

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

ALTERACIONES CEREBELOSAS EN RATAS PRENATALMENTE
EXPUESTAS A LA INHALACION DE TOLUENO.
Estudio Planimétrico.

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

P R E S E N T A

P. M.V.Z. MARIA DE LOURDES GUERRA PEÑA

A S E S O R E S:

M.V.Z. JACINTO BAÑUELOS PINEDA

MAT. AURORA GPE. BECERRA GUZMAN

M. EN C. JOAQUIN GARCIA ESTRADA

GUADALAJARA, JAL. AGOSTO 1990

U N I V E R S I D A D D E G U A D A L A J A R A .

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA.

ALTERACIONES CEREBELOSAS EN RATAS PRENATALMENTE EXPUESTAS A
LA INHALACION DE TOLUENO. Estudio planimétrico.

T E S I S P R O F E S I O N A L

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

P R E S E N T A

P. M.V.Z. MARIA DE LOURDES GUERRA PENA.

ASESORES: M.V.Z. JACINTO BANUELOS PINEDA.

MAT. AURORA GPE. BECERRA GUZMAN.

M. EN C. JOAQUIN GARCIA ESTRADA.

GUADALAJARA, JAL. AGOSTO DE 1990.

El presente trabajo se realizó en el Dpto. de Investigación Científica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnica y Facultad de Medicina de la Universidad de Guadalajara y La División de Bioquímica Farmacológica de La Unidad de Investigación Biomédica de Occidente del Instituto Mexicano del Seguro Social.

El presente estudio recibió apoyo financiero del Departamento de Investigación Científica y Superación Académica de la Universidad de Guadalajara.

I N D I C E.

C O N T E N I D O :	Páginas;	INICIAL	FINAL.
Resumen.		4 -----	4
Introducción.		5 -----	11
Justificación.		12-----	12
Planteamiento del Problema.		13-----	13
Hipótesis.		14-----	14
Objetivo general y particulares.		15-----	15
Materiales y métodos.		16-----	18
Resultados.		19-----	24
Discusión.		25-----	29
Conclusiones.		30-----	31
Referencias Bibliográficas.		32-----	35

RESUMEN.

El Tolueno se utiliza como agente psicotr6pico al inhalarse voluntariamente, tiene efectos embriot6xicos y afecta al cerebro y cerebelo inmaduros. En este estudio se determinaron los trastornos corporales y de la maduraci6n cerebelar de crias expuestas durante su desarrollo intrauterino; 20 ratas gestantes Sprague-Dawley fueron divididas en cuatro grupos de cinco animales; un control intacto y tres grupos expuestos a los vapores de Tolueno por 10 min. dos veces por dia en una c6mara de 37 lt; del dia 1 a 21(E1), 8 a 21(E2) y 15 a 21(E3) de la gestaci6n respectivamente. Par6metros somatom6tricos y encef6licos se registraron al nacimiento, 10 y 20 dias de edad, un an6lisis microm6trico se realiz6 al nacimiento y 10 dias postnatales y un estudio planim6trico a los 10 y 20 dias de edad. En cada edad se perfundieron 2 crias por rata para fijar el enc6falo, del que se obtuvieron registros de peso, espesor y anchura asi como del cerebro y cerebelo por separado, de este 6ltimo se hicieron cortes de 5 um de espesor para el estudio microm6trico del espesor de la capa germinal externa y planimetría de la capa molecular, capa germinal interna y corteza cerebelar completa. No se afect6 el n6mero de crias nacidas por la exposici6n a Tolueno. Las principales alteraciones correspondieron a la progenie del grupo E3; mortalidad (14 %), malformaci6n de la columna vertebral, edema corporal y retraso en la maduraci6n del cerebelo. El grupo E1 no revel6 alteraciones somatom6tricas, pero si retraso en la migraci6n de c6lulas granulares y una mayor superficie de la corteza cerebelosa al nacimiento y 20 dias postnatales respectivamente (P<0.05). El grupo E2 sufri6 retardo en la maduraci6n cerebelar menos severa que el grupo anterior. En general, el peso del enc6falo completo, cerebro y cerebelo separados no mostraron alteraciones al nacimiento y 10 dias, al dia 20 los dos primeros alcanzaron mayor peso en la progenie E2 y menor peso cerebelar en el grupo E3 (P<0.05). Se indujo la recuperaci6n al ajustar la camada a 6 y 4 crias por rata al nacimiento y diez dias respectivamente. Al parecer solo se desarroll6 tolerancia al Tolueno en los grupos E1 y E2. Del an6lisis de resultados es evidente que se afect6 principalmente la maduraci6n del cerebelo, por lo que 6ste 6rgano fu6 un buen modelo para estudio neurocitot6xico, sin que sea posible suponer sus alteraciones funcionales consecuentes. Los m6todos semicuantitativos utilizados permitieron estimar con precisi6n los efectos nocivos del Tolueno durante la vida prenatal.

INTRODUCCION.

En los últimos años los solventes orgánicos se han introducido como drogas de abuso en nuestro país, este hecho ocupa el primer lugar como problema de farmacodependencia. La acción que ejerce sobre el Sistema Nervioso Central (SNC) no ha sido bien estudiada ya que en los reportes se refieren únicamente a los síntomas neurológicos de las intoxicaciones .

Se conoce una gran cantidad de sustancias que pueden ocasionar efectos nocivos sobre el SNC y periférico. Entre éstas podemos encontrar disolventes que se utilizan en la industria del calzado, las artes gráficas, compuestos plásticos, pegamentos y en las fábricas textiles, de hidrocarburos, herbicidas, insecticidas y un sinúmero de agentes terapéuticos. Los solventes más utilizados en México para autointoxicación son compuestos que contienen Tolueno, Benceno, Metanol, Acetona y N-hexano (6).

El tolueno (Toluol, metilbenceno) es un hidrocarburo líquido volátil que tiene olor característico parecido a las resinas balsámicas, su nombre deriva del bálsamo Tolu (1).

Fue descubierto por Pelletier y Walter hacia 1835 en los productos de la destilación seca de resinas naturales que contienen ésteres de ácidos toluicos (1).

Se utiliza como materia prima para obtener el Trinitotolueno, como disolvente (industrial) es componente de la gasolina y como materia prima pura para obtener productos intermedios (ácido benzóico, benzaldehído, los vinitoluenos y las toluidinas) así como en la producción de materiales colorantes, perfumes y medicamentos (1-2).

La incorporación al organismo se lleva a cabo por motivos ocupacionales, accidentales, terapéuticos y por intoxicación voluntaria deliberada a través de la inhalación directa, así como la absorción en pequeñas cantidades por piel intacta e intestinal (3).

Una vez que pasa al torrente circulatorio se une a fosfolípidos, posteriormente se separa de estos y se deposita en los tejidos que contienen lípidos, a los que penetra fácilmente por difusión desde el lecho capilar sanguíneo (3,4).

Dentro de la célula los solventes producen trastornos sobre las estructuras lipídicas de las crestas mitocondriales sobre las que provoca inhibición de la cadena respiratoria y de la fosforilación oxidativa, por lo que puede alterarse la neurotransmisión a nivel de síntesis y liberación de compuestos, también se afecta el equilibrio iónico en las terminales sinápticas y sitios receptores (3-5).

Por experimentos en animales se sabe que el Tolueno se oxida inicialmente en el organismo a ácido benzóico y luego se conjuga con glicina para excretarse por la

orina como ácido hipúrico, benzóico. Las personas expuestas tienen concentraciones sanguíneas elevadas de metabolitos y un aumento proporcional en la orina, estos posiblemente inducen los efectos neurotóxicos, además que son compuestos intermediarios oxidados con alta reactividad química durante la fase aeróbica del metabolito celular (14,15).

La actividad desintoxicante se realiza principalmente por la enzima hepática citocromo P-450 cuya síntesis se estimula por el incremento de P-cloro-N-metilanilina hepática como resultado de la intoxicación con solventes orgánicos (14-16).

