno (PGn) (Inoue y col., 1998), interleucina (IL-1b) y activación del factor nuclear (FN) kB a partir de microglías en cultivo (Fig. 6) (Ferrari y col., 1997).

4.4 Proliferación microglial.

La proliferación celular es una característica de la microglia activada *in vivo*, los factores que desencadenan la actividad mitótica en microglia se han descrito como cierta clase de CSF. La microglia puede proliferar como respuesta a GM-CSF, M-CSF y multi-CSF (IL-3) (Giulian e Ingeman, 1988).

Existen reportes que muestran que CSF's, IL-2, IL-4, IL-5 y el TNF inducen proliferación celular a partir de microglia en cultivo (Giulian y col., 1991).

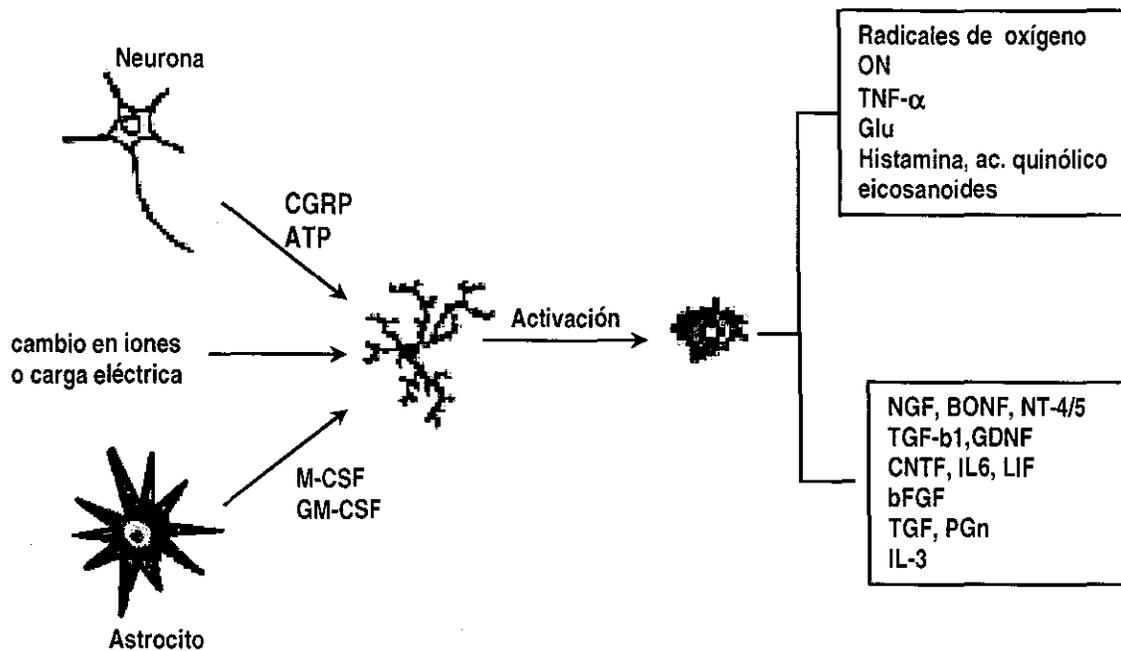


Figura 6. Moléculas que generan la activación microglial y moléculas derivadas de factores citotóxicos y neurotróficos (Tomado de Nakajima y col., 2001).

4.5 Actividad citotóxica de la microglia.

Se ha observado que la microglia puede ejercer efecto citotóxico en padecimientos crónicos, entre estos efectos se pueden mencionar las reacciones inflamatorias que van acompañadas de proliferación microglial e infiltración de células sanguíneas periféricas, a partir de las cuales se generan moléculas citotóxicas y citocinas proinflamatorias. Estas moléculas desencadenan reacciones secundarias que pueden provocar daño o muerte de neuronas vulnerables (Colton y Gilbert, 1987).

A partir de microglia en cultivo se ha logrado elucidar que, al igual que macrófagos periféricos, la microglia puede sintetizar algunas moléculas con potencial citotóxico entre los que se pueden incluir el anión súperoxido ($O_2^{\bullet -}$) (Colton y Gilbert, 1987; Colton y Gilbert, 1993; Colton y col., 1994), óxido nítrico

(ON) (Boje y Arora, 1992; Colton y col., 1996) y citocinas proinflamatorias (Fig. 6). Otros factores dañinos secretados por microglia son los lipolisacaridos (LPS), interferon-gamma (INF- γ) y la proteína β -amiloide (McDonald y col., 1997).

Entre las especies reactivas de oxígeno (ERO) se incluyen: el anión ($O_2^{\bullet-}$), hidroxilo (-OH) y peroxido de hidrógeno (H_2O_2); los cuales son especialmente dañinos para oligodendrocitos y su mielina, esto debido a su capacidad de inducir peroxidación lipídica. (Meda y col., 1995). Los óxidos de nitrógeno como el ON, son radicales libres altamente reactivos. Se cree que estos radicales ejercen efecto inhibitorio sobre enzimas respiratorias mediante la oxidación del grupo sulfídrico (SH) de las proteínas y pueden ejercer daño sobre el, proceso que puede desencadenar muerte celular (Meda y col., 1995).

4.6 Acción neurotrófica de la microglia activada.

Para evaluar la actividad neurotrófica de la microglia activada se han realizado estudios para conocer la interacción neurona-microglia en cultivo a partir de tejido embrionario. En este modelo de estudio, se ha observado que, a pesar de las propiedades fagocíticas de la microglia activada en cultivo, estas células no producen IL-1b, TNF- α y ON (Nakajima y col., 1989).

Al analizar el efecto que ejerce la microglia sobre la supervivencia neuronal en un sistema en co-cultivo, la microglia no desencadena la muerte sobre neuronas sanas *in vitro* (Cheng y col., 1994). En seguida, mediante la utilización de un medio condicionado de microglia (MCM) y su efecto sobre las neuronas, se pudo comprobar que microglia no expresa su capacidad neurotóxica, por el contrario, el MCM aumenta la supervivencia neuronal y promueve el desarrollo de neuritas de neuronas corticales (Nakajima y col., 1989). Además el MCM promueve el desarrollo de neuritas y la supervivencia de neuronas mesencefálicas (Nagata y col., 1993). En resumen, se ha observado que MCM ejerce un efecto muy pobre sobre neuronas glutamatérgicas y colinérgicas (Nagata y col., 1993).

Las moléculas neurotróficas aisladas a partir de MCM son las neurotrofinas, interleucina-6 (IL-6), factor de crecimiento de fibroastos-2 (FGF-2), TGF-2, plasminógeno (PGn) y otros factores como IL-2 e IL-3. También se han descrito

otros factores que pueden ejercer efectos tróficos neuroprotectivos sobre el SN y son las interleucinas 2 y 3 (IL-2; IL-3) (Ganter y col., 1992). El factor IL-3 promueve la supervivencia y crecimiento de neuritas sobre neuronas neocorticales y se ha reportado que ejerce efecto neurotrófico sobre neuronas colinérgicas. Esta citocina se libera por microglia no activada. En cuanto a IL-2 no se ha establecido claramente su procedencia microglial (Ganter y col., 1992).

5. Corteza cerebral.

5.1 Importancia del estudio de la corteza prefrontal.

La corteza prefrontal (CPF) de la rata incluye las áreas correspondientes a la corteza orbital y del cíngulo. Esta región se caracteriza por poseer una alta invasión dopaminérgica y está involucrada en el desarrollo de tareas que implican una relación espacial (Preus, 1995). La corteza orbitofrontal de la rata se relaciona con el desarrollo de la capacidad de elección, discriminación y acción, con la conducta social y emociones, estas actividades son dependientes de las conexiones recíprocas con la amígdala. Funcionalmente, la CPF se relaciona con el control del aprendizaje y memoria representacional (Bechara y col., 1999; Schoenbaum y Setlow, 2001).

También se asocia a conductas de elección y de consumo voluntario. Por ejemplo, la elección del consumo voluntario de alcohol en lugar de agua y la disminución en la actividad locomotora de ratas está relacionada con la producción de DA unilateralmente (lóbulo izquierdo) de la mCPF (Nielsen y col., 1999).

Por otra parte se sabe que el estrés activa el sistema catecolaminérgico periférico y central, por lo que puede inducir aumento en la concentración de DA en CPF, que es especialmente sensible al efecto de diferentes estresores tales como el manejo, temor inducido y/o exposición a ambientes novedosos (Davis y col., 1994). Lo que puede desencadenar una variedad de cambios conductuales que permiten que el animal pueda huir o buscar sitios de escape al estímulo desagradable ("*fight or fly*") (Carlson y col., 1993).

El área cortical prelimbica-infralimbica de la CPF de roedores esta relacionada con la memoria de trabajo espacial (Ragozzino y col., 1998). El

desarrollo de memoria Pavloviana (estimulo aprendizaje-recompensa) se integra en la mCPF (Bussey y col., 1997), mientras que la corteza prefrontal (orbitofrontal) está relacionada con el aprendizaje por reforzamiento, procesos motivacionales y aprendizaje por asociación. Los resultados obtenidos por Gallagher y col., (1999), indican que la corteza orbitofrontal es crítica para regular el uso de la información que dirige la conducta de ratas tras el aprendizaje por insentivación.

Recientemente se ha observado que el tolueno ejerce efecto neurotóxico sobre las neuronas de la corteza prefrontal de ratas, lo cual desencadena la respuesta neuroconductual característica (Rogers y col., 1999; Gerasimov y col. 2002). El tolueno ejerce sus efectos neuroconductuales por alteración en la función de algunos receptores ionotrópicos de manera muy específica y por cambios en la transmisión dopaminérgica (CPF) (Rogers y col., 1999; Gerasimov y col. 2002). Además, se ha observado que el abuso de solventes provoca reducción del volumen del área prefrontal cortical, lo cual se relaciona estrechamente con el desarrollo anormal de actividades cognitivas y en la adquisición de habilidades mediadas por la corteza frontal (Fein y col. 2002).

Por lo anteriormente expuesto, resulta de suma importancia estudiar el efecto de la exposición subcrónica con tolueno, como paradigma de lo que sucede en humanos expuestos voluntaria o laboralmente a este solvente. Por ello, con la finalidad de entender el mecanismo de respuesta al daño desencadenado en el cerebro por exposición a este solvente, se provocó intoxicación subcrónica a un grupo de ratas durante corto tiempo, para determinar si se producen lesiones en el tejido nervioso que se manifiesten por aumento del número de células microgliales. Asimismo, se analizaron los efectos preventivos y de recuperación de las lesiones, por el consumo de aceite de oliva, puesto que hasta el presente no se ha establecido si los componentes del aceite de oliva ejercen efectos favorables sobre la plasticidad del tejido nervioso lesionado, no obstante que se ha demostrado su importancia en la respuesta inflamatoria y en la composición y funcionalidad de las membranas biológicas.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Recientemente ha aumentado el número de reportes que involucran a la generación excesiva de radicales libres, el desarrollo de estrés oxidativo y una deficiente actividad antioxidante con una gran cantidad de eventos patológicos que tienen como consecuencia el desarrollo de trastornos neurodegenerativos.

Un ejemplo de este tipo de patología es el que se presenta tras la exposición a cierto tipo de compuestos químicos, en particular a los solventes orgánicos.

El solvente más comúnmente utilizado es el tolueno, el cual al ser metabolizado eleva la producción de radicales libres de oxígeno que pueden alterar la estructura y función de las membranas neuronales al provocar aumento significativo en la peroxidación de lípidos específicos. Paralelamente puede desencadenar disminución en los niveles de glutatión (GSH), el cual desempeña una función neuroprotectora importante contra la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) en SNC. Esto sugiere que la acción neurotóxica del tolueno tiene relación con la concentración y funciones de estos compuestos en membranas biológicas de células nerviosas. Por otro lado, también son numerosos los reportes que proponen la utilización de agentes terapéuticos antioxidantes para prevenir el daño y la muerte neuronal. Algunos de los productos más comúnmente utilizados son vegetales, o productos derivados de estos, ricos en antioxidantes, vitaminas y otros suplementos dietarios. Uno de estos productos es el aceite de oliva (AO), el cual se ha utilizado para prevenir la peroxidación de lípidos debido al estrés oxidativo y como fuente importante de ácidos grasos monoinsaturados que pueden incorporarse a membranas biológicas. Estas propiedades del AO pueden resultar útiles para disminuir el daño oxidativo desencadenado sobre las membranas neuronales de SNC. Trastorno que se acompaña por cambios en la proliferación microglial en las estructuras sensibles a la exposición subcrónica con tolueno.

III. JUSTIFICACIÓN.

Hoy en día, se sabe que el tejido nervioso es especialmente vulnerable al estrés oxidativo que puede provocar daño irreversible o muerte neuronal. Un ejemplo de éste daño se produce tras la exposición voluntaria o involuntaria a tolueno, donde se genera una gran cantidad de radicales libres que pueden exacerbar el daño oxidativo. Esto conduce a la aparición de alteraciones en la composición y fluidez de las membranas neurales, así como trastornos en la función de proteínas membranales.

Este daño puede ser evidenciado a partir de la valoración de trastornos neuroconductuales tales como desarrollo de hostilidad, ansiedad, hiperactividad, alteraciones motoras y de equilibrio, entre otros. Otro nivel de valoración de los daños por el estrés oxidativo, es el tejido nervioso. Tras el daño en las células nerviosas, se desencadena la actividad de las células de microglia. Por lo que el monitoreo de la población de esta estirpe celular, resulta ser una herramienta eficaz para evidenciar la magnitud del daño oxidativo desencadenado en sistema nervioso tras la exposición subcrónica con tolueno.

Así mismo, se considero la utilización del aceite de oliva como un posible neuroprotector al efecto del estrés oxidativo, ya que posee elementos antioxidantes importantes como fenoles, tocofenoles, clorofilas, esteroides, escualeno y vitaminas K y E; además, de su contenido de ácidos grasos monoinsaturados que pueden brindar resistencia al daño oxidativo y proveer elementos estructurales importantes para mantener la integridad de las membranas celulares.

Por lo anteriormente expuesto, la suplementación con aceite de oliva a un grupo de ratas expuestas a intoxicación oral subcrónica con tolueno permitirá valorar el efecto protector contra el estrés oxidativo desencadenado sobre sistema nervioso mediante la aplicación de pruebas neuroconductuales y la respuesta proliferativa de las células de microglia.

IV. HIPÓTESIS.

El incremento de ácidos grasos dietario no esterificados provenientes del aceite de oliva disminuye los efectos neurotóxicos del tolueno después de un periodo de intoxicación subcrónica con tolueno.

V. OBJETIVO GENERAL.

Determinar si el consumo de una dieta suplementada con ácidos grasos no esterificados ejerce efectos neuroprotectivos contra daño oxidativo en ratas sometidas a intoxicación subcrónica con tolueno.

VI. OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Determinar el efecto de la intoxicación subcrónica con tolueno y la suplementación con aceite de oliva sobre los niveles séricos de triglicéridos en ratas a los días 5 y 10 de intoxicación.
2. Determinar si la intoxicación con tolueno y la suplementación con AO ejercen efectos sobre la ganancia de peso corporal.
3. Determinar los efectos de la exposición a tolueno y la suplementación con AO sobre el peso cerebral.
4. Determinar los efectos de la intoxicación subcrónica con tolueno y la suplementación con aceite de oliva sobre la capacidad locomotriz y de equilibrio de ratas.
5. Estudiar la población de células de microglia, frente al daño neurotóxico desencadenado tras exposición a tolueno y el efecto de la suplementación con aceite de oliva.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS.

7.1 Procedimiento General.

Se utilizaron 80 ratas adultas machos Sprague-Dawley entre 250 a 280 g de peso corporal alojadas en jaulas transparentes de policarbonato (43 cm de longitud x 26 cm de ancho x 19 cm de altura) con tapas de malla de acero inoxidable y con cama de aserrín, mantenidas a 22.4°C de temperatura y 57-60% de humedad con ciclos de luz-oscuridad de 12 h, agua a libre acceso y alimentadas con una dieta balanceado para roedores constituida por 28% de proteína, 2.5% de grasa, 6% de fibra, 1% de calcio, 0.5% de fósforo y 12 % de humedad durante todo el estudio.

Estas ratas se dividieron en 4 grupos: Control intacto (CI, n=15), vehículo (VEH, n=15), grupo intoxicado vía esófago-gástrica con tolueno (TOL, n=25) y grupo suplementados con aceite de oliva (AO) 30 min antes de la intoxicación con tolueno (AO-T, n=25). Todos los animales fueron dosificados vía esófago-gástrica, con una cánula curva de acero inoxidable numero 18.

Los animales intoxicados recibieron, sin previo ayuno, una dosis inicial de 0.5 g/kg/día de tolueno, esta dosis se ajustó progresivamente durante 10 días (fase de intoxicación), de acuerdo a la respuesta de la rata hasta alcanzar la dosis máxima de 2g/Kg/día. Esta dosis fue seleccionada debido a que en ensayos preliminares fue la dosis máxima que puede recibir una rata sin provocar inconsciencia o muerte.

Los animales tratados con AO recibieron por la misma vía entre 1.5-2.0 ml. Para el grupo (AO-T), la administración con AO se efectuó 30 min previos a la intoxicación con tolueno. Los grupos CI y VEH recibieron solo agua destilada (1.5 ml) o AO respectivamente hasta finalizar el estudio.

Tras el periodo de intoxicación de 10 días, los animales correspondientes a los grupos TOL y AO-T fueron divididos en dos subgrupos cada uno y se dejaron recuperar durante 20 días, en éste tiempo 10 ratas del grupo TOL se suplementaron con AO (grupo T-AO), mientras que, las ratas restantes consumieron su dieta normal para roedores a libre acceso (grupo TOL) (cuadro 3).

Por otra parte, a la mitad de animales del grupo AO-T se les mantuvo la suplementación con AO (grupo AO-AO) hasta finalizar el estudio y, a los animales restantes se les suprimió la administración de AO (grupo AO-D). De acuerdo a las diferentes condiciones experimentales se obtuvieron las variables de estudio descritas en el cuadro 3.

Cuadro 3. Grupos experimentales y tratamientos resultantes a partir de las distintas variables experimentales que fueron establecidas durante la primera etapa del estudio (intoxicación) y la subsiguiente etapa de recuperación.

Grupos experimentales	Tratamientos	Recuperación (20 días)	
CI	Dosificación esófago-gástrica con agua destilada (1.5 ml)	Mismo tratamiento hasta finalizar el estudio.	
VHE	Dosificados con AO (aprox. 1.5-2.0 ml)		
TOL	Intoxicados con tolueno 2g/kg/día/10 días	Grupo	Tratamiento
		T-AO	Suplementados con AO/20 días (aprox. 1.5-2.0 ml)
		TOL	No suplementados con AO
AO-T	Suplementados con AO 30 min previos a intoxicación con tolueno	AO-AO	Continuaron su suplementación con AO durante 20 días
		AO-D	Supresión de dosificación con AO

La administración previa con aceite de oliva tuvo como propósito determinar si este compuesto ejerce neuroprotección frente a la intoxicación con tolueno, evaluada mediante cuantificación de microglia y trastornos neurológicos. Los animales que solamente recibieron tolueno permiten conocer la magnitud del daño

resultante por la intoxicación con tolueno sobre el cerebro, mientras que el grupo de animales que solo recibieron aceite de oliva hizo posible determinar los efectos dietarios del aceite sobre el peso corporal. Por otra parte, la suplementación con aceite de oliva de acuerdo a las variables establecidas en este protocolo permitió evaluar cual de las condiciones de suplementación con aceite fue la mejor de acuerdo al modelo establecido.

7.2 Cuantificación de triglicéridos en suero.

Para evaluar los efectos tras intoxicación por tolueno en animales suplementados y no suplementados con AO, se determinaron los niveles séricos de triglicéridos (TGC) los días 5 y 10 de la primera etapa del estudio (intoxicación). Para esto se obtuvieron muestras de sangre periférica (1.0 ml) a partir del seno venoso orbital (Nebendabl, 2001) de ratas sometidas a previo ayuno y bajo anestesia. La sangre se colectó en tubos cónicos de plástico, sin heparina. Cada muestra fue centrifugada a 1000 rpm/5 min a temperatura ambiente para separar y colectar el suero. Los sueros se congelaron y almacenaron a -20°C para su posterior utilización.

Las concentraciones séricas de TGC se evaluaron mediante un método enzimático (Wahelefeld y Bergmeyer, 1974; Passing y Bablok, 1983; Shephard y Whiting, 1990; Stein y Myers, 1995) para lo cual, se utilizó un "kit" comercial (Triglyceride, Cat. 218-15 de Diagnostic Chemycal Clinic), se obtuvieron las absorbancias de las muestras en un espectrofotómetro semiautomatizado (Loryc, Clima Jr. y Clima Plus) y se calcularon las concentraciones séricas de TGC.

