

V621

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

ALTERACIONES EN CEREBELO DE PRODUCTOS DE RATAS
EXPUESTAS A LA INHALACION DE ETHER O CLOROFORMO
AL FINAL DE LA GESTACION. ESTUDIO HISTOLOGICO
SEMICUANTITATIVO.

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el titulo de:

Médico Veterinario y Zootecnista Presenta:

JACINTO BANUELOS PINEDA

Asesores: M. en C. Joaquín García Estrada

M.V.Z. Miguel Vacquez Martínez

JULIO 1987

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL MODULO
DE MORFOLOGIA EXPERIMENTAL DEL DEPARTAMENTO
DE INVESTIGACION CIENTIFICA DE LA FACULTAD
DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA DE LA
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA.

JULIO 1987.

CONTENIDO

RESUMEN

INTRODUCCION

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

HIPOTESIS

OJETIVO GENERAL Y PARTICULARES

MATERIAL Y METODOS

RESULTADOS

DISCUSION

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFIA

REPORTE DE ANOMALIAS

CUCBA

A LA TESIS:

LCUCBA01533

Autor:

Bañuelos Pineda Jacinto

Tipo de Anomalía:

Errores de Origen: Tesis sin foliar

fue descubierta o inventada.

RESUMEN

Al final de la gestación se expusieron 10 ratas Sprague-Dawley a la inhalación de éter o cloroformo en dos grupos de 5 respectivamente durante 5 días consecutivos con el propósito de estudiar los efectos de estas sustancias sobre el desarrollo corporal y cerebelar de los productos, el grupo control consistió de otras tres ratas que no inhalaron solventes. Al nacimiento, 24, 48 y 72 hrs. de edad se registró el peso corporal, tamaño y perímetro cefálico de los productos; una parte de estos se perfundieron por vía intracardiaca en cada una de las etapas descritas para la fijación y estudio histológico semicuantitativo del cerebelo, después de la perfusión se practicó craneotomía, se deshidrató el cerebelo en series crecientes de etanol y se incluyó en parafina para obtener cortes de 2 μ m de espesor que se tiñeron con las técnicas de Kluver-Barrera y Hematoxilina-Eosina. En los animales experimentales se encontraron crías con menor peso y perímetro cefálico, el grupo prenatalmente expuesto a cloroformo reveló los efectos más severos y solo en este se encontró una disminución del tamaño estadísticamente significativa. Las diferencias entre el grupo control y experimentales se mantuvieron a través del estudio. En ambos grupos experimentales se observaron alteraciones en la citoarquitectura cerebelar indicativas de retardo en la maduración, como retraso de la migración de las células de la capa germinal externa y desorganización de las células de Purkinje, así como disminución de su número normal en tejidos de animales experimentales. Los resultados obtenidos demuestran la vulnerabilidad del cerebelo inmaduro al éter o cloroformo, por lo que debe evitarse la exposición repetida de madres gestantes o sujetos en desarrollo a estas sustancias o a sus análogos.

ALTERACIONES EN CEREBELO DE PRODUCTOS DE RATAS EXPUESTAS A LA INHALACION DE ETER O CLOROFORMO AL FINAL DE LA GESTACION. ESTUDIO HISTOLOGICO SEMICUANTITATIVO.

INTRODUCCION

La anestesia general por inhalación fué el primer método anestésico descubierto, los anestésicos inhalados producen sus efectos orgánicos en base a las leyes fundamentales de los gases, el Sistema Nervioso Central (SNC) esta expuesto a la mayor concentración de anestésicos debido a su gran vascularización y a la elevada solubilidad lipídica de estas sustancias, esta situación permite el paso de los anestésicos a través de la barrera hematoencefálica en adultos (1-4).

El óxido nitroso y el éter dietílico fueron los primeros anestésicos generales en cirugía en 1842 (1,7), el cloroformo es un hidrocarburo halogenado clorado con mayor potencia anestésica que el éter (1,3-5,17).

Los anestésicos inhalados experimentan transformaciones químicas durante su metabolismo, estas varían dependiendo de su biodisponibilidad y estabilidad estructural que a su vez se relaciona con el grado de ionización, solubilidad lipídica y tamaño molecular. En general, la mayoría de los compuestos químicos sufren biotransformación mediante oxidación, reducción e hidrólisis y además atraviesan por una fase de síntesis orgánica mediante la adición de grupos funcionales al compuesto original, entre estos están el ácido glucorónico, glicina, sulfatos y grupos metilos, de esta manera se forman metabolitos secundarios que se excretan

facilmente a través de la bilis, orina, heces o durante la respiración (2,8,9).