La exposición crónica con efectos neurotóxicos se caracteriza por cefalea, disminución de la capacidad de concentración, anorexia e irritabilidad que en la mayoría de las veces son reversibles. En otros casos el daño degenerativo cerebelar es irreversible. Sin embargo, en otros estudios donde se analizaron pintores de casas se pone en evidencia una disminución del débito sanguíneo cerebral y de los procesos oxidativos que se traducen en un detrimento intelectual aún en ausencia de atrofia cerebral (6).

La susceptibilidad a los compuestos es individual, pero los efectos tóxicos directos que se observan en el SNC son similares en todos los sujetos expuestos. Inicialmente se manifiesta sensación placentera de mareo seguida de depresión central (4). Desde el punto de vista orgánico se ven afectados otros sistemas y se encuentra

depresión de médula ósea, hepatomegalia, anemia por macrocitosis, leucocitosis seguida de leucopenia con disminución de las plaquetas circulantes. Puede haber lesiones pulmonares y renales por depósito a ese nivel (6).

Mediante estudios realizados sobre la embriotoxicidad del Tolueno en productos de madres expuestas durante el embarazo, se ha establecido que este compuesto se difunde a través de la sangre materna y atraviesa la barrera hematoplacentaria. Una vez en contacto con el feto, se deposita principalmente en tejidos lipídicos como el hígado y SNC (7) .

En un estudio realizado en niños que nacieron de madres que inhalaban grandes cantidades de Tolueno puro durante el embarazo se encontró microcefalia, disfunción del SNC, menor perímetro craneo-facial, miembros anormales así como retraso en el desarrollo.

También se han identificado alteraciones fenotípicas como abertura palpebral corta, ojos profundos, diámetro bifrontal estrecho y anomalías leves de los dedos (7).

La exposición de ratas preñadas a solventes orgánicos produjo incoordinación, salivación, ataxia y polipnea, sin embargo éstos animales se recuperaron inmediatamente después de la exposición (3). Al realizar el estudio posterior de la progenie se presentó una mortalidad del 20% en el grupo expuesto al thinner y un 59% en la progenie

expuesta al aguarrás. La exposición a estos solventes en el último tercio de la gestación provocó alteración en la maduración del cerebelo que se hizo evidente por un retardo en el tiempo de inicio en la migración celular de la capa germinal externa (3).

Las células de Purkinje fueron la población más vulnerable a los efectos de los solventes estudiados (thinner y aguarrás) ya que con ambos se produjo neurogénesis incompleta de estas. Lo anterior puede deberse a una teratogenicidad fenotípica que tiene lugar en la etapa de proliferación y migración celular durante el desarrollo encefálico y subsecuentemente en la morfogénesis facial e incremento de tamaño del producto (7,8).

Otras situaciones metabólicas como desnutrición, exposición a radiaciones (Rx), abuso de barbitúricos, exposición repetida a anestésicos volátiles u otras sustancias neurocitotóxicas también producen lesiones cerebelosas (11,12).

El cerebelo está presente en todos los vertebrados, participa en la coordinación de los movimientos musculares. En los mamíferos se localiza en la fosa posterior del cráneo, la parte superior corresponde al tentorium, caudalmente rebasa el agujero magno y llega hasta la parte superior del conducto vertebral, interponiéndose entre el bulbo y el arco posterior del atlas (5,18).

El cerebelo es un órgano aferente que forma parte de los sistemas propioceptivo y exteroceptivo, recibe información

del estado de extensión o contracción muscular, también es un modulador de las actividades motoras, continuamente recibe y traduce los estímulos aferentes propios y externos de los que se generan respuestas a los sistemas motores. Y junto con el sistema vestibular regulan el tono muscular y equilibrio (13).

La etapa de maduración del cerebelo es diferente a la del cerebro en la rata este órgano inicia su formación el día 13 embrionario (13 E) y su desarrollo termina alrededor del día postnatal 21 (21 P) y todavía sucede una aceleración en la maduración al día 30 postnatal (30 P), (9,10).

El cerebelo está constituido por 5 diferentes tipos de neuronas: células de Purkinje, granulosas, estrelladas, en forma de canasta y de Golgi (19). Las células de Purkinje reciben todos los impulsos aferentes y son el origen de la información del sistema cortical eferente. Existen aproximadamente 30 millones de estas células en el cerebelo adulto (5), por sus funciones constituyen la principal estirpe celular de la corteza cerebelar, empiezan a formarse a partir del día 15 embrionario (15E) y migran hacia su lugar definitivo por el día 16E y completan su desarrollo en el día 17 postnatal (17P) (19).

Las células granulosas se forman el día 17E y finalizan su maduración el día 30P. Las células de Golgi, las estrelladas y las de forma de canasta se desarrollan a partir del día 19E (9,19).

En general el cerebelo representa un buen modelo para realizar estudios del desarrollo del SNC por el tipo de maduración prenatal y postnatal que presenta, por su citoarquitectura estratificada y por ser un órgano de fácil manipulación tanto "in vivo" como "in vitro". Por lo que el objeto del presente estudio consiste en cuantificar los daños en el desarrollo perinatal, como consecuencia de la exposición prenatal a los vapores de Tolueno durante diferentes etapas de la gestación y así determinar los trastornos cerebelares.

JUSTIFICACION.

Actualmente se presenta en nuestro país una adicción creciente a la inhalación de solventes, entre éstos encontramos al Tolueno puro y en productos que lo contienen, es de bajo costo y fácil accesibilidad ya que su comercialización no está restringida y cualquier persona adulta los puede adquirir.

Además de la intoxicación voluntaria al Tolueno, otra forma de exposición a este solvente es la ocupacional, ya que en la industria lo utilizan en grandes cantidades, por lo que los trabajadores están continuamente expuestos. Ya sea de manera ocupacional o voluntaria la exposición es un problema de salud pública, como consecuencia de la inhalación se producen alteraciones en; hígado, riñones, pulmones y corazón, así como también en SNC.

Existen pocos estudios histológicos de la manera en que afecta el Tolueno al cerebelo, por lo que éste estudio está encaminado a conocer las alteraciones ocasionadas por este solvente mediante un modelo animal que permite inferir los resultados a la población humana.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Debido a que en la actualidad se utiliza gran cantidad de solventes orgánicos para intoxicación voluntaria y en la industria se producen daños de severidad variable en el SNC de los individuos expuestos, éstos pueden ser irreversibles en los casos crónicos ya que el Tolueno actúa como solvente lipídico, especialmente en encéfalo por la gran cantidad de fosfolípidos que contiene. La exposición continua de hembras gestantes ocasiona daños severos a los productos, especialmente en su maduración prenatal, por la capacidad del Tolueno de atravesar la placenta, por lo que es necesario estudiar los daños que ocasiona el Tolueno a nivel del cerebelo que tiene un ciclo de maduración más tardío y un patrón histológico bien definido para cada edad postnatal, por lo que pueden identificarse con bastante precisión las alteraciones que sufre, para establecer medidas preventivas o terapéuticas en otros estudios.

HIPOTESIS.

Si por la exposición a los vapores del Tolueno durante la gestación se afecta el desarrollo normal de los productos, luego entonces resultan alteraciones en la citoarquitectura del cerebelo demostrables por métodos semicuantitativos.

OBJETIVO GENERAL.

Estudiar las alteraciones histológicas postnatales del cerebelo en crías de ratas expuestas al Tolueno durante la gestación.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- 1.- Establecer el número de productos nacidos y la mortalidad perinatal por efecto del tiempo prenatal de exposición al solvente.
- 2.- Determinar parámetros somatométricos (peso corporal, tamaño y diámetro craneal) en las crías control y experimentales recién nacidas y a los 10 y 20 días de edad.
- 3.- Realizar un estudio semicuantitativo planimétrico y micrométrico de los cambios en la citoarquitectura de la corteza cerebelosa en la vida postnatal de animales control y expuestos al Tolueno en distintos periodos de la gestación.

MATERIALES Y METODOS.

