

1989-2

082398082

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EFFECTOS DE LA EXPOSICION TRANSPLENTARIA A TOLUENO
SOBRE LA ESTRUCTURA HISTOLOGICA TESTICULAR
DE RATAS EN LA ETAPA POSNATAL.

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A

BEATRIZ ORTEGA GALVAN

GUADALAJARA, JAL.

MARZO 1993



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Sección
Expediente
Número ... 0.740/91 ...

SRITA. BEATRIZ ORTEGA GALVAN
P R E S E N T E . -

Manifestamos a usted, que con esta fecha ha sido aprobado el tema de Tesis "EFECTOS DE LA EXPOSICION TRANSPLACENTARIA A TOLUENO SOBRE-LA CITOARQUITECTURA TESTICULAR DE RATAS EN LA ETAPA POSNATAL" para obtener-la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como - Director de dicha Tesis el M.V.Z. Jacinto Bañuelos Pineda.

A T E N T A M E N T E
" PIENSA Y TRABAJA "
AÑO "LIC.JOSE GUADALUPE ZUNO HERNANDEZ"
Guadalajara, Jal., 10 de Octubre de 1991.
EL DIRECTOR



M. EN C. CARLOS BEAS ZARATE

EL SECRETARIO FACULTAD DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS

M. EN C. MARTIN PEDRO TENA MEZA

c.c.p.- El M.V.Z. Jacinto Bañuelos Pineda, Director de Tesis.Pte.-
c.c.p.- El expediente del alumno.

CBZ/MPTM/cg1r.

Al contestar este oficio citese fecha y número



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Expediente

Número

Sección

C. BEATRIZ ORTEGA GALVAN
P R E S E N T E .-

Por medio de la presente, nos permitimos informar a usted, que se autoriza el cambio de título de la Tesis "EFECTOS DE LA EXPOSICION TRANSPLACENTARIA TOLUENO SOBRE LA CITOARQUITECTURA TESTICULAR DE RATAS EN LA ETAPA POSNATAL " por "EFECTOS DE LA EXPOSICION TRANSPLACENTARIA ATOLUENO SOBRE LA ESTRUCTURA HISTOLOGICA TESTICULAR DE RATAS EN LA ETAPA POSNATAL"

Sin más por el momento, nos despedimos de usted, reiterándole nuestra más alta y distinguida consideración.

A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"

Guadalajara, Jal., a 09 de Diciembre 1992.

EL DIRECTOR



FACULTAD DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS

M. EN C. JUAN LUIS CIFUENTES LEMUS

EL SECRETARIO

BIOL. JESUS ALBERTO ESPINOSA ARIAS

JLCL>JAEA>Cg1r*

M. en C. Juan Luis Cifuentes Lemus.
Director de la Facultad de Ciencias
Biológicas.
Universidad de Guadalajara.
P R E S E N T E.

Apreciable maestro Cifuentes; por este conducto me permito informarle que la P. de Biol. BEATRIZ ORTEGA GALVAN ha concluido satisfactoriamente el trabajo de tesis titulado: "EFECTOS DE LA EXPOSICION TRANSPLACENTARIA A TOLUENO SOBRE LA ESTRUCTURA HISTOLOGICA TESTICULAR DE RATAS EN LA ETAPA POSNATAL", bajo mi dirección.

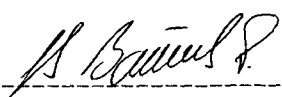
Por lo anterior, solicito a ud. su autorización con el fin de programar la presentación de su examen de tesis y profesional.

Sin otro particular aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

"piensa y trabaja"

"Año del Bicentenario"
Guadalajara, Jal. Julio 06 de 1992.



M.V.Z. Jacinto Bañuelos Pineda.

DEDICATORIAS:

A MIS PADRES:

Gabriela Galván Sandoval

Jesús Ortega Razo.

Con cariño y respeto, por el ejemplo que siempre me han brindado, porque con su comprensión y confianza han contribuido en mi formación personal alentandome siempre a continuar superandome.

A MIS HERMANOS:

A quienes tanto debo, gracias por su ayuda y apoyo durante todo el trayecto de mi vida.

A MI ESPOSO:

Manuel Ruvalcaba Pelayo.

Por el amor, confianza y apoyo que siempre me ha brindado para seguir adelante.

AGRADECIMIENTOS;

A todas aquellas personas que contribuyeron con su asesoría docente y de laboratorio para la realización de este trabajo de tesis, compartiendo conmigo sus conocimientos, su amistad y apoyo desinteresados.

A todos mis amigos y compañeros con quienes he compartido gran parte de mi formación como profesionista y quienes de alguna manera me han impulsado a seguir adelante.

Por todo Gracias.

EL PRESENTE TRABAJO SE DESARROLLO EN EL
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION CIENTIFICA
DE LA FAC. DE MED. VET. Y ZOOT. Y FAC DE
MEDICINA CON APOYO FINANCIERO OTORGADO
POR EL DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION
CIENTIFICA Y SUPERACION ACADEMICA DE LA
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA.

EFFECTOS DE LA EXPOSICION TRANSPLACENTARIA A TOLUENO SOBRE LA
ESTRUCTURA HISTOLOGICA TESTICULAR DE RATAS EN LA ETAPA
POSNATAL.

Trabajo que presenta la P. de Biol Beatriz ortega Galván
(codigo 082398082) para obtener el grado de Licenciatura en
Biología).

DIRECTOR DE TESIS

M.V.Z. Jacinto Bañuelos Pineda

ASESOR:

M. en C. Esther Albarrán Rodríguez.

Guadalajara Jal. Marzo de 1993.

EFFECTOS DE LA EXPOSICION TRANSPLACENTARIA A TOLUENO SOBRE LA
ESTRUCTURA HISTOLOGICA TESTICULAR DE RATAS EN LA ETAPA
POSNATAL.

I N D I C E

| CONTENIDO : | Página |
|---------------------------------|--------|
| Resúmen..... | 1 |
| Introducción..... | 2-12 |
| Justificación..... | 13 |
| Planteamiento del problema..... | 14-15 |
| Hipótesis..... | 16 |
| Objetivos..... | 17 |
| Materiales y métodos..... | 18-20 |
| Resultados..... | 21-31 |
| Discusión..... | 32-35 |
| Conclusiones..... | 36 |
| Bibliografía..... | 37-44 |

RESUMEN

Con la finalidad de conocer las alteraciones producidas por la exposición materna a tolueno sobre los testículos de crías, se utilizaron 15 ratas albinas Sprague Dawley que fueron divididas en 3 grupos de 5 ratas; un testigo, exposición del día 1 al 21 gestacional (I) y exposición del día 15 al 21 (II). Para la exposición se utilizó una cámara rectangular de cristal con sistema regulable de aereación en la cuál se colocaron 2 recipientes con 100 ml de tolueno media hora antes de introducir las ratas, con la finalidad de crear una atmósfera de tolueno. Los animales fueron expuestos durante 10 minutos, dos veces al día a intervalos de 8 horas. Al nacimiento y 20 días postnatales se seleccionaron de 4 a 9 crías machos por grupo; las cuáles fueron perfundidas por vía intracardiaca con una solución de formaldehido/glutaraldehido, se disectaron los testículos que fueron sometidos a una posfijación por dos horas con la misma solución, posteriormente se procesaron histológicamente para su estudio descriptivo y semicuantitativo. En el grupo I recién nacido, se encontró proliferación anormal de tejido germinal, ya que sólo se presentó en algunas zonas sobre la lámina basal, así mismo, la mayoría de los túbulos fué de forma redonda y con distribución hacia la periferia testicular; también en algunos túbulos se presentó la disminución del diámetro y una menor proliferación de espermatogonias. En el grupo II (15-21) se presentó el valor más elevado de túbulos seminíferos y de espermatogonias y los túbulos fueron de forma oval. A los 20 días de edad el grupo II (exposición 15-21) presentó una mayor proliferación de espermatogonias, además el espacio intersticial se encontró reducido. En ésta edad no se encontró diferencia estadística en el número de túbulos seminíferos entre los experimentales y el control.

Por lo anterior se puede concluir que el tejido testicular resultó ser vulnerable al tolueno.

INTRODUCCION.

En la industria se utilizan grandes cantidades de solventes orgánicos, por lo que los trabajadores frecuentemente están expuestos a combinaciones de estos (1).

Los trabajadores involucrados en la producción, el uso y transporte de compuestos químicos están expuestos a numerosos solventes capaces de provocar daño al contacto con el cuerpo humano. Las alteraciones causadas por el efecto de solventes pueden tener un rango desde un trauma agudo provocado por quemaduras e irritación de la piel hasta daños crónicos degenerativos tales como lesiones orgánicas y del Sistema Nervioso Central (SNC) (2).