El éter inhalado se degrada a bióxido de carbono y a otros productos como ácido palmítico, esteárico y oleico, así como en glicéridos con diferente número de carbonos en su cadena, colesterol y diversos compuestos carbonados (etanol, ácido acético y acetaldehído). El cloroformo origina triclorometanol, este metabolito se descompone en fosgenos que son desclorinizados o hidrolizados a dióxido de carbono y iones cloro para luego eliminarse a través de la respiración y la orina (9).

El éter es principalmente nefrotóxico (3-6,12,15), el cloroformo provoca necrosis centrolobulillar en hígado y además afecta al corazón, en hembras gestantes puede causar abortos espontáneos con disminución de la fertilidad, y se le considera carcinogénico (1-6,17,18).

La respuesta a la exposición de solventes es altamente variable entre los sujetos afectados y se basa en la concentración, frecuencia y duración de la exposición ocupacional o anestésica, así como del estado físico y edad de los individuos, por lo que la intensidad del daño dependerá de la asociación de entre estos dos grupos de factores (12,15,17,18).

El éter y el cloroformo cruzan la barrera hematoplacentaria debido a su bajo peso molecular y a su elevada afinidad en sangre, por lo que afectan el desarrollo de los productos (11).

En estudios con ratas preñadas que se anestesiaron con halotano se encontró disminución de la presión arterial materna con acidosis metabólica e hiperglucemia, algo semejante sucede con el feto, en el que además se presenta una vasodilatación que favorece la

difusión de sustancias, especialmente las liposolubles (13,14,16), esto posiblemente también ocurre con los agentes estudiados en este trabajo.

En estudios sobre las alteraciones del metabolismo transplacentario por efecto del éter y cloroformo se encontró hipoxia del producto y como consecuencia resultan trastornos del metabolismo energético cerebral, se observó que existe una acción inhibitoria de estos compuestos sobre la actividad mitocondrial neuronal y el recambio sanguíneo materno-fetal. Debido a que el cerebelo de la rata se encuentra en una fase de aceleración de la maduración durante el último tercio de la gestación, las alteraciones del metabolismo energético del SNC por la exposición prenatal a éter o cloroformo afectan severamente su desarrollo (11,13,14,24).

Se ha reportado que por la acción del halotano disminuyen los niveles de GMPc en el cerebelo sin que se manifiesten cambios estructurales a nivel de microscopia de luz, como consecuencia se producen trastornos en la actividad de las células de Purkinje, las cuales son el principal centro de conexión neuronal de las vías motoras ascendentes y descendentes. Este gas disminuye la actividad motora junto con una reducción del nivel de GMPc intracelular (21,23).

En la actualidad no existen suficientes estudios sobre alteraciones estructurales causados por éter y cloroformo a nivel cerebelar.

En varios trabajos se ha demostrado que el cerebelo tiene una especial vulnerabilidad pre y postnatal a numerosas sustancias como etanol, tolueno, barbitúricos, monóxido de carbono, y diversas clases de anestésicos volátiles, esto se debe a que el cerebelo

presenta una neurogénesis cronológicamente retardada comparada con la del cerebro, ya que en la rata inicia su formación a partir del día 13 embrionario (13 E), las células de Purkinje se forman el día 15 E e inician su migración desde el día 16 E hasta localizarse en su posición final, desde el día 17 E al día 3 postnatal (3 P) se encuentran en una etapa de maduración acelerada.

La capa germinal externa compuesta de células granulares indiferenciadas se forma a partir del día 17 E y su maduración continua después del nacimiento, esto se manifiesta por la migración de células granulares. Las células de Golgi aparecen desde el día 19 E mientras que las células estrelladas y en canasta inician su diferenciación después del día 4 postnatal. De esta manera el cerebelo termina su etapa de neurogénesis en el día 21 postnatal y completa su maduración hasta el día 30 (42-45).

En un estudio sobre los efectos de la exposición a barbitúricos en la vida temprana se encontró que estos causan disminución en el número de células de Purkinje y granulares (36), las primeras también son altamente sensibles a los efectos del etanol en la edad postnatal inmediata, ya que por efecto crónico de este se produce depoblación, también se reduce el número de células granulares, sobre todo en la población precursora presente en la capa germinal externa, en este mismo estudio se determinó que el cerebelo sufrió una inhibición en su crecimiento mucho más notable que el cerebro (37).

Existen otros agentes físicos y químicos tradicionales (metilmercurio, ácido kainico, cis-dicloro diamine platinum, etc.) que afectan especialmente a estas dos estirpes celulares de la

corteza cerebelar, tanto en el número como en su estructura, lo que nos indica la gran vulnerabilidad del cerebelo inmaduro a diversos estímulos nocivos (30-40).