Se utilizaron 20 ratas Sprague-Dawley del segundo parto alojadas en jaulas individuales con alimento balanceado para ratas y agua "ad-libitum". Se mantuvieron en ciclos de luz-obscuridad de 12/12 hr. Después de comprobar la regularidad de los ciclos estrales a través de frotis vaginales, grupos de dos ratas se aparearon con un macho durante una noche. Se determinó el primer día gestacional por la presencia de espermatozoides en el moco vaginal.

Una vez comprobada la preñez se formaron 4 grupos de 5 ratas cada uno, un control y tres experimentales. El grupo control se mantuvo intacto durante todo el estudio, los animales del primer grupo experimental se expusieron del día 1 al 21 de la gestación (E1 o gestación completa) en una atmósfera saturada con vapor de Tolueno. Para lo cual se utilizó una cámara rectangular de cristal con 37 l de capacidad que tenía dos orificios para ventilación. La saturación se logró al introducir en la cámara un recipiente extendido que contenía 300 ml del solvente 30 min antes de iniciar la exposición. Los tratamientos fueron por 10 min 2 veces al día, con intervalo de 8 h. Las ratas del segundo grupo fueron sometidas al mismo tratamiento, solo que la exposición se inició a partir del día 8 de la gestación (E2 o dos últimos tercios de gestación). Las 5

ratas experimentales restantes se expusieron del día 15 al 21 de preñez (E3 o último tercio gestacional).

Al nacimiento se pesaron todas las crías y se midió su tamaño y diámetro craneal. En forma aleatoria se ajustaron las camadas a 8 productos de ambos sexos, de cada madre se seleccionaron 2 crías recién nacidas (1 macho y 1 hembra) para realizar perfusión intracardiaca (27) y separar el cerebelo. Para ésto los productos se anestesiaron profundamente con éter y se practicó toracotomía, luego se introdujo una aguja calibre 23 en el ventrículo izquierdo y se cortó la aurícula derecha para hacer pasar una solución lavadora inicial de Ringer con procaina (1gr/sol.) y heparina 1,000 UI a 37 grados C, pH 7.3, 0.1 M y 283 mosm/l a una presión de 13 cm de agua durante 4 min., seguida de una solución fijadora de glutaraldehído 2.5% y formaldehído al 1% amortiguado con fosfatos al 0.1 M, pH 7.3 y 583 mosm/l durante 8 min. Después de la fijación se practicó craneotomía para extraer el cerebelo que se postfijó por inmersión durante 12 hr a 4° C en la misma solución fijadora.

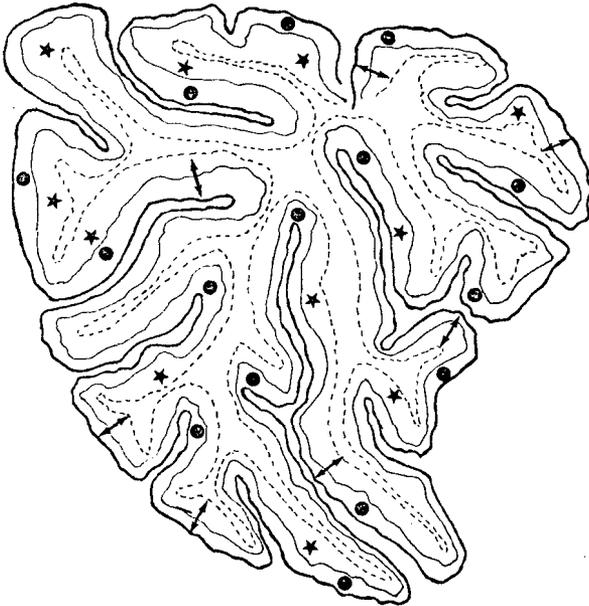
Este procedimiento se repitió en igual número de productos de 10 y 20 días de edad. El material postfijado se lavó mediante dos cambios de 15 min en amortiguador de fosfatos 0.1 M y luego se deshidrató en series crecientes de etanol y se incluyó en parafina para obtener cortes de 2 a 6 μ m de espesor del vermis cerebelar en un microtomo

American-Optical SL 20, éstos se tifieron con Hematoxilina-Eosina y Kluver-Barrera (26).

Las laminillas se observaron en un microscópio de luz Zeiss con el objetivo de 40/25x y un ocular adaptado con el micrómetro lineal se cuantificó el espesor de la capa germinal externa en los grupos control y experimentales recién nacidos y de 10 días de edad, se obtuvieron registros de las zonas superficial, lateral y profunda de tres diferentes folias. Se analizaron por lo menos dos cortes de cada cerebelo.

Se hicieron proyecciones de las laminillas amplificadas a 40x para elaborar dibujos de las estructuras cerebelares y posteriormente realizar la cuantificación de áreas por medio de un planimetro. Se midieron la capa molecular, granular interna y corteza cerebelosa en animales de 10 y 20 días de vida postnatal. Los resultados obtenidos se analizaron por el método de varianza aleatorizada a una $P < 0.05$.

CORTE CEREBELAR A LOS 10 DIAS DE EDAD



Capa Molecular

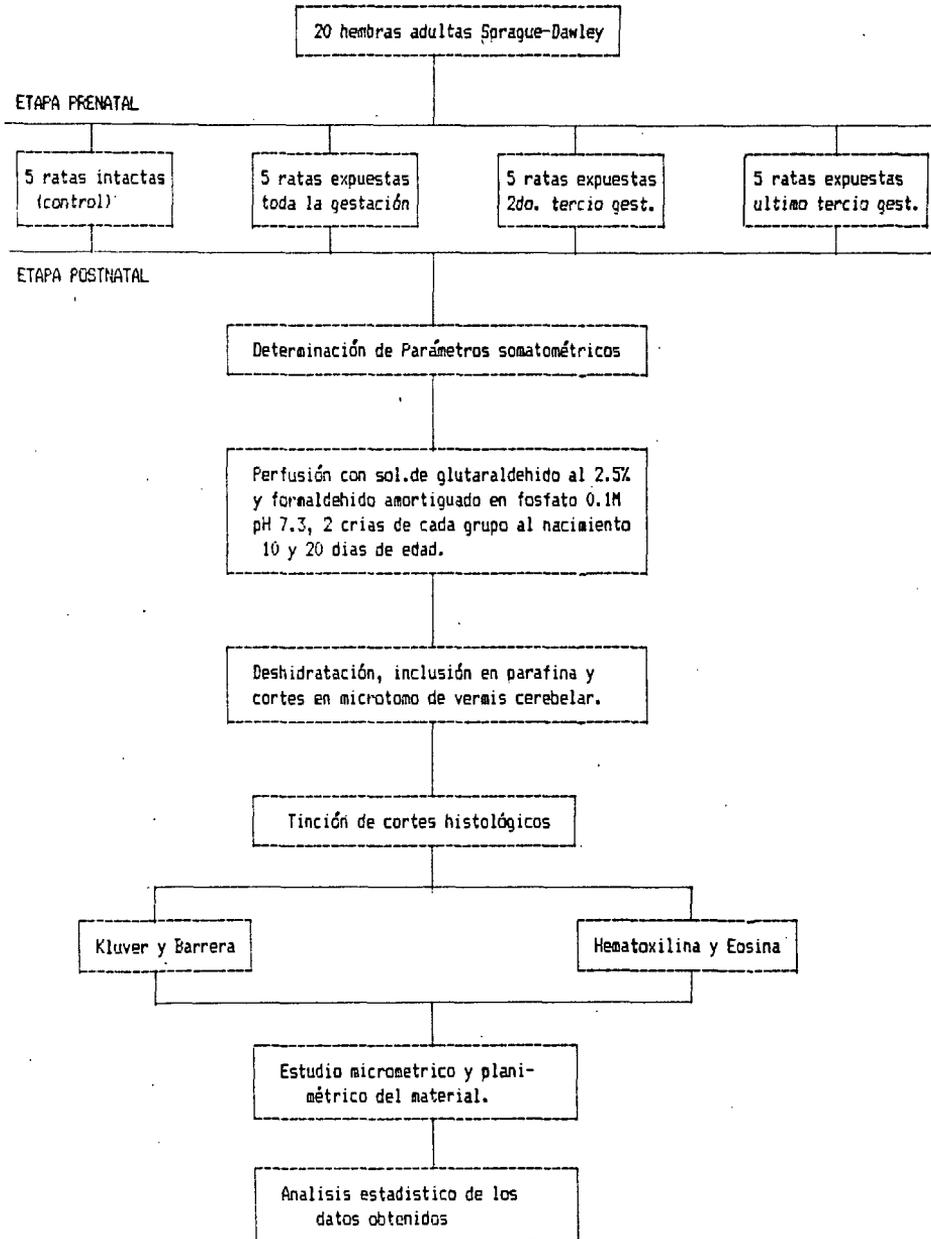


Capa Germinal Interna



Corteza Cerebelar

MODELO EXPERIMENTAL



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 del recipiente que contenía 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 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 se encontraban en un estado de lascitud.

