

Universidad de Guadalajara

Facultad de Ciencias Biológicas



Alteraciones en la Organización Celular de la Corteza
Cerebral de la Progenie de Ratas Expuestas a la
Inhalación de Tolueno en Diferentes Etapas Prenatales

Tesis Profesional

Que para obtener el Título de:

Licenciado en Biología

Presenta:

Guillermo Aceves Guizar

Guadalajara, Jalisco, 1991.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS

Sección

Expediente

Número 0548/90

SR. GUILLERMO ACEVES HUIZAR
P R E S E N T E . -

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado el tema de Tesis "ALTERACIONES EN LA ORGANIZACION CELULAR DE LA CORTEZA - CEREBRAL DE LA PROGENIE DE RATAS EXPUESTAS A LA INHALACION DE TOLUENO EN DIFERENTES ETAPAS PRENATALES" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos a usted que ha sido aceptado como Director de dicha Tesis al M.en C. Joaquín García Estrada.

A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"
Guadalajara, Jal., Abril 5 de 1990
EL DIRECTOR



ING. ADOLFO ESPINOZA DE LOS MONTEROS CARDENAS

FACULTAD DE CIENCIAS

EL SECRETARIO

M. EN C. ROBERTO MIRANDA MEDRANO

c.c.p. El M.en C. Joaquín García Estrada, Director de Tesis.-Pte.
c.c.p. El expediente del alumno.

Al contestar este oficio cifrese fecha y número



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE MEDICINA

SECCION _____

EXPEDIENTE _____

NUMERO _____

C. M en C Carlos Beas Zarate.
Director de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Guadalajara.
P R E S E N T E

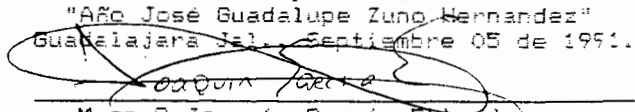
Apreciable Maestro Beas; por este conducto me permito informarle que el P. de Biol. GUILLERMO ACEVES HUIZAR ha concluido satisfactoriamente el trabajo de investigación: "ALTERACIONES EN LA ORGANIZACION CELULAR DE LA CORTEZA CEREBRAL DE LA PROGENIE DE RATAS EXPUESTAS A LA INHALACION DE TOLUENO EN DIFERENTES ETAPAS PRENATALES", bajo mi dirección.

Por lo anterior solicito a Ud. su autorización a fin de programar la presentación de su examen de tesis y profesional.

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

A T E N T A M E N T E

"Piensa y trabaja"
"Año José Guadalupe Zuno Hernández"
Guadalajara Jal., Septiembre 05 de 1991.


M en C Joaquín García Estrada
Investigador Titular "C" de la Facultad de Medicina.

c.c.p. Archivo.

DEDICATORIAS

A MIS PADRES:

Por el ejemplo que siempre me han brindado, por su comprensión y confianza sin la cual no hubiera sido posible lograr esta meta.

A MIS HERMANOS:

Por el apoyo que me dieron y porque siempre estuvieron presentes cuando los necesite.

A MIS COMPANEROS Y AMIGOS:

Quienes compartieron conmigo tantos momentos gratos así como momentos difíciles, los cuales y que recordare siempre con cariño ya que fueron parte de nuestra formación no sólo académica sino también personal.

A todas las personas que comparten conmigo el interés por la Biología.

AGRADECIMIENTOS

A LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA:

Por permitirme recibir una formación académica y profesional además por las facilidades que me otorgo para llevar a cabo la presente tesis de licenciatura.

A MIS ASESORES:

Quienes compartieron conmigo todos sus conocimientos y también por fomentar en mi persona el interés por la investigación científica.

A LOS H. MIEMBROS DEL JURADO:

Por sus atinados comentarios y observaciones al presente trabajo.

A todos mis compañeros del laboratorio de Investigación con quienes compartí muchas horas de trabajo y diversión. A Geras y muy especialmente a la M en C Esther Albarrán Rodríguez sin la cual no hubiera sido posible la terminación de este trabajo.

ALTERACIONES EN LA ORGANIZACION CELULAR DE LA CORTEZA CEREBRAL
DE LA PROGENIE DE RATAS EXPUESTAS A LA INHALACION DE TOLUENO EN
DIFERENTES ETAPAS PRENATALES

Trabajo que presenta el P. de Biol. GUILLERMO ACEVES HUIZAR
(Código 82000372) para obtener el grado de Licenciatura en
Biología.

DIRECTOR DE TESIS:

M en C Joaquín García Estrada

ASESORES:

MVZ Jacinto Bañuelos Pineda

MVZ Raúl Leonel de Cervantes Mireles

Guadalajara Jalisco., Noviembre de 1991.

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN LA FACULTAD DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTECNIA Y LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA CON APOYO FINANCIERO DEL DEPARTAMENTO
DE INVESTIGACION CIENTIFICA Y SUPERACION ACADEMICA CON ACUERDO
89/3939/MB01-01/3657.

ALTERACIONES EN LA ORGANIZACION CELULAR DE LA CORTEZA CEREBRAL
DE LA PROGENIE DE RATAS EXPUESTAS A LA INHALACION DE TOLUENO EN
DIFERENTES ETAPAS PRENATALES.

I N D I C E

Contenido	Página
Resumen	3
Introducción	4
Planteamiento del problema	10
Hipótesis.....	11
Objetivos	12
Material y métodos	13
Resultados	16
Discusión	26
Conclusiones	30
Bibliografía	31

RESUMEN

El tolueno, solvente lipídico de bajo costo y fácil acceso, es conocido como uno de los principales fármacos inhalados por motivos voluntarios o laborales, de lo que resultan diversos efectos, desde pérdida de la conciencia y narcosis, hasta trastornos neurológicos y morfológicos, además de ser embriotóxico cuando se inhala durante el embarazo. Con el propósito de determinar las alteraciones citoarquitectónicas de la corteza cerebral de ratas expuestas prenatalmente a la inhalación de vapores de tolueno, 20 ratas hembras adultas Sprague-Dawley preñadas, divididas en 3 grupos de 5 c/u fueron expuestas durante la gestación a la inhalación del solvente; 1.- Desde el primer día gestacional (1-21), 2.- A partir del segundo tercio (8-21), y 3.- El último tercio (15-21), y un grupo adicional control, también de 5 ratas permaneció sin exposición. Dos crías de cada rata fueron perfundidas por vía intracardiaca al nacimiento 20 y 60 días. Se practicó craneotomía y los cerebros postfijados se procesaron histológicamente y tiñeron con las técnicas de Kluver-Barrera y Hematoxilina-Eosina para el análisis microscópico descriptivo y semicuantitativo. Los parámetros somatométricos mostraron el efecto más evidente en todos los grupos expuestos de recién nacidos, encontrándose un incremento en el peso corporal y disminución significativa del mismo a los 60 días para los dos primeros grupos de animales expuestos. Por otra parte, los parámetros encefálicos solo revelaron notables alteraciones a los 60 días de edad, con un incremento del espesor cerebral en todos los grupos experimentales. No se observaron daños severos en los demás parámetros analizados. El estudio histológico en recién nacidos reveló disminución e indiferenciación celular y arreglo neuronal irregular de los grupos expuestos, con menor severidad a los 20 y 60 días de edad, en donde solamente se observó indiferenciación del estrato piramidal y la mayor recuperación del grupo 15-21. Los cambios observados en el espesor cortical no resultaron severos para ninguna edad. Al parecer el tolueno afectó solo la neurogénesis normal fetal, debido a una reducción en el suministro hemato-placentario de nutrientes. Este déficit funcional puede compensarse por sinaptogénesis en la vida adulta. La inhalación de tolueno produjo disminución de la población neuronal y retardo en la maduración de diversas estirpes celulares en relación directa con el tiempo de exposición.

INTRODUCCION.

El tolueno (Metil-benceno, toluol) es un hidrocarburo liquido volátil que tiene olor característico parecido al de las resinas balsámicas, fue descubierto por Pelletier y Walter hacia 1835 en los productos de la destilación seca de las resinas naturales que contienen ésteres de ácidos toluicos (1).

Las fuentes industriales más importantes del tolueno son el petróleo y la hulla grasa, este solvente se emplea como materia prima para obtener el explosivo Trinitrotolueno y productos químicos intermedios como el ácido benzoico, benzaldehido, los vinitoluenos y las toluidinas, también se utiliza como disolvente industrial y componente de la gasolina así como para formar revestimientos protectores como; pinturas, barnices, lacas, esmaltes, telas, cubiertas de suelos y paredes y para confeccionar el cuero artificial (1,2).

Anteriormente el principal solvente orgánico de pinturas, lacas y gomas era el benceno, en las pasadas dos décadas el tolueno y n-hexano por sus características químicas reemplazaron a éste como los principales constituyentes orgánicos de numerosos compuestos industriales (3).

La incorporación de los solventes al organismo sucede fundamentalmente por la respiración, y pequeñas cantidades penetran por la piel y el epitelio intestinal (4,5).