Los resultados fueron analizados mediante la prueba de variancia aleatorizada (ANOVA) de una vía y la comparación de medias se efectuó por la prueba de diferencia mínima significativa (DSM) con diferente número de repeticiones a una $p < 0.05$.

7.3 Evaluación de daño neurotóxico.

7.3.1 Prueba de equilibrio en cilindro giratorio.

Se aplicó la prueba de equilibrio en rodillo giratorio (*rotarod test*) de acuerdo al método propuesto por Dunham y Miya (1957), ya que esta prueba se ha utilizado ampliamente para evidenciar el daño neurotóxico que pueden ejercer ciertas sustancias —incluido el tolueno— sobre el cerebro, lo cual se evidencia por alteraciones en la capacidad motora de los animales expuestos (Thiel y Chahoud, 1997; Da-Silva y col., 1990; Hougaard y col., 1999). Para esta prueba se utilizó un cilindro de 3.2 cm de diámetro y una velocidad constante de giro de 10 rpm. Antes de iniciar los ensayos, cada animal de los grupos TOL y AO-T fueron sometidos a una prueba de habituación, para lo cual se colocó a cada animal sobre el rodillo giratorio durante 1 min (Fig. 7).

Tras la prueba de habituación, los ensayos en las ratas se llevaron a cabo durante 10 días consecutivos entre las 12:00 y 15:00 h, 30 min tras intoxicación con tolueno, por un máximo de 3 min. El registro del tiempo sobre el rodillo se inicio a partir de que el animal fue colocado sobre el rodillo giratorio y se detuvo una vez que el animal perdía el equilibrio (caía o se resbalaba del rodillo), o cuando el animal completaba los 3 min de la prueba. Los resultados fueron analizados mediante la prueba de variancia aleatorizada (ANOVA) de una vía, seguido por la prueba de Tukey a una $p < 0.05$.

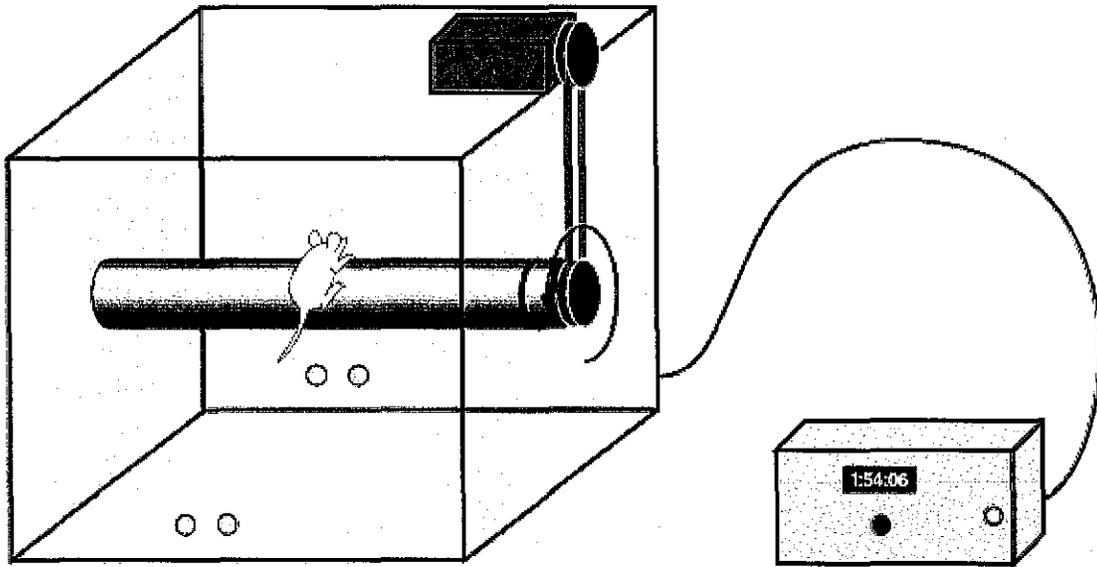


Figura 7. Muestra prueba de equilibrio en rodillo giratorio.

7.4 Efectos emocionales posintoxicación.

7.4.1 Prueba exploratoria en campo abierto (*Open field test*).

La prueba conductual en campo abierto (CCA), es una prueba que se ha utilizado ampliamente desde 1934, como herramienta para medir la conducta emocional de animales. Este instrumento para evaluación emocional fue desarrollado por Calvin Hall (1934), se orienta principalmente a la evaluación emocional y de actividad (exploración).

Esta prueba fue utilizada para evaluar el efecto psicofarmacológico de la exposición subcrónica con tolueno tras un periodo breve de recuperación y el efecto de la suplementación con AO. Además, la repetición de esta prueba una semana después, permitió evaluar si el daño ocasionado sobre SNC tras la intoxicación subcrónica con tolueno se revierte tras un periodo breve de recuperación de la lesión y el efecto protector de la suplementación con AO.

Para ésta prueba se utilizó una caja de acrílico transparente con dimensiones de 60 x 60 x 10 cm (Fig. 8), en la cual se evaluó la conducta exploratoria a los animales de todos los grupos experimentales; las sesiones se realizaron en aislamiento, en silencio y a la misma hora (11:00 AM - 13:00 PM). Todos los ensayos fueron filmados para su análisis posterior. Los ensayos, comenzaron con la prueba de habituación al día 10 de haber empezado la fase de recuperación y, al día siguiente, se realizó la primera sesión de trabajo; Esta consistió de tres ensayos —uno por día—, de 3 min cada uno y en el día 18 se realizó la segunda sesión en las mismas condiciones.

El análisis de las sesiones, se realizó utilizando un monitor de televisión al cual se le colocó un acetato cuadriculado para cuantificar el número de cuadros cruzados por animal (Fig. 8). Los resultados fueron analizados mediante la prueba de variancia aleatorizada (ANOVA) de una vía, seguida por la prueba de DMS con diferente numero de repeticiones ($p < 0.05$).

7.5 Registro de peso corporal.

Diariamente se pesaron todas las ratas entre las 9:00 AM y 11:30 AM hasta finalizar el estudio, para evaluar el efecto de la intoxicación con tolueno y suplementación con aceite de oliva. Además, se utilizó el peso para calcular el ajuste de las dosis, según las diferentes condiciones experimentales.

El análisis de los resultado se efectuó mediante la prueba de varianza aleatorizada de una vía (ANOVA) seguida por la prueba de Tukey a una $p < 0.05$.

7.6 Registro del peso cerebral.

Al final de la fase de intoxicación (día 10), 5 animales de cada grupo experimental fueron sometidos a anestesia profunda con una sobredosis intraperitoneal (ip) de pentotal sódico tras lo cual se decapitaron y se obtuvieron los cerebro sin lóbulos olfatorios y se registro el peso cerebral en base húmeda. Este registro permitió evaluar el posible el posible edema por la exposición subcronica a tolueno, así mismo, se pudo evaluar el efecto por la suplementación

previa con AO. Se utilizó la prueba de ANOVA y la comparación de medias mediante la prueba DMS ($p < 0.05$).

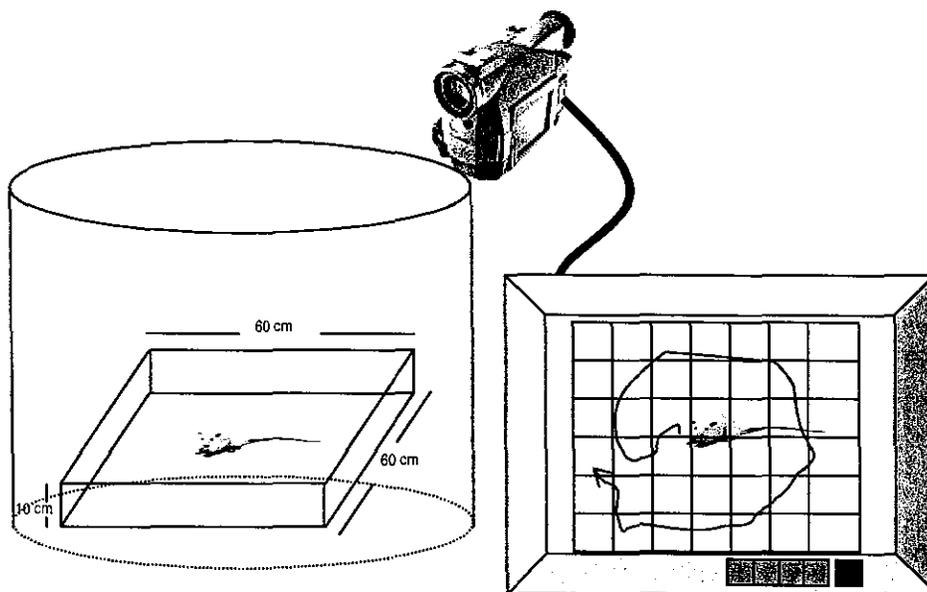


Figura 8. Estrategia para la evaluación de la actividad locomotora en campo abierto y cuantificación de la distancia recorrida.

7.7 Marcaje de la población microglial.

La visualización de células microgliales se realizó por el método histoquímico descrito por Streit (1990), en el cual se visualizan histoquímicamente células de microglia utilizando lectinas. Este método permite observar la morfología de todas las células microgliales, independientemente de su estado funcional, ya que está basada en la afinidad química de las isolectinas en los residuos de azúcares en la cubierta de estas células

7.7.1 Procedimiento general.

a) Preparación de tejidos para inmunohistoquímica.

35 días después de haber iniciado los experimentos, los animales fueron anestesiados profundamente mediante inyección i.p. de pentotal sódico en agua destilada (tiopental) a dosis de 10 mg/100 g de peso y se practicó perfusión intravascular. Primero se hicieron pasar aproximadamente 100 mL de solución salina fisiológica a 37°C/4 min para lavar la mayor cantidad de sangre, en seguida se hizo pasar por 4 min la solución fijadora constituida por paraformaldehído al 4.0 % en tampón de fosfatos 0.1 M a pH 7.2 a 37°C. Se practicó craneotomía a los animales perfundidos para extraerles su cerebro sin lóbulos olfatorios; los cerebros se posfijaron en la misma solución fijadora durante 24 h a 22 °C, posteriormente se lavaron en amortiguador de fosfatos (pH 7.3) durante 48 h a 4°C. Los tejidos fueron deshidratados en series crecientes de alcohol y xileno y fueron procesados para su inclusión en parafina. Con un micrótopo se obtuvieron cortes coronales de 20 µm de espesor, los cuales fueron procesados para identificación de microglía mediante la técnica histoquímica de Isolectina-B4. Se obtuvieron los cortes comprendidos entre las coordenadas interaural 13.2 mm y 7.7 mm del atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (Paxinos y Watson, 1982), a nivel de la porción anterior de hipocampo. Durante todo el estudio se tuvo especial cuidado en la homogeneidad del espesor de los cortes y su orientación.

7.7.2 Inmunotinción para microglia.

a) Desparafinado y rehidratación de tejidos en portaobjetos.

Las laminillas seleccionadas fueron desparafinadas y rehidratadas; inicialmente se hicieron 3 cambios de 10 min en xileno, seguidos por dos cambios sucesivos en alcohol en orden decreciente hasta llegar a agua destilada. Cada uno de estos pases fue de 5 min y a continuación los tejidos fueron sumergidos en amortiguador de fosfatos (PB) 0.1 M (5.3 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 28.0 g K_2HPO_4) para continuar con el desenmascaramiento de epítopes.

b) Desenmascarado electroquímico.

Para la realización del desenmascaramiento electroquímico, se empleó una cámara electroquímica en la cual se sumergieron los tejidos completamente en PB 0.1 M y se aplicó, mediante electrodos, una corriente eléctrica de entre 110 – 115 voltios hasta alcanzar 50-55 °C de temperatura. Este proceso se repitió dos veces (10 min).

Completado el tratamiento desenmascarado, se hizo un lavado rápido en PBS 0.1 M y se procedió al bloqueo de peroxidasas endógenas (Garzón de la Mora y col., 1996).

c) Bloqueo de peroxidasas endógenas.

Se llevó a cabo mediante incubación de los tejidos durante 15 min a temperatura ambiente (sin agitación) en una mezcla que contenía 25 mL de PBS 0.4 M; 10 ml de metanol absoluto; 2 ml de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y agua destilada hasta completar 100 ml. Posteriormente, se hicieron dos lavados de 15 min con una solución lavadora constituida por tampón fosfato 0.1 M; albúmina sérica bovina al 0.1% y Tritón X-100 al 0.2%. Esta solución fue utilizada en los siguientes lavados e incubaciones.

d) Incubación en solución de cationes.

Tras el bloqueo de peroxidasas endógenas, los portaobjetos con los tejidos fueron lavados mediante dos cambios de 15 min con tampón *PBS* 0.1 M para eliminar el exceso de peróxido de hidrógeno, a continuación fueron sumergidos durante 10 min en una solución tampón que contenía cloruro de calcio 0.1 mM; cloruro de magnesio 0.1 mM y cloruro de manganeso 0.1 mM. Una vez completada la incubación se hicieron dos cambios rápidos con solución lavadora.

e) Eliminación del fondo.

Para eliminar el marcaje inespecífico (fondo), se incubaron los tejidos durante 1.3 h en una solución constituida por 0.91 g de lisina y 0.36 g de glicina disueltas en 25 mL de *PBS* 0.1 M y 1% de suero de conejo. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron dos lavados de 5 min sin agitación con la misma solución lavadora.

f) Incubación con Isolectina-B4.

Los tejidos fueron incubados durante 24 h, a temperatura ambiente en cámara húmeda, con Isolectina-B4 [*Griffonia simplicifolia* (Vector L-1104)] en dilución 1:100 durante 24 h; completada la incubación se hicieron dos lavados de 15 min y los tejidos se incubaron en el anticuerpo (ac) primario *anti-isolectina-B4* generado en cabra (Vector AS-2104) en dilución 1:100 durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Completada la incubación, los cortes se lavaron para eliminar el exceso de ac, posteriormente los tejidos se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente en cámara húmeda con el ac secundario, *anti-IgG* de cabra biotinilado, generado en conejo (Vector BA-5000) disuelto 1:100 en *PBS*. Al finalizar la incubación, se hicieron dos lavados y los tejidos se incubaron 2 h a temperatura ambiente en cámara húmeda con el complejo ABC (Vector) a la dilución recomendada por el fabricante, para formar un complejo inmunoenzimático con el ac secundario. Una vez completada la incubación los cortes se lavaron nuevamente y se procedió al revelado de la reacción. Para ello

los tejidos se sumergieron en una solución de *DAB* (3,3'-diaminobencidina) al 0.03%, y H_2O_2 al 0.01% en tampón fosfatos 0.1 M a pH 7.2. Efectuado el revelado, se hicieron tres lavados rápidos con tampón PBS 0.1 M. Al finalizar el procedimiento, los cortes fueron secados en una estufa a 37°C y se procedió a su deshidratación en series crecientes de alcohol etílico y xileno y se montaron en resina para su análisis microscópico.

7.7.3 Análisis cuantitativo de la población microglial.

Los cortes fueron examinados con un analizador de imágenes Leica QWIN500 y se estudiaron siempre las mismas áreas de la corteza prefrontal (Fig. 9). Para realizar la cuantificación, se dividió arbitrariamente la corteza en tres capas (superficial, media y profunda) (Fig. 9). Esto debido a que existen reportes en los cuales se muestra que en cerebro adulto de roedores la distribución de microglia es muy heterogénea y existen variaciones, aún en la misma región (Lawson y col., 1990; Vela y col., 1995).

Una vez seleccionada el área de cuantificación, las observaciones se realizaron con el objetivo 40x, se registró el número de células de microglia de cada estrato. Solo se cuantificaron las células que aparecían en un plano de foco ($738 \mu m^2$), cuyo soma podía ser identificado. Se realizó la cuantificación de 100 campos por estrato de cada grupo experimental. Se analizaron entre 5-10 cortes consecutivos de cada animal y se cuantificó un promedio de 6-9 campos por corte y para evitar repeticiones de las células cuantificadas, se registró en papel y con ayuda de un brazo de dibujo (cámara clara) el sitio donde se localizó cada célula para su posterior registro. Los datos se analizaron mediante la prueba de varianza aleatorizada (ANOVA) seguida por la prueba de Tukey a una $p < 0.05$.

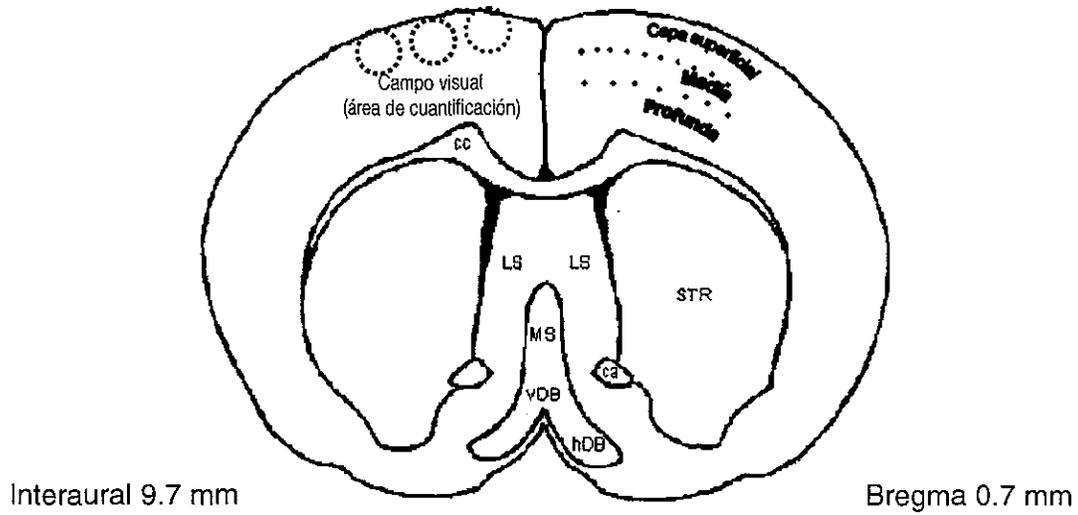


Figura 9. Estrategia de cuantificación de la población celular inmunoreactiva a isolectina-B4 (microglia). Los círculos punteados representan los campos para cuantificación con el objetivo 40 x. La región contralateral muestra la forma en que se subdividió la corteza para cuantificación.

VIII. RESULTADOS

8.1 Signos clínicos.

Solo se presentaron signos clínicos en los grupos de animales tratados con tolueno (TOL y AO-T) y consistieron en ataxia hiperactividad locomotriz, incoordinación, excitación y acicalamiento, seguido de postración. Con el incremento de las dosis se produjo inapetencia y polidipsia, caquexia, pelo hirsuto, problemas respiratorios y renales, e incluso muerte súbita de algunos animales de ambos grupos (Cuadro 4).

Para la etapa II (recuperación), los animales sobrevivientes de cada grupo que se subdividieron en dos subgrupos cada uno presentaron lo siguientes porcentajes de mortalidad: 28.57% de los animales del grupo TOL y de 14.28% para el grupo AO-T. El grupo AO-D presento 25% y el grupo AO-AO un 12.5%. Esto muestra que independientemente de la suplementación con aceite de oliva los efectos tóxicos del tolueno se mantienen en el tiempo.

Cuadro 4. Porcentaje de animales muertos tras dosificación esófago-gástrica con tolueno (2g/kg/día) en ratas suplementadas con aceite de oliva, previo a la intoxicación con tolueno y ratas no suplementadas con aceite de oliva.

<i>Dosis suministradas</i>	<i>Grupo</i>	
	<i>TOL</i>	<i>AO-T</i>
1	1	---
2	2	1
4	1	1
5	2	1
6	---	1
Total	6	4
Porcentaje	24%	16%

8.2 Triglicéridos séricos.

La concentración sérica de triglicéridos para el día 5 de la fase de intoxicación mostró aumento significativo ($p < 0.05$) en los grupos VEH (9.42 %) y TOL (10.21 %) en comparación con el grupo CI; en contraste, el grupo AO-T presentó valores muy similares al control registrando un aumento de solo 0.84 %. Para el día 10, el grupo VEH presentó una disminución de 0.37 % en relación al CI. A diferencia el grupo TOL, mostró un aumento del 4.76 % y AO-T que presentó un ligero incremento de 1.6 %.