Actualmente el éter y el cloroformo ya casi no se usan en anestesia, sin embargo por sus propiedades de solventes de lípidos se emplean en la industria, por lo que existe una gran diversidad de situaciones bajo las cuales se produce exposición a estos agentes, el éter todavía se usa como anestésico de rutina en animales que se emplean para trabajos de investigación, por lo que su utilización puede afectar los resultados que se obtengan sobre estudios de neurogénesis, particularmente si se exponen hembras gestantes.

En el presente trabajo se estudió el daño estructural sobre el cerebelo de ratas gestantes sometidas a la inhalación repetida de éter o cloroformo, ya que a pesar de que estos ya no se usan como anestésicos clínicos, existen otros compuestos análogos, como los éteres halogenados; Enflurano, Metoxiflurano, Isoflurano y Fluroxeno que se sintetizaron en base a la estructura química primaria del éter y son de uso frecuente en anestesia clínica humana y de animales (9,21).

Asimismo el halotano, hidrocarburo halogenado que se emplea ampliamente en anestesia, guarda una gran semejanza estructural con el cloroformo. Todas estas sustancias volátiles lipofílicas descritas conservan las principales propiedades físico-químicas del éter y el cloroformo, solo que atenuadas, por lo que su mecanismo básico de acción es parecido, al igual que los efectos secundarios, aunque con diferente severidad.

Por todas las razones señaladas, el éter y cloroformo se seleccionaron para desarrollar un modelo experimental que permitiera analizar los efectos de solventes orgánicos sobre la integridad estructural y distribución de las principales estirpes celulares cerebelares de ratas recién nacidas. Los resultados obtenidos nos permitirán inferir las consecuencias de la exposición repetida médica o laboral a los compuestos estudiados o a sus análogos de más reciente síntesis.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El éter y el cloroformo son sustancias volátiles solventes de lípidos que en la actualidad ya no se utilizan como anestésicos clínicos, a partir de ellos han surgido nuevos agentes inhalatorios de uso común en la clínica humana y veterinaria que conservan las principales propiedades de los originales, entre estas están la de atravesar la barrera hematoplacentaria, por lo que ejercen su acción y efectos sobre los productos. Dado que el cerebelo madura más tardíamente en comparación con el cerebro, su vulnerabilidad durante el final de la gestación y la vida postnatal inmediata es mucho mayor, por lo que posiblemente la exposición materna a vapores de estos anestésicos en la última etapa de gestación ocasione daños en el SNC, especialmente en cerebelo, mismos que afectan el desarrollo postnatal del individuo. Debido a los escasos estudios estructurales acerca de los efectos de estos agentes sobre el cerebelo de los productos, es necesario realizar un análisis semicuantitativo de la citoarquitectura cerebelar de animales nacidos de madres expuestas durante el último tercio de la gestación.

HIPOTESIS

Si la exposición materna a éter o cloroformo afecta el metabolismo cerebelar de fetos en la última etapa de gestación, luego entonces se producen alteraciones en la citoarquitectura de este órgano, evidentes a nivel de microscopia de luz.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar los cambios histológicos que se producen en cerebelo de productos de ratas expuestas repetidamente a éter o cloroformo al término de la gestación.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Realizar un estudio descriptivo y semicuantitativo de la apariencia y distribución de las principales estirpes celulares presentes en cerebelo de animales recién nacidos, y a las 24, 48 y 72 horas de vida postnatal, mediante técnicas citoquímicas específicas para neuronas y neuroglia.

2. Analizar los principales parámetros morfométricos de animales control y experimentales.

MATERIAL Y METODOS

Para el presente estudio se utilizaron 13 ratas hembras adultas de la cepa Sprague-Dawley del segundo parto con un peso entre 250 y 300 g. El grupo control se formó de 3 ratas y los dos grupos experimentales con 5 animales cada uno, mismos que fueron expuestos al éter y cloroformo respectivamente, todas las hembras se criaron bajo condiciones normales de bioterio con ciclos circadianos de 12 h luz, 12 h oscuridad y se alimentaron con Chow-purina y agua "ad libitum".

Mediante citología exfoliativa vaginal se detectó el estro y se dejaron tres hembras con un macho durante una noche, para el día siguiente determinar el día uno gestacional mediante la identificación de espermatozoides en el exudado vaginal (19).

Todas las hembras se mantuvieron bajo las mismas condiciones durante la gestación, del día 17 al 21 se realizó la exposición a los solventes orgánicos durante 10 min. en la mañana y otros 10 min. en la tarde, para lo cual se empleó una cámara hermética de vidrio de 30 cm. de ancho, 40 cm. de largo y 25 cm. de altura, que contaba con un dispositivo para regular la ventilación, en su interior se colocaron algodones completamente impregnados con cada uno de los agentes anestésicos por separado e inmediatamente después se introdujeron las ratas preñadas, las cuales se mantuvieron en un estado de anestesia superficial mediante regulación de la ventilación. El grupo control recibió el mismo manejo en la cámara experimental pero sin la exposición a los vapores anestésicos.