En ningún momento se manifestaron signos de asfixia, ni pérdida de la conciencia, tampoco se produjeron enfermedades respiratorias durante el periodo experimental. Al completarse los 10 min de exposición las ratas tenían flaccidez muscular y algunas eran incapaces de sostenerse por sí mismas y cuando se levantaban mostraban una marcha tambaleante. Después de los primeros 30 min post-exposición 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 ésta 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 momento del parto no se observaron distocias maternas, sin embargo se produjeron muertes durante el nacimiento en el grupo de animales expuestos a partir del último tercio de la gestación, cuya mortalidad fue del 14% ($P < 0.05$) (Cuadro 1).

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 fué 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.

Parámetros somatométricos y encefálicos.

Al nacimiento algunas de las progenies experimentales presentaron diferencias respecto a las controles en el peso y tamaño corporales. Las crias expuestas durante el último tercio de la gestación revelaron el mayor peso y tamaño que fueron significativamente diferentes al resto de los grupos ($P < 0.05$) (Gráficas 1,2); un 39.13 % de este grupo presentó un peso mayor que el control y un 45.6 % reveló mayor tamaño que éste. Debido a que solamente en éste grupo se presentó mortalidad neonatal y malformaciones musculoesqueléticas, deducimos que los incrementos de peso y tamaño fueron manifestaciones patológicas.

No hubo diferencias en el diámetro cefálico de crias control y experimentales, excepto el grupo expuesto toda la gestación, cuyo valor fue menor ($P < 0.05$) (Gráfica 3). De los parámetros encefálicos estudiados, el grupo control mostró el mayor espesor cerebral ($P < 0.05$) (Cuadro 2), sin que hubiera diferencia significativa para la longitud y anchura cerebrales entre las crias control y experimentales.

A los diez días postnatales no existieron diferencias importantes en los parámetros somatométricos y cerebrales en la mayoría de los productos control y experimentales ($P > 0.05$) (Gráficas 1,2,3). Solamente los expuestos al partir del último tercio de la gestación tuvieron un menor

espesor cerebral significativamente diferente ($P < 0.05$) (Cuadro 2).

A los veinte días de edad se observó una mayor variabilidad en los parámetros estudiados respecto a las edades anteriores. El grupo expuesto durante el último tercio de la gestación tuvo un mayor tamaño que el control y los demás grupos experimentales, aunque solo difirió significativamente del primero ($P < 0.05$) (Gráfica 2). Estos mismos animales mostraron mayor anchura cerebelar que los demás grupos ($P < 0.05$) (Cuadro 2). El grupo expuesto desde el segundo tercio de la gestación reveló el mayor peso del encéfalo completo y del cerebro por separado, en comparación con el grupo control y el expuesto durante el último tercio de la gestación ($P < 0.05$) (Gráficas 4,5). El mayor peso del cerebelo separado correspondió al grupo control, éste solamente difirió significativamente del grupo expuesto durante el último tercio de la gestación ($P < 0.05$) (Gráfica 6).

Estudio cerebelar histológico semicuantitativo (um).

Espesor de la capa germinal externa.

Los datos corresponden a valores registrados en las zonas profunda, lateral y superior de tres diferentes folias. Solamente se analizaron cortes de cerebelo de crías al nacimiento y 10 días de edad debido a que en la mayoría

de los animales de veinte días de edad ya había desaparecido la capa premigratoria.

Los tres grupos experimentales mostraron el mayor espesor de la capa germinal externa a través del estudio; al nacimiento el grupo control mostró el menor espesor, significativamente diferente a los demás grupos experimentales ($P < 0.05$), a los diez días de edad éste grupo también presentó el menor espesor, pero solo difirió de los grupos expuestos a partir del primer y último tercio de la gestación ($P < 0.05$), sin que hubiera diferencias con el grupo expuesto desde el segundo tercio gestacional ($P > 0.05$) (Cuadro 3).

Planimetría de la corteza cerebelosa.

Se analizaron; capa molecular desde la región pial-gliar a la monocapa de células de Purkinje, capa germinal interna y el área integrada por las regiones anteriores a los 10 y 20 días de edad, ya que al nacimiento no pudieron definirse los límites de éstas.

Capa molecular.

A los 10 días de edad no existió diferencia significativa entre los animales control y los expuestos, no obstante que el mayor valor se registró en los primeros. A los 20 días la progenie de madres expuestas toda la gestación alcanzó mayores valores que los grupos restantes ($P < 0.05$).

Capa germinal interna.

No hubo diferencia significativa entre los diferentes grupos a los 10 y 20 días ($P > 0.05$).

Corteza cerebelar de región pial-glial al límite interno de a capa granular interna.

A los 10 días no existió diferencia significativa, la mayor superficie se encontró en los grupos control y el expuesto el último tercio de la gestación. A los 20 días postnatales la máxima superficie correspondió a la progenie expuesta toda la gestación que difirió de los demás grupos ($P < 0.05$) (Gráfica 7).

PROLIFICIDAD Y MORTALIDAD NEONATAL.

Grupo	No. de madres	No. de productos	\bar{X}	Mortalidad Z
C	5	52	10.4	3.8
E1	6	55	9.1	1.8
E2	5	55	11.0	0.0
E3	5	54	10.8	14.8 *

* Difiere significativamente del control ($P < 0.05$).

C=Control.

E1=Exposición toda la gestación.

E2=Exposición, últimos dos tercios.

E3=Exposición último tercio.

Cuadro 1. La exposición a Tolueno no afectó el número de crias nacidas de las madres control y experimentales, solo se presentó mortalidad al nacimiento en la progenie expuesta el último tercio de la gestación. \bar{X} = Promedio.

PARAMETROS ENCEFALICOS (mm)

EDAD (DIAS)

		1				10				20			
Encefalo	Grupo	n	\bar{X}	\pm D E	CV (%)	n	\bar{X}	\pm D E	CV (%)	n	\bar{X}	\pm D E	CV (%)
Longitud	C	10	11.68	0.65	7.79	10	17.50	1.56	8.91	10	20.76	0.52	2.50
	E1	10	10.92	1.44	13.18	10	17.71	1.24	7.00	10	20.42	1.62	7.80
	E2	10	11.27	0.24	2.12	10	17.62	0.65	3.75	10	20.85	0.64	3.06
	E3	10	11.20	0.63	6.50	8	18.26	0.23	1.25	8	20.99	0.77	3.66
Cerebro	C	10	8.34	0.58	5.90	10	12.78	0.97	7.58	10	10.70	0.45	4.20
	E1	10	8.20	0.50	6.00	10	12.46	0.68	5.45	10	10.56	0.62	5.90
	E2	10	8.32	0.30	3.60	10	12.67	0.44	3.47	10	10.76	1.53	14.21
Anchura	E3	10	8.07	0.50	6.19	8	13.02	0.29	2.22	8	10.75	2.71	4.18
	C	10	5.70 a	0.33	5.78	10	8.55 a	0.41	4.79	10	9.26	0.44	4.75
	E1	10	5.30 b	0.34	6.41	10	8.34ab	0.73	8.75	10	8.80	0.75	8.52
	E2	10	5.36 b	0.47	8.76	10	7.93 b	0.36	4.53	10	9.12	0.45	4.93
	E3	10	5.00 b	0.44	8.80	8	8.58 a	0.22	2.56	8	9.05	0.51	5.63
Cerebelo	C	10	5.41	0.37	6.63	10	8.83	0.73	8.26	10	14.06 b	0.33	2.34
	E1	10	5.47	0.36	6.58	10	9.11	0.51	5.59	10	13.86 b	0.58	4.18
	E2	10	5.27	0.26	4.93	10	8.88	0.37	4.16	10	14.54 b	0.28	1.92
	E3	10	5.24	0.54	10.30	8	9.39	0.26	2.76	8	16.48 a	0.26	1.57

Valores sin literales indican que no existe diferencia estadística.