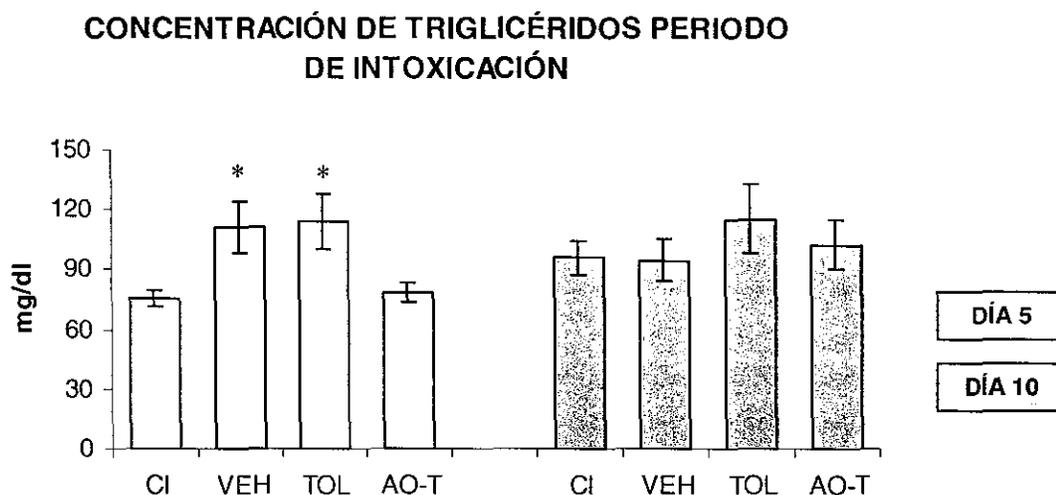


Figura 10. Comparación entre las concentraciones séricas de triglicéridos de sangre periférica de ratas al día 5 y 10 de la fase de intoxicación subcrónica con tolueno, suplementadas y no suplementadas con aceite de oliva, y el efecto por el suplemento con AO sin intoxicación (VEH). Se presentan los valores promedios de TGC séricos (mg/dl \pm ES); Para el día 5 (bloque de la izquierda) se utilizó una $n=10$ para los grupos CI y VEH y una $n=12$ para TOL y AO-T. Para el día 10 (bloque de la derecha) se utilizó una $n=10$ para cada grupo experimental. Los asteriscos muestran las diferencias significativas ($*p < 0.05$) de los grupos vs el CI.

8.3 Prueba de equilibrio en cilindro giratorio.

La evaluación del efecto neurotóxico del tolueno mediante la prueba de equilibrio en rodillo giratorio (*rotarod test*) a los grupos TOL y AO-T (n=18/grupo), mostró diferencias significativas entre grupos ($p<0.05$) (Fig. 12). El monitoreo diario evidenció el mejor desempeño del grupo AO-T vs TOL (Fig. 11). Aunque los animales de ambos grupos no lograron registrar los 180 seg designados para esta prueba. Por otro lado, el promedio diario registrado para cada grupo experimental TOL y AO-T permitió evaluar el desarrollo de tolerancia al tolueno, lo cual fue útil para el ajuste creciente de las dosis de tolueno. Los tiempo promedios de equilibrio registrados al final del periodo de intoxicación (24.6912 ± 1.40 para TOL y 50.64 ± 2.21 para AO-T) evidenciaron que la suplementación con AO disminuyó los efecto neurotóxico y depresivo del tolueno.

8.4 Conducta exploratoria en campo abierto (*open field test*).

Para el día 20 de recuperación, tras la intoxicación esófago-gástrica con tolueno se evaluó la actividad locomotriz de una n=5 animales CI y VEH y una n=4 para el resto de los diferentes grupos experimentales. La actividad locomotora en campo abierto mostró diferencias significativas ($p<0.5$) entre los grupos TOL y T-AO con respecto al control. Los resultado de ésta prueba mostraron disminución en la actividad exploratoria vs CI en los grupos VEH (-3.9%), AO-D (-3.6%) y AO-AO (-6.48); mientras que los grupos TOL y T-AO presentaron aumentos de 5.53% y 1.64% respectivamente en comparación con el control.

Por otra parte, una vez depositados los animales del grupo TOL en el cuadro central de la caja, inmediatamente iniciaban su actividad exploratoria y por ello, no registraron tiempos de latencia. Además se evidenció un comportamiento errático y fugas constantes de la caja durante los 3 min de prueba. Aunque no reportamos el numero de heces depositadas por cada animal, si observamos que los animales de los grupos TOL y T-AO, presentaron incremento en la defecación y micción en contraste con el resto de los grupos experimentales. Se debe

destacar que, el incremento en la defecación, fue un comportamiento sostenido durante todos los ensayos, es decir, no se desarrolló habituación ni adaptación emocional.

Para la segunda sesión se evaluó la actividad locomotriz en una n=4 ratas con excepción de los grupos CI y VEH (n=5). El número promedio de cuadros cruzados para esta etapa de evaluación mostró disminución en la actividad de los grupos VEH (-3.07%) y AO-AO (-6.19%) con respecto al CI. Mientras que, el resto de los grupos experimentales presentaron aumentos de 5.71% (TOL), 4.11% (T-AO) y 0.74% (AO-D) en comparación con el CI. Para esta etapa de estudio, solo se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos TOL y AO-AO con respecto al control (Fig. 14).

DESEMPEÑO EN CILINDRO GIRATORIO TRAS INTOXICACIÓN CON TOLUENO

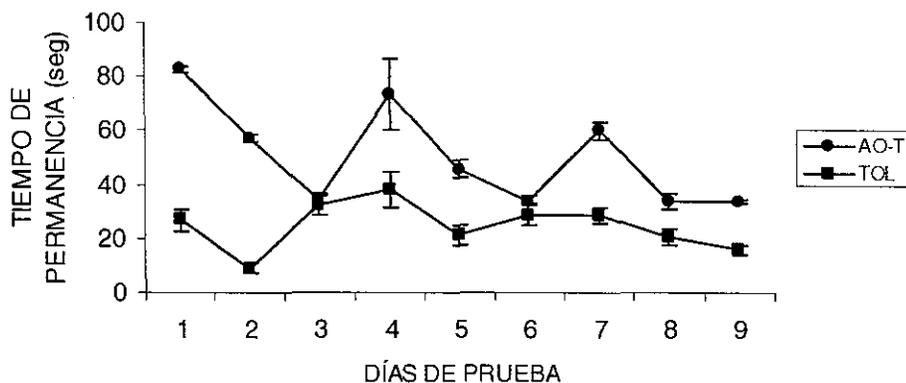


Figura 11. Se muestra el desempeño diario de los animales tras intoxicación con tolueno y el efecto de la suplementación con AO previo a intoxicación (AO-T) sobre la capacidad para mantener el equilibrio sobre un rodillo giratorio. Además el efecto tras el reajuste progresivo de las dosis de tolueno administrado por vía esófago-gástrica. Se presenta el tiempo promedio diario de una n=18 animales de cada grupo (seg \pm ES).

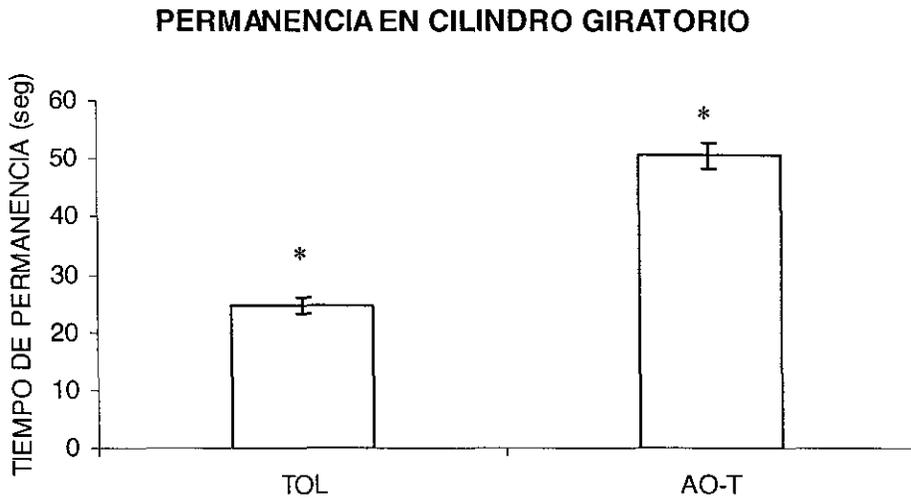


Figura 12. Muestra el tiempo promedio de equilibrio sobre un cilindro giratorio de ratas sometidas a intoxicación esófago-gástrica con tolueno durante 10 días y el efecto de la administración de AO antes de su intoxicación con el solvente. Las barras presentan el tiempo promedio (seg \pm ES) de permanencia sobre un rodillo giratorio de 9 días de ensayos para una $n=18$ animales por grupo. Los asteriscos muestran diferencias significativas entre grupos ($*p<0.05$).

**ACTIVIDAD LOCOMOTRIZ EN CAMPO ABIERTO
(ENSAYO 1)**

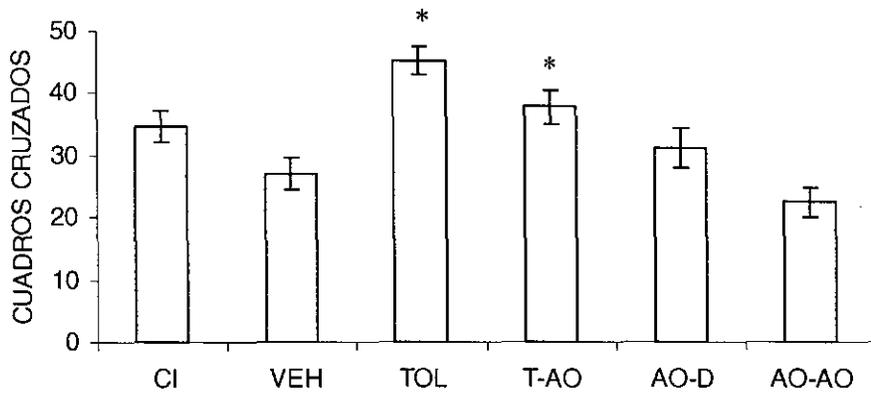


Figura 13. Actividad locomotriz en campo abierto al día 20 de recuperación de ratas sometidas intoxicación subcrónica con tolueno y el efecto de la suplementación con AO durante la intoxicación y/o durante la recuperación. Se muestra el número de cuadros cruzados \pm ES. Los asteriscos indican la diferencia mínima significativa par a un numero desigual de repeticiones (* $p < 0.05$).

ACTIVIDAD LOCOMOTRIZ EN CAMPO ABIERTO (ENSAYO 2)

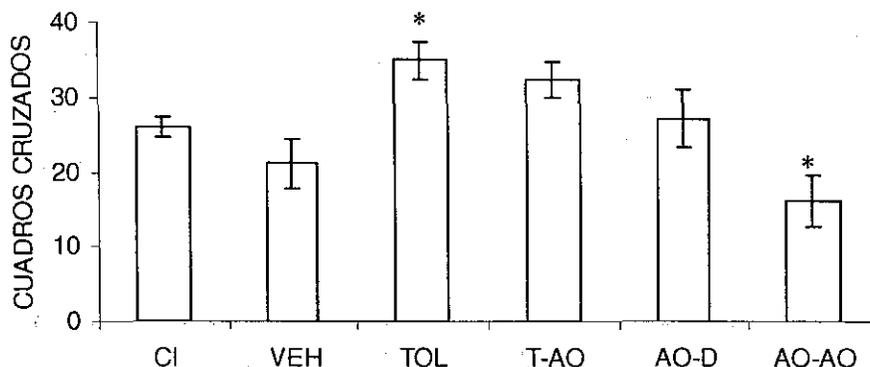


Figura 14. Actividad locomotriz en campo abierto al día 28 posintoxicación de ratas sometidas intoxicación subcrónica con tolueno y el efecto de la suplementación con AO durante la intoxicación y/o durante la recuperación. Se muestra el número de cuadros cruzados \pm ES. Los asteriscos indican las diferencias mínimas significativas par a un numero desigual de repeticiones (* $p < 0.05$).

8.5 Peso corporal tras intoxicación esófago-gástrica con tolueno.

Se evaluó el efecto de la intoxicación subcrónica con tolueno (10 días) y el efecto de la suplementación con AO previo a intoxicación sobre el peso corporal en un total de 10 animales de los grupos CI y VEH, y 18 animales por cada grupo TOL y AO-T. El registro diario del peso corporal en los animales del grupo TOL presentó disminución de un 2.34 % con respecto al grupo CI, mientras que los animales del grupo AO-T tuvieron un déficit de 1.56 % con respecto al mismo grupo (Fig. 15). Por otra parte, la suplementación con AO al grupo VEH provocó una disminución de 0.31 % con respecto al grupo CI (Fig. 15). Al analizar

estadísticamente nuestros resultados encontramos una diferencia significativa ($p < 0.05$) de todos los grupos contra el CI.

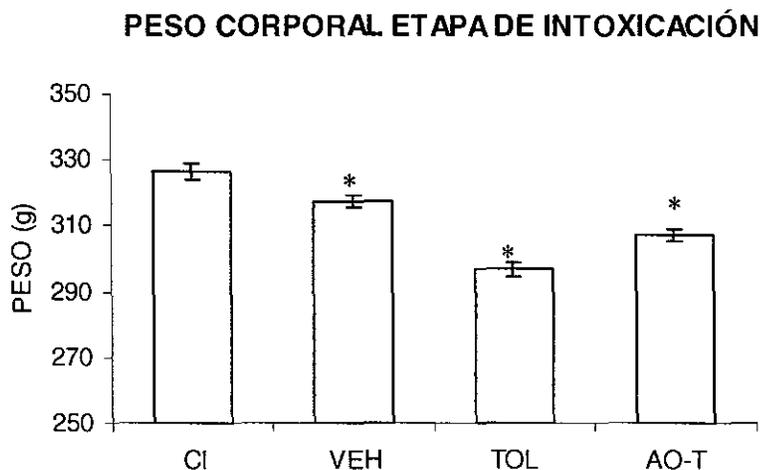


Figura 15. Efectos de la intoxicación subcrónica con tolueno y la suplementación con aceite de oliva previo a intoxicación sobre el peso corporal de ratas tras 10 días de intoxicación esófago-gástrica con tolueno. Las barras muestran el peso corporal promedio ($g \pm ES$) en un número de animales de 10 y 18 por grupo; los asteriscos señalan las diferencias mínimas significativas ($*p < 0.05$) de los grupos contra el CI.

El registro diario del peso corporal durante el periodo de recuperación (Etapa II), mostró que los animales suplementados con AO presentaron una mejor recuperación del peso en comparación con el grupo de animales no suplementados con el aceite (Fig. 16).

A pesar de la mejoría mostrada en los grupos de animales dosificados con AO, se encontró que el peso corporal promedio continuó por debajo del registrado en el grupos CI. El déficit mostrado por los diferentes grupos experimentales fue de 3.36% para TOL; 2.26 % para T-AO; 1.67 % en AO-D y de 1.3 % en AO-AO. El análisis estadístico de los resultados mostró diferencia significativa ($p < 0.05$) en los grupos AO-AO, AO-D y TOL con respecto al control (Fig. 16).

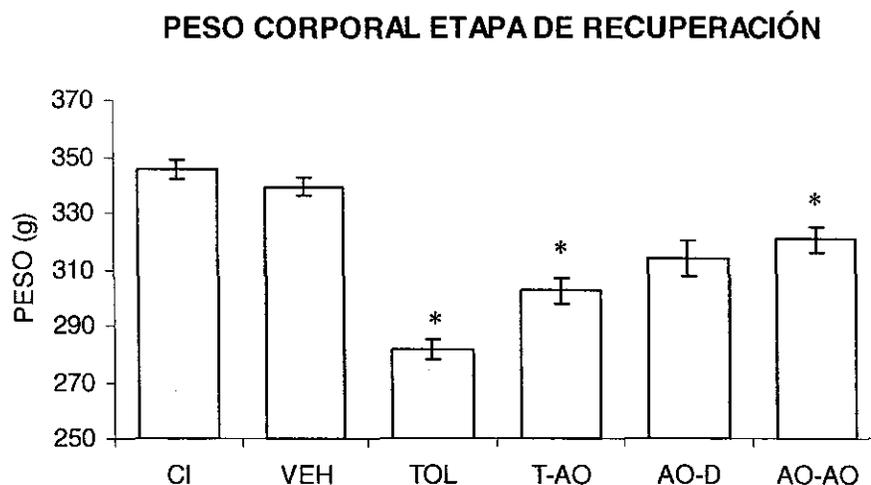


Figura 16. Se presenta la evolución del peso corporal de los diferentes grupos experimentales tras un periodo de recuperación de 30 días post-intoxicación subcrónica con tolueno y el efecto de la suplementación con aceite. Las barras muestran el peso corporal promedio ($g \pm ES$) en grupos de entre 7-10 animales; los asteriscos muestran las diferencias significativas ($*p < 0.05$) de los diferentes tratamientos contra el grupo CI.

8.6 Peso cerebral.

Tras un periodo breve de exposición a tolueno se puede desencadenar pérdida de masa cerebral, especialmente de la corteza cerebral de entre 6-10% (von Euler, 2000). Por ello se evaluó el efecto de la intoxicación esófago-gástrica con tolueno y la suplementación con aceite de oliva.

El peso de los cerebros en fresco y sin bulbos olfatorio de 5 animales, por cada grupo experimental al final del periodo de intoxicación, mostró una disminución del 1.63 % en el grupo TOL, mientras que para AO-T se registró una disminución de 3.33 %; por el contrario, el grupo VEH, presentó un aumento del 1.6 % en relación con el grupo CI (Fig. 17). El análisis estadístico de nuestros resultado arrojó diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los grupos VEH y TOL con respecto al CI.

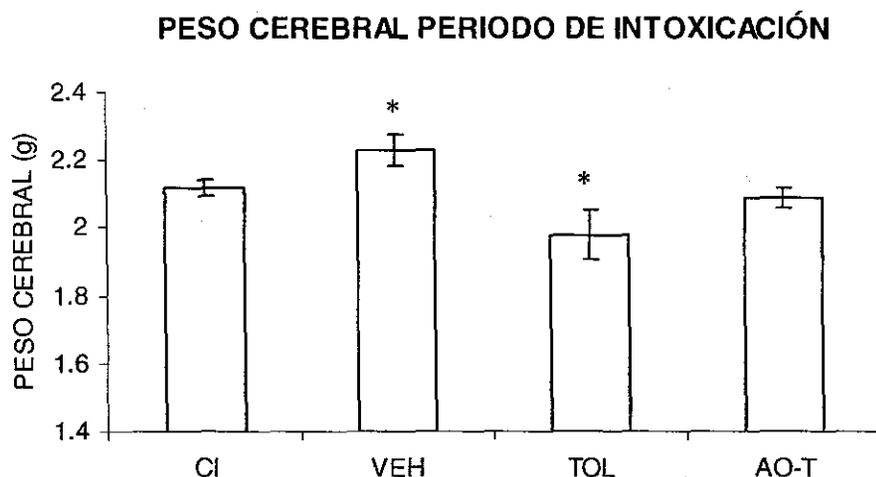


Figura 17. Efectos de la intoxicación subcronica con tolueno sobre el peso cerebral de ratas tras 10 días de intoxicación y de la suplementación con aceite de oliva al grupo AO-T y VEH. Se muestra el peso cerebral promedio ($g \pm ES$) para una $n=5$; los asteriscos sobre las barra indican diferencia significativa ($*p < 0.05$) con respecto al grupo CI.

8.7 Descripción histológica de células microgliales.

Las células microgliales evidenciadas mediante la técnica inmunohistoquímica con isolectina-B4, en la corteza prefrontal de ratas expuestas a tolueno, dosificadas con AO antes de intoxicación y durante todo el estudio presentaron proyecciones cortas, con pocas ramificaciones y densamente teñidas (Fig. 18). Éstas, características concuerdan con la morfología de microglías activadas. En contraste: los grupos CI y VEH mostraron una población microglial con características de células típicas (reposo o quiescentes) con procesos largos y ramificados, finamente teñidos y con morfología estrellada característica de microglías de materia gris (Fig. 18).

Por otro lado, las imágenes de la figura 19 mostraron mayor densidad celular en los cortes de los grupo AO-D, en contraste con AO-AO, lo cual puede reflejar que los tejidos del grupo AO-AO fueron protegidos contra el daño oxidativo, desencadenad otras exposición a tolueno. Esto sugiere que los efectos menores correspondieron a las ratas que siempre recibieron AO, antes de la intoxicación con tolueno y después de la misma, al menos en la región cerebral evaluada (corteza prefrontal).