El tolueno se popularizó como un agente recreativo y psicotrópico al ser inhalado directamente en solución (2) o a través de vapores que contienen productos como aerosoles, pinturas y pegamentos (6). Además, su posesión y mal uso tienen pocas consecuencias legales, lo que ocasionó que por su bajo costo y fácil acceso se convirtiera en favorito de los farmacodependientes (2,7).

Por la farmacodinamia del tolueno se ha demostrado que es rápidamente metabolizado a ácido benzóico a través de oxidación y en menor grado a p-cresol (4,8).

El tolueno tiene afinidad con los componentes lipídicos de la membrana celular por su elevada lipofilicidad (9), por lo que se concentra mayormente en los tejidos ricos en lípidos (2,3).

La toxicidad de los solventes orgánicos además del tiempo y nivel de exposición también depende sobre todo del metabolismo corporal, respecto a esto último, el tolueno se considera más neurotóxico que hepatotóxico, debido a que en el cerebro sucede la principal transformación metabólica y en menor proporción en el tejido hepático (8).

La eliminación de los metabolitos del tolueno, puede suceder mediante la respiración ó en forma de ácido hipúrico que se excreta fácilmente en la orina, pequeñas cantidades pueden eliminarse a través de secreciones glandulares como el sudor y la leche (4).

EFFECTOS TOXICOS DE LOS SOLVENTES ORGANICOS.

Los límites aceptables de concentración de vapor de tolueno en la atmósfera pueden ser de hasta 100 ppm, cantidades mayores pueden provocar los primeros signos de intoxicación; mareos, ansiedad (3), cefalea, fatiga y confusión o en otros casos náuseas, vómitos y trastornos del equilibrio. En los casos de exposición aguda puede ocurrir pérdida de la conciencia, depresión, narcosis y conducta psicópata (1-4,10,11,12).

-Alteraciones Anatómo-Patológicas.

Entre las lesiones que resultan por exposición voluntaria crónica, están; encefalopatía irreversible, atrofia óptica y pérdida sensorial neural auditiva (3,13). También se han observado daños más graves como disfunción del Sistema Nervioso Central (SNC), atrofia cerebral, cerebelar y cortical, disfunción del tracto cortico-espinal, sordera e hiposmia, resultantes por exposición crónica ocupacional (6,11,14,15).

-Hallazgos Histopatológicos.

En tejidos de pacientes voluntariamente expuestos a solventes se encontró mielina pálida mal definida en la materia blanca cerebelar y áreas periventricular y profunda del cerebro (6), también se observó gliosis en sustancia blanca y gris con densidad disminuida en la población neuronal de ésta

última (16). Entre las alteraciones resultantes por exposición laboral se observó pérdida de los límites entre materia gris y blanca en diferentes regiones del SNC y un incremento de sustancia blanca periventricular (6).

A nivel experimental se producen cambios morfológicos en cultivos primarios de astrocitos y neuronas (17).

La mayor parte de los efectos reportados por la exposición a solventes provienen de evaluaciones clínico-patológicas o neurológicas, de estudios cromatográficos (3), de resonancia magnética nuclear (6) y tomografía computarizada (14), sin embargo estos resultados varían en función del tiempo y el tipo de exposición a la que fueron sometidos los pacientes.

Algunas de las manifestaciones descritas en humanos también se observaron en animales de experimentación con exposición repetida aguda (18).

ESTUDIOS EXPERIMENTALES.

Los estudios experimentales bajo condiciones controladas de exposición describen sobre todo efectos sobre el comportamiento como; salivación, polipnea e incoordinación, así como una reducción en la ganancia promedio del peso corporal (18,19). A nivel neuroquímico se afectan sobre todo las concentraciones de monoaminas y los niveles de catecolaminas (17,20), puede producirse incremento de algunos aminoácidos cerebrales como P y M tiramina (21). También se ha encontrado que los solventes producen alteraciones en la

composición de la membrana lipídica sináptica (18,22).

EFFECTOS EMBRIOTOXICOS Y POSTNATALES.

En las últimas décadas se determinó que los solventes orgánicos provocan embriotoxicidad, los productos son más susceptibles al efecto lipolítico por la inmadurez de su Sistema Nervioso Central (SNC) y las lesiones se reflejan posteriormente en el desarrollo físico y mental de los sujetos afectados (2,4). Está reportado que la exposición a tolueno durante el embarazo puede provocar microcefalia, alteraciones del SNC, disminución del tamaño craneofacial, anomalías en los miembros y deficiencias variables del desarrollo (2).

Cuando la exposición sucede durante el periodo postnatal temprano los solventes pueden interferir con el desarrollo de las estructuras nerviosas córticales y subcorticales que intervienen en actividades como el nado y la locomoción (23), el uso crónico de estos después del nacimiento causa lesiones en cerebro, médula ósea, hígado y riñón (24).

Comunmente se utilizan compuestos neurocitotóxicos que contienen una mezcla variable de tolueno, benceno, acetona, metanol y hexano para la autointoxicación recreativa, con distintos efectos en varios órganos (16).

En México, en la actualidad las pinturas que contienen thinner como solvente y el pegamento para zapatos son los productos comerciales más frecuentemente utilizados para

intoxicación recreativa, sobre todo por jóvenes desorientados y de bajos recursos económicos, esto ocasiona un grave problema de salud pública (3,6,16,19).

Debido a que son poco conocidas las alteraciones en la organización celular de la corteza cerebral de la progenie de ratas expuestas a la inhalación de tolueno en la etapa prenatal, se realizará el presente estudio que tiene por objeto exponer de manera controlada a ratas gestantes, con el propósito de analizar las modificaciones que resultan en la organización citológica del SNC de los productos en la vida postnatal.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Debido al amplio uso industrial de solventes orgánicos sin que se consideren debidamente las especificaciones preventivas establecidas por Medicina del Trabajo, y por la utilización de los mismos como un medio para la intoxicación voluntaria, en ambos casos resultan daños irreversibles en el cerebro de individuos jóvenes y adultos por la exposición aguda ó crónica, ya que estos actúan como solventes lipídicos, por lo que se afectan los fosfolípidos, cerebrósidos y esfingolípidos presentes en el tejido nervioso.

La exposición prolongada de hembras gestantes, aún a bajas concentraciones de solventes ocasiona daños severos a los productos debido a la capacidad de los solventes para atravesar la barrera hemato-placentaria, los efectos adversos son más severos especialmente durante la etapa de maduración del SNC en que los fetos son altamente vulnerables. En el presente estudio se analizaron las alteraciones somatométricas y en la citoarquitectura de la corteza cerebral de animales en la vida postnatal para identificar los trastornos en el patrón de maduración del SNC que termina tiempo después del nacimiento para establecer la severidad de los efectos adversos, lo que permitirá definir medidas preventivas o terapéuticas.

HIPOTESIS.

La inhalación repetida de tolueno por ratas gestantes afecta el desarrollo corporal y la citoarquitectura cerebral de los productos en relación con su estado de maduración prenatal al inicio de la exposición.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL.

Describir los cambios del desarrollo corporal y en la organización histológica de la corteza cerebral en la progenie prenatalmente expuesta a tolueno.

OBJETIVOS PARTICULARES.

1.- Determinar las alteraciones somatométricas de los animales control y experimentales (Peso, longitud craneo-caudal y perímetro cefálico).

2.- Analizar las principales modificaciones en las dimensiones encefálicas de la progenie (Anchura máxima, longitud antero-posterior, espesor y peso).

3.- Describir la organización celular en la corteza cerebral de la progenie al nacimiento, 20 y 60 días mediante la aplicación de técnicas de tinción específicas para tejido nervioso.

4.- Semicuantificar la población neuronal de la corteza cerebral y el espesor de la misma de las crías control y experimentales al nacimiento 20 y 60 días.

MATERIALES Y METODOS.

Se utilizaron 20 ratas albinas Sprague-Dawley del segundo parto de alrededor de 260 g de peso alojadas en jaulas individuales, alimentadas con Chow-Purina y agua "ad-libitum" con ciclos de luz-oscuridad de 12 x 12 h. Después de comprobar la etapa de estro, tres ratas se aparearon con un macho durante una noche y se determinó el primer día gestacional por la identificación de espermatozoides en el moco vaginal. Con las ratas gestantes se formaron 4 grupos de 5 ratas cada uno, tres de estos fueron sometidos a la inhalación de los vapores de tolueno en una atmósfera saturada. La exposición fue por 10 min, 2 veces al día con un intervalo de 8 h, para lo cual se utilizó una cámara de cristal de 50 cm. de largo, 25 cm. de ancho y 30 cm. de altura con dos orificios laterales para ventilación.

Para el primer grupo se expusieron las madres durante la gestación completa (1 a 21 días), para el segundo grupo la exposición fue a partir del día 8 al 21 de la gestación (segundo tercio) y para el último grupo experimental se expusieron las 5 ratas del día 15 al 21 de la gestación (último tercio de la gestación).

Los cinco animales restantes fueron los control que se conservaron intactos sin manejo y sin exposición a los vapores del tolueno durante todo el estudio.

Inmediatamente después del parto se registró el número de productos nacidos y se pesaron por separado, se midió su longitud craneo-caudal y el diámetro cefálico. En forma aleatoria se ajustaron las camadas a 8 crías por rata. Se seleccionaron al azar 2 crías por grupo para perfundirlos por vía intracardiaca y posteriormente mediante craneotomía se separo el encéfalo completo.