Los adolescentes deliberadamente se exponen en forma recreacional a la inhalación de vapores de una amplia variedad de compuestos volátiles (3). Los solventes que más frecuentemente se utilizan para autointoxicación son los compuestos que contienen tolueno, benceno, metanol, acetona y n-hexano. En México, quizás por su bajo costo y fácil accesibilidad en el comercio se usan comunmente los pegamentos y el thinner (1).

Los principales efectos por la inhalación de solventes industriales y cemento para zapatos se atribuyen al tolueno, hidrocarburo aromático conocido también como tonsol, toluol, metilbenceno o fenilmetano, fué descubierto por Pelletier y Walter en 1835. Es un líquido incoloro que se obtiene del alquitrán de hulla y del petróleo, tiene un olor parecido al

del benceno. Se absorbe a través de la piel y las mucosas, así como por los tractos respiratorio y digestivo(4,5).

El tolueno es un solvente orgánico que se utiliza en una gran diversidad de productos, desde la elaboración del TNT hasta formar parte del thinner, gasolina, disolvente de lacas e insecticidas en aerosol, de tintas para la industria gráfica y textil. Se considera dentro de los márgenes de seguridad la presencia de hasta 200 p.p.m. en el aire, cantidades mayores hacen sentir los efectos de la intoxicación aguda que se caracteriza por cefalea, fatiga y confusión, en otros casos náuseas, vómitos y trastornos del equilibrio, ocasionalmente puede haber pérdida de la conciencia y conducta psicópata (1). Además, su posesión y uso tiene pocas consecuencias legales y desafortunadamente la mayoría de los adictos al tolueno no manifiestan toxicidad sistémica o neurológica durante el tiempo necesario para el desarrollo de dependencia (6), es por eso que cuando estos efectos son observables en el individuo, ya se han producido lesiones irreversibles en el sistema nervioso sobre todo de tipo desmielizante (1).

La inhalación de tolueno puro y pegamentos ha tendido a ser más frecuente en las últimas tres décadas, estas sustancias se han popularizado como agentes recreativos psicotrópicos de inhalación directa, los efectos tóxicos también se manifiestan en hígado, riñones, médula ósea e inclusive llega ocasionalmente a producirse la muerte repentina por arritmias cardíacas (1,7)

La inhalación es la vía más común y rápida de incorporación del solvente, una vez en la sangre se une a fosfolípidos, posteriormente se separa de éstos y se deposita en tejidos lipídicos por su elevada afinidad a las grasas, por lo que la mayor concentración dentro del organismo se encuentra en los tejidos de alto contenido de lípidos sobre los que se ejerce su acción lipolítica, como en el SNC, hígado y riñones por lo que es posible que también se incorporen a tejido testicular debido a la gran cantidad de hormonas esteroides que aquí se producen y cuyos precursores son lípidos (8,9).

La exposición crónica con efectos neuróticos en trabajadores de la industria se manifiesta por cefalea, disminución de la capacidad de trabajo, insomnio, poca capacidad de concentración, anorexia e irritabilidad, que en más de los casos son reversibles al cesar la exposición al disolvente. Sin embargo en individuos que presentan síndrome cerebral orgánico, persisten las alteraciones dos y cinco años después (10). La inhalación crónica del tolueno puede terminar al final en demencia orgánica (1,11).

También se ha demostrado la embriotoxicidad de los solventes bajo condiciones de exposición ocupacional, abuso voluntario y mediante experimentos con animales de laboratorio, los solventes pueden atravesar por difusión la barrera hematoplacentaria y llegar al producto a través del paquete vascular umbilical (12,13), provocando cambios en la concentración de oxígeno, alterando con ello el meta-

bolismo fetal (14). El producto por su inmadurez es más vulnerable a los efectos tóxicos de éstos agentes (12,13), entre las lesiones teratogénicas resultantes del abuso materno del tolueno están: microcefalia, anencefalia, disfunción del SNC, deficiente desarrollo corporal; dislalia y malformaciones congénitas principalmente de la cabeza, como fisura palpebral, ojos profundos y micrognacia entre otras (8,15). También se ha reportado alta incidencia en la disminución del peso corporal al nacimiento y asfixia en infantes que provienen de mujeres que trabajan en un área de alta exposición a tolueno durante el embarazo (16).

Las alteraciones que se producen dependen del período de gestación en que se encuentren las madres, duración y nivel de exposición; por ejemplo, en la exposición a éter y cloroformo utilizados como anestésicos el feto sufre más daño cerebral y orgánico por hipoxia en el último tercio de la gestación ya que aumentan las necesidades de oxígeno y nutrientes (17).

Por estudios en humanos, se ha observado que existe cierto grado de asociación entre los efectos causados por la exposición a solventes orgánicos y los desórdenes de síndromes mielodisplásticos y leucemias (18). Por otra parte, la exposición ocupacional a mutágenos químicos y solventes orgánicos como el benceno y tolueno pueden provocar efectos de alta incidencia a nivel cromosomal principalmente en el ser humano se ha observado la presentación frecuente de aberraciones cromosomales (19). Así como también, en

pacientes con historia de exposición diaria a solventes orgánicos el número clonal de aberraciones cromosómicas es especialmente más elevado; además la exposición puede estar asociada con características citogenéticas de cambios en células de linfomas (20). Por medio de un estudio realizado en 27 trabajadores expuestos a tolueno por un periodo mayor a 5 años, después de la cesación de la exposición se ha identificado una elevada incidencia de aberraciones de tipo cromosómico a nivel de linfocitos (21).

Así mismo, se han reportado graves daños a nivel testicular provocados por la exposición a solventes orgánicos.

El testículo es una glándula citógena tubulosa rodeada de una cápsula fibrosa llamada túnica albúginea hacia la cual se extiende radialmente un engrosamiento de tejido conjuntivo llamado mediastino testicular que forma tabiques fibrosos llamados Septula testis que divide al órgano en lobulillos testiculares, compuestos cada uno de 4 túbulos seminíferos de 150 a 250 μ m de diámetro y de 30 a 70 cm de longitud, los cuales constituyen la parte exócrina del testículo, cuyo producto de secreción holócrina lo constituyen los espermatozoides. En la cara interna de la túnica albúginea el tejido se continúa con la túnica vascular del testículo provista de vasos sanguíneos, a partir de esta el tejido se extiende para distribuirse en los intersticios de los túbulos seminíferos, este tejido se compone de fibroblastos, macrófagos, células cebadas y

células de Leydig que constituyen el tejido endócrino del testículo (22).

Los testículos se desarrollan precozmente durante la vida embrionaria. Aproximadamente a partir de la 4a semana de vida intrauterina en humanos, aparecen en la línea media entre el mesonefros y el mesenterio dorsal de las crestas gonadales, la llegada de las células germinales se inicia a la 6a. semana. Del pliegue gonadal proliferan células epiteliales que se introducen en el mesénquima formando los cordones sexuales primarios que proliferan de la 6a a la 8a semana y se introducen a la médula gonadal anastomosándose entre si formando los cordones testiculares. Hacia el hilio de la glándula se originan los tubos de la red de Haller o rete testis. Los cordones testiculares se separan del epitelio superficial por tejido fibroso durante la 7a. semana, formándose la túnica albúginea que forma la cápsula del testículo. En el 4o mes de vida intrauterina los cordones testiculares adquieren forma de herradura. Los extremos se estrechan y forman los conductos rectos y el arco de la herradura se enrolla en forma de conducto contorneado. Las células epiteliales de los cordones testiculares se convierten en las células sustentaculares de Sertoli (23).

Las células de Leydig se desarrollan a partir del mesénquima situado entre los conductos seminíferos y abundan particularmente del 4o al 6o mes de vida embrionaria.

El descenso de los testículos se inicia entre el 7o y

8o. mes de desarrollo embrionario y puede no estar completo antes del nacimiento (24).

En las ratas la línea germinal se establece a los 8 días de desarrollo embrionario, las células aparecen en el saco vitelino en la base del alantoides, éstas se mueven al intestino dorsal mesenquimatoso alojándose en la cresta genital a partir del día 11 embrionario, el número original se incrementa por mitosis, en el macho la actividad mitótica de las células germinales inician los avances en la maduración y sucesión en la espermatogonia y maduración de los espermatozoides. La maduración gonadal comienza entre el día 11 y 12 embrionario, aunque en las células germinales todavía no se distingue el sexo. En lo concerniente a los machos, las células germinales son más dispersas y desarrolladas y a partir del día 13 los cordones testiculares pueden ser identificados (25). Estos cordones testiculares aumentan su longitud, se hacen más sinuosos y se convierten en canalículos seminíferos. Los elementos indiferentes de la pared de los canalículos se convierten en las células de Sertoli (26), cuya diferenciación no es total hasta la pubertad, éstas células se asientan sobre la membrana basal del túbulo mediante un pie ensanchado y estrechándose progresivamente alcanzan la cavidad del conductillo seminífero. Su núcleo es pobre en cromatina, dotado de un nucleolo bien perceptible cerca de la base (27), son elementos de sostén cuya función es proporcionar apoyo mecánico y nutricional a las espermátides y

espermatozoides en maduración, participan en la liberación de espermatozoides maduros hacia la luz tubular (28, 29).