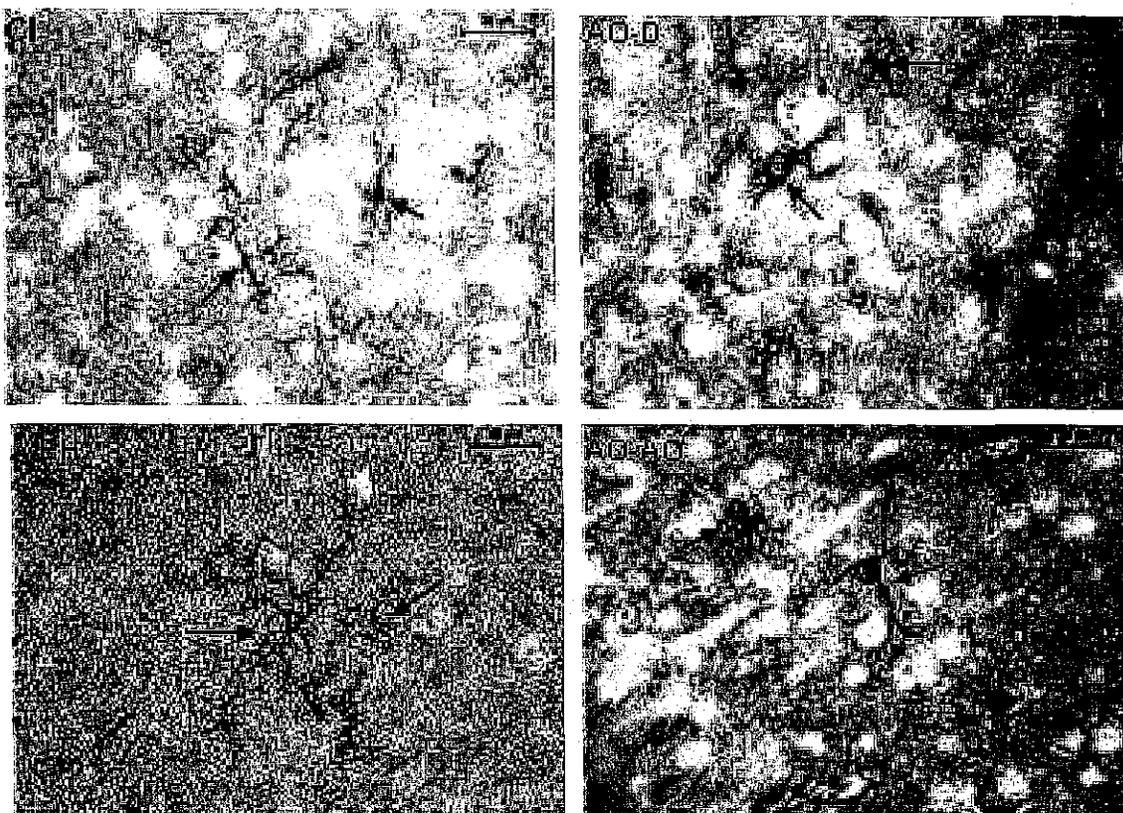


Figura 18. Microfotografía que muestra imágenes donde pueden apreciarse las características morfológicas de la población microglial (*flechas*) en cortes coronales de corteza prefrontal de ratas sometidas a intoxicación subcrónica con tolueno y suplementadas con aceite de oliva, antes de la intoxicación con el solvente (AO-D) y durante todo el estudio (AO-AO). Las imágenes de la izquierda muestran la morfología característica de microglías de sustancia gris. Células marcadas con isolectina-B4 de *Griffonia simplicifolia*. (40 x)

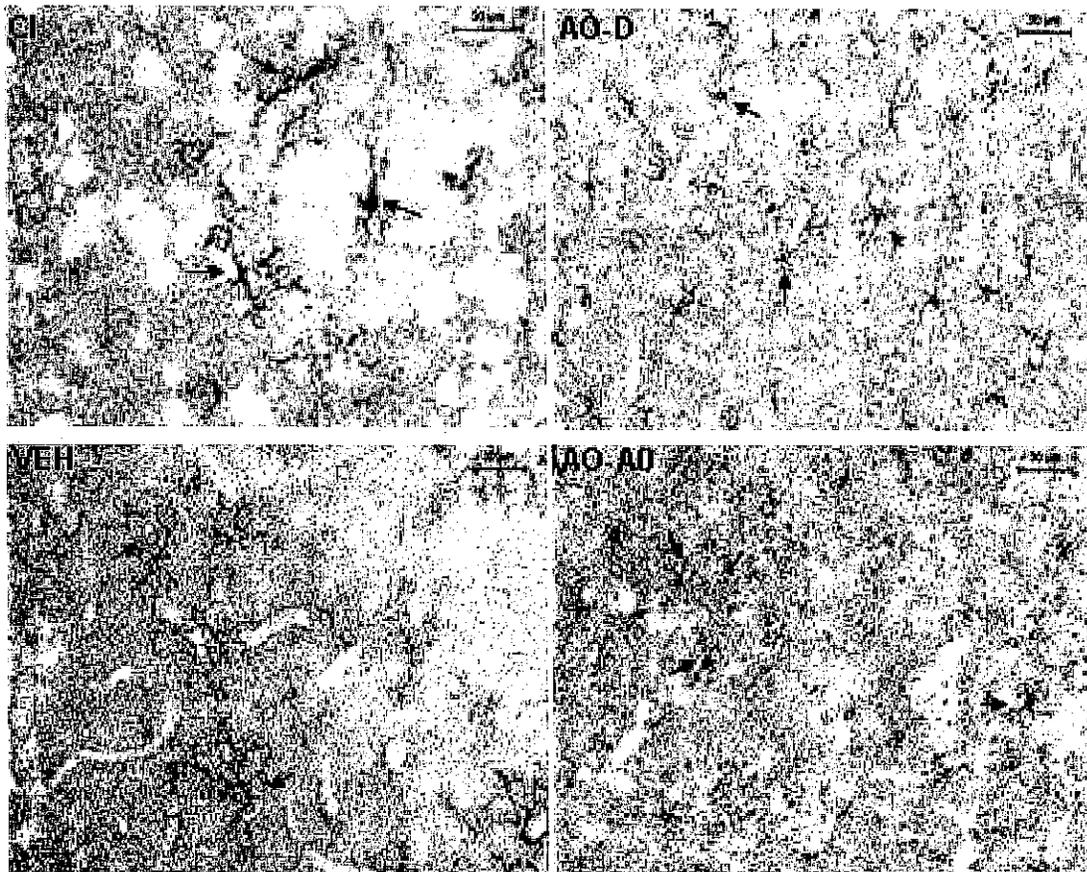


Figura 19. Las imágenes muestran la densidad de células de microglia en corteza prefrontal de ratas sometidas a intoxicación subcrónica con tolueno y los efectos de la suplementación con aceite de oliva, previo a la intoxicación (AO-D) y durante todo el estudio (AO-AO). En la imagen superior derecha se observan microglia (*flechas*) una gran cantidad de células microgliales cuya morfología concuerda con la de microglia activadas. En la imagen inferior derecha se observa un corte coronal de corteza prefrontal de un animal intoxicado con tolueno y dosificado con AO durante todo el estudio. Cortes teñidos mediante la técnica inmunohistoquímica para isolectina-B4. (20 x).

8.8 Densidad microglial.

Tras daño al SNC, se desencadenan cambios celulares encaminados a tratar de reparar el tejido lesionado y/o retirar los restos de células dañadas. Una respuesta particularmente rápida en cerebro es la generada por las células microgliales, ellas responden a la lesión activándose, por lo que pueden aumentar en numero (proliferación) o modificar su morfología (transformación celular). Por ello se evaluó el daño neurotóxico sobre la corteza prefrontal de ratas tras un periodo de intoxicación subcronica con tolueno, y los efectos benéficos de la suplementación con AO antes de la intoxicación y durante la etapa de recuperación del daño sobre la población de células microgliales.

La cuantificación del numero de células reactivas a isolectina-B4 de corteza prefrontal de ratas arrojó los siguientes resultados: para el estrato superior, el grupo VEH presentó disminución del 3.83 % con respecto al control así mismo, el grupo AO-D tuvo un aumento del 23.09 % y el grupo AO-AO del 10.77 % (Figs. 19 y 20). En el estrato medio, el grupo VEH presentó disminución del 4.98 % en relación al control; AO-D presentó aumento del 14.49 % y AO-AO de 4.43 % con respecto al mismo grupo (Fig. 20). Para el estrato profundo se cuantifico una disminución del 2.35 % para el grupo VEH y aumento del 16.49 % en AO-D y 7.95 % en AO-AO, con respecto al CI (Fig. 20).

Se encontró aumentada la población microglial en todos los estratos corticales estudiados, sin embargo el análisis estadístico de los resultados solo mostró diferencia significativa ($p < 0.05$) en el estrato superior de todos los grupos en comparación con el grupo CI.

Se debe destacar que, aunque el promedio de células por estrato del grupo AO-AO se encontró elevado en comparación con los grupos CI y VEH, si mostró menor reactividad que la presentada por el grupo AO-D. Esto refleja que la suplementación con AO tuvo un efecto de atenuación del daño citotóxico (Fig. 20). Por otra parte, se debe recalcar que no se pudo cuantificar la población de células de microglia en los grupos TOL y T-AO, ya que el marcaje con Isolectina-B4 no fue lo suficientemente aceptable como para realizar una buena identificación de

somas microgliales. Por esta razón, no se pudo realizar la cuantificación de éstas células. En el apartado de discusión se retoma este asunto.

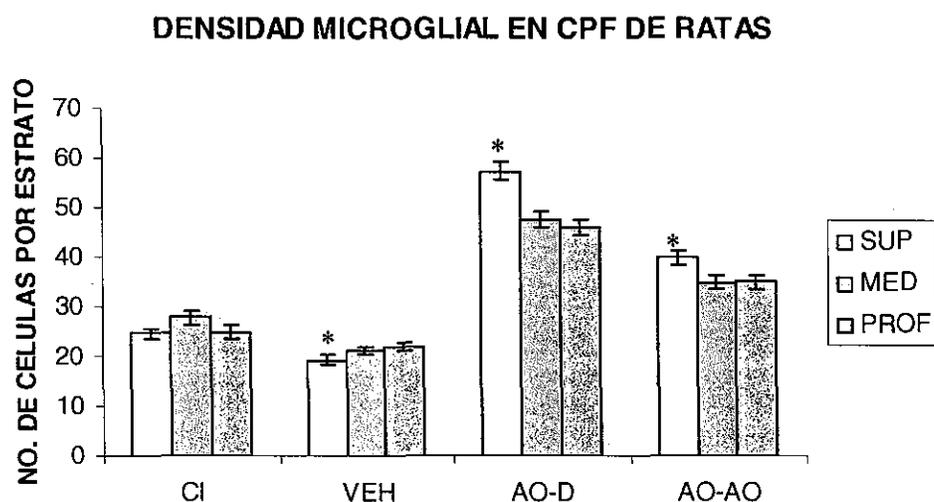


Figura 20. Se muestra el número de células de microglia (promedio \pm ES) por estrato en corteza prefrontal de ratas sometidas a intoxicación subcrónica con tolueno. Así como el efecto de la suplementación con AO, previo a intoxicación (AO-D) y durante todo el estudio (AO-AO), sobre la población de células de microglia. Los asteriscos sobre las barras muestran las diferencias significativas ($*p < 0.05$) de los grupos vs control intacto.

IX. DISCUSIÓN

9.1 Signos Clínicos.

Los signos clínicos desarrollados en los animales tras la administración esófago-gástrica con tolueno están asociados a los efectos del tolueno sobre el SNC; ésta respuesta neuroconductual estuvo presente en los grupos TOL y AO-T, lo que demuestra que la suplementación de aceite de oliva previa a la intoxicación con tolueno no impidió la absorción gastrointestinal del solvente. Wolf y col. (1956) y NTP (1990) reportaron, que el aceite de oliva no altera el coeficiente de partición de solventes orgánicos, lo cual puede explicar la toxicocinética del tolueno. Además, el tolueno en contraste con otros solventes, posee un alto coeficiente de partición (tolueno / aceite), por lo cual se absorbe rápidamente y se le puede encontrar a los pocos minutos en sangre y otros tejidos (Campbell y Luthy, 1985; Biedermann y col., 1995).

Las manifestaciones clínicas observadas tras la administración de tolueno en ambos grupos TOL y AO-T, evidencian la intoxicación sobre el SNC. Reportes del National toxicology program (1990), muestran que la dosis oral subcrónica a la que se presentan alteraciones neuroconductuales, oscila entre 312 a 5000 mg/Kg/día. Para éste experimento se utilizaron dosis ascendentes entre 500 y 1,500 mg/Kg/día. En las cuales se observó la respuesta citotóxica antes mencionada, aunque a dosis de 2 g/kg/día se produjo la muerte del 20% de animales del grupo AO-T y 30% para TOL.

La dosis letal de referencia (RfD) reportada por exposición oral subcrónica en ratas es de 2.0 mg/Kg/día (EPA, 1993). La muerte de éstos animales pudo ser consecuencia de daño hepático y/o renal, debido a que niveles relativamente altos tras exposición oral con tolueno por un periodo corto de tiempo, ejercen sus efectos nocivos principalmente sobre éstos órganos (Lauwerys y col., 1985; Rana y Kumar, 1994; IPCS, 1999). Liu y col., (2002) y Al-Ghamdi y col., (2003a,b), han reportado que el tolueno produce daño citotóxico sobre células de túbulos contorneados proximales debido al estrés oxidativo desencadenado por el aumento en la actividad de citocromos, lo cual reduce la viabilidad de éstas células

y desencadena muerte por necrosis 48 h después de la exposición. Aunque no se realizó el análisis de éstos tejidos, es importante señalar que se observó hematuria y diarrea en algunos animales expuestos a tolueno, indicativos de alteraciones renales y/o estomacales desencadenadas tras la intoxicación esófago-gástrica (Kamijima y col., 1994; Faust, 1994; Martín, 2001). Estas evidencias sugieren que la suplementación con aceite de oliva, antes de la intoxicación con tolueno, no impidió la absorción de éste solvente a través del epitelio gastrointestinal y su distribución sistémica.

9.2 Triglicéridos séricos.

Las concentraciones séricas de TGC al día 5 del periodo de intoxicación mostraron aumento significativo en relación al control en los grupos VEH y TOL, aunque, al comparar nuestros resultados con lo reportado en la literatura, encontramos que caen dentro del parámetro normal de 26 a 145 mg/dL (Melby y Altman, 1974). A pesar de ello, si debe destacarse que el aceite de oliva es rico en triglicéridos (contenidos en un 80% en el ácido oleico) (Eggstein y Kreutz, 1966; Funari y col., 2003), lo cual pudo contribuir al aumento inicial de TGC en el grupo VEH en comparación con el control. Por otra parte, la disminución de TGC al día 10 quizás se debió a que los TGC presentes en el AO tras ser metabolizados, pudieron ser incorporados a membranas biológicas y lípidos de baja densidad (LDL), confiriéndole a éstos últimos resistencia a la oxidación. Gimeno y col., (2002) y Funari y col., (2003) han reportado que, tras la ingesta de altas concentraciones de AO, la incorporación de TGC contenidos en el ácido oleico a LDL o membranas biológicas tarda aproximadamente 7 días.

Por otra parte, el aumento en los niveles de triglicéridos al día 5 concuerda con lo reportado por Kaneko y col. (2000), ellos encontraron que tras exposición a solventes lipofílicos, se puede desencadenar aumento en los niveles sanguíneos de TGC. Además, Danni y col., (1986) reportaron el desarrollo de aumento en los niveles séricos de TGC debido al desarrollo de citólisis, esteatosis y deficiencias metabólicas como consecuencia del daño toxico hepático, lo cual posiblemente

fue la causa del incremento observado en nuestro modelo experimental de intoxicación esófago-gástrica con tolueno.

Por otro lado, la eficiencia en los procesos responsables para la remoción de TGC de la sangre pudo ser el mecanismo que ayudo a normalizar las concentraciones sanguíneas de TGC (Stumph, 1985). Sin embargo, es necesario señalar que existen muchos reportes en los que se relaciona el aumento de TGC circulantes con el abuso en el consumo de alcohol (Rios, 2001). Para el caso de intoxicación con tolueno, son casi inexistentes los reportes; —a excepción de Stumph y col., (1985), quienes reportaron que, entre dos y tres semanas de intoxicación por inhalación a concentraciones constantes de 2500 ppm con tolueno, se presenta disminución de las concentraciones circulantes y cerebrales de tolueno, mientras que la concentración sérica de TGC presenta aumento. A decir de estos autores, estas manifestaciones pueden ser indicadores del desarrollo de tolerancia provocada por la inducción exacerbada de la actividad de oxidasas hepáticas y alteraciones en la composición de lípidos de membranas.

9.3 Equilibrio en cilindro giratorio.

El desempeño de los animales intoxicados con tolueno (TOL y AO-T), mostró que la suplementación con aceite de oliva previo a intoxicación pudo ejercer efectos neuroprotectivos evidenciados por el mejor desempeño del grupo AO-T en la realización de ésta. Aunque ambos grupos mostraron deficiencia en la capacidad para mantener el equilibrio y coordinación en la prueba de cilindro giratorio (*rotarod test*), sí se observaron diferencias significativas entre ambos grupos de animales dosificados con tolueno.

Posiblemente la intoxicación con tolueno provocó daño neurotóxico en ganglios basales y cerebelo —estructuras implicadas en la coordinación sensitivo-motora; — este daño neurotóxico se evidenció por incoordinación motora (ataxia), asociada con el desarrollo de desordenes neurológicos (Kyvik y Moen 1990; Pryor, 1991). La característica mas común de desordenes neurotóxicos son trastornos motores como desequilibrio, anomalidades de la tensión muscular y, alteraciones propioceptivas y/o patrón de caminado (Kyvik y Moen 1990; Rustay y col., 2003).

La prueba de equilibrio en cilindro giratorio evidenció la sensibilidad de los animales al efecto neurotóxico del tolueno (Jones y Roberts, 1968) y, aunque esta prueba se ha empleado para medir sensibilidad al alcohol, es evidente que puede utilizarse para medir la sensibilidad al tolueno (Costa y col., 2002). Por otra parte, los resultados de esta prueba muestran que los animales no fueron capaces de aprender a mantenerse sobre el rodillo, probablemente debido al daño neurotóxico por el tolueno.

La incoordinación motora y los trastornos del aprendizaje motor pueden ser consecuencia de una integración funcional defectuosa de la corteza frontoparietal, corteza motora y cerebelo (Jueptner y col., 1997; Massaquoi y Hallett, 1998; Bowen y Balster, 1998; Hikosaka y col., 2002) producidas por el daño neurotóxico del tolueno.

Se debe recalcar que esta prueba ha resultado una herramienta útil para revelar daño neurotóxico, sin embargo pueden presentarse variaciones de acuerdo al genotipo de cada individuo (Rustay y col., 2003) lo cual debe tomarse en cuenta cuando se aplique ésta prueba para valorar daño neurotóxico.

9.4 Actividad locomotriz en campo abierto.

La conducta exploratoria de ratas sometidas a intoxicación subcrónica con tolueno, que fue evaluada a los 20 y 28 días posintoxicación, permitió evidenciar la persistencia del daño por tolueno. Se debe destacar que entre los grupos TOL y AO-AO se encontraron diferencias opuestas y significativas respecto al control; hiperactividad e hipoactividad, respectivamente. En cuanto al aumento en la actividad locomotora de animales expuestos a tolueno que no recibieron suplemento con aceite de oliva, ésta pudo deberse a alteraciones de neuronas dopaminérgicas del estriado, como fue propuesto por von Euler y col. (1993). Kyvik y Moen, (1990), reportaron que 30 días después de un periodo de exposición subcrónica con tolueno, aumentó de manera significativa la actividad locomotora de los animales expuestos al tolueno respecto al control, así mismo, se observó que la motilidad espontánea no resulta afectada por el tolueno. Otros autores descubrieron que la actividad locomotora se incrementa tras exposición a

tolueno y es mediada por aumento en la expresión de receptores D₂ del estriado (Mutti y col., 1988; Martín y Slapper, 2001; Marubio y col., 2003).

Según Riegel y French (2002) y Riegel y col., (2003), la hiperactividad tras exposición a tolueno es dependiente de la dosis y resulta por la sobre-estimulación de neuronas dopaminérgicas del núcleo acumbens.

La conducta exploratoria mostrada por el grupo AO-AO fue significativamente menor que el control, éstos resultados son similares a los reportados por Maimanee y col., (2003). Quienes encontraron que la suplementación con ácidos grasos a la dieta de roedores puede modificar su conducta. Por ejemplo; al aplicar la prueba de conducta exploratoria en campo abierto, encontraron mejor desarrollo emocional, evidenciado por la ausencia de defecaciones y baja actividad motora en la caja.

Para estos autores, el suplemento de ácidos grasos puede influir en el mejoramiento emocional de roedores. Otros autores como Coscina y col., (1986), Yehuda y col., (1986) y Kamara y col., (1998), reportaron resultados similares e incluso encontraron que la suplementación con ácidos grasos dietarios disminuye la respuesta al estrés, lo cual se evidenció utilizando ésta misma prueba (campo abierto).

El mecanismo mediante el cual el AO pudo ejercer sus efectos benéficos fue quizás a través de la modulación en la función de las membranas neuronales, debido a cambios en su estructura, particularmente de los fosfolípidos de membranas (Carlson y col., 1986). Cabe señalar que, la calidad y cantidad de ácidos grasos dietarios se reflejan en la estructura, fluidificación y función de membranas neuronales, lo cual puede influir en la transmisión serotoninérgica y catecolaminérgica y de formación de prostaglandina, de ahí que puede influir en la modulación de la respuesta al estrés y emocional de animales al encontrarse en un ambiente novedoso (Carlson y col., 1986; Haag, 2003).