Valores con literales diferentes indican diferencia significativa ($P < 0.05$).

Cuadro 2. Al analizar los parámetros morfométricos encéfalicos solamente a los 20 días de edad se identificó una mayor anchura cerebelar en el grupo E3. Por otra parte, solo al nacimiento y 10 días de edad los grupos control y E3 tuvieron valores significativamente mayores en el espesor cerebral respectivamente. A los 10 días el grupo E2 mostró el menor valor en éste parámetro ($P < 0.05$).

\bar{X} = Promedio. D E = Desviación estándar. C V = Coeficiente de variación.

ESTUDIO HISTOLOGICO SEMICUANTITATIVO. (μm)

C E R E B E L O.

EDAD (días)

ZONA	Gpo.	1				10			
		\bar{X}	\pm	D E	CV (%)	\bar{X}	\pm	D E	CV (%)
		n = 12				n = 12			
Superior	C	11.87 b	2.90	24.43	22.70 c	6.07	26.74		
	E1	23.95 a	6.24	26.05	32.50 a	7.77	23.90		
	E2	22.95 a	5.53	24.09	25.83 bc	5.81	22.49		
	E3	20.83 a	4.60	22.08	29.58 ab	6.44	21.77		
Lateral	C	13.13 c	1.86	13.95	24.79 b	4.39	17.66		
	E1	22.37 ab	4.38	19.57	35.41 a	9.56	26.99		
	E2	25.37 a	5.28	20.81	33.12 ab	7.29	22.01		
	E3	21.25 b	7.18	33.78	39.58 b	13.10	33.09		
Profunda	C	12.29 b	2.38	19.36	25.33 c	8.62	34.03		
	E1	23.08 a	4.23	18.32	38.33 b	12.51	32.63		
	E2	27.20 a	5.95	21.87	31.45 bc	12.30	39.10		
	E3	25.20 a	12.30	48.80	51.66 a	18.41	35.63		

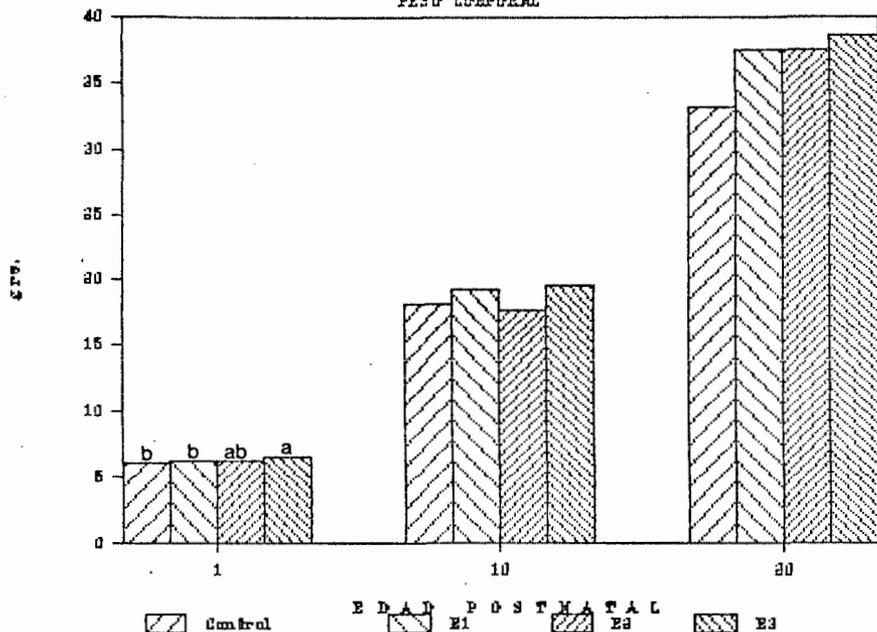
literales distintas indican diferencia significativa ($P < 0.05$).

C= Control E1= Exposición desde el primer tercio de la gestacion.
 E2= Expuestos a partir del segundo tercio gestacional.
 E3= Exposición solo el último tercio.

Cuadro 3. Al cuantificar el área de la capa germinal externa al nacimiento y 10 días de edad se encontró que los grupos experimentales mostraron los mayores valores debido a un retraso en la migración de las células granulares ($P < 0.05$). \bar{X} = Promedio. D E= Desviación estandar. C V= Coeficiente de variación.

PARAMETROS SOMATOMETRICOS

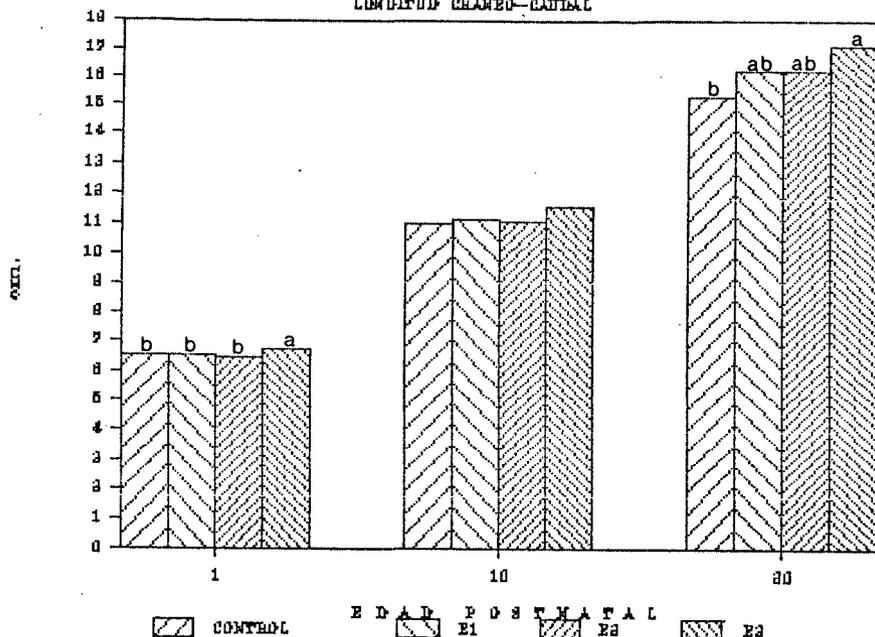
PESO CORPORAL



Grafica 1. Se muestran los cambios del peso corporal al nacimiento 10 y 20 días postnatales, el grupo E3 reveló el máximo valor en las tres edades estudiadas aunque solo en recién nacidos se apreciaron diferencias significativas entre éste y los grupos control y E1 ($P < 0.05$).

PARAMETROS SOMATOMETRICOS.