El epitelio germinativo está constituido por células germinales que se encuentran embebidas en hoquedades citoplasmáticas de las células de Sertoli (27).

Las espermatogonias son células intra tubulares ovoides de gran tamaño y se forman a partir de las células sexuales primitivas y tienen la finalidad de seguir dividiéndose después de la pubertad para formar espermatozoides; gracias a la acción de la FSH (Hormona folículo estimulante). La formación de espermatozoides en la rata adulta comienza alrededor de los 50 días de edad (30, 31).

Las células intersticiales del testículo o células de Leydig son de origen mesenquimatoso, son de gran tamaño y se encuentran en el tejido conjuntivo laxo entre los túbulos seminíferos, a veces se pueden encontrar en la albúginea y el cordón espermático, presentan gran desarrollo del retículo endoplásmico liso, pigmentos de tipo lipofusínico y a partir de la pubertad frecuentemente en el citoplasma se presentan algunos cristales de albúmina, su principal función es la síntesis de testosterona, gracias a la acción de la ICSH (hormona estimulante de las células intersticiales) (28, 32).

Por medio de estudios primarios se ha determinado que la exposición paterna en humanos a diferentes solventes (incluyendo al tolueno), pueden ocasionar trastornos en la espermatogénesis (33).

La exposición a 2 hexano y 1,2 dibromo 3 cloropropano produce efectos gonodotóxicos sobre la actividad testicular en ratas; la combinación de éstos compuestos inhibe la capacidad esteroidogénica de los testículos en rata, éstos compuestos provocan la inhibición de la actividad de 17-alfa hidroxilasa, lo cual produce cambios significativos en el peso de los testículos y el contenido de proteínas testiculares. Los resultados de este estudio indican que las células esteroidogénicas de los testículos, las células de Leydig son los sitios primarios de los efectos tóxicos de éstos agentes en los testículos de ratas (34).

En estudios realizados con fluotano (4 nitro-3 trifluor-metilisobutiramida) se demostró que éste compuesto induce importantes cambios en el crecimiento de ratas machos así como también, se afecta la histología testicular presentándose un decremento del 20% en la división de espermatogonias; por otra parte éste compuesto afecta la fertilidad en un 48% (35).

Así mismo, se ha demostrado que los daños causados en testículo pueden ser reversibles dependiendo del tiempo de exposición, cantidad y estructura química del compuesto empleado para la exposición entre otras variables, esto se demostró mediante un estudio realizado en ratas, expuestas a diferentes concentraciones de 2-metoxietil eter (diglyme) y a 2-metoxietanol (2-ME), durante dos semanas. Después de 14, 48 y 84 días de post exposición, se observó que el daño a nivel de células germinales, población de espermatocitos en

los túbulos del epididimo y la reversibilidad de la espermatogénesis inducida por 2-metoxietanol (300 ppm) fue más severa que la causada por 2-metoxietil eter (diglyme) (370 ppm), aunque los daños de la exposición a 1100 ppm de 2-metoxietil eter fueron ligeramente más remarcados (36).

También se han reportado daños por la exposición maternal a algunos solventes; un estudio realizado en ratas que fueron expuestas al final de la gestación a la inhalación de éter y cloroformo al ser evaluados sus productos al nacimiento se encontró proliferación anormal de tejido conectivo en los testículos de los machos, con aumento del área testicular, células de Leydig de mayor tamaño y tubos seminíferos de perímetro superior (37). Sin determinar la funcionalidad de éstos órganos en etapas posteriores.

Así mismo, se desconoce si este daño fué causado por efecto directo a los testículos o por un daño a nivel del SNC, específicamente en la glándula hipófisis en su parte anterior, ya que funciona durante la mayor parte de la vida fetal y secreta las mismas hormonas tróficas que la glándula adulta. La hipofisectomía fetal impide el desarrollo normal de las glándulas tiroideas, suprarrenales y los testículos, páncreas y ovarios son poco afectados (38,39).

Por otra parte, se ha observado que la ingestión de alcohol puede alterar la relación hipófisis-gonadal a través del daño a nivel de los receptores androgénicos del

hipotálamo y cuerpo pituitario (40).

En base a la consulta realizada fué notable el bajo número de estudios realizados tanto de tipo estructural como bioquímicos acerca de los efectos que causa la inhalación materna a bajas dosis de solventes orgánicos sobre los testículos de crías.

Por lo anteriormente señalado, en este trabajo se analizaron los efectos que causa la exposición prenatal a bajas dosis de tolueno sobre el desarrollo de las diferentes estirpes celulares del tejido gonadal masculino, mediante un estudio semicuantitativo y la observación histológica del testículo al nacimiento y en la etapa posnatal inmediata.

JUSTIFICACION:

La inhalación de solventes orgánicos tanto en forma voluntaria como por exposición laboral, actualmente constituye un grave problema de salud pública dentro de nuestro país; ya que la intoxicación por éstos elementos provoca alteraciones a nivel orgánico en forma general, así como daño en las células germinales masculinas y femeninas.

Son escasos los estudios que nos permiten comprender el daño causado por la inhalación prenatal a los solventes orgánicos y especialmente los efectos a nivel de testículo, por lo que resultó de gran interés realizar este estudio, mediante el cual se determinaron los daños morfológicos y citológicos en los testículos de productos provenientes de madres expuestas a la inhalación de bajas dosis de tolueno durante diferentes etapas de la gestación, con el objeto de establecer la vulnerabilidad de éstos órganos a solventes orgánicos como el tolueno.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El tolueno es un solvente orgánico que tiene la capacidad de atravesar las membranas placentarias y llegar a la circulación fetal provocando graves daños a los productos.

A pesar de los efectos genotóxicos reportados por la inhalación a bajas dosis de tolueno a las que se exponen frecuentemente madres gestantes bajo condiciones laborales, no se han realizado suficientes estudios sobre el efecto tóxico del tolueno a nivel de testículos; los cuales pueden resultar afectados por la inhalación de este compuesto, debido a que no existe ningún mecanismo protector hemato-testicular, lo que facilita el libre paso de éste compuesto hacia el parénquima y el estroma testicular. Por otra parte, en el testículo se lleva a cabo la producción de hormonas de tipo esteroide inclusive durante la fase prenatal de lo cuál resulta una gran afinidad de éste compuesto al tejido testicular.

Además, cabe mencionar que las células de la línea germinal que constituyen los cordones testiculares se encuentran en proceso activo de mitosis durante la etapa prenatal y perinatal, por lo que la exposición al tolueno puede provocar daños estructurales que probablemente se manifiesten por alteraciones en la fertilidad. Así pues, mediante el presente estudio se determinaron los efectos de la exposición a la inhalación del tolueno a bajas dosis en

productos de madres gestantes sobre la estructura histológica testicular, y se estableció la vulnerabilidad de las diversas estirpes celulares testiculares a éste compuesto inhalado en dos diferentes períodos de la gestación.

HIPOTESIS.

El tolueno tiene una alta afinidad por lípidos, por lo que es capaz de atravesar la membrana hematoplacentaria y afectar a órganos ricos en lípidos del feto entre ellos el tejido gonadal, el cual por encontrarse en desarrollo lo hace más vulnerable, por lo tanto resultan alteraciones morfológicas en las diferentes estirpes celulares del testículo.

OBJETIVO GENERAL.

Estudiar las características histológicas de las principales estirpes celulares testiculares en crías expuestas transplacentariamente al tolueno por inhalación de las madres durante diferentes periodos de la vida intrauterina.

OBJETIVOS ESPECIFICOS.

A) Practicar un estudio descriptivo histológico de las estirpes celulares testiculares al nacimiento y 20 días de edad.

B) Realizar un análisis semicuantitativo del número de túbulos seminíferos/unidad de superficie así como la densidad numérica de espermatogonias en túbulos de animales control y experimentales.

MATERIALES Y METODOS.

Se utilizaron 15 ratas albinas Sprague-Dawley de segundo parto alojadas en jaulas individuales, alimentadas con dieta balanceada para roedores y agua en abundancia, sujetas a un ciclo de luz-obscuridad de 12x12 horas. Después de comprobar la regularidad de sus ciclos estrales, las ratas se aparearon con los machos durante una noche. Se determinó el primer día gestacional por la presencia de espermatozoides en un frotis vaginal.