Nuestros resultados muestran que la suplementación con AO puede ayudar a modular la respuesta de retirada tras la intoxicación con tolueno, evidenciado por una mejor respuesta emocional en los animales suplementados con éste aceite,

aunque los efectos fueron más evidentes cuando se suministró AO antes de intoxicación y durante la recuperación.

9.5 Peso corporal.

Su registro durante todo el estudio nos ayudó a evaluar el efecto de la intoxicación oral con tolueno y la adición de ácidos grasos dietarios sobre la ganancia de peso corporal en las diferentes condiciones experimentales.

Los pesos alcanzados al final de la fase de intoxicación muestran que la administración esófago-gástrica de tolueno produjo una disminución en la ganancia de peso corporal, quizás debido a disminución del consumo del alimento. A pesar de que no se cuantificó el consumo del alimento, sí se observó disminución de la ingesta tras intoxicación con el solvente.

Hasta hace poco el mecanismo mediante el cual el tolueno provoca pérdida de apetito no se había esclarecido, aunque recientemente Moron y col., (2004) han demostrado que la exposición al tolueno produce disminución del consumo de alimento y de la ganancia de peso. En sus resultados éstos autores encontraron que la exposición a altas concentraciones de tolueno produce una disminución significativa en las concentraciones de NPY (neuropéptido-Y) del núcleo paraventricular y aumento en el núcleo arcuato, aunque no encontraron cambios en otras regiones hipotalámicas. También encontraron niveles elevados de galanina en los núcleos paraventricular y arcuato. Los hallazgos de estos autores sugieren que el tolueno induce el desarrollo de anorexia tras exposición a altas dosis de tolueno.

Se conoce que el NPY es uno de los más abundantes en cerebro de mamíferos y que participa en el control hipotalámico de la ingesta de alimento y ritmos circadianos, así como en la integración emocional límbica (Heilig y Widerlov, 1995). Stanley y Leibowitz, (1984) y Levine y Morley, (1984) demostraron que la inyección directa de NPY en el núcleo paraventricular hipotalámico (PVN) produce aumento del consumo de alimento y agua dosis dependiente, pero no altera cierto tipo de conductas como rascado, sueño, reposo o diferentes niveles de actividad. Además, estos autores demostraron que

mediante la utilización de un antagonista del NPY, como el naloxano, o por medio de la utilización del antagonista de dopamina, el haloperidol, se ejerce un efecto supresor de la ingesta de alimento.

Por otra parte, se sabe que la disminución en las concentraciones de NPY, en el PVN, produce disminución del consumo de alimento y consecuentemente trastornos en la ganancia de peso corporal (Shibasaki y col., 1993; Hulse y col., 1995).

De acuerdo a lo reportado por Moron y col. (2004), y a nuestros resultados, probablemente la disminución en las concentraciones de NPY tras la intoxicación con tolueno pudo desencadenar la disminución del peso corporal en los animales expuestos al solvente durante la etapa de intoxicación.

En cuanto al peso corporal registrado en la etapa de recuperación, nuestros resultados sugieren que la suplementación con aceite de oliva durante la intoxicación con tolueno, y en la fase de recuperación, pudo ejercer efectos benéficos sobre éste parámetro, al modular la respuesta al daño neurotóxico tras la intoxicación con el solvente, lo cual pudo mejorar el apetito de los animales tratados y consecuentemente lograron una mejor recuperación del peso corporal.

9.6 Peso cerebral.

De acuerdo a nuestros resultados, la intoxicación subcrónica con tolueno a concentraciones elevadas puede producir pérdida de masa cerebral, quizás debido a que el tolueno es altamente lipofílico, lo cual facilita su incorporación a SN donde desencadena daño neurotóxico y, eventualmente, provocar la muerte neuronal. Aunque según lo reportado en la literatura, la sustancia blanca del SNC resulta afectada principalmente por la exposición a tolueno (Knox y Nelsen, 1966; Shirabe y col., 1974; Korobkin y col., 1975).

Reportes de von Euler y col., (2000) mencionan que, tras intoxicación con tolueno, a bajas concentraciones y por un corto periodo, puede resultar en pérdida de masa cerebral cortical, especialmente de la corteza parietal de entre 6 y 10%. Anteriormente, Rosenberg y col., (1988) realizaron estudios mediante imágenes de resonancia magnética (MRI) en cerebros de individuos abusadores de tolueno

y entre sus hallazgos reportaron: 1) atrofia difusa en cerebro, cerebelo y tallo cerebral; 2) pérdida de los límites entre materia blanca y gris y; 3) aumento de materia blanca intraventricular, lo cual sugiere que el tolueno causa cambios metabólicos en la mielina (Polakowska, 1989). Resultados similares han sido publicados por Scarpelli y col., (1994) en individuos sometidos a intoxicación crónica.

Otros reportes muestran que la exposición subcrónica oral a tolueno, produce una disminución del área subcortical límbica, núcleo caudado y putamen (Hillefors-Berglund y col., 1995). Además, Lazar y col., (1983) y Suzuki y col., (1992) reportaron que periodos breves de intoxicación con tolueno pueden causar lesiones en materia blanca cerebral, ganglios basales, cápsula interna, tallo cerebral y pedúnculo cerebelar.

Este daño puede resultar por la acumulación de metabolitos tóxicos producidos durante el proceso de detoxificación del tolueno por la acción enzimática de CYP 450 y aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) que pueden dañar a las células (Iqbal, 2001). Según Mattia y col., (1993); y, Garbe y Yukawa (2001) el tolueno es el único solvente lipofílico capaz de inducir la formación de ERO que pueden causar daño oxidativo severo a membranas neuronales y mitocondriales lo cual puede inducir la muerte celular.

A pesar de que el tiempo de exposición al tolueno fue relativamente corto, trabajos previos muestran que aún tras intoxicación aguda con tolueno se puede producir daño severo al tejido nervioso (Gotohda y col., 2000). Este autor encontró que, tras intoxicación aguda con tolueno las células astrocitarias de hipocampo y cerebelo se activan, proliferan y aumentan considerablemente la expresión de proteína acídica fibrilar glial (PAFG), lo cual puede contribuir a la supervivencia de las neuronas cerebrales (Gotohda y col., 2000). También se debe mencionar que el desarrollo de gliosis es indicativo de daño severo y/o muerte neuronal (Huang y col., 1992).

También se ha reportado que tras exposición subcrónica con tolueno la expresión de enolasa neuronal específica (NSE) aumenta considerablemente en varias regiones cerebrales, aunque en neuronas cerebelares se expresa más

abundantemente (Huang y col., 1990). Estas alteraciones se presentan como respuesta a disturbios funcionales y estructurales tras daño severo sobre membranas neuronales que pueden culminar en muerte neuronal (Schmechel y col., 1973, Persson y col., 1987)

Los pesos cerebrales registrados al final del estudio, muestran que tal vez la suplementación con aceite de oliva, antes de la intoxicación con tolueno y durante la recuperación, ayudó a disminuir el daño oxidativo sobre lípidos de membranas celulares (Rabovsky y Cuomo, 1999; Ruiz-Gutiérrez, y col., 1999; de la Puerta y col., 2000; Masella y col., 2001; Funari y col., 2003), ya que el peso cerebral promediado por éstos animales fue similar al control. Por otra parte, el aumento del peso cerebral encontrado en el grupo VEH, pudo deberse a la incorporación membranaral de lípidos (Kinsella, 1990; Navarro y col., 1994; Aguilera y col., 2003; Funari y col., 2003).

9.7 Población microglial.

Durante el periodo de intoxicación se produjo reactividad microglial, manifestada por un aumento en el número de estas células. Este aumento fue más evidente en el grupo de ratas AO-D. En tanto que en el grupo de animales suplementados con el aceite durante todo el estudio (AO-AO) fue menos notorio.

En lo referente a los grupos TOL y T-AO, se debe destacar que no se logró un buen marcaje de la población microglial, razón por la cual no fue posible realizar la cuantificación de células inmunoreactivas a Isolectina-B4. Una posible explicación de éste hecho es que el tolueno haya dañado severamente las cubiertas celulares, induciendo perdida del sitio de afinidad para las lectinas utilizadas, que corresponde a glicolípidos presentes en las membranas de células microgliales (Streit y Kreutzberg, 1987; Alroy y col., 1988 a,b; Streit, 1990; Streit, 2002; Desantis y col., 2003).

Existen otros factores que también pueden inhibir la inmunotinción de microglia por ejemplo; Jan Bauer, (comunicación personal) encontró que, en cortes parafinados ejerce una gran influencia la temperatura y el tipo de fijador

utilizado, así como el pH de las soluciones lavadoras y la calidad de los materiales utilizados para la inclusión. En éste trabajo, pueden descartarse estos factores debido a que todos los cerebros fueron procesados en paralelo y bajo las mismas condiciones, lo más probable es que la exposición al tolueno produjo daño severo a las membranas de éstas células.

En cuanto al aumento en el número de células de microglia (microgliosis); la administración esófago-gástrica de tolueno produjo aumento de éstas células a pesar de la suplementación con AO, que puede interpretarse como una manifestación de daño sobre el tejido nervioso (Kreutzberg, 1995; Sedgwick y col., 1998; Streit y col., 1999; Streit, 2000; Schwab y col., 2001).

La proliferación de células microgliales como respuesta a daño ha sido ampliamente estudiada, aunque no encontramos reportes en los cuales se relacione esta respuesta celular con el daño resultante después de la exposición al tolueno. Por otro lado; existen reportes que describen aumento del número de células de la microglia tras exposición intermitente a alcohol (microgliosis) (Kloss y col., 1997; Streit y col., 1999; Riikonen y col. 2002).

Se sabe que la exposición a altas concentraciones de tolueno puede producir un aumento en la generación de ERO en SNC de mamíferos, los cuales, a su vez, pueden desencadenar daño y/o muerte neuronal (Lam y col., 1990; Mattia y col., 1991; 1993a,b) al desencadenar aumento de la peroxidación de membranas. A este respecto, es importante señalar que el daño oxidativo se ha relacionado con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas entre las que se incluyen la enfermedad de Parkinson (EP), daño isquémico y lesiones traumáticas en los que la microglia juega un papel importante (Markesbery y Carney, 1999).

Los radicales libres generados tras exposición a tolueno ejercen sus efectos sobre lípidos membranales específicos y susceptibles a peroxidación tales como; fosfatidiletanolamina (FE) y fosfatidilinositol (FI) —abundantes en membranas de células de cerebro— (Nitsch y col., 1992). La peroxidación de estos lípidos, produce una disminución de ácidos grasos que derivan a partir de ellos por ejemplo; la disminución de FE ocasiona una disminución importante de ácido

esteárico, oleico, araquidónico y docosahexenoico en tanto, que la disminución de FI desencadena disminución de fosfolípidos, oleico y araquidónico.

Según Esterbauer y col., (1991), los ácidos grasos mas susceptibles al daño oxidativo son lo AGPI (araquidónico y docosahexenoico), tras lo cual se pueden generar gran cantidad de aldehídos entre los que se incluyen el propanal, butanal, pentanal, hexanal y 4-hidroxinonenal (HNE), cuya vida media oscila de entre algunos minutos a horas y pueden difundir a sitios distantes donde actúan como radicales libres altamente reactivos. Por ejemplo, HNE es muy reactivo con α y β aldehídos responsables de citotoxicidad en conjugación con estrés oxidativo y son capaces de inhibir al ADN, ARN, síntesis de proteínas y glucólisis, y pueden mediar la degradación de proteínas mediante uniones covalentes a residuos de histidina, lisina y cisteína a través de la reacción de Michael o Schiff (Esterbauer y col., 1991; Uchida y Stadtman, 1992). También se ha demostrado que HNE puede desencadenar muerte neuronal por apoptosis y es altamente toxico para la neuroglia (Montine y col, 1996; Kruman y col., 1997; Keller y col., 1998), aunque existen reportes que hacen mención al desarrollo de muerte celular por ésta vía solo en casos de accidente vascular cerebral (Linnik y col., 1993; MacManus y col., 1993) y enfermedad de Huntington (Portera-Cailliau y col., 1995).

Estos eventos pueden actuar como disparadores de la respuesta microglial al daño, evidenciados por aumento del número de células microgliales (Gehrmann y col., 1995; Gehrmann, 1996; Stoll y Jander, 1999; Banati, 2000; Kato y col., 2003) aunque en este estudio no podemos especificar sí este aumento se debió a la acumulación y/o proliferación de ésta estirpe celular.

Por otro lado, aunque las ERO desencadenan muerte por apoptosis y, ésta a su vez, aumento de ERO en neuronas, se ha reportado que la utilización de antioxidantes puede prevenir el desarrollo de apoptosis (Kane y col., 1993; Whittemore, y col., 1994; Kruman y col., 1997). Lo anterior podría explicar el menor numero de células de microglia registradas en la corteza cerebral del grupo AO-AO que pudiera reflejar el efecto benéfico por la suplementación con aceite de oliva antes de la intoxicación y durante la recuperación. Esto debido a sus posibles efectos antioxidantes que pudieron inhibir la peroxidación de lípidos (Carlson y

col., 1986; Masella, y col., 2001; Quiles y col., 1999; Rabovsky y Cuomo, 1999; Visioli y col., 2001). De acuerdo a Scaccini y col., (1992), el consumo de ácidos grasos monoinsaturados, abundantes en el AO, proporcionan resistencia al daño oxidativo.

A pesar del efecto protector del aceite de oliva, es necesario señalar que el aumento en la población de microglia persistió con el tiempo (30 días) esto indica la permanencia de los efectos por el daño oxidativo, después de haber suspendido la administración del solvente. Riikonen y col., (2002) reportaron un incremento en el número de células de microglia, que el encontrado en éste estudio. Sin embargo, ellos sacrificaron a sus animales inmediatamente después de terminar su periodo de experimentación. Bajo esas condiciones, es de esperar que la activación de la microglia sea elevada (Gehrmann y Banati, 1995). A este respecto, Gehrmann y Banati (1995), según sus trabajos de monitoreo de respuesta de la microglia tras lesión, reportaron que a los 21 días se pueden alcanzar los niveles máximos de proliferación microglial, tras lo cual se inicia una respuesta de autorregulación que puede prolongarse hasta el día 60 poslesión.

Ochoa-Herrera y col., (2001) atribuyen los mejores efectos antioxidantes a la combinación de ácidos grasos monoinsaturados y tocoferoles —abundantes en el aceite de oliva virgen—. Ellos encontraron que estos pueden cambiar el perfil lipídico de membranas plasmáticas y mitocondriales mediante la incorporación de mayor cantidad de ácidos grasos saturados de moléculas antioxidantes a partir de compuestos fenólicos (alfa-tocoferol, ubiquinona 10) y, la optimización de la actividad de la enzima glutatión peroxidasa, así como en la disminución del contenido de hidroperóxidos y ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Kinsella, 1990; Mataix y col., 1998; de La Cruz y col., 2000; Visioli y col., 2001; Masella y col., 2001; Quiles y col., 2002; Visioli y Galli, 2003).

Lo anterior provee evidencias *in vivo* de la capacidad protectora del aceite de oliva contra el daño oxidativo desencadenado tras la exposición esófago-gástrica subcrónica a tolueno, evidenciada a través de cuantificación de la población microglial presente en la corteza prefrontal de ratas suplementadas con

AO, antes de intoxicación y durante el periodo de recuperación, después de suprimir la desintoxicación de éste solvente.

Por otro lado, éste estudio fundamenta la pertinencia de realizar experimentos adicionales en los que se evalúen los efectos benéficos del aceite de oliva contra el estrés oxidativo desencadenado después de una intoxicación crónica con tolueno.

Estudios como éste, pueden generar información valiosa para la salud pública humana, ya sea que se trate de intoxicación recreativa o de tipo ocupacional al tolueno, debido a que la exposición a este solvente genera la producción de especies reactivas de oxígeno dependiente de la dosis (Mattia y col., 1991; Mattia y col., 1993 a,b). Por ello, la conveniencia de utilizar el aceite de oliva como una forma de prevenir el desarrollo de trastornos neurodegenerativos asociados a la peroxidación excesiva, que provoca daño oxidativo a las membranas celulares responsable de muerte celular por apoptosis o necrosis.

X. CONCLUSIONES

1. La suplementación con aceite de oliva, previo a la intoxicación oral con tolueno, no impidió la absorción gastro-intestinal de éste, ya que se produjeron signos clínicos de neurotoxicidad manifestada por el desarrollo de incoordinación motora y falta de equilibrio en un cilindro giratorio (*rotarod test*) 30 minutos después de la intoxicación con tolueno, lo cual muestra la sensibilidad de los roedores al efecto neurotóxico de este solvente.
2. La suplementación con aceite de oliva no modifico la concentración sérica de triglicéridos.
3. La suplementación preventiva con aceite de oliva, antes de iniciar un periodo de intoxicación subcrónica con tolueno y su continuación durante la fase de recuperación, produjo efectos ansiogénicos evidenciados por disminución de la actividad locomotora en campo abierto.
4. El aceite de oliva previno la perdida de tejido cerebral y facilitó la recuperación del peso corporal tras de suprimir la intoxicación con tolueno.
5. Este estudio provee evidencias *in vivo* de la capacidad protectora del aceite de oliva contra el daño oxidativo que se desarrolla tras la intoxicación esófago-gástrica subcrónica con tolueno a través de los compuestos antioxidantes que contiene, y el aporte de ácidos grasos monoinsaturados a las membranas biológicas que inhiben la severidad del daño evidenciado por la menor población de células microgliales en la corteza prefrontal de ratas que recibieron suplementación con aceite de oliva y durante todo el estudio.

XI. BIBLIOGRAFÍA

Agency for Toxic Substances and Disease Registry, (ATSDR) (1989). Toxicological profile for toluene. Prepared by life systems, Inc., under contract No. 205-88-0608. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry, (ATSDR) (2000). Toxicological profile for Toluene. Atlanta, GA: U.S Department of health CAS # 108-88-33. *Public Health Statement. Agency for toxic substances and disease registry.*

Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Cases (ATSDR) (1999). Determination of Acute Reference Exposure Levels for Airborne Toxicants: Toluene. C 325-34.

Aguilera, C.M., y Mesa, M.D., Ramirez-Tortosa, M.C., Quiles, J.L., y Gil, A., (2003). Virgin olive and fish oils enhance the hepatic antioxidant defence system in atherosclerotic rabbits. *Clin Nutr.* 22: 379-84.

Albaugh, B. y Albaugh, P., (1979). Alcoholism and substance sniffing among the Cheyenne and Arapaho Indians of Oklahoma. *International Journal of the Addictions.* 14: 1001-07.

Alberts, B., Lewis, R. y Roberts, W., (1983). *Molecular Biology of the Cell.* Garland, Nueva York. 255-317.

Alcaraz, M. García-Castells, E. y Guzmán, C., (1973). Efectos conductuales y electrográficos provocados por la inhalación aguda y crónica de tiner en el gato, En: Inhalación voluntaria de disolventes industriales. *Contreras, C.M. De. Trillas, México, D.F.,* 88-103.

Al-Ghamdi, S.S., Raftery, M.J., y Yaqoob, M.M., (2003a). Organic solvent-induced proximal tubular cell toxicity via caspase-3 activation. *J Toxicol Clin Toxicol.* 41: 941-5.

Al-Ghamdi, S.S., Raftery, M.J., y Yaqoob, M.M., (2003b). Acute solvent exposure induced activation of cytochrome P4502E1 causes proximal tubular cell necrosis by oxidative stress. *Toxicol In Vitro.* 17: 335-41.

Allen, N., (1979). Solvents and other *industrial organic compounds.* In *Handbook of Clinical Neurology*, Vol. 36. ed. by P. J. Vinken and G. W. Bruyn, New York Elsevier. 361-89.

Alroy, J., Adelman, L.S., y Warren, C.D., (1988b). Lectin histochemistry of gangliosidosis. II. Neurovisceral tissues from patients with Sandhoff's disease. *Acta Neuropathol (Berl)*. 76: 359-65.

Alroy, J.M., Ucci, A.A., y Periera, M.E., (1988a). Lectin histochemistry: an update. In *Advances in Immunocytochemistry*, DeLellis, R.A. ed. *Raven Press, New York*. 93-131.

Ameno, K., Fuke, C., Ameno, S., Kiri, T., Sogo, K., y Ijiri, I., (1989). A fatal case of oral ingestion of toluene. *Forensic Sci Int*. 41: 255-60.

Ameno, K., Kiri, T., Fuke, C., Ameno, S., Shinohara, T., y Ijiri, I., (1992). Regional brain distribution of toluene in rats and in a human autopsy. *Arch Toxicol*. 66:153-6.

American Academy of Pediatrics, (AAP) (1996). Inhalant abuse. Committee on Substance Abuse and Committee on Native American Child Health. *Pediatrics*; 97: 420-3.