Para la perfusión los animales se anestesiaron profundamente con cloroformo y se introdujo en el ventrículo izquierdo una aguja biselada corta calibre 23, para inmediatamente después seccionar la aurícula derecha y hacer pasar una solución lavadora inicial de Ringer-Krebs con procaina (1g/l de sol.) y heparina 1,000 U.I. a 37 grados centígrados, pH de 7.3, 0.1 M y 283 mosm/l bajo una presión de 130 cm³ de agua durante 4 min. Enseguida se introdujo una solución fijadora de glutaraldehido: 2.5% y formadehido al 1% amortiguado en fosfatos al 0.1 M, pH 7.3 y 583 mosm/l por 8 min. El cerebro se postfijo 24 h por inmersión en la misma solución fijadora a 4 grados C. para luego obtener el peso y sus dimensiones.

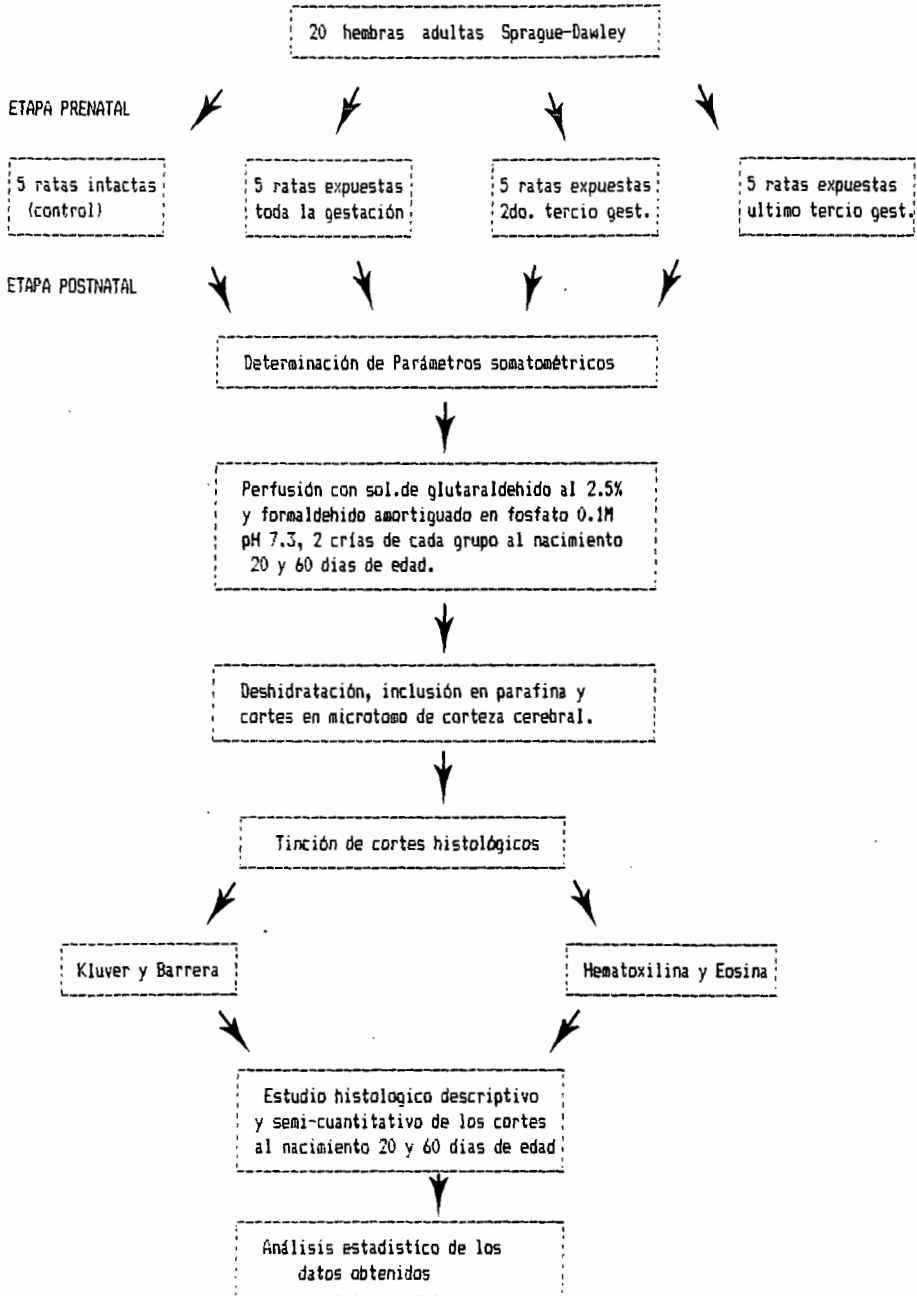
Este procedimiento se repitió a los 20 y 60 días postnatales con el mismo número de animales.

Los tejidos postfijados se lavaron con dos cambios de 15 min. en amortiguador de fosfatos 0.1 M, y posteriormente se deshidrataron en series crecientes de etanol y mezclas de etanol-xilol antes de incluirse en parafina. Se obtuvieron

cortes de 3 a 5 μ m de espesor de las diferentes muestras en un microtomo American Optical SL-20 que se tiñeron con técnicas de Hematoxilina y Eosina y Kluver-Barrera, para su análisis en un microscópio óptico Zeiss Fomi-III.

Los resultados morfométricos se analizaron por el método estadístico de varianza aleatorizado a un nivel de significancia de $P < 0.05$.

DIAGRAMA DE FLUJO



RESULTADOS:

Durante los primeros días de exposición en la cámara saturada con vapores de tolueno las ratas se rehusaban a entrar, después de tres o cuatro días no se resistían a ingresar en la cámara, por lo que no se produjo estrés como resultado de la manipulación. Una vez dentro de la cámara las ratas caminaban en círculos alrededor de los recipientes que contenían el tolueno y constantemente se paraban sobre sus extremidades posteriores para alcanzar con la nariz los orificios de ventilación de la cámara, asimismo efectuaban movimientos de acicalamiento y se tocaban la nariz y los ojos.

La micción y defecación frecuentes sucedieron después de los primeros 5 min. de exposición en que los animales se mostraban bastante intranquilos, posteriormente se redujo la actividad locomotora y la mayoría de los animales presentaron un estado de lascitud.

En ningún momento se manifestaron signos de asfixia, ni pérdida de la conciencia, no se produjeron enfermedades respiratorias como consecuencia de la inhalación del solvente. Al completarse los 10 min. de exposición las ratas tenían flacidez muscular y algunas eran incapaces de sostenerse por sí mismas y cuando se levantaban mostraban una marcha tambaleante.

Después de los primeros 30 min. postexposición las ratas se habían recuperado casi completamente, la exposición a tolueno no redujo el consumo de alimento en ninguno de los grupos expuestos a través del estudio, por esta razón se mantuvo un

incremento normal de peso en relación con el tiempo gestacional.

El número de crías nacidas por rata fue semejante entre las hembras control y las experimentales, el promedio de la progenie fue de 10.4 y 10.25 productos respectivamente. Al parecer todos los partos se desarrollaron normalmente, sin embargo se presentaron productos nacidos muertos en el grupo de animales expuestos a partir del último tercio de la gestación (Cuadro 1), cuya mortalidad fue del 14% ($P < 0.05$).

Estos productos nacieron de bajo peso y con mucho menor tamaño que el resto de la progenie experimental y control. Debido a que al practicar la necropsia se encontró licuefacción en las vísceras abdominales y torácicas, no fue posible distinguir alteraciones en la anatomía de los diferentes órganos, sin embargo se apreció que la columna vertebral estaba incompletamente formada.

En ninguna de las camadas control o experimentales se produjo la muerte postnatal inmediata.

En general, los productos nacidos vivos de las madres expuestas mostraron una menor actividad locomotora y motilidad en respuesta a los estímulos, en comparación con los productos control.

PARAMETROS SOMATOMETRICOS.

LONGITUD CRANEOCAUDAL (Tamaño):

Las crías recién nacidas del grupo E3 presentaron el mayor tamaño aunque solamente difirió significativamente con el grupo

E2 ($P < 0.05$).

A los 20 días postnatales todos los productos experimentales fueron de mayor tamaño que los control, solo la progenie del grupo con el menor tiempo de exposición difirió estadísticamente de estos (Cuadro 2).

A los 60 días de edad el tamaño craneocaudal de todos los grupos experimentales fue menor al del grupo control sin presentarse diferencias significativas ($P < 0.05$).

PESO CORPORAL:

Al nacimiento las crías expuestas tuvieron mayor peso que las controles, aunque sólo el grupo E3 difirió significativamente de éste ($P < 0.05$). A los 20 días de edad los promedios obtenidos de las crías expuestas fueron mayores que los controles, sin observarse diferencias significativas entre ellos.

A los 60 días postnatales los grupos expuestos mostraron menor peso que fue significativamente diferente al control, en los grupos E1 y E2 ($P < 0.05$) el menor peso correspondió al grupo E1 (Cuadro 2).