Una vez comprobada la preñez, se formaron tres grupos de 5 ratas cada uno, los cuáles fueron manejados de la siguiente manera:

Grupo 1: Los animales fueron expuestos desde el día 1 al 21 de la gestación (GESTACION COMPLETA), en una atmosfera saturada de vapor de tolueno durante 10 minutos mañana y tarde y con intervalos de 8 h, para lo cuál se utilizó una cámara de cristal con sistema regulable de aereación.

En la cámara se colocaron 2 recipientes con 100 ml de tolueno cada uno media hora antes de introducir las ratas con el fin de crear una atmósfera de tolueno en la cámara.

Grupo 2: Estos animales fueron manejados de la misma forma, sólo que la exposición fué a partir del día 15 de la gestación (ULTIMO TERCIO DE LA GESTACION).

Grupo 3: Este grupo correspondió al testigo que se mantuvo

intacto de manejo sin exposición al vapor del tolueno durante toda la gestación, esto obedece a que por estudios previos se ha determinado que la manipulación de la rata durante la exposición a solventes no afecta significativamente los resultados (41).

Al momento del nacimiento se ajustaron las camadas a 8 crías por rata. Se seleccionaron de 4 a 9 machos por grupo para realizar perfusión intracardiaca antes de la obtención de testiculos. Primeramente se anestesiaron con cloroformo y se perfundieron con una aguja calibre 23 por vía intracardiaca con una solución lavadora inicial de Ringer con procaina (1g/Lt de sol) y heparina 1000 UI a 37°C, P.H 7.3, 0.1 M y 283 Dsm/L a una presión de 130 cm. de agua durante 4 minutos, seguida de una solución fijadora de glutaraldehido 2.5% y formaldehido al 1% amortiguado en fosfatos al 0.5M P.H 7.3 y 583 mDsm/L durante 8 min (42). Posteriormente se extrajeron los testículos que se posfijaron por inmersión durante 2 h a 5°C en la misma solución fijadora. Este procedimiento se repitió en ratas machos a los 20 días de edad.

Después fueron lavados con amortiguador de fosfatos al 0.1 M con cambios de 14 min y posteriormente se deshidrataron en series crecientes de etanol (70% al 100%) y se incluyeron en parafina. Para luego obtener cortes de 5 a 6 μ m de espesor de los tejidos en un microtomo American Optical SL 20, se tiñeron con la técnica de H/E para su observación en un microscopio óptico y después se realizaron

los estudios descriptivo y semicuantitativo del tejido. Este último consistió en reproducir los cortes histológicos a través de un proyector de laminillas Karl-Zeiss (Objetivo 10X) colocado a una distancia de 60cm y proyectando la imagen sobre una hoja de papel con una superficie de 20 X 15cm para la cuantificación de túbulos seminíferos y a una distancia de 115cm sobre una hoja tamaño carta para el número de espermatogonias. La cuantificación se realizó en tres áreas del mismo testículo y se repitió el procedimiento en tres diferentes testículos provenientes de los diversos grupos control y experimentales.

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante la prueba de varianza simple a un nivel de significancia de ($p < 0.05$) (43,44).

RESULTADOS

ANALISIS HISTOLOGICO

En el grupo testigo de ratas recién nacidas, se encontró que la lámina basal está constituida por una monocapa de células alargadas que rodean al túbulo seminífero, su núcleo es central y grande y adopta la misma forma de la célula; predominan los túbulos de forma redonda con distribución hacia la periferia del testículo.

El tejido germinal es abundante, integrado por una monocapa de células de forma irregular con núcleo central grande; entre este grupo de células se encuentran incrustadas escasas células de Sertoli.

Las espermatogonias se presentaron en forma abundante y mostraron un aspecto compacto; son células de forma poligonal o redonda con núcleo central grande; por lo que contienen escaso citoplasma.

El tejido intersticial fué abundante con distribución uniforme sobre la superficie del testículo, su aspecto es denso, presentando gran cantidad de fibroblastos, así como también abundantes células de Leydig de forma irregular cuyo núcleo es central y grande. (Fig 1).

A diferencia del grupo testigo, en el experimental I recién nacidas (Exposición 1-21), el tejido germinal sólo proliferó en algunas zonas sobre la superficie de la lámina

basal. Al analizar la forma del túbulo seminífero, se encontró que la mayoría presentaba forma redonda y en menor proporción se encontró la forma oval, pero con distribución hacia la periferia del testículo. Algunos túbulos presentaron una disminución del diámetro. Las espermatogonias fueron menos abundantes que en el grupo control y en algunos túbulos no hubo proliferación de este tipo de células; así mismo, el tejido intersticial fue poco abundante, pero con distribución uniforme sobre todo el testículo y presentó gran cantidad de fibroblastos y pocas células de Leydig, de las cuales algunas se encontraban en mitosis (Fig 2).

En el grupo experimental II (Exposición 15-21 días de la gestación) predominaron los túbulos de forma oval con distribución uniforme sobre el testículo. Las espermatogonias fueron abundantes, pero su distribución fue reticular; aunque el tejido intersticial presentó una distribución uniforme en el testículo, al compararlo con el grupo control este fue escaso, por lo que presenta pocos fibroblastos y escasas células de Leydig (Fig 3), Cuadro I.

En el grupo testigo de 20 días de edad, se encontró que la lámina basal está integrada por células alargadas con núcleo pequeño y abundante citoplasma; predominó la forma alargada de los túbulos seminíferos, distribuyéndose de manera uniforme en todo el testículo, el tejido germinal fue abundante y denso, en éste se encontraron incrustadas células de Sertoli; las espermatogonias fueron abundantes y

de aspecto denso, en algunos túbulos la proliferación de estas células alcanzó la luz tubular; el tejido intersticial fué escaso al igual que las células de Leydig (Fig 4).

En el grupo experimental I (exposición 1-21 días de la gestación) predominó la forma alargada de los túbulos seminíferos cuya distribución fué uniforme sobre la superficie testicular, las espermatogonias fueron abundantes aunque de aspecto reticular, algunas de ellas proliferaron hacia la luz del túbulo seminífero, la distribución del tejido germinal fué heterogénea ya que las células que lo integran se distribuyen en una monocapa, bicapa o varias capas de células (Fig 6,7).

En el grupo experimental II (exposición 15-21), a diferencia del grupo control se encontró un número similar de túbulos seminíferos y el espacio entre túbulos se encontró reducido, pero su distribución fué uniforme sobre el testículo, así mismo, las espermatogonias se presentaron en forma más abundante que en el grupo control e incluso en algunos túbulos la proliferación se expande hacia la luz. (Fig 5), Cuadro 2.

ANALISIS SEMICUANTITATIVO

NUMERO DE TUBULOS SEMINIFEROS

En los productos recién nacidos de ratas expuestas a la inhalación de tolueno en diferentes etapas de la gestación

se encontró que el grupo experimental II (Exposición 15-21) se presentó estadísticamente el número más elevado de túbulos seminíferos. Así mismo, se encontró una diferencia significativa entre los grupos expuestos.

A los 20 días de edad no se encontró diferencia significativa entre los grupos expuestos ni el control, no obstante, los valores numéricos más altos corresponden al grupo experimental I (Exposición 1-21). Cuadro No.3

NUMERO DE ESPERMATOGONIAS:

En el grupo experimental II que corresponde a los productos recién nacidos de ratas gestantes expuestas a la inhalación de tolueno en el último tercio de la gestación se presentó el número mayor de espermatogonias; sin embargo, entre el grupo control y el experimental I (1-21) este valor fué similar. Así mismo, se presentó diferencia significativa entre los grupos expuestos a tolueno.

A los 20 días posnatales en los productos de ratas expuestas a tolueno se observó un número mayor de espermatogonias. En el grupo experimental II (Exposición 15-21) se presentó el mayor valor; encontrándose diferencia significativa entre éstos grupos. Cuadro No.4

Figura 1.

Fotomicrografía que muestra la estructura testicular de un animal testigo recién nacido en donde se observa la distribución uniforme de los túbulos seminíferos con predominancia de la forma redonda (Tr), abundante proliferación de espermatogonias (→), así como tejido conectivo intersticial distribuido simétricamente sobre la superficie testicular (→) y fibroblastos (F). (Tinción HE. 154 X).

Figura 2.

Imagen del tejido testicular de un animal recién nacido expuesto a tolueno durante toda la gestación, en la cual se muestra una distribución asimétrica de túbulos seminíferos (Tr, To), así como del tejido conectivo intersticial (→). (Tinción HE. 169 X).

Figura 3.