Ando, S., Toyoda, Y., y Ikuta, F., (1984). Alterations in brain gangliosides and other lipids of patients with Creutzfeldt-Jakob disease and subacute sclerosing panencephalitis (SSPE). *Jnp.J. Exp. Med*. 54: 229-34.

Aparicio, R., Morales, M.T., y Alonso, V., (1997). Autenticación de los aceites de oliva vírgenes europeos por medio de sus compuestos químicos, atributos sensoriales y las actitudes de los consumidores. *J Agric Food Chem*. 45: 1076-83.

Araya, A.J., Fernández, M.P., Rojas, G.M., y Mateluna A.A., (1999). Ácidos grasos esenciales en eritrocitos de sangre umbilical de recién nacidos prematuros y de término, pequeños o adecuados a la edad gestacional. *Arch. Argent. Pediatr*. 97: 377-82.

Aydin, K., Sencer, S., Demir, T., Ogel, K., Tunaci, A., y Minareci, O., (2002). Cranial MR findings in chronic toluene abuse by inhalation. *Am. J. Neuroradiol*. 23: 1173-9.

Banati, R.B., (2000). Visualising microglial activation in vivo. *Glia*; 40: 206-217.

Baydas, G., Reiter, R.J., Nedzvetskii, V.S., Yasar, A., Tuzcu, M., Ozveren, F., y Canatan, H., (2003). Melatonin protects the central nervous system of rats against toluene-containing thinner intoxication by reducing reactive gliosis. *Toxicol Lett*. 137: 169-74.

Bechara, A., Damasio, H., Damasio, A.R., y Lee, G.P., (1999). Different contributions of the human amygdala and ventromedial prefrontal cortex to decision-making. *J. Neurosci*. 19: 5473-81.

- Berenger, P., Soulage, C., Perrin, D., Pequignot, J.M., y Abraini, J.H., (2003).** Behavioral and neurochemical effects induced by subchronic exposure to 40 ppm toluene in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 74: 997-1003.
- Bergman, K., (1979).** Application and results of whole-body autoradiography in distribution studies of organic solvents. *Rev. Toxicol.* 12: 59-1198.
- Biedermann, M., Grob, K., y Morchio, G., (1985).** On the origin of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene in extra virgin olive oil. *Z Lebensm Unters Forsch.* 200: 266-72.
- Bjorklund, A. y Suendsen, C., (1999).** Breaking the brain-blood barrier. *Nature.* 397: 569-70.
- Boje, K.M. y Arora, P.K., (1992).** Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. *Brain Res.* 587: 250-56.
- Bojes, H.K., Datta, K., Xu, J., Chin, A., Simonian, P., Nunez, G., y Kehrer, J.P., (1997).** Bcl-xL overexpression attenuates glutathione depletion in FL5.12 cells following interleukin-3 withdrawal. *Biochem J.* 325: 315-9.
- Bowen, S.E. y Balster, R.L., (1998).** A direct comparison of inhalant effects in locomotor activity and schedule-controlled behavior in mice. *Exp. Clin. Psychopharmacol.* 6: 235-47.
- Bussey, T.J., Everitt, B.J., y Robbins, T.W., (1997).** Dissociable effects of cingulate and medial frontal cortex lesion on stimulus reward learning using a novel Pavlovian autoshaping procedure for the rat: implications for the neurobiology of emotion. *Behav Neurosci.* 111: 908-19.
- Cameron, A., y Rosenfeld, J., (2002).** Nutritional issues and supplements in amyotrophic lateral sclerosis and other neurodegenerative disorders. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 5: 631-43.
- Campbell, J.R., y Luthy, R.G., (1985).** Prediction of aromatic solute partition coefficients using the UNIFAC group contribution model. *Environ Sci Tech.* 19: 980-5.
- Carlini-Cotrim, B., y Carlini, E. A., (1988).** The use of solvents and other drugs among children and adolescents from a low socioeconomic background: A study of Sao Paulo, Brazil. *Int. J. Addictions.* 23: 1145-56.
- Carlson, J.N., Fitzgerald, L.W., Kellr, R.W. Jr., y Glick, S.D., (1993).** Lateralized changes prefrontal cortical dopamine activity induced by controllable and uncontrollable stress in the rat. *Brain. Res.* 630: 178:87.

Carlson, S.E., Carver, J.D., y House, S.G., (1986). High fat diets varying in ratios of polyunsaturated to saturated fatty acid and linoleic to linolenic acid: a comparison of rat neural and red cell membrane phospholipids. *J. Nutr.* 116: 718-25.

Carlsson, A., (1982). Exposure to toluene: Uptake, distribution and elimination in man. *Scandinavian J. W. Environ. Health.* 8: 43-55.

Celani, M.F., Fuxe, K., Agnati, L.F., Andersson, K., Hansson, T., Gustafsson, J.A., Battistini, N., y Eneroth, P., (1988). Effects of subacute treatment with toluene on central monoamine receptors in the rat. [3H] 5-HT binding sites and in [3H]-spiperone binding sites linked to dopamine receptors. *Toxicol. Lett.* 17: 275-81.

Chadwick, O., Yule, W., y Anderson, R., (1990). The examination attainments of secondary school pupils who abuse solvents. *British J Educ Psych.* 60: 180-91.

Chapman, D.E., Moore, T.J., Michener, S.R. y Powis, G., (1990). Metabolism and covalent binding of [14C]toluene by human and rat liver microsomal fractions and liver slices. *Drug Metab Dispos.* 18: 929-36.

Cheng, B., Christakos, S., y Mattson, M.P., (1994). Tumor necrosis factors protect neurons against metabolic-excitotoxic insults and promote maintenance of calcium homeostasis. *Neuron* 12: 139-53.

Codex Alimentarius [CODEX STAN 33-1981 (Rev. 1-1989)] (2001). Codex standard for olive oil, virgen and refined, and for refined olive-pomace oil. Codex Alimentarius, 8: 25-39.

Colton, C.A. y Gilbert, D.L., (1987). Production of superoxide anions by a CNS macrophage, the microglia. *FEBS Lett.* 223: 284-88.

Colton, C.A., Snell, J., Chernyshev, O., y Gilbert, D.L., (1994). Induction of superoxide anion and nitric oxide production in cultured microglia. *Ann NY Acad Sci.* 738: 54-63.

Colton, C.A., y Gilbert, D.L., (1993). Microglia, an in vivo source of reactive oxygen species in the brain. *Adv Neurol.* 59: 321-6.

Colton, C. A., Wilt, S., Gilbert, D., Chernyshev, O., Snell, J., y Dubois-Dalcq, M., (1996). Species differences in the generation of reactive oxygen species by microglia. *Mol Chem Neuropathol.* 28: 15-20.

Coscina, D.V., Yehuda, S., Dixon, L.M., y Kish, S.J., (1986). Leprohon-Greenwood CE. Learning is improved by a soybean oil diet in rats. *Life Sci.* 38: 1789-94.

Costa, L.G., Guizzetti, M., y Burry, M., (2002). Developmental neurotoxicity: do similar phenotypes indicate a common mode of action? A comparison of fetal alcohol syndrome, toluene embryopathy and maternal phenylketonuria. *Toxicol Lett.* 127: 197-205.

Crawford, M.A., Hassan, A.G. y Williams, G., (1976). Essential fatty acid and fetal growth. *Lancet.* 28: 452-53.

Cruz, S.L., Balster, R.L., y Woodward, J.J., (2000). Effects of volatile solvents on recombinant N-methyl-D-aspartate receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Br J Pharmacol.* 131: 1303-8.

Cruz, S.L., Mirshahi, T., Thomas, B., Balster, R.L., y Woodward, J.J., (1998). Effects of the abused solvent toluene on recombinant N-methyl-D-aspartate and non-N-methyl-D-aspartate receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 286: 334-40.

Cruz-Martín del Campo, S.L., y Torres, A., (2002). Determinación comparativa de efectos de disolventes industriales sobre aspectos pertinentes de salud ambiental y adicciones. Sustitución y/o reducción de psicotrópicos y fotorreactivos en disolventes industriales". Fideicomiso para la Investigación Sobre Inhalables. *INSP-CENIDS.*

Cuadros, M.A., y Navascues, J., (2001). Early origin and colonization of the developing central nervous system by microglial precursors. *Prog Brain Res.* 132: 51-9.

Danni, O., Brando, C., Burdino, E., Aragno, M., y Ugazio, G.A., (1986). Model for monitoring changes in liver function. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 54: 395-403.

Da-Silva, V.A., Malheiros, L.R. y Bueno, F.M., (1990). Effects of toluene exposure during gestation on neurobehavioral development of rats and hamsters. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 23: 533-7.

Davis, M., Hitchcock, J.M., Bowers, M.B., Berridge, C.W., Melia, K.R., y Roth, R.H., (1994). Stress-induced activation of prefrontal cortex dopamine turnover: blockade by lesions of the amygdala. *Brain. Res.* 664: 207-10.

de La Cruz J.P., Quintero, L., Villalobos, M.A., y Sanchez de la Cuesta F., (2000). Lipid peroxidation and glutathione system in hyperlipemic rabbits: influence of olive oil administration. *Biochim. Biophys. Acta.* 1485: 36-44.

de la Puerta, R., Martínez-Dominguez, E., y Ruiz-Gutierrez, V., (2000). Effect of minor components of virgin olive oil on topical antiinflammatory assays. *Z Naturforsch [C].* 55: 814-9.

Del Rio-Hortega, P., (1932). Microglia in Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System, Vol. 2, (Penfield, W., eds.), Hocker, New York. 481-534.

Desantis, S., Corriero, A., Acone, F., Zubani, D., Cirillo, F., Palmieri, G., y De Metrio, G., (2003). Lectin histochemistry on the dorsal epidermis on the Breton dog. *Acta Histochem.* 105: 73-9.

Dundarz, M.R., Turkbay, T., Akay, C., Sarici, S.U., Aydin, A., Denli, M., y Gokcay, E., (2003). Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in adolescents with inhalant abuse. *Turk J Pediatr.* 45: 43-5.

Dunham, N. W., y Miya, T. S., (1957). A note on a single apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J. Am. Pharm. Assoc.* 46: 208-209.

Edelfors S., Hass, U., y Hougaard, K.S., (2002). Changes in markers of oxidative stress and membrane properties in synaptosomes from rats exposed prenatally to toluene. *Pharmacol. Toxicol.* 90: 26-31.

Edelfors, S., y Ravn-Jonsen A., (1990). The effects of alcohols in vitro on the nervous cell membrane measured by changes in the (Ca²⁺/Mg²⁺) ATPase activity and fluidity of the synaptosomal membrane. *Pharmacol Toxicol.* 67: 56-60.

Eggstein, M., y Kreutz, F., (1966). Triglyceride GPO-PAP. *Klein Wschr.* 44: 262-67.

Elvevoll, E., y James, D., (2000). Potential Benefits of Fish for Maternal, Fetal and Neonatal Nutrition: a Review of the Literature. Ed. *FAO. Food, Nutrition and Agriculture.* 27: 1-40.

Engelke, M., Diehl, H. y Tahti, H., (1992). Effects of toluene and n-hexane on rat synaptosomal membrane fluidity and integral enzymes activities. *Pharmacol. Toxicol.* 71: 343-7.

Environmental Protection Agency (U.S. EPA) (1984). Integrated Risk Information System (IRIS) database. Reference concentration (RfC) for toluene.

Environmental Protection Agency (U.S. EPA) (1990). Drinking water criteria document for toluene. Prepared by the Environmental Criteria and Assessment Office of Health and Environmental Assessment, U.S. EPA. *Cincinnati, OH, for the Office of Drinking Water. ECAO-CIN-408.*

Environmental Protection Agency (U.S. EPA) (1992). Respiratory health effects of passive smoking: lung cancer and other disorders. Washington DC, *EPA Report No. EPA/600/6-90/006F.*

Environmental Protection Agency (U.S. EPA) (1993). Ambient concentration summaries for Clean Air Act. Title III Hazardous Air Pollutants. Final report.). Washington, D.C., US (*EPA Report No. EPA/600/R-94/090*).

Ernstgard, L., Gullstrand, E., Johanson, G. y Lof, A., (1999). Toxicokinetic interactions between orally ingested chlorzoxazone and inhaled acetone or toluene in male volunteers. *Toxicol Sci.* 48: 189-96.

Esterbauer, H., Puhl, H., Dieber-Rotheneder, M., Waeg, G., y Rabl, H., (1991). Effect of antioxidants on oxidative modification of LDL. *Ann Med.* 23: 573-81.

Evans E.B. y Balster, R.L., (1991). CNS depressant effects of volatile organic solvents. *Neurosci. Behav. Rev.* 15: 233-241.

Faust, R.A., (1994). Toxicity summary for toluene. Chemical Hazard Evaluation Group Biomedical and Environmental Information Analysis Section Health Sciences Research Division Oak Ridge National Laboratory Oak Ridge, Tennessee. 1-15.

Fawcett, D., (1995). Tratado de histología. 12ª ed. Madrid. *Interamericana Mc Graw Hill.* 396-400.

Fein, G., Di Sciafani, V. y Meyerhoff, D., (2002). Prefrontal cortical volume reduction associated with frontal cortex function deficit in 6-week abstinent crack-cocaine dependent men. *Drug. Alcohol. Depend.* 68: 87-93.

Ferrari, D., Wesselborg, S., Bauer, M.K.A., y Schulze-Osthoff, K., (1997). Extracellular ATP activates transcription factor NF-KB through P2Z purinoreceptor by selectively targeting NF-KB p65. *J. Cell Biol.* 139: 1635-43.

Flanagan, R.J., y Ives, R.J., (1994). Volatile substance abuse. *Bull Narc.* 46: 49-78.

Funari, S.S., Barcelo, F., y Escriba, P.V., (2003). Effects of oleic acid and its congeners, elaidic and stearic acids, on the structural properties of phosphatidylethanolamine membranes. *J Lipid Res.* 44: 567-75.

Fuxe, K., Martire, M., von Euler, G., Agnati, L.F., Hansson, T., Anderson, K., Gustafsson, J.A., y Harfstrand, A., (1987). Effects of subacute treatment with toluene on cerebrocortical alpha- and beta-adrenergic receptors in the rat. Evidence for an increased number and a reduced affinity of beta-adrenergic receptors. *Acta Physiol. Scand.* 130: 307-11.

Gallagher, M., McMahan, R.W., y Schoenbaum, G., (1999). Orbitofrontal Cortex and Representation of Incentivative Value in Associate learning. *J. Neurosci.* 19: 6610-14.

Ganter, S., Northoff, H., Mannel, D., y Gebicke-Haerter, P.J., (1992). Growth control of cultured microglia. *J. Neurosci. Res.* 33: 218-30.

Garbe, T.R., y Yukawa, H., (2001). Common solvent toxicity: autoxidation of respiratory redox-cyclers enforced by membrane derangement. *Z Naturforsch [C]*. 56: 483-91.

Garzon-De La Mora, P., García-Estrada, J., Ballesteros-Guadarrama, A., Navarro-Ruiz, A., De Jesus Macias-Comparan, J., Murillo-Leaño, M., Casillas-Ochoa, J., Peña-Moreno, P., (1996). Electrochemical fixation techniques. I. Electrochemical fixation of human brain. *Arch Med Res.* 27: 37-42.

Gehrmann, J., (1996). Microglia: a sensor to threats in the nervous system? *Res Virol.* 147: 79-88.

Gehrmann, J., Matsumoto, Y., y Kreutzberg, G.W., (1995). Microglia: intrinsic immune effector cell of the brain. *Brain Res Brain Res Rev.* 20: 269-87.

Gehrmann, J., y Banati, R.B., (1995). Microglial turnover in the injured CNS: activated microglia undergo delayed DNA fragmentation following peripheral nerve injury. *J Neuropathol Exp Neurol.* 54: 680-8.

Gerasimov, M.R., Schiffer, W.K., Marsteller, D., Ferrieri, R., Alexoff, D., y Dewey, S.L., (2002). Toluene inhalation produces regionally specific changes in extracellular dopamine. *Drug Alcohol Depend.* 65: 243-51.

Gimeno, E., Fito, M., Lamuela-Raventos, R.M., Castellote, A.I., Covas, M., Farre, M., de La Torre-Boronat, M.C., y Lopez-Sabater, M.C., (2002). Effect of ingestion of virgin olive oil on human low-density lipoprotein composition. *Eur J Clin Nutr.* 56: 114-20.

Giulian, D., e Ingeman, J.E., (1988). Colony-stimulating factors as promoters of amoeboid microglia. *J. Neurosci.* 8: 4707-17.

Giulian, D., Li, J., Li, X., George, J., y Rutecki, P.A., (1994). The impact of microglia-derived cytokines upon gliosis in the CNS. *Dev Neurosci.* 16: 128-36.

Goetz, C.G., (1985). Organic Solvents. In *Neurotoxins in Clinical Practice*, ed. by C. G. Goetz, Jamaica, NY: *Spectrum*; 65-90.

Gospe, S.M. Jr. y Calaban, M.J., (1988). Central nervous system distribution of inhaled toluene. *Appl. Toxicol.* 11: 540-5.

Gotohda, T., Tokunaga, I., Kubo, S., Morita, K., Kitamura, O., y Eguchi, A., (2000). Effect of toluene inhalation on astrocytes and neurotrophic factor in rat brain. *Forensic Sci Int.* 113: 233-8.

Graeber, M.B., Lopez-Redondo, F., Ikoma, E., Ishikawa, M., Imai, Y., Nakajima, K., Kreutzberg, G.W., y Kohsaka, S., (1998). The microglia-macrophage response in the neonatal rat facial nucleus following axotomy. *Brain. Res.* 813: 241-253.

Graeber, M.B., y Kreutzberg, G.W., (1994). Microglia, cell of the brain decade. *Brain Pathol.* 4: 337-9.

Gupta, B.N., Kumar, P., y Srivastava, A.K., (1990). An investigation of the neurobehavioral effects on workers exposed to organic solvents. *J. Soc. Occup. Med.*, 40: 94.

Gutiérrez, F., Hernández, I.M., y Rabago S., (1978). Psychological, familial, and social study of 32 patients using inhalants. In *Voluntary Inhalation of Industrial Solvents*, ed. by C. W. Sharp and L. T. Carroll. Rockville, MD: National Institute on Drug Abuse, DHHS Pub. No. (ADM 87-1527).

Gutteridge, J., y Halliwell, B., (1999). Antioxidant protection and oxygen radical signaling: En: reactive oxygen species in biological systems: An Interdisciplinary Approach. D.L. Gilbert and C.A. Colton (eds) Kluwer Academic Press. Plenum Publishers NY. 189-218.

Guzmán, F.C., (1975). Neurobiología del thinner: Alteraciones conductuales producidas a largo plazo. *Cuadernos Científicos CEMEF, México*, 2: 49.

Haag, M., (2003). Essential fatty acids and the brain. *Can. J. Psychiatry.* 48: 195-2003.

Hailer, N.P., Heppner, F.L., Haas, D., y Nitsch, R., (1998). Astrocytic factors deactivate antigen presenting cells that invade the central nervous system. *Brain Pathol.* 8: 459-74.

Halifeoglu, I., Canatan, H., Ustundag, B., Ilhan, N., y Inanc, F., (2000). Effect of thinner inhalation on lipid peroxidation and some antioxidant enzymes of people working with paint thinner. *Cell Biochem Funct.* 18: 263-7.

Hall, C.S., (1934). Emotional behaviour in the rat. I Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *J Comp Psychol.* 22: 345-52.

Hao, C., Richardson, A. y Fedoroff, S., (1991). Macrophage-like cells originate from neuroepithelium in culture: characterization and properties of the macrophages-like cells. *Int. J. Dev. Neurosci.* 9: 1-14.

Harada, T., Harada, C., Kohsaka, S., Wada, E., Yoshida, K., Ohno, S., Mamada, H., Tanaka, K., Parada, L.F., y Wada, K., (2002). Microglia-Muller glia cell

interactions control neurotrophic factor production during light-induced retinal degeneration. *J Neurosci.* 22: 9228-36.

Harris, W.E. y Stahl, W.L., (1983). Incorporation of cis-parinic acid, a fluorescent fatty acid, into synaptosomal phospholipids by an acyl-CoA-acyltransferase. *Biochem Biophys. Acta.* 736: 79-91.

Hazardous Substances Data Bank (HSDB), (1999). National Library of Medicine, Bethesda, MD.

Heilig, M., y Widerlov, E., (1995). Neurobiology and clinical aspects of neuropeptide Y. *Crit Rev Neurobiol.* 9: 115-36.

Hickey, W.F., y Kimura, H., (1988). Perivascular microglia cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science;* 239: 290-92.

Hikosaka, O., Nakamura, K., Sakai, K., y Nakahara, H., (2002). Central mechanisms of motor skill learning. *Curr. Opin. Neurobiol.* 12: 217-22.

Hillefors-Berglund, M., Liu, Y., y von Euler, G., (1995). Persistent, specific and dose-dependent effects of toluene exposure on dopamine D2 agonist binding in the rat caudate-putamen. *Toxicol.* 100: 185-94.