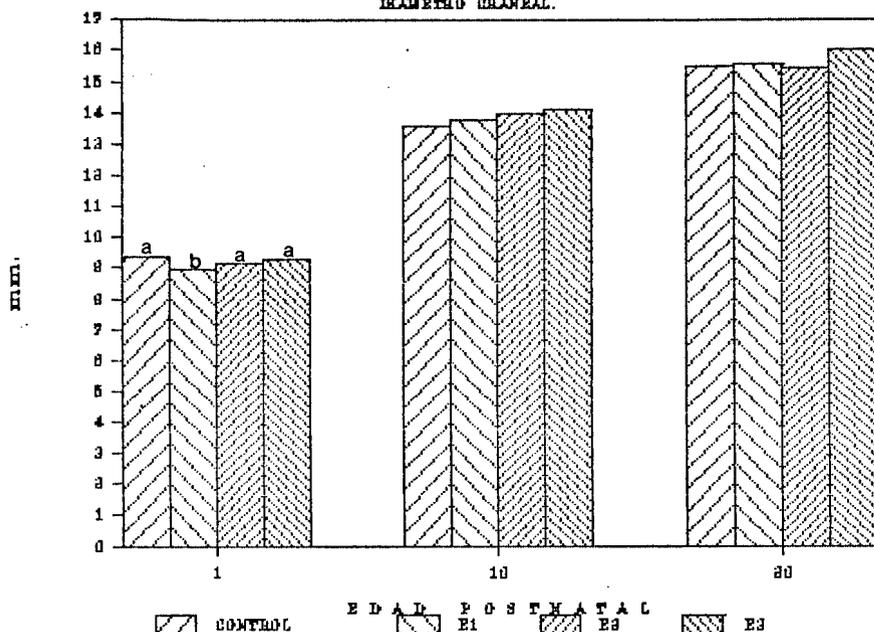
LONGITUD CROTAL-CRURAL



Gráfica 2. Se analizó el tamaño de los productos control y experimentales en las 3 diferentes edades. Al nacimiento resultaron con el máximo valor los productos de las madres expuestas a partir del último tercio gestacional, superior a los demás grupos experimentales y control ($P < 0.05$).

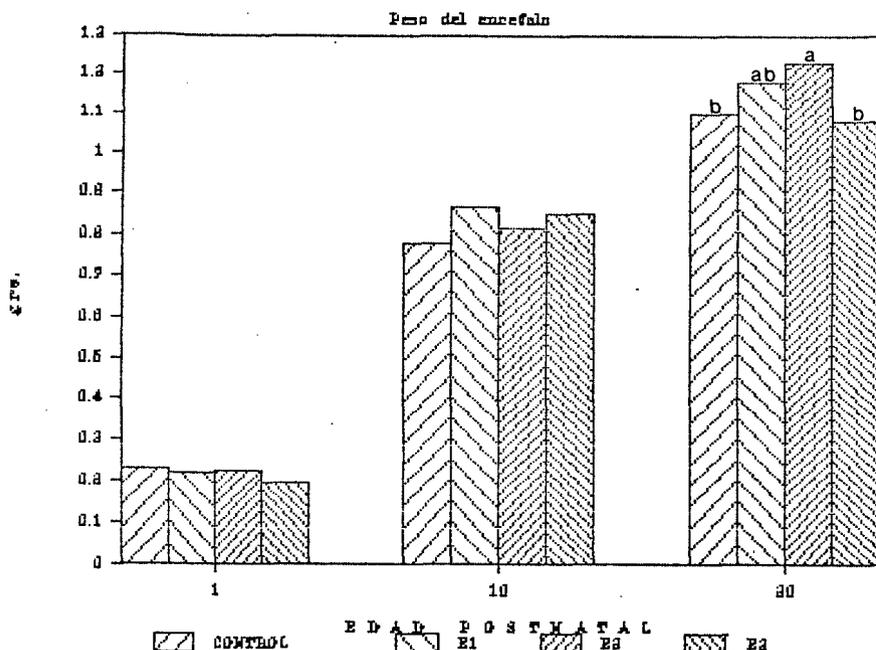
PARAMETROS SOMATOMETRICOS:

DIAMETRO CRANEAL.



Gráfica 3. Al nacimiento el grupo control presentó el mayor diámetro craneal, pero solo difirió estadísticamente del grupo E1 ($P < 0.05$). A los 10 y 20 días de edad no existió diferencia estadística entre los diferentes animales testigo y experimentales.

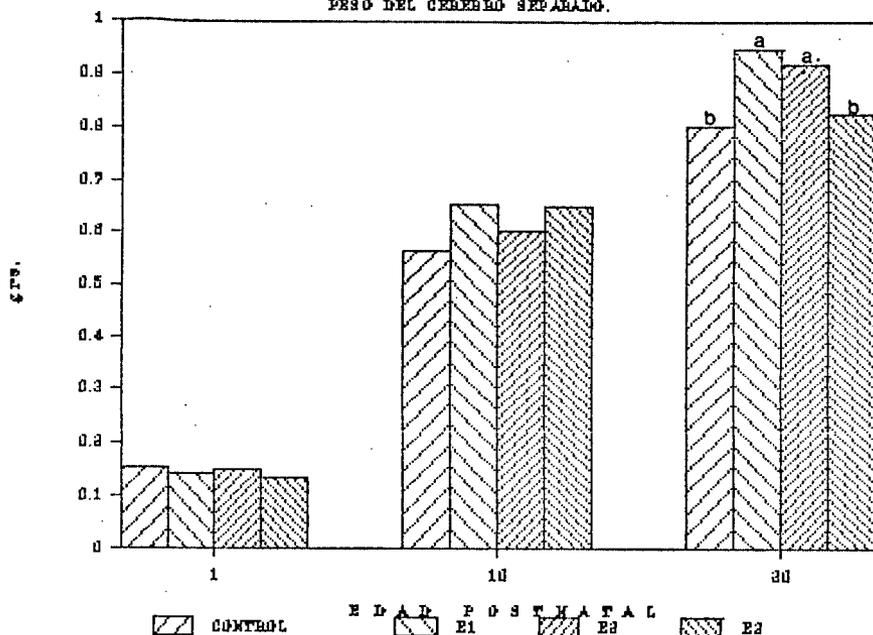
PARAMETROS ENCEFALICOS.



Grafica 4. Permite apreciar las diferencias del peso encefálico de los grupos control y experimentales expuestos a Tolueno. Al nacimiento el control presentó el mayor peso que no difirió de los grupos expuestos. A los 10 días postnatales el grupo E1 mostró el mayor peso aunque no difirió significativamente de los demás grupos. A los 20 días de edad el grupo E2 obtuvo el mayor valor con diferencia significativa respecto a los grupos control y E3 ($P < 0.05$).

PARAMETROS ENCEFALICOS.

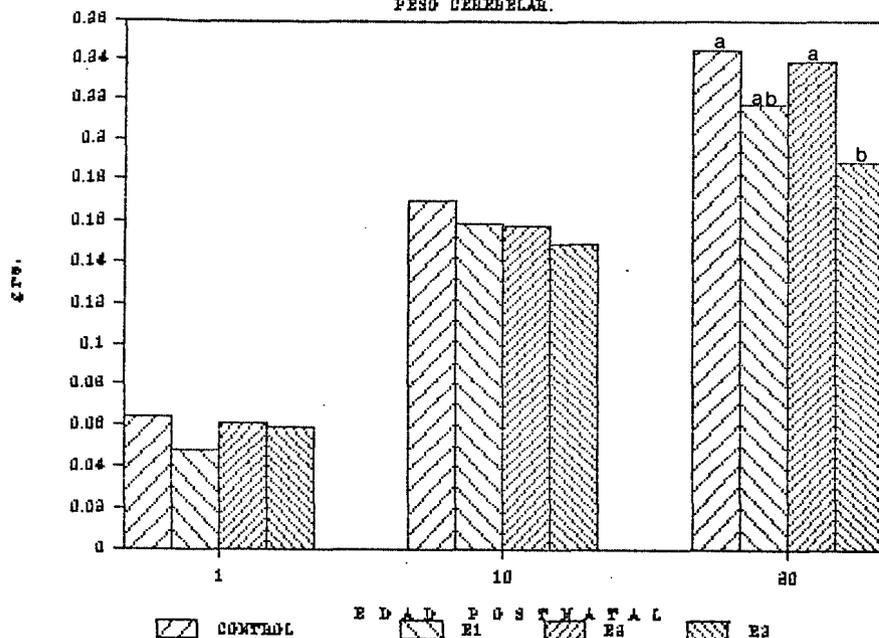
PESO DEL CEREBRO SEPARADO.