DIAMETRO CRANEAL:

Esta medición fue realizada en el diámetro transversal de la cabeza de las crías vivas. Al nacimiento las crías prenatalmente expuestas a tolueno mostraron un menor diámetro craneal que las controles, aunque solamente el grupo E1 difirió significativamente de todos los demás ($P < 0.05$).

A los 20 días de edad no hubo diferencias entre animales control y experimentales.

Las crías de 60 días revelaron menor diámetro cefálico que las controles aunque sólo el grupo E1 difirió significativamente (Cuadro 2).

PARAMETROS ENCEFALICOS.

PESO ENCEFALICO:

Este consistió del peso de cerebro, lobulos olfatorios, cerebelo y tallo cerebral, para este parámetro no hubo diferencias en el peso encefálico de las crías recién nacidas control y experimentales.

A los 20 días de edad el mayor valor correspondió al grupo E2 (Cuadro 3), que difirió significativamente de los grupos control y E3 ($P < 0.05$). A los 60 días de edad no hubo diferencias entre grupos control y experimentales.

PESO CEREBRAL:

Una vez diseccionados los lobulos olfatorios, cerebelo y tallo cerebral, los cerebros fueron pesados y al nacimiento no se apreciaron diferencias por efecto de la exposición prenatal, a los 20 días de edad el peso cerebral de los grupos experimentales fue mayor que los controles (Cuadro 3), esta diferencia fue significativa con los grupos E1 y E2, este último presentó el mayor peso ($P < 0.05$).

A los 60 días tampoco hubo diferencias entre la progénie control y experimental. Las crías del grupo E1 difirieron significativamente del grupo E2 experimental.

LONGITUD ENCEFALICA:

La medición de la longitud (Cuadro 3), se realizó en encefálos completos en los cuales no hubo diferencias significativas en las crias control y experimentales al nacimiento, a los 20 y 60 días de edad ($P < 0.05$).

ANCHURA CEREBRAL:

Al nacimiento no hubo diferencias en la anchura cerebral de los diferentes grupos control y experimentales. A los 20 días de edad el grupo E3 presentó la mayor anchura significativamente diferente al resto de los grupos (Cuadro 3). A los 60 días postnatales la progénie del grupo E1 reveló el mayor promedio y el menor correspondió al grupo E2 ($P < 0.05$).

ESPESOR CEREBRAL

Al nacimiento solamente el grupo E3 difirió significativamente con un menor valor que la progénie control ($P < 0.05$).

A los 20 días de edad las crias experimentales mostraron un menor valor aunque ninguno de estos grupos difirió significativamente del control.

A los 60 días postnatales los grupos expuestos revelaron un mayor espesor que los experimentales significativamente diferente (Cuadro 3).

(ESTUDIO HISTOLOGICO DESCRIPTIVO)**ARREGLO CITOARQUITECTONICO:**

En los tejidos control analizados al nacimiento, se observó indiferenciación neuronal y estratificación incompleta (Cuadro 4), (Fig. 4). Mientras que por otra parte en la progénie de los grupos experimentales se apreciaron diferencias notables

en comparación con los tejidos control. En general no se observó una estratificación definida, tampoco se identificaron los límites correspondientes a la región pial-glial y sustancia blanca profunda. Se apreciaron ligeras diferencias en la distribución celular de los grupos expuestos toda la gestación y a partir del segundo tercio en comparación a los controles (Fig. 2). Los experimentales mostraron una menor concentración celular en los estratos superficiales con el consecuente aumento del espacio intercelular en las áreas subyacentes, por lo que la densidad numérica se redujo en los cortes experimentales examinados. Al comparar los tejidos de crías prenatalmente expuestas el último tercio gestacional con las control, las primeras mostraron una distribución celular irregular en todo el espesor de la corteza sin una organización evidente. (Cuadro 4), (Fig.3).

A los 20 días postnatales en el grupo control se observó una organización incompleta en la estratificación de las estirpes neuronales y persistió el conglomerado celular superficial, en los estratos inferiores pudo distinguirse cierta organización celular en la capa piramidal interna (Cuadro 5), (Fig. 4). Los grupos experimentales de la misma edad mostraron una mayor desorganización de las estirpes celulares corticales. En el grupo expuesto del día 1-21 gestacional no se observaron conglomerados celulares en ningún estrato de la corteza, la densidad neuronal estaba disminuida y no pudo distinguirse claramente la capa piramidal interna como en los tejidos control (Fig. 5).

Los cortes de crías expuestas a partir del segundo tercio de la gestación mostraron un arreglo irregular en la organización laminar de las estirpes celulares neuronales superficiales y profundas y tampoco se observaron conglomerados celulares. En estos dos grupos experimentales se observó un mayor espacio intercelular (Cuadro 5), (Fig. 6).

El grupo expuesto durante el último tercio de la gestación mostró un aspecto semejante al control (Cuadro 5), (Fig. 7).

A los 60 días postnatales el grupo control mostró un arreglo celular homogéneo en todo el espesor de la corteza, con un espacio intercelular regular (Cuadro 6) (Fig.8). Los tejidos de crías expuestas del día 1-21 gestacional no presentaron la estratificación igualmente organizada y al parecer el número de células fue menor (Fig.9 y 11). Estas mismas alteraciones se observaron en tejidos de crías expuestas a partir del día 8 gestacional (Fig.12). En estos dos grupos expuestos no se observaron anomalías celulares en la proporción de neuronas y células gliales respecto a los tejidos control.

Igual que a los 20 días de edad, no hubo diferencias entre los tejidos control y de animales tratados el último tercio de la gestación (Cuadro 6) (Fig.13).

MORFOLOGIA CELULAR:

Al nacimiento, los grupos prenatalmente expuestos toda la gestación y desde el día 8 no mostraron características distintivas para neuronas y células gliales. La mayoría de los somas fueron ovalados y/o fusiformes y de un tamaño ligeramente menor que las controles, en los que se distinguieron

predominantemente neuronas piriformes.

En los tejidos de crías con el menor tiempo de exposición la mayoría de las células se observaron pequeñas y de aspecto redondeado, sugestivo de mayor inmadurez en comparación con las control (Cuadro 4), (Fig. 3).

A los 20 días postnatales los tejidos de animales con el mayor tiempo de exposición mostraron indefinición de las capas piramidales cuyas células sobresalieron por su tamaño aunque en el grupo control se observó una estratificación mas definida. Asimismo, éste grupo mostró una menor diferenciación entre las principales estirpes neuronales, predominaron las formas redondeadas (Fig. 5), y pudieron diferenciarse los núcleos de las células gliales. Los tejidos de crías prenatalmente expuestas desde el día 8 revelaron formas celulares con características normales, aunque con arreglo diferente al grupo control y menor densidad neuronal (Fig. 6). No se observaron diferencias en la morfología celular de cortes de cerebro de animales expuestos al final de la gestación comparados con los control (Cuadro 5), (Fig. 7).

A los sesenta días de edad en las preparaciones de tejidos controles se identifico la morfología típica de neuronas y células gliales (fig.10). Los grupos prenatalmente expuestos la gestación completa y solo dos tercios revelaron rasgos celulares de inmadurez distinguibles por predominancia de formas ovaladas y/o esféricas de diferentes tamaños (Fig.11 y 12).

En algunas preparaciones solamente los núcleos gliales fueron las estructuras más distinguibles. El grupo con el tiempo intermedio de exposición reveló un conglomerado celular discreto en el estrato superficial de la corteza a diferencia del control. El grupo con el menor tiempo de exposición mostró un aspecto celular semejante al control (Cuadro 6) (Fig. 13).

ESTUDIO SEMICUANTITATIVO.

ESPEJOR DE CORTEZA:

El espesor de la corteza cerebral de crías control y experimentales al nacimiento fue bastante homogéneo, solamente el grupo expuesto toda la gestación resultó con el menor espesor significativamente diferente al resto de los grupos ($P < 0.05$).

A los 20 días de edad el grupo expuesto desde el día 8 prenatal mostró el mayor espesor comparado con todos los demás (Cuadro 7).

A los 60 días postnatales, el grupo expuesto toda la gestación mostró el mayor espesor significativamente diferente a los demás ($P < 0.05$).

DENSIDAD NUMERICA CELULAR:

Los grupos experimentales de animales recién nacidos tuvieron menor población celular que los controles ($P < 0.05$). También se identificaron diferencias significativas entre los grupos experimentales; el grupo con el mayor tiempo de exposición reveló los menores valores y los más cercanos al control correspondieron al grupo expuesto el último tercio (Cuadro 8). A los 20 y 60 días de edad todos los grupos expuestos también

presentaron una menor población celular aunque no significativa a los 20 días postnatales, sin embargo a los 60 días los valores promedio de crías expuestas del día 1-21 y 8-21 fueron significativamente inferiores a las control ($P < 0.05$). A los 60 días al parecer, al evaluar la cantidad celular si se estableció una relación inversa con el tiempo de exposición.