Fotomicrografía que muestra la estructura del testículo de un animal expuesto a la inhalación de tolueno durante el tercer tercio de la gestación (exposición 15-21 días), en la cual se observa la distribución uniforme de los túbulos seminíferos de forma oval (To) y abundante tejido conectivo intersticial con distribución uniforme (→). (Tinción HE. 99 X).

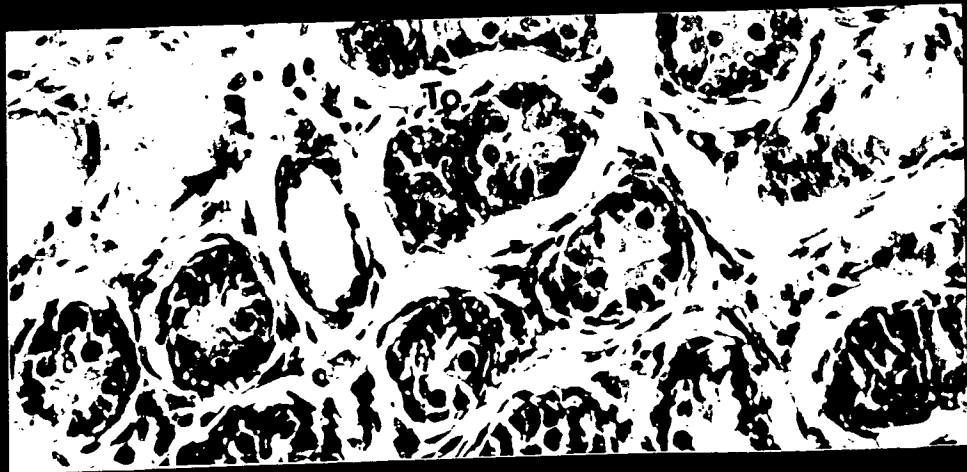
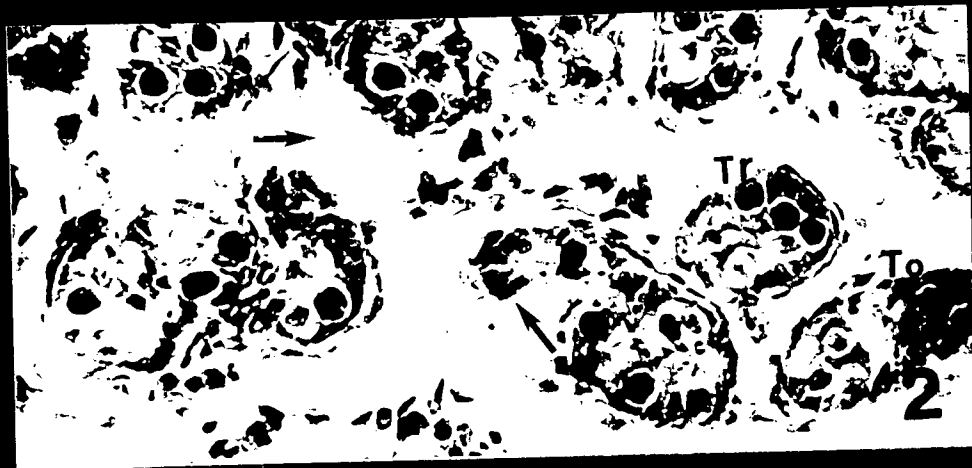
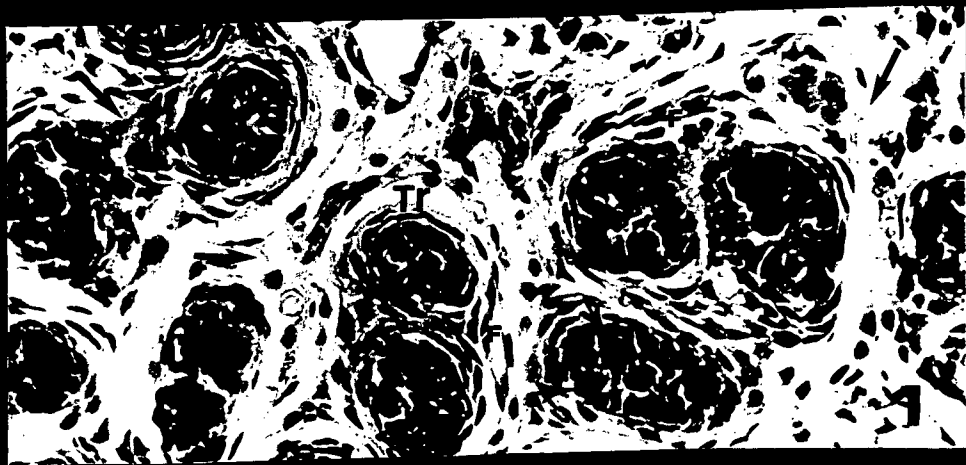


Figura 4.

Muestra la estructura del testículo de un animal testigo de 20 días de edad, donde se observa escaso tejido conectivo intersticial (→), la forma alargada del túbulo seminífero (Ta), parte de la estructura de la lámina basal formada por células alargadas con núcleo grande y alargado distribuidas en una monocapa de células (Lb), el tejido germinal distribuido en varias capas de células (Tg), así como una proliferación de espermatogonias de distribución reticular (→). En la parte central del margen superior se aprecia la luz del túbulo seminífero (Lt). (Tinción HE. 175 X).

Figura 5.

La fotomicrografía que corresponde a un corte del testículo de un animal a los 20 días de edad expuesto prenatalmente a tolueno durante el tercer tercio de la gestación (15-21 días), donde se aprecia gran proliferación de túbulos seminíferos de forma alargada (Ta), muy abundante proliferación de espermatogonias (→) que llegan a cubrir la luz tubular (Lt) y escaso espacio intersticial entre los túbulos (*). (Tinción HE. 144 X).