Gráfica 5. El peso del cerebro por separado de los grupos control y experimentales al nacimiento y 10 días de edad no difirió significativamente. Solamente a los 20 días postnatales el grupo E1 fué estadísticamente diferente al grupo control y E3 ($P < 0.05$).

PARAMETROS ENCEFALICOS.

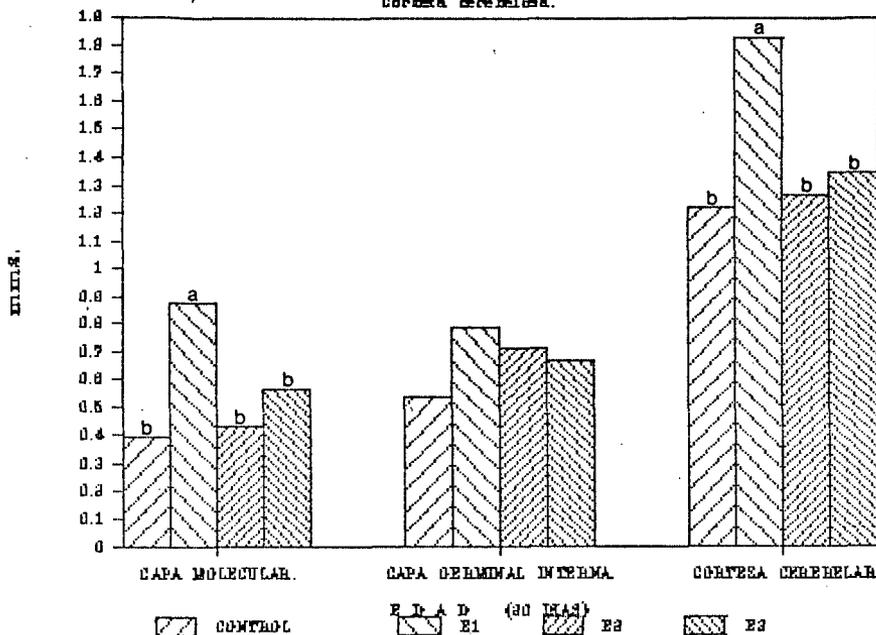
PESO CEREBELAR.



Gráfica 6. Al nacimiento 10 y 20 días postnatales el mayor peso cerebelar correspondió al grupo control pero solamente en la última edad se encontró diferencia estadística con el grupo E3, esto se debe a la vulnerabilidad del cerebelo a los solventes orgánicos ($P < 0.05$).

ESTUDIO PLANIMETRICO

Corteza cerebelosa.



Gráfica 7. La mayor superficie de la capa molecular y corteza cerebelar que se apreció en todos los grupos experimentales durante la vida postnatal probablemente se debió a una mayor cantidad de prolongaciones celulares axodendríticas. A los 20 días de edad el grupo E1 difirió estadísticamente ($P < 0.05$).

DISCUSION.

En general se encontraron 2 tipos de trastornos; en los parámetros somatométricos y la maduración del cerebelo, aunque en ningún caso pueden considerarse severos como resultado de la exposición prenatal a Tolueno. Los datos somatométricos de las crías al nacimiento en este trabajo difirieron de los que se han reportado en otros estudios de exposición prenatal a éter, cloroformo, thinner o aguarrás que provocaron disminución del tamaño y peso corporal (3,8,19).

En los parámetros somatométricos analizados resultaron más afectados los animales que tuvieron un menor tiempo total de exposición (2.3hr). Los parámetros de maduración cerebelar resultaron más afectados en la progenie de las ratas con mayor tiempo total de exposición (7 hr) ya que estuvieron presentes hasta el día 20 en que concluyó el estudio, sin embargo se observó una relación directa entre el tiempo de exposición y la alteración en la organización celular al nacimiento, 10 y 20 días postnatales.

El grupo que resultó más afectado a través del estudio fue el de animales expuestos a partir del último tercio de la gestación, al nacimiento se produjo un 14 % de mortalidad y en algunas crías se identificó formación incompleta de la columna vertebral, además de edema corporal generalizado que provocó un mayor peso corporal y un mayor espesor de la capa germinal externa.

Las alteraciones anteriores al parecer tuvieron su origen en la incapacidad de las madres en adaptarse a los efectos de la exposición al solvente, lo que no sucedió en los otros grupos experimentales. La presentación de edema se ha descrito como uno de los efectos de la exposición a Tolueno, las crias que desarrollaron éste trastorno mostraron un aspecto "regordete" y mayor peso corporal al nacimiento, el edema resulta al alterarse la presión de retorno del fluido intersticial por un descenso en la presión oncótica intravascular (24). La formación incompleta de la columna vertebral provocó una sobre-extensión de la misma, que se reflejó en un mayor tamaño. Inferimos que este trastorno musculoesquelético resultó por la intoxicación más severa que se produjo en este grupo no obstante que las madres fueron expuestas solamente durante un tiempo total de 2.3 hr, sin que sea posible explicar el mecanismo exacto.

El mayor espesor cerebral a los 10 días de edad podría explicarse como una recuperación de las crias debido a los efectos favorables de rehabilitación nutricional del modelo establecido, ésto mismo se infiere para explicar la mayor anchura cerebelar a los 20 días de edad por la maduración más tardía del cerebelo.

Debido a que de las 8 crias inicialmente asignadas a cada madre se redujeron a 6 y 4 al nacimiento y 10 días de edad respectivamente, se indujo la recuperación de las crias al haber una mayor cantidad de leche materna disponible (10).

Asimismo, los productos sobrevivientes en este grupo revelaron un mayor tamaño a los 20 días de edad, posiblemente debido a un efecto compensatorio en el desarrollo postnatal como resultado de la restricción previa de oxígeno y posiblemente de nutrientes (22).

Es poco probable que estos resultados puedan deberse a errores en la selección de las muestras o por la variación resultante de la diferente edad de las madres utilizadas en este estudio.

El modelo experimental utilizado en este trabajo es comparable a las condiciones de intoxicación voluntaria en humanos por los periodos cortos y frecuentes de exposición hasta la presentación de los primeros síntomas, parecidos a los que se observaron en las ratas del presente estudio, sin llegar a producirse depresión profunda o pérdida de la conciencia.

En otros estudios de exposición de animales de laboratorio a solventes se han establecido condiciones de exposición parecidas a las que suceden por motivos ocupacionales, en éstos reportan los mismos síntomas descritos en nuestros experimentos, a excepción de sialorrea que no observamos (3,7,20).

Por otra parte, el dispositivo de ventilación mediante dos orificios laterales en la cámara utilizada evitó que la exposición a Tolueno alcanzara niveles de intoxicación aguda y permitió la rápida recuperación de las ratas, esto mismo redujo el estrés resultante por la

hipoxia en las madres, lo que permite descartar efectos adversos atribuibles a éste factor, aparte de que la inhalación misma del solvente provocó un estado de relajamiento.

La lascitud observada al final de la exposición posiblemente se debió a los efectos del Tolueno sobre la concentración de monoaminas y catecolaminas cerebrales (21), además de las alteraciones en la neurotransmisión al afectarse la membrana sináptica (3,5,20,21).

El grupo expuesto a partir del segundo tercio de gestación presentó mayor peso del encéfalo y cerebro separado por el mismo estímulo de recuperación antes mencionado. Otros estudios también han reportado la rehabilitación de individuos afectados prenatalmente por causas diversas cuando se crían bajo condiciones nutricionales favorables (20,22).

Lo anterior explica la variación de los resultados en el desarrollo postnatal desigual entre cerebro y cerebelo, como se observó en estos grupos experimentales ya que el último madura más tardíamente.

El mayor espesor de la capa germinal externa de todos los tejidos experimentales refleja la persistencia de una mayor cantidad de células granulares. Esta se manifestó mediante el estudio histológico micrométrico y se debió al retardo en el desarrollo cerebelar, ya que normalmente éstas células empiezan a migrar desde el día 19 de vida prenatal, está reportado que el Tolueno provoca un trastorno en el

metabolismo energético celular neuronal de los productos (23).