INDICE DE MORTALIDAD
(Ratas Sprague-dawley)

Grp	No. de madres	No. de productos	Promedio de crías	No. de muertes	Tasa de mortalidad (%)
C	5	49	9.8 a	2	4.08
E1	5	54	10.8 a	0	0
E2	5	55	11.0 a	1	1.8
E3	5	46	9.2 a	8	16.32

C= Grupo control.

E1= Grupo expuesto toda la gestación.

E2= Grupo expuesto del día 8-21 gestacional.

E3= Grupo expuesto del día 15-21 gestacional.

No se encontró diferencia significativa entre el control y los grupos experimentales ($P < 0.05$).

Cuadro 1.

PARAMETROS SOMATOMETRICOS (Tamaño)

EDAD (DIAS)

	Gpo	n	1			20			60							
			X	+DE	CV(%)	n	X	+DE	CV(%)	n	X	+DE	CV(%)			
Longitud	C	10	6.63	0.45	6.78	10	15.32	1.50	9.79	10	34.07	2.04	5.98			
Craneo-caudal	E1	10	6.53	ab	0.27	4.13	10	16.31	a	0.84	5.15	10	33.60	a	0.46	1.36
	E2	10	6.48	a	0.39	6.01	10	16.44	a	1.20	7.29	10	33.18	a	1.78	5.38
	E3	10	6.81	b	0.38	5.58	8	17.09	*a	1.45	8.48	8	33.66	a	2.92	8.69
Peso	C	10	6.19		0.90	14.53	10	32.64		7.14	21.87	10	193.64		22.70	11.72
Corporal	E1	10	6.27	a	0.71	11.32	10	37.64	a	3.49	9.27	10	138.00	*a	2.00	1.45
	E2	10	6.41	a	0.71	11.07	10	37.59	a	7.37	19.60	10	169.08	*b	18.02	10.66
	E3	10	6.80	*a	1.02	15.00	8	38.66	a	8.38	21.66	8	170.41	bc	33.42	19.61
Diametro	C	10	9.38		0.62	6.60	10	15.66		0.63	4.02	10	19.55		1.78	9.09
Craneal	E1	10	8.97	*a	0.61	6.80	10	15.54	a	0.60	3.86	10	16.65	*a	0.67	4.04
	E2	10	9.19	ab	0.59	6.42	10	15.46	a	0.83	5.36	10	18.56	a	1.32	7.11
	E3	10	9.33	b	0.60	6.43	8	16.00	a	1.28	8.00	8	17.94	a	1.52	8.49

* difiere estadísticamente del control

Literales diferentes indican diferencia significativa entre los grupos experimentales (P<0.05)

C= Grupo control.

E1= Grupo expuesto toda la gestación.

E2= Grupo expuesto del día 8-21 gestacional.

E3= Grupo expuesto del día 15-21 gestacional.

Los parámetros somatométricos mostraron el efecto mas evidente en todos los grupos expuestos de recién nacidos, encontrandose un incremento en el peso corporal y disminución significativa del mismo a los 60 días para los dos primeros grupos expuestos.

X= Media aritmética. +DE= Desviación estandar.

CV(%)= Coeficiente de variación.

Cuadro 2.

PARAMETROS ENCEFALICOS

EDAD (DIAS)

	Gpo	n	1			20			60				
			X	±DE	CV(%)	n	X	±DE	CV(%)	n	X	±DE	CV(%)
Longitud	C	10	11.68	0.65	7.79	10	20.76	0.52	2.50	10	24.05	1.80	7.49
Encefalica	E1	10	10.92	a 1.44	13.18	10	20.42	a 1.62	7.80	10	23.86	a 0.54	2.29
	E2	10	11.27	a 0.24	2.12	10	20.85	a 0.64	3.06	10	23.32	a 0.57	4.29
	E3	10	11.20	a 0.63	6.50	8	20.99	a 0.77	3.66	8	23.76	a 0.53	2.24
Anchura	C	10	8.34	0.58	5.90	10	14.06	0.33	2.34	10	14.05	0.95	6.76
Cerebral	E1	10	8.20	a 0.50	6.00	10	13.86	a 0.58	4.18	10	14.85	a 0.13	0.89
	E2	10	8.32	a 0.30	3.60	10	14.54	a 0.28	1.92	10	14.30	b 0.51	3.60
	E3	10	8.07	a 0.50	6.19	8	16.48	*b 0.26	1.57	8	14.58	ab 0.61	4.20
Espesor	C	10	5.70	0.33	5.78	10	9.26	0.44	4.75	10	8.42	0.54	6.45
Cerebral	E1	10	5.30	a 0.34	6.41	10	8.80	a 0.75	8.52	10	9.20	*a 0.32	3.56
	E2	10	5.36	a 0.47	8.76	10	9.12	a 0.45	4.93	10	9.20	*a 0.32	3.49
	E3	10	5.00	*a 0.44	8.80	8	9.05	a 0.51	5.63	8	9.43	*a 0.65	6.97
Peso	C	10	0.23	0.05	21.74	10	1.10	0.08	7.27	10	0.98	0.83	85.58
Encefalico	E1	10	0.22	a 0.03	13.63	10	1.17	ab 0.10	8.55	10	1.10	a 0.90	82.47
	E2	10	0.22	a 0.02	9.09	10	1.23	*a 0.09	7.32	10	1.54	a 0.25	16.77
	E3	10	0.20	a 0.06	30.00	8	1.07	b 0.11	10.28	8	1.62	a 0.26	16.30
Peso	C	10	0.15	0.03	20.00	10	0.80	0.06	7.5	10	0.99	0.18	18.57
Cerebral	E1	10	0.14	a 0.02	14.29	10	0.90	*ab 0.06	6.67	10	1.16	a 0.04	4.23
	E2	10	0.15	a 0.01	6.67	10	0.92	*a 0.07	7.61	10	0.99	b 0.14	14.64
	E3	10	0.13	a 0.04	30.77	8	0.82	b 0.09	10.98	8	1.10	ab 0.13	12.07

* difiere estadísticamente del control.

Literales diferentes indican diferencia significativa entre los grupos experimentales. (P<0.05)

C= Grupo control.

E1= Grupo expuesto toda la gestación.

E2= Grupo expuesto del día 8-21 gestacional.

E3= Grupo expuesto del día 15-21 gestacional.

Solamente hubo diferencias significativas entre los animales experimentales y el control atribuibles a los efectos del tolueno en el espesor cerebral a los 60 días de edad. En los demás parámetros analizados los trastornos no fueron severos.

X= Media aritmética. ±DE= Desviación estandar.

CV(%)= Coeficiente de variación.

Cuadro 3.

ESTUDIO HISTOLOGICO DESCRIPTIVO

AL NACIMIENTO

Grupo	C. MOLECULAR	GRANULAR EXTERNA	PIRAMIDAL EXTERNA	GRANULAR INTERNA	PIRAMIDAL INTERNA	POLIMORFICA	DANO
C	Escasas células.	Arreglo uniforme Indiferenciadas Conglomerado celular externo.	Arreglo uniforme Indiferenciadas Conglomerado celular externo.	Arreglo uniforme Indiferenciadas Conglomerado celular externo.	Indiferenciadas	Células multi-formes.	
	(7/10)	(9/10)	(9/10)	(9/10)	(8/10)	(10/10)	
E1	Menor número de células.	Menor cantidad de células. Indiferenciadas	Baja densidad neuronal. Indiferenciadas	Menor cantidad de neuronas. Indiferenciadas	Mayor espacio intercelular. Indiferenciadas	Menor diversidad celular.	En ciertas zonas.
	(6/9)	(7/9)	(6/9)	(7/9)	(8/9)	(8/9)	
E2	Menor número de células.	Menor cantidad de células. Indiferenciadas	Baja densidad neuronal. Indiferenciadas	Menor cantidad de neuronas. Indiferenciadas	Mayor espacio intercelular. Indiferenciadas	Menor diversidad celular.	En ciertas zonas.
	(5/9)	(6/9)	(6/9)	(7/9)	(7/9)	(8/9)	
E3	Ausencia casi completa de células.	Arreglo irregular Inmadurez	Arreglo irregular Inmadurez	Arreglo irregular Inmadurez	Indiferenciadas	Pérdida del límite cortical.	General
	(6/9)	(7/9)	(7/9)	(7/9)	(7/9)	(6/9)	

C= Grupo control.

E1= Grupo expuesto toda la gestación.

E2= Grupo expuesto del día 8-21 gestacional.

E3= Grupo expuesto del día 15-21 gestacional.

Cuadro 4.