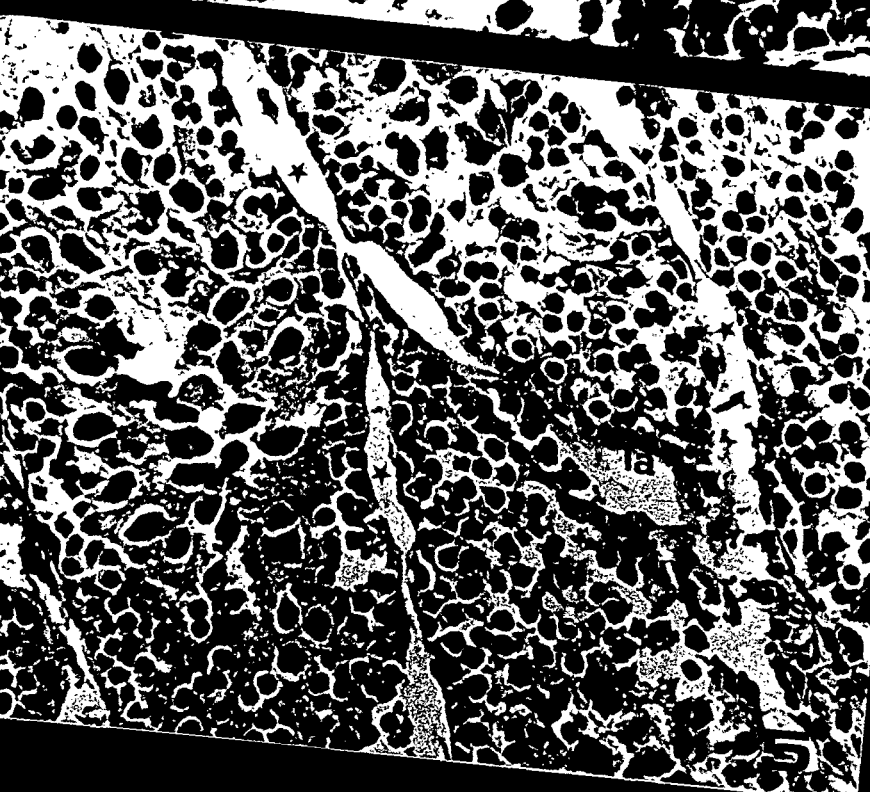
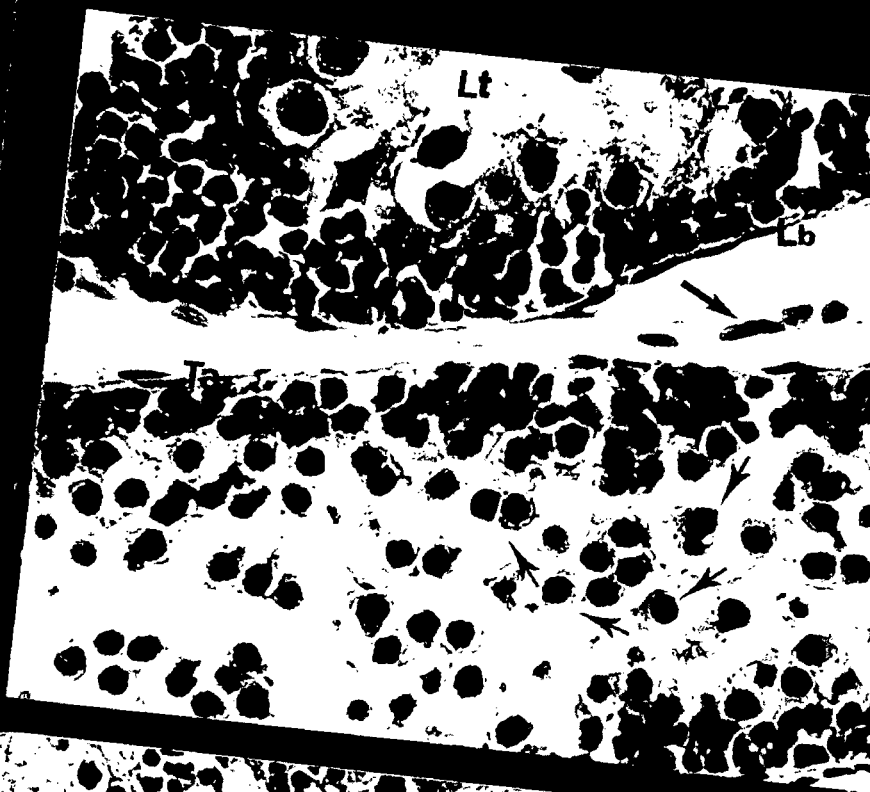
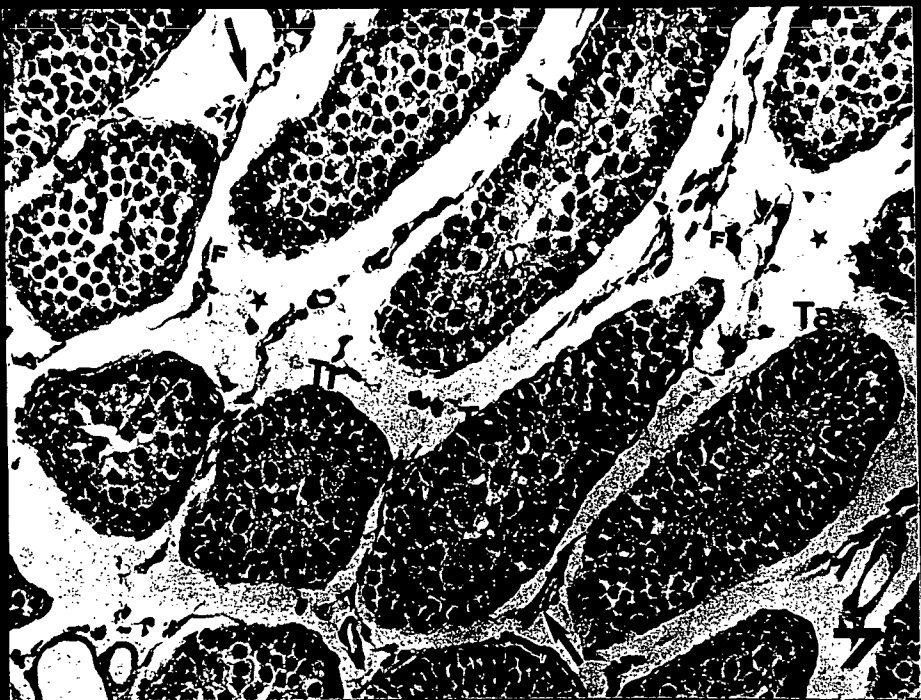
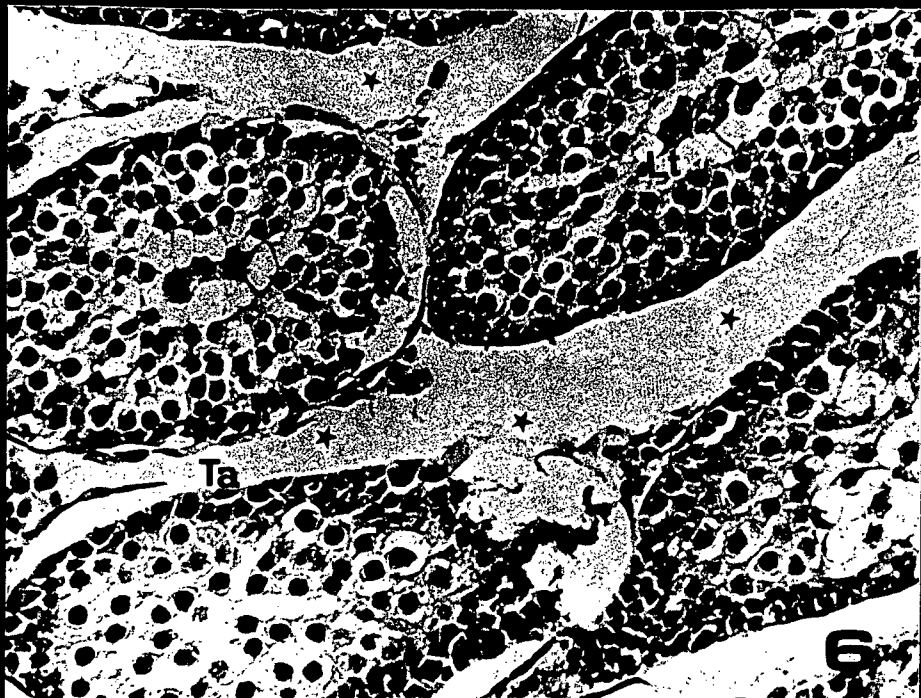


Figura 6.

Muestra con detalle la estructura de los túbulos correspondientes a un animal de 20 días de edad expuesto prenatalmente a tolueno durante toda la gestación (1-21 días), donde predomina la forma alargada del túbulo (Ta), abundante proliferación de espermatogonias, localizándose escasamente en la luz tubular (Lt). (Tinción HE. 160 X).

Figura 7.

Fotomicrografía de un corte del testículo de un animal a los 20 días de edad expuesto durante la gestación completa a tolueno donde se observan túbulos de forma redonda (Tr) y alargada (Ta), gran espacio intersticial (*), escaso tejido intersticial con distribución uniforme, escasos fibroblastos (F) y tejido germinal abundante (Tg). (Tinción HE 60 X).



CUADRO I

CUADRO DE HALLAZGOS HISTOLOGICOS. GRUPO RECIENTE NACIDO

| | TEJIDO CONECTIVO INTERSTICIAL | CELULAS DE LEYDIG | TUBULOS SEMINIFEROS | ESPERMATOSONIAS | TEJIDO GERMINAL | LAMINA BASAL |
|-------------------------------|---|--|---|--|---|---------------------------------------|
| TESTIGO | Es muy abundante de aspecto compacto con distribución uniforme en la superficie testicular. (4/7) | Abundantes de forma irregular con núcleo central grande y distribución uniforme (7/7). | Predomina la forma redonda con distribución uniforme (7/7). | Abundantes con arreglo compacto y distribución uniforme (7/7). | abundantes, disposición en una monocapa de células (7/7). | Monocapa de células alargadas. (7/7). |
| EXPERIMENTAL I GRUPO (1-21) | Abundante, poco compacto con distribución uniforme (5/7) | Pocas con distribución uniforme (7/7). | Se presentó la forma redonda y con distribución hacia la periferia del testículo (6/7). | Poco abundantes con arreglo reticular (6/7). | Abundante con disposición en una capa de células (7/7). | Monocapa de células alargadas. (7/7). |
| EXPERIMENTAL II GRUPO (15-21) | Escaso con distribución uniforme (4/4). | Pocas con distribución uniforme (4/4). | Con forma oval muy abundantes y con distribución uniforme 4/4. | Abundantes de arreglo reticular (3/4). | Abundante, con distribución en una capa de células (4/4). | Monocapa de células alargadas. (4/4). |