El estudio planimétrico a los 20 días de edad demostró una mayor superficie de la capa molecular y corteza cerebelar completa del grupo expuesto durante toda la gestación esto puede explicarse por la elevada vulnerabilidad del cerebelo a diversos solventes (8,12,19,25) debido a que se encuentra en fase de neurogénesis durante la etapa perinatal de la rata.

Por ésta razón, cuando se altera el metabolismo sistémico fetal de los productos la maduración del cerebelo también se afecta notablemente, lo que sucede en menor grado con el cerebro.

Al parecer, el retardo en la maduración cerebelar fue la alteración mas importante, a pesar de los trastornos metabólicos ocurridos en la vida prenatal como resultado de la hipoxia, modificación de nutrientes en la sangre materna y exposición a metabolitos secundarios, debido al desarrollo de mecanismos de protección materno-fetales orientados a reducir los efectos nocivos por la presencia sistémica del Tolueno.

Con el método semicuantitativo utilizado fué posible determinar con precisión las alteraciones en la maduración del cerebelo que no podrian percibirse igualmente mediante un estudio subjetivo.

CONCLUSIONES.

1. Las ratas gestantes expuestas toda la gestación desarrollaron tolerancia parcial a los efectos del Tolueno y en menor grado las expuestas desde el segundo tercio. Esta se manifestó por las distintas alteraciones en las progenies.

2. La exposición prenatal a Tolueno principalmente produjo un retardo en la maduración del cerebelo cuya severidad estuvo directamente relacionada con el tiempo total de exposición.

3. Al nacimiento y 10 días de edad no se manifestaron alteraciones importantes en los parámetros encefálicos de las diferentes crías experimentales.

4. En la progenie de madres expuestas toda la gestación y desde el segundo tercio no se observaron alteraciones somatométricas a través del estudio.

5. Al nacimiento la progenie expuesta el último tercio de la gestación fué la única que presentó mortalidad, formación incompleta de la columna vertebral y edema corporal.

6. A los veinte días de edad se observó un mayor peso encefálico y del cerebro por separado en la progenie expuesta a partir del segundo tercio de la gestación posiblemente como una respuesta de recuperación.

7. En esta misma edad el grupo expuesto durante toda la gestación presentó la mayor superficie en la corteza cerebelar, esto sugiere hiperinervación por recuperación.

8. Los resultados obtenidos sugieren que el menor número de la camada en el modelo utilizado facilitó la recuperación de los productos afectados.

9. Los métodos semicuantitativos utilizados en este estudio permitieron identificar con precisión las alteraciones provocadas por la exposición prenatal a Tolueno.

10. El cerebelo mostró vulnerabilidad a los efectos del Tolueno, por lo que se confirma que es un buen modelo para estudios de neurocitotoxicidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- 1.- Raymon E. K. y Donald F.O. (1965) Enciclopedia de Tecnología Química. Primera Edición. Tomo XV. 540-551.
- 2.- Fuentes Victor. (1985) Farmacología y Terapéuticas Veterinarias. Edit. Interamericana. 190.
- 3.- Garcia E. J., Rodriguez S. A. y Garzón Pedro. (1987) Cerebral cortex and body growth development of progeny of rats exposed to thinner and turpentine inhalation. Gen. Pharmac. 19 (3); 467-470.
- 4.- Lazar R. B., Ho S. V., Melen O. y Daghestani A. M. (1983) Multifocal central nervous system damage caused by toluene abuso. Neurology 4 (33); 1337-40.
- 5.- Noback Charles R. y Demarest Robert J. (1975) The human nervous system. Basic principles of Neurobiology. Second Edition 283-304.
- 6.- Escobar A., Aruffo C. y Jimenez G. (1984) Efecto neurotóxico de los disolventes industriales y otros compuestos. Boletín de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas. Volumen 5. Número 3. 4-6.
- 7.- Hersh J. H., Podruch P. E., Roger G. y Weisskopf B. (1985) Toluene embriopathy. J. Pediat. 106; 922-24.
- 8.- Gómez V. M. (1988) Alteraciones en corteza cerebelar de ratas expuestas a thinner o aguarrás al final de la gestación. Tesis Profesional de Licenciatura. Fac. Med. Vet. Zoot. Univ. de Guad.

- 9.- Altman J. y Bayer A. (1987) Prenatal development on the cerebellar cortex in the rat. I; Citogenesis and histogenesis of the deep nuclei and cortex of the cerebellum. J. Comp. Neur. 179; 23-48.
- 10.- Altman J. (1972) Posnatal development on the cerebellar cortex in the rat. I, II y III. Comp. Nutr. 179; 353-514.
- 11.- Magaña M. H., Garcia E. J. y Garzón de la M. P. (1987) Alteraciones estructurales del encéfalo de ratones con retardo en el crecimiento intrauterino y restricción ó rehabilitación nutricional postnatal. Tiempos de Ciencia. Univ. de Guad. 7; 22-23.
- 12.- Garcia E. J., Vázquez M. M. y Garzón P. (1986) Efectos de la exposición materna al éter 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.
- 13.- Savolainen H. y Pfafli P. (1978) Effects of long-term turpentine inhalation on rat brain metabolism. Chem.Biol. Interactions. 6 (25); 133-38.
- 14.- Austin C. R. y Short R. V. (1972) Embryonic and fetal development. Cambridge University Press. Book 2. 73-95.
- 15.- Chand P. y Clausen J. (1982) Effects of tolueno on cytochromo P-450 mixed function oxigenase and glutathione S-transferase activities in rat brain and liver. Bull Environm. Contam. Toxicol. 28; 542-45.

- 16.- De la Torre G. P. (1987) Alteraciones del desarrollo testicular prenatal de ratas por efecto de la exposición materna al cloroformo y éter. Estudio histológico. Tesis Profesional de Licenciatura. Fac. Med. Vet. Zoot. Univ. de Guad.
- 17.- Guzmán F. C., Guzmán L.C. y Alcaráz M. (1974) Efectos agudos del thinner sobre la conducta y la actividad eléctrica cerebral. Estudio experimental en el gato. Biol. Estud. Méd. Méx. 28; 157-165.
- 18.- Patton H. D. , Crill W. E., Swanson P. D. y Sundsten J. W. (1976). The cerebellum. Introduction to basic neurology. W. B. Saunders Company. E. U. 289-298.
- 19.- Bafuelos Pineda J. (1987). Alteraciones en cerebelo de productos de ratas expuestas a la inhalación de éter o cloroformo al final de la gestación. Estudio histológico semicuantitativo. Tesis Profesional de Licenciatura. Fac. Med. Vet. Zoot. Univ. de Guad.
- 20.- Stumph M. J., Weir. F. W. y Noall. M. W. (1985). Comparison of Blood and Brain Toluene concentrations and circulating Triglyceride levels resulting from acute and repeated exposure in rats. Am. Ind. Hyg. Assoc. J., 46(5); 244-250.
- 21.- Yamawaki S. y Keisure S. (1982). Effects of Toluene inhalation on locomotor activity and Brain catecholamine levels in rats. Institute Clinical Res. Vol. 2(1); 57-60.
- 22.- Mendoza Magaña M. L. (1987). Estudio histológico de la población celular neuronal y glial del encéfalo de rata con

retardo en el crecimiento intrauterino. Tesis Profesional de Licenciatura. Fac. Med. Vet. Zoot. Univ. de Guad.

23.- Triner L., Vulliemoz Y., Verosky M. y Alpert M. (1981). Halothane effect on cGMP and control of motor activity in mouse cerebellum. *Anesthesiology* 34; 193-198.

24.- 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.

25.- Bauer-Moffett C. y Altman J. (1977). The effect of ethanol chronically administered to preweaning rats on cerebellar development: A morphological study. *Brain Res* 119; 249-268.

26.- Kluver H. y Barrera E. (1953). Methode for myeline and nerve cells. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 12; 400-412.

27.- Feria Velasco A. y Karnovski M. J. (1970): Preservación óptima del sistema nervioso central por perfusión con glutaraldehído para estudio estructural. *Arch. Invest. Med. Mex.* 1; 201-217.