ESTUDIO HISTOLOGICO DESCRIPTIVO

A LOS 20 DIAS

Grupo	C. MOLECULAR	GRANULAR EXTERNA	PIRAMIDAL EXTERNA	GRANULAR INTERNA	PIRAMIDAL INTERNA	POLIMORFICA	DAÑO
C	Células escasas. (8/9)	Estratificación incompleta. Indiferenciadas Conglomerado celular. (8/10)	Estratificación incompleta. Indiferenciadas Conglomerado celular. (8/10)	Estratificación incompleta. Indiferenciadas Conglomerado celular. (8/9)	Mayor grado de diferenciación (8/10)	Notables, de formas variadas. (8/10)	
E1	Células escasas. (7/9)	Estratificación incompleta. Indiferenciadas Menor densidad neuronal. (7/10)	Estratificación incompleta. Indiferenciadas Menor cantidad de células. (8/10)	Estratificación incompleta. Indiferenciadas Menor numero celular. (8/9)	Población disminuida con mayor espaciamiento intercelular. (7/9)	Células mas espaciadas. (8/10)	En ciertas zonas.
E2	Células visibles. (7/9)	Estratificación incompleta. Indiferenciadas Desalineadas. (7/9)	Estratificación incompleta. Indiferenciadas Desalineadas. (8/9)	Estratificación incompleta. Indiferenciadas Desalineadas, mas compactadas. (7/9)	Mayor espaciamiento y desorganización. (8/9)	Células circulares mas evidentes. (7/10)	En ciertas zonas.
E3	Células escasas. (8/10)	Estratificación incompleta y conglomerado similar al control. (8/10)	Estratificación incompleta y conglomerado similar al control. (7/10)	Estratificación incompleta y conglomerado similar al control. (6/10)	Apariencia semejante al control. (7/10)	Diversidad celular. (7/10)	En ciertas zonas.

C= Grupo control.

E1= Grupo expuesto toda la gestación.

E2= Grupo expuesto del día 8-21 gestacional.

E3= Grupo expuesto del día 15-21 gestacional.

Cuadro 5.

ESTUDIO HISTOLOGICO DESCRIPTIVO

A LOS 60 DIAS

Grup	C. MOLECULAR	GRANULAR EXTERNA	PIRAMIDAL EXTERNA	GRANULAR INTERNA	PIRAMIDAL INTERNA	POLIMORFICA	DAÑO
C	Células en número mínimo formas horizontales. (8/10)	Formas más evidentes. Estratificación (8/10)	No claramente distinguibles, mezcladas con las granulares. (8/10)	Estratificación clara. Células distinguibles. (8/10)	Morfología y estratificación característicos. (7/10)	Diversidad de formas. (8/10)	
E1	Células de aspecto similar al control. (7/9)	Pérdida de la estratificación. Más espacio intercelular. (6/9)	Difícilmente diferenciables de las granulares. (8/10)	Pérdida de la estratificación. Mayor espacio intercelular. (7/9)	Desalineadas no tan evidentes. (7/9)	Pérdida ligera de la diversidad. (7/10)	En ciertas zonas.
E2	Decremento en el número celular. (5/9)	Menor estratificación, mayor espacio intercelular. (6/9)	Células no bien definidas. (7/9)	Menor estratificación, más espaciamiento. (7/9)	Cambios morfológicos ligeros. Desalineación. (6/9)	Disminuyó la diversidad. (5/9)	En ciertas zonas.
E3	Células poco visibles. (7/9)	Recuperación poblacional. Estratificación. (6/9)	Persistió indiferenciada. (7/9)	Recuperación poblacional. Estratificación (6/9)	Morfología y estratificación como el control (6/9)	Formas diversas. (5/9)	Mínimo.

C= Grupo control.

E1= Grupo expuesto toda la gestación.

E2= Grupo expuesto del día 8-21 gestacional.

E3= Grupo expuesto del día 15-21 gestacional.

Cuadro 6.

ESPESOR DE LA CORTEZA

EDAD (DÍAS)

RN				20 días				60 días							
Grupo	n	X	+DE	CV(%)	n	X	+DE	CV(%)	n	X	+DE	CV(%)			
E1	8	4.05	*a	0.09	2.46	8	8.62	a	0.25	2.89	8	11.25	*a	0.50	4.44
E2	8	4.50	b	0.00	0.00	8	10.75	*b	0.50	4.65	8	8.10	b	0.11	1.42
E3	8	4.47	b	0.05	1.11	8	7.75	c	0.28	3.72	8	8.62	c	0.25	2.98
C	8	4.37		0.25	5.71	8	8.00		0.57	7.21	8	8.37		0.25	2.98

* difiere estadísticamente del control.

Literales diferentes indican diferencia significativa entre los grupos experimentales ($P < 0.05$)

C= Grupo control.

E1= Grupo expuesto toda la gestación.

E2= Grupo expuesto del día 8-21 gestacional.

E3= Grupo expuesto del día 15-21 gestacional.

Los cambios observados en el espesor cortical no resultaron severos para ninguna edad.

X= Media aritmética, +DE= Desviación estandar.

CV(%)= Coeficiente de variación.

Cuadro 7.

DENSIDAD NUMERICA CELULAR

EDAD (DIAS)

Gpo	n	1			20			60				
		X	±DE	CV(%)	n	X	±DE	CV(%)	n	X	±DE	CV(%)
E1	8	21.25 *a	2.21	10.43	8	18.00 a	0.81	4.53	8	13.25 *a	0.95	7.22
E2	8	25.25 *b	0.95	3.79	8	18.50 a	0.57	3.12	8	15.50 *b	0.57	3.72
E3	8	30.25 *c	0.50	1.65	8	19.25 b	0.50	2.59	8	16.75 c	0.95	5.51
C	8	31.75	0.5	1.57	8	20.00	1.82	9.12	8	17.75	0.5	2.81

* difiere estadísticamente del control.

Literales diferentes indican diferencia significativa. (P<0.05)

C= Grupo control.

E1= Grupo expuesto toda la gestación.

E2= Grupo expuesto del día 8-21 gestacional.

E3= Grupo expuesto del día 15-21 gestacional.

Se observó un decremento poblacional en todas las edades y grupos experimentales.

X= Media aritmética. ±DE= Desviación estandar.

CV(X)= Coeficiente de variación.

Cuadro 8.

FOTOMICROGRAFIAS

Fig. 1.- Se observa el arreglo normal de la corteza cerebral en los productos recién nacidos del grupo control.

cm= Capa molecular. es= Estratos superficiales. → =Conglomerado celular.

Fig. 2.- Fotografía que revela la disminución del conglomerado celular superficial, así como una evidente reducción de la población neuronal en un corte de corteza cerebral correspondiente a un animal recién nacido prenatalmente expuesto toda la gestación.

cm= Capa molecular. es= Estratos superficiales.

→ = Conglomerado celular disminuido.

Fig. 3.- Muestra proveniente de crías recién nacidas del grupo 15-21, en donde se puede apreciar el aspecto redondeado inmaduro de la población neural que revela predominantemente la imagen nuclear y escaso citoplasma.

em = Estratos medios. ep= Estratos profundos. → = Células inmaduras.

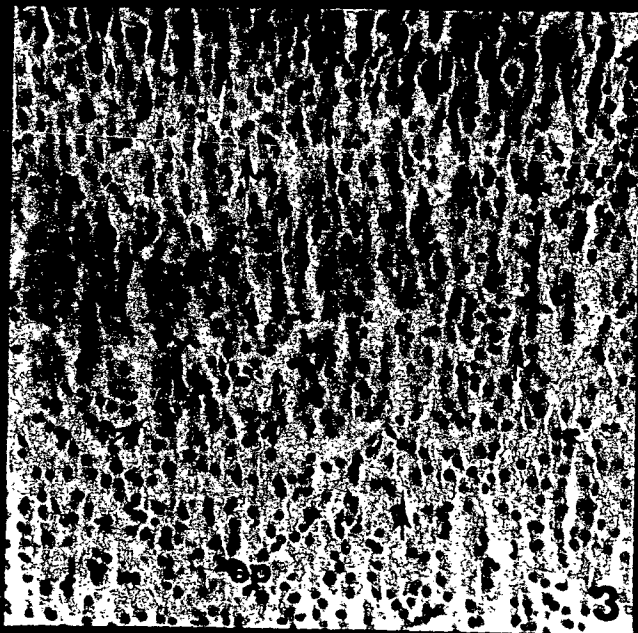


Fig. 4.- Grupo control de 20 días de edad en donde se observa un notable grado de diferenciación neuronal comparativamente con la imagen al nacimiento, esta fue mas notable en la población neuronal de la capa piramidal interna.

cm= Capa molecular. ➔ = Células granulares y piramidales sin una estratificación evidente. cp= Células piramidales con mayor grado de diferenciación.

Fig. 5.- Corte obtenido de un animal del grupo experimental 1-21 a los 20 días de edad donde se evidencia una menor densidad celular, y formas atípicas en neuronas de los estratos medios y superficiales.

cm= Capa molecular. ⊛ = Mayor espaciamiento intercelular.
cp= Células piramidales indiferenciadas.

Fig. 6.- Fotomicrografía de un animal de 20 días de edad expuesto desde el día 8 gestacional donde se aprecia una menor población neuronal y mayor espacio intercelular.

cm= capa molecular. ⊛ = Mayor espacio intercelular.

➔ = Células granulares y piramidales sin estratificación aparente, mas compactadas.

Fig. 7.- Fotomicrografía de una cría de 20 días de edad correspondiente al grupo 15-21 que muestra un aspecto semejante al de los animales control tanto en el aspecto como en la morfología de las diferentes estirpes neuronales.

cm= capa molecular. cp= Células piramidales mas diferenciadas.

➔ = Células granulares y piramidales sin estratificación evidente.