CUADRO 2

CUADRO DE HALLAZGOS HISTOLOGICOS. GRUPO 20 DIAS DE EDAD

| | TEJIDO CONECTIVO INTERSTICIAL | CELULAS DE LEYDIG | TUBULOS SEMINIFEROS | ESPERMATOGONIAS | TEJIDO GERMINAL | LAMINA BASAL |
|----------------------------|--|--------------------------------------|---|--|--|--------------------------------------|
| TESTIGO | Escaso, distribución uniforme. (9/9). | Escasas, distribución uniforme (9/9) | Predomina la forma alargada con distribución uniforme muy abundantes 9/9. | Abundantes de arreglo compacto algunas proliferan hacia la luz del túbulo (6/9). | Abundante y denso distribuido en varias capas de células (7/9). | Monocapa de células alargadas (9/9). |
| EXPERIMENTAL GRUPO (1-21) | Escaso, distribución uniforme. (4/4). | Escasas. (4/4). | Predomina la forma alargada con distribución uniforme (4/4). | Abundantes con arreglo reticular proliferan hacia la luz del túbulo (4/4). | Abundante, distribuido en una monocapa o bicapa de células (4/4) | Monocapa de células alargadas (4/4). |
| EXPERIMENTAL GRUPO (15-21) | Escaso, con distribución uniforme (4/4). | Escasas (4/4). | De forma alargada muy abundantes distribución uniforme (4/4) | Muy abundantes, arreglo compacto cubren la luz del túbulo. (4/4). | Abundante, con distribución en una monocapa de células (4/4). | Monocapa de células alargadas (4/4). |

CUADRO No.3 TUBULOS SEMINIFEROS
en 6.1 mm de tej.

| GRUPO | Media | Desv. est. | Coef. var. |
|-------------------------------|-------|---------------|---------------|
| Recien nacido | | | |
| TESTIGO | 65.4b | 22.3 | 34.0 |
| EXPERIMENTAL I GPO. 1-21 | 61.5b | 16.6 | 27.0 |
| EXPERIMENTAL II GPO. 15-21 | 99.3a | 39.7 | 40.0 |
| GRUPO 20 Dias | | | |
| TESTIGO | 61.5 | 11.6 | 18.99 |
| EXPERIMENTAL I GPO. 1-21 | 71.2 | 21.8 | 30.6 |
| EXPERIMENTAL II GPO. 15-21 | 65 | 31.4 | 48.4 |

a,b indican diferencia estadística ($p < 0.05$)

CUADRO No. 4 ESPERMATOGONIAS /3.4 mm de tej.

| GRUPO Recien nacido | Media | Desv. est. | Coef. var. |
|---------------------------------|--------|---------------|---------------|
| TESTIGO | 96.1b | 19.4 | 20.2 |
| EXPERIMENTAL I GPO. 1 - 21 | 90.2b | 21.1 | 23.4 |
| EXPERIMENTAL II GPO. 15 - 21 | 139.3a | 26.5 | 19 |
| GRUPO 20 Dias | | | |
| TESTIGO | 618.2b | 132.2 | 21.3 |
| EXPERIMENTAL I GPO. 1 - 21 | 573b | 126.1 | 22 |
| EXPERIMENTAL II GPO. 15 - 21 | 995.1a | 237.2 | 23.8 |

a,b indican diferencia estadística a ($p < 0.05$).

DISCUSION:

El tolueno es un solvente orgánico de uso industrial capaz de provocar cambios psicológicos y neuronales en trabajadores expuestos a la inhalación de éste compuesto durante periodos prolongados, así como daños teratogénicos en sus hijos (2,16); por lo que resulta de gran interés, conocer los efectos provocados en crías de madres expuestas a este tipo de compuestos durante el proceso de gestación.

En el presente estudio se observaron las alteraciones provocadas a nivel testicular en productos de ratas expuestas a tolueno durante diferentes etapas de la gestación, con el objeto de determinar la vulnerabilidad de este tejido durante el desarrollo embrionario.

En los grupos testigo tanto recién nacidos como a los 20 días de edad, al realizar los estudios semicuantitativo e histológico se encontró un desarrollo normal de los testículos de ratas (30,32).

Las alteraciones ocasionadas por la exposición a tolueno fueron evidentes en los productos de ratas gestantes debido a que éste compuesto es capaz de atravesar por difusión la barrera hematoplacentaria y llegar al producto a través del paquete vascular umbilical (12,13), provocando cambios en la concentración de oxígeno, alterando con ello el metabolismo fetal (14), por otra parte éste compuesto una vez en sangre se deposita en tejidos lipídicos por su elevada afinidad a las grasas por lo que es posible que se

incorpore a tejido testicular debido a la gran cantidad de hormonas esteroides que aquí se producen y cuyos precursores son lípidos (8, 9).

En el grupo experimental I recién nacido (exposición 1-21 días de la gestación), se encontraron manifestaciones anormales en los túbulos seminíferos ya que aparentemente hay una disminución del diámetro, así como también se presentó una menor cantidad de espermatogonias, los cambios encontrados probablemente se deben a que la exposición a tolueno fué constante durante todo el período de la gestación de las ratas. En estudios realizados en ratas se ha determinado que la exposición a diferentes solventes entre ellos el N-hexano y el tolueno, pueden ocasionar trastornos alterando la morfología testicular, induciendo daño en la línea germinal e inducir a la atrofia testicular. Así mismo, se ha comprobado que la utilización del 1,2 dibromo, 3 cloropropano en ratas Sprague Dawley y conejos Dutch Belted provoca toxicidad sobre el sistema reproductor masculino ocasionando un menor diámetro de los túbulos seminíferos y menor número de espermatocitos y células de Sertoli (45, 46).

Por otra parte; en el grupo experimental II recién nacido (exposición 15-21) entre los cambios más notables que se presentaron al compararlo con el control fueron una menor cantidad de tejido intersticial y células de Leydig así como cambios en la forma del túbulo seminífero; también se presentó un mayor número de túbulos seminíferos y

espermatogonias, existen estudios que indican que la utilización de compuestos tales como el cloroformo y el eter utilizadas como anestésicos en el último tercio de la gestación provocan graves daños a nivel fetal ya que en éste periodo aumentan las necesidades de oxígeno y de nutrientes (17).

Tanto en el grupo testigo como en los grupos experimentales a los 20 días de edad, se presentó una disminución del tejido conectivo intersticial que probablemente es consecuencia del aumento del tamaño del testículo y el desplazamiento de éste tejido hacia las diversas zonas del testículo.

Así mismo la disminución de células de Leydig en los grupos experimentales a los 20 días de edad fué notable, lo cuál probablemente se debe a que cuando se daña el S.N.C. por exposición a los agentes tóxicos, como resultado del intercambio gaseoso transplacentario, se lesiona la hipófisis de los fetos y como consecuencia se alteran sus funciones, tales como la producción de hormonas sexuales como la hormona estimulante de las células intersticiales (ICSH) por ésta razón los testículos modifican su desarrollo normal y actividad endócrina y exócrina (32,39,40).

Una de las alteraciones más notables en los testículos de los productos de 20 días posnatales se presentó en el grupo 15-21 fué una proliferación más elevada de espermatogonias (30), ésto pudo haber sido ocasionado por un estímulo irritante de los solventes sobre el tejido

testicular que probablemente indujo a una mayor proliferación de las espermatogonias provocando con ello un aumento del diámetro del túbulo seminífero, tal como sucede en algunos casos de lesión mecánica (47,48).

Por lo anteriormente señalado, se puede determinar que la exposición a tolueno durante la etapa de gestación produce alteraciones en el tejido testicular, sin embargo, se requiere de estudios citogenéticos más profundos para determinar si hay alteraciones en la fertilidad ya que en el presente estudio no se encontraron anormalidades en la forma y tamaño de las diversas estirpes celulares del testículo.

Mediante los resultados obtenidos se puede suponer que bajo condiciones de exposición moderada al tolueno durante la etapa de gestación, existe un mayor tiempo de contacto con éste compuesto por lo que es posible suponer que se presentes transtornos más severos que afecten la fertilidad de los productos.

CONCLUSIONES

1.-La inhalación materna a bajas dosis de tolueno altera la estructura testicular durante el desarrollo fetal debido al estado de inmadurez del tejido gonadal.

2.-La exposición transplacentaria a tolueno en los días de gestación 15-21 altera la proliferación celular de los testículos en productos recién nacidos y de 20 días de edad.

3.-Dentro de los efectos producidos por el tolueno durante las diferentes etapas del desarrollo fetal no se encontraron anomalías en cuanto a forma y tamaño de las diversas estirpes celulares del tejido testicular.

BIBLIOGRAFIA:

1.-Escobar A, Arruffo C y Jiménez G. (1984). Efecto neurotóxico de los disolventes industriales y otros compuestos . Boletín de la Sociedad Mexicana de Ciencias Biológicas. 5(3):4-6.

2.-Vahdat N. (1987). Permeation of polymeric materials by toluene . Am. Ind. Hyg. Assoc. J. 48(2):155-159.

3.-Press E, M.D., Done K. A, M.D. (1967). Physiologic effects and community control measures for intoxication from the intentional inhalation of organic solvents. J. Pediatrics 39(3):451-461.

4.-Hers J.H., Philip E., Prodruch G.R., and Bernard W., (1985) Embryopathy by toluene. J. Pediat. (106):922-924.