Honda, S., Sasaki, Y., Ohsawa, K., Imai, Y., Nakamura, Y.M., Inoue, K. y Kohsaka, S., (2001). Extracellular ATP or ADP induce chemotaxis of cultured microglia through Gi/o-coupled P2Y receptors. *J. Neurosci.* 21: 1975-82.

Honma, T., (1983). Changes in acetylcholine metabolism in rat brain after a short-term exposure to toluene and n-hexane. *Toxicol Lett.* 16: 17-22.

Hougaard, K.S., Hass, U., Lund, S.P., y Simonsen, L., (1999). Effects of prenatal exposure to toluene on postnatal development and behavior in rats. *Neurotoxicol Teratol;* 21: 241-50

Huang, J., Asaeda, N., Takeuchi, Y., Shibata, E., Hisanaga, N., Ono, Y., y Kato, K., (1992). Dose dependent effects of chronic exposure to toluene on neuronal and glial cell marker proteins in the central nervous system of rats. *Br J Ind Med.* 49: 282-6.

Huang, J., Kato, K., Shibata, E., Hisanaga, N., Ono, Y., y Takeuchi, Y., (1990). Effects of subacute toluene exposure on neuronal and glial marker proteins in rat brain. *Toxicology.* 61: 109-17.

Hulseley, M.G., Pless, C.M., White, B.D., y Martin, R.J. (1995). ICV administration of anti-NPY antisense oligonucleotide: effects on feeding behavior, body weight, peptide content and peptide release. *Regul Pept.* 59: 207-14.

Ikeda, T., Maehara, N., Sedamoto, T., Harabuchi, I., Yamamura, K., y Myyake, H., (1981). Effects of toluene exposure on the rest-activity cycle of rats. *Toxicol. Lett.* 9: 255-65.

Inoue, K., Nakajima, K., Morimoto, T., Kikuchi, Y., Koizumi, S., Illes, P., y Kohsaka, S., (1998). ATP stimulation of Ca²⁺-dependent plasminogen release from cultured microglia. *Br. J. Pharmacol.* 123: 1304-10.

International Agency for Research on Cancer (IARC), (1988). Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to Humans. *IARC*; 44.

International olive oil council (IOOC), (1999). *Consejo Internacional del Aceite de Oliva: Normativa comercial aplicable al aceite de oliva y al aceite de orujo de oliva.* COI/T.15/NC No.2.

International Programme on Chemical Safety (IPCS) (1999). Environmental Health Criteria 52; Toluene.

Iqbal, N., (2001). Neurotoxic effects of inhalants. *Annals of Saudi Medicine.* 21: 216-18.

Jones, B.J., y Roberts, D.J., (1968). A rotarod suitable for quantitation measurement of motor incoordination in naive mice. *Naunun-Schmeidebergs Arch. of Pharmacol.* 259: 211.

Jueptner, M., Frith, C. D., Brooks, D. J., Frackowiak, R.S.J. y Passingham, R. E., (1997). Anatomy of Motor Learning. II. Subcortical Structures and Learning by Trial and Error. *J Neurophysiol.* 77: 1325-37.

Kafatos, A., (1995). Olive oil consumption in Crete. One of the main characteristics of the Mediterranean – Cretan Diet. *Olivae*; 56:22.

Kamara, K., Eskay, R., y Castonguay, T., (1998). High-fat diets and stress responsivity. *Physiol. Behav.* 64: 1-6.

Kamijima, M., Nakazawa, Y., Yamakawa, M., Shibata, E., Hisanaga, N., Ono, Y., Toida, M., y Takeuchi, Y., (1994). Metabolic acidosis and renal tubular injury due to pure toluene inhalation. *Arch Environ Health.* 49: 410-3.

Kane, D.J., Sarafian, T.A., Anton, R., Hahn, H., Gralla, E.B., Valentine, J.S., Ord, T., y Bredesen, D.E., (1993). Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science.* 262: 1274-7.

Kaneko, T., Wang, P.Y., y Sato, A., (2000). Relationship between blood/air partition coefficients of lipophilic organic solvents and blood triglyceride levels. *Toxicology.* 143: 203-8.

Kato, H., Takahashi, A., e Itoyama, Y., (2003). Cell cycle protein expression in proliferating microglia and astrocytes following transient global cerebral ischemia in the rat. *Brain Res Bull.* 60: 215-21.

Kato, H., y Walz, W., (2000). The initiation of the microglial response. *Brain Pathol.* 10: 137-143.

Keller, J.N., Kindy, M.S., Holsberg, F.W., St. Clair, D.K., Yen, H.C., Germeyer, A., Steiner, S.M., Bruce-Keller, A.J., Hutchins, J.B., y Mattson, M.P., (1998). Mitochondrial manganese superoxide dismutase prevents neural apoptosis and reduces ischemic brain injury: suppression of peroxynitrite production, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction. *J. Neurosci.* 18: 687-97.

Kerner, K., (1988). Current topics in inhalant abuse. In. Crider R.A., Rouse B.A., eds. Epidemiology of inhalant abuse. An update. *NIDA Research Monograph 85.* U.S. Department of Health and Human Services. 8-29.

Kim, H., Wang, R.S., Elovaara, E., Raunio, H., Pelkonen, O., Aoyama, T., Vainio, H., y Nakajima, T., (1997). Cytochrome P450 isozymes responsible for the metabolism of toluene and styrene in human liver microsomes. *Xenobiotica.* 7: 657-65.

Kinsella, J.E., (1990). Lipids, membrane receptors, and enzymes: effects of dietary fatty acids. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 14: 200S-217S.

Kiritsakis, (1998). Edición del aceite de oliva del A. Segundo; del árbol a la tabla. *Food y Nutrition Press, Inc.* Trumbull. Connecticut, 006611, E.E.U.U.

Kiritsakis, (1999). Composición de aceite de oliva y su efecto alimentario y de salud. New Horizons for an old crop. *Proceedings of the 10th International Rapeseed Congress, Canberra Australia.*

Kiritsakis, A., y Markakis, P., (1987). Olive oil: a review. *Adv Food Res.* 31: 453-82.

Kiriu, T., Ameno, K., Fuke, C., Ameno, S., y Ijiri, I., (1990). The distribution of toluene in the brain and its effects on the brain catecholamines in acute toluene poisoning. *Nippon Hoigaku Zasshi.* 44: 25-33.

Kishi, R., Harabuchi I., Ikeda, T., Yokota, H. y Miyake, H., (1988). Neurobehavioural effects and pharmacokinetics of toluene in rats and their relevance to man. *Br. J. Ind. Med.* 45: 396-408.

Kishi, R., Harabuchi, I., Katakura, Y., Ikeda, T., y Miyake, H., (1993). Neurobehavioral effects of chronic occupational exposure to organic solvents among Japanese industrial painters. *Environ Res.* 62: 303-13.

Kishi, R., y Miyake, H., (1990). Acute and chronic effects of organic solvents on the central nervous system. Use of psychobehavioral performance tests in the assessment of toxicity. *Sangyo Igaku*. 32: 3-17.

Kitamura, T., Miyake, T. y Fujita, S., (1984). Genesis of resting microglia in the gray matter of mouse hippocampus, *J. Comp. Neuron*. 226: 421-33.

Kloss, C.U., Kreutzberg, G.W., y Raivich, G., (1997). Proliferation of ramified microglia on an astrocyte monolayer: characterization of stimulatory and inhibitory cytokines. *J Neurosci Res*. 49: 248-54.

Knox, J.W., y Nelson, J.R., (1966). Permanent encephalopathy from toluene inhalation. *N Engl J Med*. 275: 1494-6.

Korobkin, R., Asbury, A.K., Sumner, A.J., y Nielsen, S.L., (1975). Glue-sniffing neuropathy. *Arch Neurol*. 32: 158-62.

Korpela, M. y Tahti H., (1988). The effect in vitro and in vivo toluene exposure on rat erythrocyte and synaptosome membrane integral enzymes. *Pharmacol Toxicol*. 63: 30-2.

Korpela, M., (1989). Inhibition of synaptosome membrane-bound integral enzymes by organic solvents. *Scand J Work Environ Health*. 15: 64-8.

Korsak, Z., Sokal, J.A. y Gorny, R., (1992). Toxic effects of combined exposure to toluene and m-xylene in animals. III. Suchronic inhalation study. *Pol. J. Occup. Med Environ Health*. 5: 27-33.

Kreutzberg, G.W., (1995). Microglia, the first line of defense in brain pathologies. *Arzneimittelforschung*. 45: 357-60.

Kreutzberg, G.W., (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends. Neurosci*. 19: 312-318.

Kruman, I., Annadora J. Bruce-Keller, A.J., Bredesen, D., Waeg, G., y Mattson, M.P., (1997). Evidence that 4-Hydroxynonenal Mediates Oxidative Stress-Induced Neuronal Apoptosis. *J. Neurosci*. 17: 5089-5100.

Kushi, L.H., Lenart, E.B., y Willett, W.C., (1995). Health implications of Mediterranean diets in light of contemporary knowledge. Meat, wine, fats, and oil. *Am J Clin Nutr*. 61: 1416s-1427s.

Kyvik, K.R., y Moen, B., (1990). Nervous system impairment caused by solvents. *Tidsskr Nor Laegeforen*. 110: 1342-5.

Lam, C.W., Galen, T.J., Boyd, J.F., y Pierson, D.L., (1990). Mechanism of transport and distribution of organic solvents in blood. *Toxicol Appl Pharmacol.* 104: 117-29.

Lawson, L.J., Perry, V.H., Dri, P., y Gordon, S., (1990). Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neurosci.* 39: 151-70.

Lawson, L.J., Perry, V.H., y Gordon, S., (1992). Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience.* 48: 405-15.

Lazar, R.B., Ho, S.U., Melen, O., y Daghestani, A.N., (1983). Multifocal central nervous system damage caused by toluene abuse. *Neurology.* 33: 1337-40.

Leal, H., Mejia, L., Gómez, L., y Salinas de Valle, O., (1978). Naturalistic study on the phenomenon of inhalant use in a group of children in Mexico City. In *Voluntary Inhalation of Industrial Solvent*, ed. by C. W. Sharp and L. T. Carroll. Rockville, MD: National Institute on Drug Abuse.

LeBel, C.P., y Bondy, S.C., (1991). Oxygen radicals: common mediators of neurotoxicity. *Neurotoxicol Teratol.* 13: 341-6.

LeBel, C.P., y Schatz R.A., (1990). Altered synaptosomal phospholipid metabolism after toluene: possible relationship with membrane fluidity, Na⁺, K⁽⁺⁾—adenosine triphosphatase and phospholipid methylation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 253: 1189-97.

Levine, A.S., y Morley, J.E., (1984). Neuropeptide Y: a potent inducer of consummatory behavior in rats. *Peptides.* 5: 1025-9

Ling, E.A., (1979). Transformation of monocytes into amoeboid microglia in the corpus callosum of postnatal rats, as shown by labeling monocytes by carbon particles. *J. Anat.* 128: 847-858.

Linnik, M.D., Zobrist, R.H., y Hatfield, M.D., (1993). Evidence supporting a role for programmed cell death in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke.* 24: 2002-8; discussion 2008-9.

Liu, B., Wang, K., Gao, H.M., Mandavilli, B., Wang, J.Y., y Hong, J.S. (2001) Molecular consequences of activated microglia in the brain: overactivation induces apoptosis. *J Neurochem.* 77(1):182-9.

MacDougal, J.N., 1990. Dermal absorption of organic chemical vapors in rats and humans. *Fundamental and applied toxicology;* 14: 29-308.

MacManus, J.P., Buchan, A.M., y Hill, I.E., (1993). Rasquinha I, Preston E. Global ischemia can cause DNA fragmentation indicative of apoptosis in rat brain. *Neurosci Lett.* 164: 89-92.

Maimanee, T.A., Brain, P.F., y Zari, T.A., (2003). Dietary fats influence 'open-field' behaviour of male and female laboratory mice. *Lab Anim.* 37: 222-32.

Mariane, L., (1998). La dieta como determinante del desarrollo del Sistema Nervioso Central: rol de los ácidos grasos esenciales. *Rev. Archivos Latinoamericanos de Nutrición.* 48: 29-33.

Markesbery, W.R., y Carney, J.M., (1999). Oxidative alterations in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* 9: 133-46.

Martin, K.A., y Slapper, D., (2001). Toxicity Toluene. *Med. J.* 2: 2-10.

Martínez-Martos, J.M., Ramírez-Expósito, M.J., Prieto, I., Mayas, M.D., y Ramírez, M., (1999). Influencia del ácido eleico sobre la actividad aminopeptidasa de astrocitos de rata. *Rev Neurol.* 29: 97-101.

Marubio, L.M., Gardier, A.M., Durier, S., David, D., Klink, R., Arroyo-Jimenez, M.M., McIntosh, J.M., Rossi, F., Champtiaux, N., Zoli, M., y Changeux, J.P., (2003). Effects of nicotine in the dopaminergic system of mice lacking the alpha4 subunit of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Eur J Neurosci.* 17: 1329-37.

Masella, R., Giovannini, C., Vari, R., Di Benedetto, R., Coni, E., Volpe, R., Fraone, N., y Bucci, A., (2001). Effects of dietary virgin olive oil phenols on low density lipoprotein oxidation in hyperlipidemic patients. *Lipids;* 36: 1195-202.

Massaquaoi, S.G. y Hallett, M., (1998). In Parkinson's disease and movement disorders, eds., Jankovic, J. & Tolosa, E. (*William & Wilkins, Baltimore*); 623-686.

Mataix, J., Quiles, J.L., Huertas, J.R., Battino, M., y Manas, M., (1998). Tissue specific interactions of exercise, dietary fatty acids, and vitamin E in lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med.* 24: 511-21.

Mattia, C.J., Adams, J.D. Jr., y Bondy, S.C., (1993a). Free radical induction in the brain and liver by products of toluene catabolism. *Biochem. Pharmacol.* 46(1): 103-110.

Mattia, C.J., Ali, S.F., y Bondy, S.C., (1993b). Toluene-induced oxidative stress in several brain regions and other organs. *Mol. Chem. Neuropathol.* 18(3): 313-28.

Mattia, C.J., LeBel, C.P., y Bondy, S.C., (1991). Effects of toluene and its metabolites on cerebral reactive oxygen species generation. *Biochem Pharmacol.* 42: 879-82.

McDonald, D.R., Brunden, K.R., y Landreth, G.E., (1997). Amyloid fibrils activate tyrosine kinase-dependent signaling and superoxide production in microglia. *J. Neurosci.* 17: 2284-94.

McGeer, P.L., Kawamata, T., Walker, D.G., Akiyama, H., Tooyama, I., y McGeer, E.G., (1993). Microglia in degenerative neurological disease. *Glia*; 7: 84-92.

Meda, L., Cassatelia, M.A., Szendrei, G.I., Otvos, Jr. L., Baron, P., Villalba, M., Ferrari, D., y Rossi, F., (1995). Activation of microglial cells by β -amyloid protein and interferon- γ . *Nature.* 374: 647-50.

Melby, Jr. N.H., y Altman N.H., (1974). Clinical Pathology: Blood chemistry. Handbook of laboratory animal science. Vol 2 CRC Press; Cleveland, OH. 381

Mertsch, K., Hanisch, U., Kettenmann, H., y Schnitzer, J., (2001). Characterization of microglial cells and their response to stimulation in an organotypic retinal culture system. *J. Comp. Neurol.* 431: 217-27.

Metodiewa, D., y Koska, C., (2000). Reactive oxygen species and reactive nitrogen species: relevance to cytoneurotoxic events and neurologic disorders. An overview. *Neurotox Res.* 1: 197-233.

Minghetti, L., y Levi, G., (1998). Microglia as effector cells in brain damage y repair: focus on prostanoides and nitric oxide. *Prog. Neurobiol.* 54: 99-125.

Mølhave, L., y Pedersen, O.F., (1984). Measurements of alveolar concentration of toluene. *Int Arch Int Arch Occup Environ Health* 54: 65-71.

Monster, A.C. (1993). Evaluation of biological monitoring parameters for occupational exposure toluene. *Int Arch Int Arch Occup Environ Health.* 65: S159-S162.

Montine, T.J., Huang, D.Y., Valentine, W.M., Amarnath, V., Saunders, A., Weisgraber, K.H., Graham, D.G., y Strittmatter, W.J., (1996). Crosslinking of apolipoprotein E by products of lipid peroxidation. *J Neuropathol Exp Neurol.* 55: 202-10.

Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D.J., Sakmann, B., y Seeburg, P.H., (1994). Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron.* 12: 529-40.

Morgan, D.L., Cooper S.W., Carlock, D.L., Sykora, J.J., Sutton, B., Mattie, D.R., y McDougal, J.N., (1991). Dermal absorption of neat and aqueous volatile organic chemicals in the Fischer 344 rat. *Environ Res.* 55: 51-63.

Moron, L., Pascual, J., Portillo, M.P., Casis, L., Macarulla, M.T., Abecia, L.C., y Echevarria, E., (2004). Toluene alters appetite, NPY, and galanin immunostaining in the rat hypothalamus. *Neurotoxicol Teratol.* 26: 195-200.

Morrison, R.T., y Boyd, R.N., (1990). Química orgánica. 5a. edición, editorial Addison-Wesley Iberoamericana. 484, 540-542.

Morton, D.B., Abbot, D., Barclay, R., Close, B.S., Ewbank, R., Gask, D., Heath, M., Mattic, S., Poole, T., y Seamer, J., Southee, J., Thompson, A., Trussel, B., West C., y Jennings, M. (1993). Extracción de Sangre en los Mamíferos y Aves de Laboratorio. *Laboratory Animals;* 27: 1-22.

Mutti, A., Falzoi, M., Romanelli, A., Bocchi, M.C., Ferroni, C., y Franchini, I., (1988). Brain dopamine as a target for solvent toxicity: effects of some monocyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicology.* 49: 77-82.

Nagata, K., Takei, N., Nakajima, K., Saito, H., y Kohsaka, S., (1993). Microglial conditioned medium promotes survival and development of cultured mesencephalic neurons from embryonic rat brain. *J. Neurosci. Res.* 34: 357-63.

Nagata, S., (1997). Apoptosis by death factor. *Cell;* 88: 355.

Nakajima, K., Hamanoue, M., Shimojo, M., Takei, N., y Kohsaka, S., (1989). Characterization of microglia isolated from a primary culture of embryonic rat brain by a simplified method. *Biomed. Res.* 10: 411-423.

Nakajima, K., Kohsaka, S., Tohyama, Y., y Kurihara, T., (2003). Activation of microglia with lipopolysaccharide leads to the prolonged decrease of conventional protein kinase C activity. *Brain Res Mol Brain Res.* 110: 92-9.

Nakajima, K., y Kohsaka, S., (2001). Microglia: activation and their significance in the central nervous system. *J Biochem.* 130: 169-75.

Nakajima, T., Wang, R.S., Elovaara, E., Park, S.S., Gelboin, H.V., y Vainio, H., (1993). Cytochrome P450-related differences between rats and mice in the metabolism of benzene, toluene and trichloroethylene in liver microsomes. *Biochem Pharmacol.* 5: 1079-85.

Nakajima, T., y Wang, R.S., (1994). Induction of cytochrome P450 by toluene. *Int. J. Biochem.* 26: 1333-40.

Nakajima, T., Wang, R.S., Elovaara, E., Gonzalez, F.J., Gelboin, H.V., Raunio, H., Pelkonen, O., Vainio, H., y Aoyama, T., (1997). Toluene metabolism by cDNA-expressed human hepatic cytochrome P450. *Biochem Pharmacol.* 53: 271-7.

National Drug Intelligence Center (NDIC) (2002). Esnifar. El uso indebido de los inhalantes, Boletín Informativo. *Dep. Just. U.S.* L0508-002:1-8.

National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) (1988). Proposed national strategies for the prevention of leading work-related diseases and injuries. *Neurotoxic disorders, U.S. Department of Health and Human Services*, 2.

National Toxicology Program (NTP) (1990). Toxicology and Carcinogenesis Studies of Toluene (CAS No. 108-88-3) in F344/N Rats and B6C3F₁ Mice (Inhalation Studies). *Technical Report Series No. 371. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Research Triangle Park, NC.*

Navarro, M.D., Periago, J.L., Pita, M.L., y Hortelano, P., (1994). The n-3 polyunsaturated fatty acid levels in rat tissue lipids increase in response to dietary olive oil relative to sunflower oil. *Lipids*; 29: 845-9.

Nazarian, B.E., y Connolly, H., (2002). Hydrocarbon Inhalation Injury. *eMedicine Specialties*. Section 2-10.

Nebendabl, K., (2001). The handbook of experimental animals: The laboratory rat. Ed. by George J. Krinke; *Ed. Academic Press*; 463-479.

Nielsen, D.M., Crosley, K.J., Séller, R.W. Jr., Glick, S.D., y Carlson, J.N., (1999). Left and right 6-hydroxydopamine lesions of the medial prefrontal cortex differentially affect voluntary ethanol consumption. *Brain. Res.* 823: 59-66).