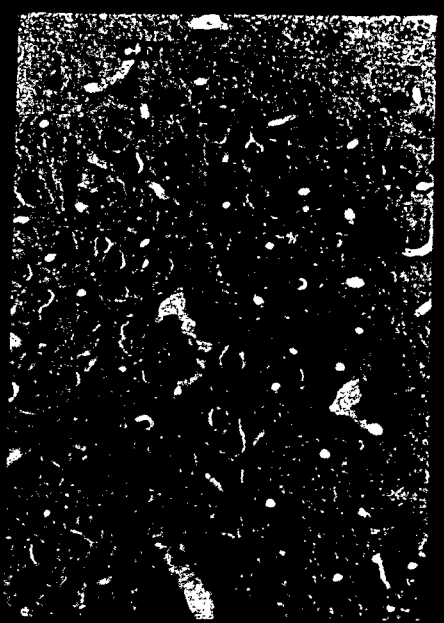


Fig. 8.- Fotomicrografia de una cría control de 60 días que muestra una visión amplia del espacio cortical en donde es posible apreciar el arreglo laminar normal, así como la notable diferenciación de las diversas estirpes neuronales.

cm= capa molecular. em= estratos medios. es= estratos superficiales.

→ = Arreglo laminar normal.

Fig. 9.- Se observa una región mas extensa de la corteza cerebral de una cría de 60 días de edad que muestra la baja densidad neuronal y el mayor espaciamiento intercelular observado en las ratas experimentales del grupo 1-21.

cm= capa molecular. em= estratos medios. es= estratos superficiales. ⊛ = Mayor espaciamiento intercelular.

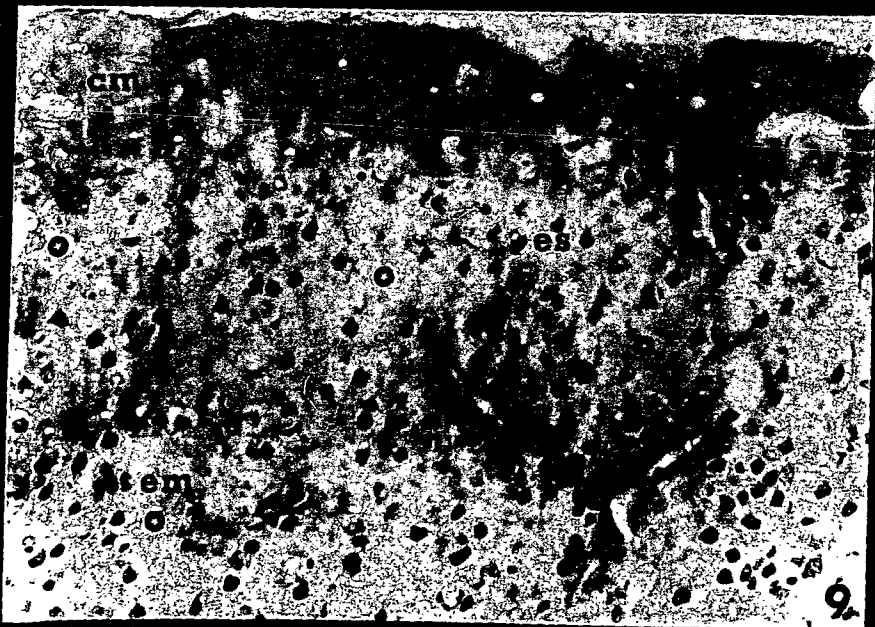
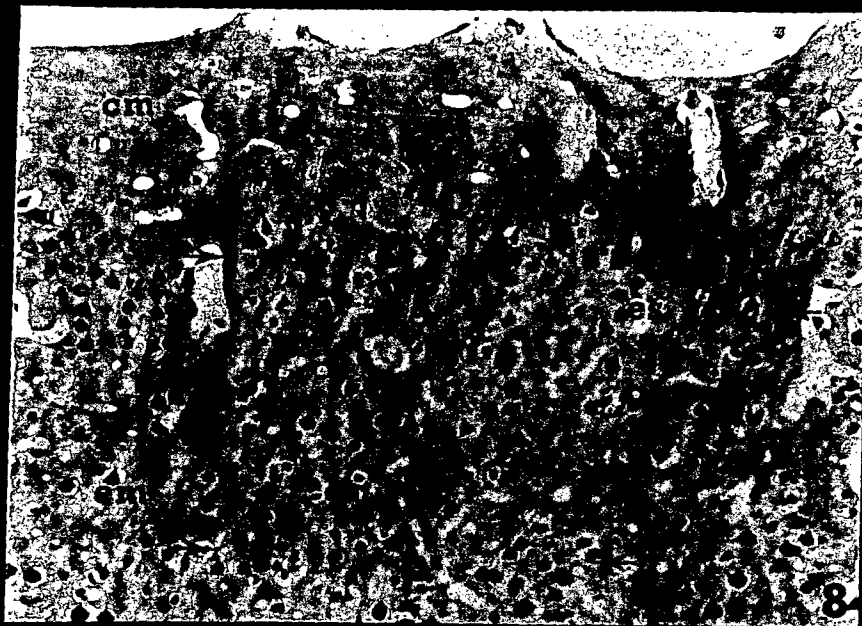


Fig. 10.- Cria control de 60 días de edad mostrando la morfología característica de las diferentes estirpes neuronales así como la evidente estratificación.

cm= capa molecular. em= estratos medios. es= estratos superficiales. → = Arreglo laminar.

Fig. 11.- Muestra proveniente de una cria del grupo expuesto 1-21 a los 60 días de edad que revela una menor densidad celular, además de un menor grado de diferenciación de las diferentes células corticales.

cm= capa molecular. em= estratos medios. es= estratos superficiales. * = Mayor espacio intercelular.

Fig. 12.- Corte obtenido de un animal del grupo 8-21 mostrando las formas atípicas en neuronas de la corteza cerebral y un evidente aumento del espacio intercelular.

cm= capa molecular. em= estratos medios. es= estratos superficiales. * = Mayor espacio intercelular.

Fig. 13.- Fotomicrografía de una cria del grupo 15-21 de 60 días de edad en donde se aprecia cierto grado de recuperación de la densidad neuronal así como un aspecto semejante en el arreglo de las células corticales.

cm= capa molecular. em= estratos medios. es= estratos superficiales. → = Arreglo laminar y recuperación neuronal.



DISCUSION:

Durante la exposición al tolueno las ratas experimentales no desarrollaron adicción a los vapores del solvente que se hubiera manifestado por el ingreso voluntario a la cámara, sin embargo si desarrollaron tolerancia a medida que aumentó el número de exposiciones. Esta se manifestó por una menor severidad de los signos de intoxicación evidentes por incoordinación locomotora y relajamiento muscular al final del periodo de exposición (2). Esta lascitud posiblemente se debió a los efectos del tolueno sobre la concentración de monoaminas y catecolaminas cerebrales aparte de que se alteró la permeabilidad en las membranas sinápticas y como consecuencia la neurotransmisión (22,25).

En general, tanto los parámetros somatométricos como encefálicos evaluados (Cuadros 2 y 3), no mostraron alteraciones importantes atribuibles a los efectos del solvente en ningún grupo experimental estudiado.

Algunos de los parámetros encefálicos analizados (como el espesor cerebral), fueron menores a los controles y significativamente diferentes, lo que indica trastornos del desarrollo, sin embargo la mayoría de las muestras experimentales examinadas revelaron promedios constantes semejantes a los controles (Cuadro 3).

Contrariamente a lo reportado por algunos autores, al nacimiento y a los 60 días postnatales no se observó

el incremento normal del peso cerebral en las crías expuestas a tolueno (26). Las diferencias significativas de algunos animales experimentales identificadas a los 20 días de edad fueron reversibles.

No se produjeron trastornos severos del desarrollo cerebral posiblemente debido a que el tiempo total de exposición fue corto, aparte de que no se provocó intoxicación profunda con pérdida del conocimiento o depresión severa en las ratas gestantes.

El peso corporal de las ratas experimentales recién nacidas resultó mayor que en el grupo control (Cuadro 2), estas mismas diferencias se identificaron a los 20 días de edad. Estos resultados difieren de otros estudios en los que se reporta disminución del peso corporal como resultado de la exposición a solventes (8,18,27). El mayor peso corporal de las crías experimentales posiblemente se debió a la presencia de edema intersticial generalizado.

Al parecer las alteraciones resultantes en los productos recién nacidos tienen su origen en la incapacidad de las madres de adaptarse a los efectos adversos vasculares y metabólicos provocados por la exposición al solvente. La formación de edema provocado por solventes ha sido previamente reportado y es el resultado de una alteración en la presión de retorno del fluido intersticial por un descenso en la presión oncótica intravascular fetal (28).

Al nacimiento se observó una mayor mortalidad (Cuadro 1), en las crías experimentales del grupo E3, sin que se pudiera

establecer claramente una causa efecto en relación con la inhalación del solvente. Estos productos fueron severamente afectados probablemente debido a la inmadurez de su sistema nervioso por lo que fueron incapaces de sobrevivir (2,4,29).