5.-Kirk R.E. y Othmer D.F. (1965) Enciclopedia de Tecnología Química. Unión Tipográfica. Editorial Hispano-Americana, Tomo XV pp 540-551.

6. -Lazar R.B. (1983) Multifocal central nervous system damage caused by toluene abuse. Neurology. 4(33): 137-40.

7.-Takeuchi Y., Hisanaga N., Yuichiro O. Hagamuchi Y, and

Susumo O. (1981). Cerebelar disfunction caused by sniffing of toluene containing thinner. Ind. Healt. 19(3): 163-9.

8. -Brucckner J.V. y Peterson R.G. (1981) Evaluation of toluene and acetona inhalant abuse: Pharmacologic and pharmacodinamics. Toxicol Appl Pharmacol. 61:27-38.

9.-Chism J.P., Turner M.J. Jr. y Rickert D.E. (1984). The metabolism and excretion of mononitrotoluenes by fischer 344 rats . Drug Metab. Dispos. 12(5):596-602.

10.-Lindstrom K y Wickstrom G. (1983). Psychological function changes among maintenance house painter exposes to low leveles of organic solvent mixtures. Acta Psychiat Scan. 67:SUPPL 303;81-91.

11.-Dick R.B., James V.S., Wait R., Beth H.M., Bobby J., Bill Y. (1984). Effect by facute exposure to toluene and metil-ethyl-Ketone in performance psichomotor. Int Arch. Occup. Environ. Healt 54:91-99.

12.-Garcia E.J.,Rodriguez S.A. y Garzon P. (1987) Cerebral cortex and body growth development of progeny of rats exposed to thinner and turpetine inhalation . Gen. Pharmac. 19:467-470.

- 13.-Yamawaki S., Tomio S.,y Keisure S. (1982). Effects of acute and chronic toluene inhalation on behavior and tritium-labeled serotonin in rat. Life Sci. 30:1997-2002.
- 14.-Caton D. M.D.(1977). Obstetric anesthesia and concepts of placental transport. Anesthesiology 46:132-137.
- 15.-Toutant C, Pippmsnn S. (1979).Fetal solvents syndrome . The Lancet 4(5):1359.
- 16.-Joseph H. M.D., Philip E.P., M.D., and Weisskopf B. M.D. (1984). Toluene embryopathy. J. Pediatrics. 106:922-927.
- 17.-Lassen V.A. (1978) Cerebral circulation and anesthesia. Acta anaesthesiol Scand. SUPPL.70: 53-59.
- 18.-Vineis P., Avanzzy G.C., Giovinazzo B., Ponzio G., Cambrin G.R., Ciccone G. (1990). Cytogenetics and occupational exposure to solvents: A pilot study on leukemias and myelodysplastic disorders. Tumori 76(4): 350-52.
- 19.-Gundy S. (1989). Cytogenetical studies on a large control population and on persons occupationally exposed to radiation and/or to chemicals. Ann Ist Super Sanita 25(4): 549-555.

20.-Brandt L., Kristoffersson V., Olsson H., Mitelman F. (1989). Relation between occupational exposure to organic solvents and chromosome aberrations in non-hodgkins lymphoma. J. Haematol 42(3): 293-302.

21.-Schmid E.M., Bauchinger and Hauf (1985) Chromosome changes whith time in limphocytes, after occupational exposure to toluene. Mutat res 142(1/2):37-40.

22.-Bloom W. M.D., Don F.W. M.D. (1978). Tratado de histologia 7ma. Edición. Edit. Labor S.A. Barcelona-España.pp 806-812.

23.-Langman J. (1969). Embriologia Médica. 2da. edicion.Editorial Interamericana México D.F.pp146-149.

24.- Skanda L. J.E. (1984) Complicaciones anatómicas en cirugia general. 1a. Edicion. Edit. Mc. Graw Hill. México, D.F.pp 286

25.-Rugh R, (1964) Vertebrate Embryology (the dynamics of development) Editorial Harcourts Brace World Inc. New york/Burlingame pp 241

26.-Michel G., Schwarze E., (1984) Compendio de anatomia veterinaria. Tomo IV (Embriologia) 3a reimpression. pp206-219.

- 27.-Vaquero C.J., Fernandez G.H., Oya D.G. Zamarano S.L.,
(1982) Fundamentos de histología Ednteramericana. 1a.
edición pp 244-252
- 28.-Schumacher M., Rienfrid. (1980) Compendio de histología
humana. Editorial nacional pp. 174-179.
- 29.-Lesson C., Lesson T., Apararo A. (1988). Atlas de
histologia. Editorial Interamericana 2da. Edición pp 264-
266.
- 30.-Milis N. (1977). Morfological and biochemical changes
whitch occur during postnatal development and maturation of
rats testis. Biol Reprod 17(1):124-130.
- 31.-Lesson R., Lesson S. (1981) Manual de histologia.
Editorial Interamericana. 3a. Edición. pp 481-487.
- 32.-Tapanainen J., Kuopio T., Pellinemi J. (1984). Rat
testicular endogenous esteroid and number of Leydig cells
between the fetal period and asexual maturity. Biol Rep. 31-
1027-1035.
- 33.- Taskinen H., Anttila A., Lindbohm ML., Sallmen M.,
Heminski K., (1989) Spontaneous abortion and congenital
malformations among the wives of men occupationally exposed
to organic solvents. Scand J.Work Environ Health. 15(5):345-

52.

34.-Kelce WR., Raisbeck MF., Ganjam VK., (1990). Gonadotoxic effects of 2-hexanone and 1,2-dibromo-3-chloropropane on the enzymatic activity of rat testicular 17 α -hydroxylase/c-17-20 lyase. *Toxicol-lett* 52(3):331-338.

35.-Martinez v., Reviers H., Barenton B., Perreau C. (1983) Endocrinological and histological changes induced by flutamide treatment on the hypothalam-hipophyseal testicular axis of the adult male rat and their incidences on fertility. *Acta Endocrinológica* 104:246-252.

36.-Lee Kp., Kinney LA., Valentine R. (1989). Comparative testicular toxicity of bis (2-methoxyethyl) ether and 2-methoxyethanol in rats. *Toxicology* 59(3):239-258.

37.-De la Torre G.P. (1987) Alteraciones del desarrollo testicular prenatal de ratas por efecto de la exposición materna a cloroformo y eter. Estudio Histológico. Tesis profesional. Fac Med Vet y Zoot. U de G.

38.-Austin R.C. y Short R.V. (1982) Desarrollo embrionario y fetal. *La Prensa Medica Mexicana S.A.* Vol. 2:91-99.

39.-Eguchi Y., Sakamoto Y., Arishima K., Morikawa Y and Hishimoto Y. (1975). Hypotalamic control of the pituitary

testicular relation in fetal rats. Measurement of collective volume of Leydig cells. *Endocrinology*. 96: 504-507.

40.-Babichev V.N., Peryshkova T.A., Aivazashvili N.I., Shishkina I.V. (1989) Effect of alcohol on the content of sex steroid receptors in the hypothalamus and hypophysis of male rats. *Biull Eksp Biol Med* 107(2): 204-207.

41.-Vázquez M.M, (1986). Alteraciones en la corteza cerebral de ratas al nacimiento como resultado de la exposición anestésica prenatal materna a eter y cloroformo. Estudio histológico. Tesis profesional. Fac. Med. Vet. Zoot. U de G.

42.-Hayat M.A. (1972). Basic electron microscopy techniques. Cap 2. (Fixation by vascular perfusion). Editorial Litton Educational Publishing Inc. pp 31-33.

43.- Infante S.G., Zarate de L. J.P. (1990). Metodos estadísticos. Cap. II (Análisis de la varianza). Editorial Trillas. 1a. reimpresión. pp 401-451.

44.- Wayne W.D. (1990). Bioestadística. Cap 7. (Análisis de varianza). Editorial Limusa. 5ta. reimpresión. pp 283-353.

45.-Nylen P. Ebendal T, Erikdotter N.M., Hansson T., Henschen A., Jhonson Ac., Kronevi T., Kuist V., Sjostrand

ND.,Hoglund G. (1989) Testicular atrophy and loss of nerve growth factor immunoreactive germ cell line in rats exposed to n-hexane and aprotective effects of simultaneous exposure to toluene or xylene . Arch toxicol 12(2):291-307.

46.-Berndtson WE., Neefus C., Foote RH., Amann RP., (1989).Optimal replication for histometric analyses of testicular function in rats or rabbits. Appl Toxicol 12(2):291-302.

47.-López A.G. (1968). Drogas anestésicas. Fundamentos de anestesiología. Editorial Prensa médica Mex. pags. 29-42.

48.-Meyer L.J. (1980). Anestésicos por inhalación. Farmacología y terapéutica veterinaria. Editorial Uthea. pags. 171-174.