Nitsch, R.M., Blusztajn, J.K., Pittas, A.G., Slack, B.E., Growdon, J.H., y Wurtman, R.J., (1992). Evidence for a membrane defect in Alzheimer disease brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 1671-75.

Ochoa-Herrera, J.J., Huertas, J.R., Quiles, J.L., y Mataix, J., (2001). Dietary oils high in oleic acid, but with different non-glyceride contents, have different effects on lipid profiles and peroxidation in rabbit hepatic mitochondria. *J. Nutr. Biochem.* 12: 357- 64.

Oetting, E.R., Edwards, R.W., y Beauvais, F., (1988). Social and Psychological factors underlying inhalant abuse. *In National Institute on Drug Abuse Research Monograph 85: Epidemiology of Inhalant Abuse: An Update*, ed. By R. Crider and B. Rouse, Washington, D.C.: U.S. Govt. Print. Off. 172-203.

Passing, H., y Bablok, W., (1983). A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 21: 709-20.

Paterson, S.C., y Sarvesvaran, R., (1983). Plastic bag death: A toluene fatality. *Med. Sci. Law.* 23: 64-66.

Paxinos, G., y Watson, C., (1982). The rat brain in Stereotaxic Coordinates, *Academic, New York.*

Persson, L., Hardemark, H.G., Gustafsson, J., Rundstrom, G., Mendel-Hartvig, I., Esscher, T., y Pahlman, S., (1987). S-100 protein and neuron-specific enolase in cerebrospinal fluid and serum: markers of cell damage in human central nervous system. *Stroke.* 18: 911-8.

Pfriege, F., y Barres, B., (1995). What de fly's glia tell the fly's brain? *Cell.* 83: 671-74.

Polakowska, B., (1989). Current views on the pathological changes in the nervous system of persons chronically exposed to organic solvents. *Wiad Lek;* 42: 970-4.

Portera-Cailliau, C., Hedreen, J.C., Price, D.L., y Koliatsos, V.E., (1995). Evidence for apoptotic cell death in Huntington disease and excitotoxic animal models. *J Neurosci.* 15: 3775-87.

Pres, E., y Done, A. K., (1967). Physiologic effects and community control measures for intoxication from the intentional of organic solvents. *Pediatrics;* 39: 611-22.

Preus, T.M., (1995). Do rats prefrontal cortex? The Rose-Woolsey-Akert program reconsidered. *J. Cognitive Neurosc.* 7: 1-24.

Pryor, G.T. (1991). A toluene-induced motor syndrome in rats resembling that seen in some human solvent abusers. *Neurotoxicol. Teratol.* 13: 387-400.

Quiles, J.L., Farquharson, A.J., Simpson, D.K., Grant, I., y Wahle, K.W., (2002). Olive oil phenolics: effects on DNA oxidation and redox enzyme mRNA in prostate cells. *Br J Nutr.* 88: 225-34.

Quiles, J.L., Ramirez-Tortosa, M.C., Ibanez, S., Alfonso Gonzalez J., Duthie, G.G., Huertas, J.R., y Mataix, J. (1999) Vitamin E supplementation increases the stability and the in vivo antioxidant capacity of refined olive oil. *Free Radic Res. Suppl:* S129-35.

Rabovsky, A., y Cuomo, J., (1999). Olive Oil: Direct Measure of Antioxidant Activity. *Free Radic. Biol. Med.* 27: S42.

Ragozzino, M.E., Adams, S., y Kesner, R.P., (1998). Differential involvement of the dorsal anterior cingulate and prelimbic-infralimbic areas of the rodent prefrontal cortex in spatial working memory. *Behav. Neurosci.* 112: 747.

Raikhlin-Eisenkraft, B., Hoffer, E., Baum, Y., y Bentur, Y., (2001). Determination of urinary hippuric acid in toluene abuse. *J Toxicol Clin Toxicol.* 39: 73-6.

Raivich, G., Gehrman, J., y Kreutzberg, G.W., (1991). Increase of macrophage colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulation factor receptors in the regenerating rat facial nucleus. *J. Neurosci. Res.* 30: 682-686.

Rajadhyaksha, M.S., y Khan, J., (2002). Glial Cells: The other cells of the Nervous System. An Introduction to glial cell. *RESONANCE.* 4-10.

Rana, S.V., y Kumar, S., (1994). Lipid peroxidation in liver, kidney and brain of rats after combined exposure to xylene, toluene and methyl alcohol. *Indian J Exp Biol.* 32:919-21.

Riegel, A.C., Ali, S.F., y French, E.D., (2003). Toluene-induced locomotor activity is blocked by 6-hydroxydopamine lesions of the nucleus accumbens and the mGluR2/3 agonist LY379268. *Neuropsychopharm.* 28: 1440-7.

Riegel, A.C., y French, E.D., (2002). Abused inhalants and central reward pathways: electrophysiological and behavioral studies in the rat. *Ann. NY Acad. Sci.* 965: 281-91.

Riikonen, J., Jaatinen, P., Rintala, J., Porsti, I., Karjala, K., y Hervonen, A., (2002). Intermittent ethanol exposure increases the number of cerebellar microglia. *Alcohol Alcohol.* 37: 421-6.

Ríos, M.J. (2001). Efectos de los solventes orgánicos sobre el sistema nervioso. Los métodos neurológicos (Revisión). *Neurosci. Cub.* 78: 107-109.

Roach, P.D., Balasubramaniam, S., Hirata, F., Abbey, M., Szauto, A., y Simons, L.A., (1993). The low density lipoprotein receptor and cholesterol synthesis are affected differently by dietary cholesterol in rat. *Biochem. Biophys. Acta.* 1170: 165-72.

Rogers, W.R., Miller, C.S., y Bunegin, L., (1999). A rat model of neurobehavioral sensitization to toluene. *Toxicol Ind Health;*15: 356-69.

Ronald. K.M., Mirshahi,T., y Woodward, J.J., (2001). Ethanol Inhibition of N-Methyl Daspártado Receptors is Reduced by site-directed Mutagenesis of a Transmembrane Dominian Phenylalanine residue. *Journal of Biological Chemistry.* 276: 44729-735.

Rosenberg, N.L. (2002). Neuropsychologic impairment and MRI abnormalities associated with chronic solvent abuse. *J. Toxicol- Clinic.Toxicol.* 40: 21-34.

Rosenberg, N.L., Kleinschmidt-DeMasters, B.K., Davis, K.A., Dreisbach, J.N., Hormes, J.T., y Filley, C.M. (1988). Toluene abuse causes diffuse central nervous system white matter changes. *Ann Neurol.* 23: 611-4.

Ruiz-Gutierrez, V., Perez-Espinosa, A., Vazquez, C.M., y Santa-Maria, C., (1999). Effects of dietary fats (fish, olive and high-oleic-acid sunflower oils) on lipid composition and antioxidant enzymes in rat liver. *Br J Nutr.* 82: 233-41.

Rustay, N.R., Wahlsten, D., y Crabbe, J.C., (2003). Assessment of genetic susceptibility to ethanol intoxication in mice. *Proc Natl Acad Sci.* 100: 2917-22.

Salimi, K., y Humpel, C., (2002). Down-regulation of complement receptor 3 and major histocompatibility complex I and II antigen-like immunoreactivity accompanies ramification in isolated rat microglia. *Brain Res.* 946: 283-9.

Santambrogio, L., Belyanskaya, S.L., Fischer, F.R., Cipriani, B., Brosnan, C.F., Ricciardi-Castagnoli, P., Stern, L.J., Strominger J.L., y Riese, R. (2001) Developmental plasticity of CNS microglia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 6295-300.

Sawada, M., Suzumura, A., y Marunouchi, T., (1995). Cytokine network in the central nervous system and its roles in growth and differentiation of glial and neuronal cells. *Int J Dev Neurosci.* 13: 253-64.

Scaccini, C., Nardini, M., D'Aquino, M., Gentili, V., Di Felice, M., y Tomassi, G., (1992). Effect of dietary oils on lipid peroxidation and on antioxidant parameters of rat plasma and lipoprotein fractions. *J Lipid Res.* 33: 627-33.

Scarpelli, M., Salvolini, U., Diamanti, L., Montironi, R., Chiaromoni, L., y Maricotti, M., (1994). MRI and pathological examination of post-mortem brains: the problem of white matter high signal areas. *Neuroradiology.* 36: 393-8.

Schoenbaum, G., y Setlow, B., (2001). Integrating orbitofrontal cortex into prefrontal theory: common processing themes across species and subdivisions. *Learning & Memory.* 8: 134-47.

Schulz, J.B., Lindenau, J., Seyfried, J., y Dichgans, J., (2000). Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem.* 267: 4904-11.

Schwab, J.M., Freu, E., Klusman, I., Schwab, M.E., y Schluesener, H.J., (2001). AIF-1 expression defines a proliferating and alert microglia/macrophage phenotype following spinal cord injury in rats. *J. Neuroimmunol.* 119: 214-22.

Sedgwick, J.D., Ford, A.L., Foulcher, E., y Arriess, R., (1998). Central nervous system microglial cell activation and proliferation follows direct interactions with tissue-infiltrating T cell blasts. *J. Immunol.* 160: 5320-30.

Sedgwick, J.D., Schwender, S., Imrich, H., Dorries, R., Butcher, G. W., y Meulen, V., (1991). Isolation and direct characterization of resident microglial cells from the normal and inflamed central nervous system. *Proc. Natl. Acad.* 88: 7438-42.

Shephard, M.D.S., y Whiting, M.J., (1990). False low estimation of triglycerides in lipemic plasma by the enzymatic triglyceride method with modified Trinder's chromogen. *Clin. Chem.* 36: 325-9.

Shibasaki, T., Oda, T., Imaki, T., Ling, N., y Demura, H., (1993). Injection of anti-neuropeptide Y gamma-globulin into the hypothalamic paraventricular nucleus decreases food intake in rats. *Brain Res.* 601: 313-6.

Shirabe, T., Tsuda, T., Terao, A., y Araki, S. (1974). Toxic polyneuropathy due to glue-sniffing. Report of two cases with a light and electron-microscopic study of the peripheral nerves and muscles. *J Neurol Sci.* 21: 101-13:

Smith-Kielland, A., y Ripel, A. (1993). Toluene metabolism in isolated rat hepatocytes: effects o fin vivo pretreatment with acetone and phenobarbital. *Arch. Toxicol.* 67: 107-12.

Stanley, B.G., y Leibowitz, S.F., (1984). Neuropeptide Y: stimulation of feeding and drinking by injection into the paraventricular nucleus. *Life Sci.* 35: 2635-42.

Steffee, CH., Davis, G.J., y Nicol, K.K., (1996). A whiff of death: fatal volatile solvent inhalation abuse. *South Med J.* 89: 879-84.

Steicher, H.Z., Gabow, P.A., y Moss A.H., (1981). Syndromes of toluene sniffing in adults. *Ann Intern Med.* 94: 758-62.

Stein, E.A., y Myers, G.L., (1995). National Cholesterol Education Program Recommendations for Triglycerides Measurements: Executive Summary. *Clin Chem.* 41: 1421-26.

Stoll, G., y Jander, S., (1999). The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. *Prog Neurobiol.* 58: 233-47.

Streit, W.J., (1990). An improved staining method for rat microglial cells using the lectin from *Griffonia simplicifolia* (GSA I-B4). *J Histochem Cytochem.* 38: 1683-6.

Streit, W.J., (1996). The role of microglia in brain injury. *Neurotoxicology*; 17: 671-8.

Streit, W.J., (2000) Microglial response to brain injury: a brief synopsis. *Toxicol Pathol.* 28: 28-30.

Streit, W.J., (2002). Microglia and the response to brain injury. *Ernst Schering Res Found Workshop.* 39: 11-24.

Streit, W.J., Graeber, M.B., y Kreutzberg G.W., (1988). Functional plasticity of microglia: a review. *Glia;* 1: 301-7.

Streit, W.J., Walter, S.A., y Pennell, N.A., (1999). Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol.* 57: 563-81.

Streit, W.J., y Kreutzberg, G.W., (1987). Lectin binding by resting and reactive microglia. *J. Neurocytol.* 16: 249-60.

Streit, W.K., y Colton, C., (1995). The brain's immune system. *Sci Amer.* 273: 38-43.

Stumph, M. J., Weir, W. F., y Noall, M., (1985). Comparison of blood and brain toluene concentrations and circulating trygliceride levels resulting from acute and repeated exposure in rats. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 46: 244-250.

Stumph, M.J., Weir, F.W., y Noall, M.W., (1985). Comparison of blood and brain toluene concentrations and circulating triglyceride levels resulting from acute and repeated exposures in rats. *Am Ind Hyg Assoc J.* 46: 244-50.

Suzuki, K., Wakayama, Y., Takada, H., y Okayasu, H., (1992). A case of chronic toluene intoxication with abnormal MRI findings: abnormal intensity areas in cerebral white matter, basal ganglia, internal capsule, brain stem and middle cerebellar peduncle. *Rinsho Shinkeigaku.* 32: 84-7.

Tahin, Q.S., Blum, M., y Carafoli, E., (1981). The fatty acid composition of subcellular membranes of rat liver, heart, and brain: diet-induced modifications. *Eur J Biochem.* 121: 5-13.

Tateo, E., Brunelli, N., Cucurachi, S., y Ferillo, A., (1993). New trends in the study of the merits and shortcomings of olive oil in organoleptic terms, in correlation with the GC/MS analysis of the aromas. In *Food Flavours, Ingredients and Composition*, G Charalampous, editor, Elsevier Science publishers B V , Amsterdam.

Tenenbein, M., Young, S., y Lonstaffe, S., (1996). Is solvent abuse a gateway for the abuse of others drugs? *J Toxicol Clin Toxicol.* 625-6

Texas Commiccion on Alcohol and Drug Abuse (TCADA), (1997). Educational materials on substance use, develops prevention, intervention and treatment programs, and conducts studies on the problems of substance use. Texas, 9001 North IH-35, Suite 105, Austin Texas 78753-5233. 1-46.

- Thiel, R., y Chahoud, I., (1997).** Postnatal development and behaviour of Wistar rats after prenatal toluene exposure. *Arch Toxicol.* 71: 258-65.
- Thomson, A.B.R., Keelan, M., Clandinin, M.Y., y Walker, K., (1986).** Dietary fat selectively alters transport properties of rat jejunum. *J Clin Invest.* 77: 279-88.
- Toftgard, R., Nilsen, O.G., y Gustafsson J-A., (1982).** Dose dependent induction of rat liver microsomal citochrome p-450 and microsomal enzymatic activities after inhalation of toluene and dichloromethane. *Acta Pharmacol et Toxicol.* 51:108-14.
- Trotter, R.T. II, (1999).** Friends, Relatives and Relevant Others: Conducting Ethnographic Network Studies. In Schensul, J.J., LeCompte, M.D., Trotter, R.T., II, Ellen K. Cromley, E.K., Singer, M.. Mapping Social Networks, Spacial Data, and Hidden Populations. Ethnographers Toolkit. Walnut Creek, CA: *Altamira Press.* 1-50.
- Tsuruta, H., (1996).** Skin Absorption of Solvent Mixtures Effect of Vehicles on Skin Absorption of Toluene. *INDUSTRIAL HEALTH;* 34: 369-78.
- Uchida, K., y Stadtman, E.R., (1992).** Selective cleavage of thioether linkage in proteins modified with 4-hydroxynonenal. *Proc Natl Acad Sci.* 89: 5611-5.
- Ulvestad, E., Williams, K., Bjerkvig, R., Tiekotter, K., Antel, J., y Matre, R. (1994).** Human microglial cells have phenotypic and functional characteristics in common with both macrophages and dendritic antigen-presenting cells. *J. Leukoc. Biol.* 56: 732-40.
- van den Dobbelen, D.J., Nobel, C.S., Schlegel, J., Cotgreave, I.A., Orrenius, S., y Slater, A.F., (1996).** Rapid and specific efflux of reduced glutathione during apoptosis induced by anti-Fas/APO-1 antibody. *J Biol Chem.* 271: 15420-7.
- Vela, J.M., Dalmau, I., Gonzalez, B., y Castellano, B. (1995).** Morphology and distribution of microglial cells in the young and adult mouse cerebellum. *J Comp Neurol.* 361: 602-16.
- Visioli, F., Caruso, D., Plasmati, E., Patelli, R., Mulinacci, N., Romani, A., Galli, G., y Galli, C., (2001).** Hydroxytyrosol, as a component of olive mill waste water, is dose- dependently absorbed and increases the antioxidant capacity of rat plasma. *Free Radic Res.* 34: 301-5.
- Visioli, F., y Galli, C., (2000).** Olive oil: more than just oleic acid. *Am J Clin Nutr.* 72: 853.
- Visioli, F., y Galli, C., (2003).** Olives and their production waste products as sources of bioactive compounds. *Nutraceutical Research,* 1: 85-88.

von Euler, G., Fuxe, K., Hansson, T., y Gustafsson, J.A., (1988). Effects of toluene treatment in vivo and in vitro on the binding characteristics of [3H] neurotensin in rat striatal membranes. *Toxicology*. 49: 149:54.

von Euler, G., Fuxe, K., y Bondy, S.C., (1990). Ganglioside GM1 prevents and reverses toluene-induced increases in membrane fluidity and calcium levels in rat brain synaptosomes. *Brain Res*. 508: 210-4.

von Euler, G., Ogren, S.O., Li, X.M., Fuxe, K., y Gustafsson, J.A., (1993). Persistent effects of subchronic toluene exposure on spatial learning and memory, dopamine-mediated locomotor activity and dopamine D2 agonist binding in the rat. *Toxicology*. 77: 223-32.

von Euler, M., Pham, T.M., Hillefors, M., Bjelke, B., Henriksson, B., y von Euler, G., (2000). Inhalation of low concentrations of toluene induces persistent effects on a learning retention task, beam-walk performance, and cerebrocortical size in the rat. *Exp Neurol*. 163: 1-8.

Wahlefeld, A.W., y Bergmeyer, H.U., (Hrsg), (1974). Methods of enzymatic analysis 2nd English ed. New York NY. *Academic Press Inc*. 1831.

Wallen, M., (1986). Toxicokinetics of toluene in occupationally exposed volunteers. *Scann J Work Environ Health*, 12: 588-93.

Walton, J., (1997). Brain's diseases of the nervous system. 8^a ed., *Medical Oxford Publication*.

Wenzel, A., Fritschy, J.M., Mohler, H., y Benke, D., (1997). NMDA receptor heterogeneity during postnatal development of the rat brain: differential expression of the NR2A, NR2B, and NR2C subunit proteins. *J Neurochem*. 68: 469-78.

Whittemore, E.R., Loo, D.T., y Cotman, C.W., (1994). Exposure to hydrogen peroxide induces cell death via apoptosis in cultured rat cortical neurons. *Neuroreport*. 5:1485-8.

Wiaderna, D., y Tomas, T., (2002). Assessment of long-term effects of exposure to toluene based on the analysis of selected behavioral responses with particular reference to the ability to trigger behavioral hypersensitivity in rats. *Int J Occup Med Environ Health*. 15: 239-45.

Wilkins-Haug L., (1997). Teratogen update: Toluene. *Teratology*, 55: 145-51.

Williams, K., Alvarez, X., y Lackner, A.A., (2001). Central nervous system perivascular cells are immunoregulatory cells that connect yhe CNS with the peripheral immune system. *Glia*; 36: 156.

Wolf, M.A., Rowe, V.K., McColliser, D.D., Hollingsworth, R.T., y Oyen, F., (1956). Toxicological studies of certain alkylated benzenes and benzene. *Arch. Ind. Health.* 14: 387.

Yamawaki, S., y Sarai, K., (1982). Effects of toluene inhalation on locomotor activity and brain catecholamines levels in rats. *Yakubutsu Seishin Kodo.* 2: 57-9.

Yaqoob, P., Sherrington, E.J., Jeffery N.M., Sanderson, P., Harvey, D.J., y Newsholme, E.A., (1995). Comparison of the effects of a range of dietary lipids upon serum and tissue lipid composition in the rat. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 27: 297-310.

Yehuda, S., Leprohon-Greenwood, C.E., Dixon, L.M., y Coscina, D.V., (1986). Effect of dietary fat on pain threshold, thermoregulation and motor activity in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 24: 1775-7.

Yuan, W., Sequira, D.J., Cawley, G.E., Eyer, C.S., y Backes W.L., (1997). Time course for the modulation of hepatic cytochrome P450 after administration of ethylbenzene and its correlation with toluene metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* 339: 55-63.

Zielasek, J., y Hartung, H.P., (1996). Molecular mechanisms of microglial activation. *Adv. Neuroimmunol.* 6: 191-222.

Zur, J., y Yule, W., (1990). Chronic solvent abuse. 2. Relationship with depression. *Child: Care Health Dev.* 16: 21-34.