Al parecer los trastornos del desarrollo cerebral identificados por los límites irregulares de la población celular estratificada en la corteza cerebral (Fig. 3) y el retraso en el tiempo normal de migración neuronal para su ubicación final en diferentes estratos evidenciado por conglomerados celulares presentes en los estratos superficiales (Fig. 2) fueron provocados por la hipóxia resultante de la exposición a los vapores de tolueno, como consecuencia de esto se alteró la actividad de algunas enzimas oxidativas y de la vía glucolítica (10,29).

El esquema de exposición al tolueno implementado en el presente estudio afectó levemente a las madres gestantes y sus productos, sin que pudiera establecerse una clara relación entre la severidad de las alteraciones observadas y el tiempo total de exposición a través de la gestación, posiblemente debido al desarrollo de tolerancia.

Las alteraciones fetales se debieron al elevado coeficiente de difusión y transporte del tolueno en la sangre una vez inhalado, además de su libre difusión a través de la barrera hemato-placentaria hacia la circulación fetal, lo que provocó hipóxia y reducción del flujo sanguíneo placentario debido a vasoconstricción (24,29).

A nivel histológico, las alteraciones más relevantes identificadas para las ratas recién nacidas fueron la disminución en el conglomerado que ocupaba la población celular superficial de la corteza cerebral tanto para el grupo expuesto la gestación completa y el expuesto a partir del día 8 gestacional (Fig. 2), mientras que en el grupo restante expuesto el menor tiempo lo más notable fue la falta de definición de los límites corticales y la ausencia de la morfología característica de las principales estirpes de la corteza cerebral indicativa de inmadurez (Fig. 3).

Por todo lo anteriormente señalado, en el presente estudio se demostró la capacidad adaptativa metabólica de ratas a la presencia de tolueno y la vulnerabilidad fetal a bajas concentraciones del solvente o sus metabolitos.

El modelo experimental estudiado sería equivalente a las situaciones en que se produce exposición moderada por periodos cortos sin llegar a alcanzarse manifestaciones severas de intoxicación.

CONCLUSIONES:

- 1.- La corteza cerebral, por su organización laminar y el patrón definido de migración neuronal resultó un buen modelo experimental que permitió determinar las alteraciones resultantes por la exposición prenatal a solventes orgánicos.
- 2.- De los parámetros somatométricos evaluados, solamente el espesor cerebral de todos los grupos expuestos fue significativamente diferente al control a los 60 días postnatales.
- 3.- La principal alteración identificada a través del estudio correspondió a una disminución de la población neuronal en todos los grupos experimentales.
- 4.- Otro de los efectos del solvente fue retardo en la maduración de las diferentes estirpes neuronales de la corteza cerebral.
- 5.- Ambos trastornos tuvieron relación directa con el tiempo total de exposición durante la gestación.
- 6.- La mayor mortalidad neonatal correspondió a las crías con el menor tiempo de exposición (15-21), sin relación con los efectos del solvente.
- 7.- El incremento anormal del peso corporal en ratas experimentales recién nacidas y de 20 días de edad posiblemente se debió a edema corporal generalizado que desapareció a los 60 días postnatales.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Kirk, R.E. y Othmer, D.F. (1985). Enciclopedia de Tecnología Química., Union Tipografica. Editorial Hispano-Americana. Tomo XV:540-551.
- 2.- Hersh, J.H., Podruch, P.E., Roger, G., y Weisspf, B. (1985). Toluene embryopathy., The Journal of Pediatrics., 106:922-927.
- 3.- Lazar, R.B., Ho, S. U., Melen, D., y Daghestani, A.N. (1983). Multifocal central nervous system damage caused by tolueno abuse. Neurology, 33:1337-40.
- 4.- Campbell, L., Marsh, D.M., y Wilson, H.K. (1987). Towards a biological monitoring strategy for toluene., Am. Occup., 31(2):121-133.
- 5.-Ameno, K., Fuke, C., Ameno S., Kiriu, T., Sogo, K., Ijiri, I. (1989). A fatal case of oral ingestion of toluene. Forensic Sci. Int., 41(3): 255-60.
- 6.- Rosenberg, N.L., Kleinschmidt-De Masters, D.K., Davis, K.A., Dreisbach, J.N., Hormes, J.T., Filley, C.M. (1988). Toluene abuse causes diffuse central nervous system white matter changes., Ann Neurol., 23:611-614.
- 7.- Huang, J., Hisanaga, N., Hara, I., Ikeda, M., Sato, A., Ono, Y., Shibata, E., Takeuchi, Y. (1989 in press). Occurrence and clinical pictures of occupational organic solvent poisonings in Japan. Proc., 12th Asian Conf. Occup. Health.

- 8.- Chand, P. y Clausen, J., (1982). Effects of toluene on cytochrome P-450 mixed function oxygenase and glutathione-S-transferase activities in rat brain and liver., Bull. Environm. Contam. Toxicol., 28:542-545.
- 9.- Celani, M.F., Fuxe, K., Agnati, L.F., Andersson, K., Hansson, T., Gustafsson, J.A., Battistini, N., y Eneroth, P. (1983). Effects of subacute treatment with toluene on central monoamine receptors in the rat. Reduced affinity in (3H)5-hydroxytryptamine binding sites and in (3H)sipiperone binding sites linked to dopamine receptors., Toxicology Letters., 17:275-281.
- 10.- Escobar, A., Aruffo, C., y Jimenez, G. (1984). Efecto neurotóxico de los disolventes industriales y otros compuestos., Boletín de la Sociedad Mexicana de Ciencias Biológicas, 5(3):4-6.
- 11.- Axelson, O., Hane y Hogstedt, C. (1976). Neuropsychiatric ill-health in workers exposed to solvents. A case control study. Lakartidningen, 73:322-325.
- 12.- Bruckner, J.V., y Peterson, R.G., Evaluation of toluene and acetone inhalant abuse: Pharmacology and Pharmacodynamics., Toxicol Appl Pharmacol., 61:27-38.
- 13.- Bjornaes, S., Naalsund, L.U. (1988). Biochemical changes in different brain areas after toluene inhalation. Toxicology, 49 (2-3): 467-74.
- 14.- Schikler, K.N., Seitz, K., Raice, J.F., y Strader, T. (1982). Solvents abuse associated cortical atrophy., Journal of adolescent health care, 3:37-39.

- 15.- Juntunen, J., Hernberg, S., Eistiola, P., y Hupli, V. (1980). Exposure to industrial solvents and brain atrophy., *Eur. Neurol.*, 19:366-375.
- 16.- Escobar, A., Aruffo, C. (1980). Chronic thinner intoxication. *J. of Nuer. Neuroch and Pschiat.*, 43:986-993.
- 17.- Hansson, E., Von Euler, G., Fuxe, K, y Hansson, T. (1988). Toluene induces changes in the morphology of astroglia and neurons in striatal primary cell cultures. *Toxicology*, 49:155-163.
- 18.- Stumph, M.J., Weir, W.F., 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(5):224-250.
- 19.- Garcia, E. J., Rodriguez-Segura, A., y Garzón, P. (1988). Cerebral cortex and body growth development of progeny of rats exposed to thinner and turpentine inhalation., *Gen. Pharmac.*, 19(3):461-470.
- 20.- Kiriu, T., Ameno, K., Fuke, C., Ameno, S., 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(1): 25-33.
- 21.- Juorio, A.V. y Yu, P.H. (1985). Effects of benzene and other organic solvents on the decarboxylation of some brain aromatic-L-aminoacidz., *Biochemical Pharmacology.*, 34(9):1381-87.
- 22.- LeBel, C.P., Schatz, R.A. (1989). Effect of toluene on rat synaptosomal phospholipid methylation and membrane fluidity.

Biochem Pharmacol., 38(22); 4005-11.

23.- Lorenzana, J., Marte-Salas, M., (1980). Effects of neonatal exposure to paint thinner on development of swimming in rats. Neurobeh. Toxicol., 2:1-6.

24.- Toutant, C., Lapman, S., (1979). Fetal solvens syndrome. The Lancet., June 23, pp 1356.

25.- Yamawaki, S., Sarai, K. (1982) Effects of toluene inhalation on locomotor activity and brain catecholamines levels in rats. JPN J Psychopharmacol, 2(1): 57-60.

26.- Bauer-Moffett, C. y Altman, J. (1977) The effect of ethanol chronically administered to preweanling rats on cerebellar development: A morphological study. Brain Res., 119: 249-68.

27.- Wendell, C., Stevens, I. y Dolan, W. (1975). Comparative toxicities of halothane, isoflurane and diethyl ether at subanesthetic concentrations in laboratory animals. Anesthesiology, 42:408-16.

28.- Wong, K.L., Karol, M. H. y Alarie, Y. (1985). Use of repeated CO₂ challenges to evaluate the pulmonary performance of guinea pigs exposed to toluene Diisocyanate. Journal of Toxicology and Environmental Health, 15; 137-148.

29.- Garcia, E. J., Vazquez, M.M., y Garzón, P. (1986). Efectos de la exposición materna al eter y cloroformo al final de la gestación sobre el desarrollo corporal y de la corteza cerebral de ratas recién nacidas. Tiempos de Ciencia. Univ. de Guad. 5; 31-35.