El procedimiento descrito se repitió en un total de 10 ocasiones, posteriormente, al momento del nacimiento se registraron los datos de peso corporal, longitud craneo-caudal y perímetro cefálico de todos los animales neonatos pertenecientes a los grupos control y experimentales.

De cada uno de los grupos se seleccionaron productos al azar a las 24, 48 y 72 horas de vida postnatal y se registraron los parámetros morfométricos, del grupo éter se sacrificaron 10 productos en cada etapa, del grupo cloroformo 5 a las 24 y 48 h, y 6 para la etapa de 72 h (debido al bajo número de nacidos vivos), del grupo control se sacrificaron 6 productos para cada edad mediante perfusión intracardiaca (26) para luego obtener el encéfalo completo.

Todos los animales recién nacidos se anestesiaron profundamente con éter inmediatamente antes de iniciar la perfusión, para la cual se practicó toracotomía y se introdujo una aguja biselada calibre 23 corta en el ventrículo izquierdo, simultáneamente se cortó la aurícula derecha y se hizo pasar una solución lavadora inicial de Ringer-Krebs con procaina (0.1%) y heparina (0.6%) con ph de 7.3 y 283 mosm/L durante 4 min., seguida de una solución fijadora de glutaraldehído al 2.5 % y formaldehído al 1 % amortiguados en fosfatos 0.1 M con ph 7.3 y 584 mosm/L durante 7 a 8 min.. La perfusión se realizó bajo una presión de 130 cm. de agua y a una temperatura de 37 grados C.

Al final de la perfusión se practicó craneotomía y se extrajo el encéfalo completo, que se postfijó por inmersión durante dos horas en la misma solución fijadora a 4 grados C, después se lavó en amortiguador de fosfatos 0.1 M en tres cambios de 15 min.

Todos los cerebelos sin cerebro y tallo cerebral se cortaron en sentido medio sagital a nivel del vermis y los dos hemisferios se deshidrataron en etanol-xilol para luego incluirse en parafina y realizar cortes de 2 um de espesor en un microtomo American Optical SL-20. La mitad de los cortes correspondientes a cada hemisferio, se tiñeron alternadamente con la técnica de Kluver-Barrera para la identificación de neuronas (28) y la otra mitad con hematoxilina-eosina para observar neuronas y células gliales.

Después de teñir los cortes se montaron en portaobjetos para su observación microscópica.

Se realizó un análisis semicuantitativo de las principales estirpes neuronales del cerebelo mediante observación directa de las preparaciones en un microscopio de luz Wild a baja amplificación y con la ayuda de micrómetro se hicieron cuantificaciones sobre la capa germinal externa y la línea de células de Purkinje.

Mediante determinaciones en 10 campos microscópicos seleccionados completamente al azar de las zonas inferior, media y superior de las folias cerebelosas, se cuantificó el espesor de la capa germinal externa, siguiendo la dirección de la línea de células de Purkinje se hicieron 7 cuantificaciones sobre distintas circunvoluciones de las folias en cada una de tres preparaciones provenientes de distintos animales del mismo grupo.

Todos los datos obtenidos se procesaron mediante un análisis de variancia simple para identificar los niveles de significancia.

RESULTADOS

El número promedio de crias nacidas por madre fuè de 10 en el grupo control y ligeramente menor en los grupos experimentales, sin que hubiera diferencias estadísticamente significativas entre estos grupos.

ANALISIS DE LOS PARAMETROS MORFOMETRICOS

El peso corporal promedio de todos los productos de madres expuestas a los solventes resultò menor que el de los controles, las crias mas pequeñas se encontraron en el grupo prenatalmente expuesto a cloroformo cuya diferencia fuè significativa a una $P < 0.05$ y se mantuvo hasta las 72 h en que finalizò el estudio (Grafica 1). El perimetro cefàlico de los animales experimentales igualmente fuè menor a través del estudio y tambièn solo resultò significativa a una $P < 0.05$ la diferencia de la progenie del grupo expuesto a cloroformo (Grafica 2). Cuando se analizò el tamaño de los productos solamente se encontrò una disminuciòn significativa en el grupo proveniente de madres expuestas a cloroformo (Grafica 3).

ESTUDIO HISTOLOGICO

En el estudio del vermis cerebelar de crias control y experimentales que fueron sacrificadas mediante perfusiòn intracardiaca a las 24, 48 y 72 h de vida postnatal, se apreciaron diferencias estructurales bastante notables, particularmente en el espesor de la capa germinal externa y densidad de la poblaciòn celular presente en esta, asi como en la citoarquitectura y número

de la población de las células de Purkinje.

Después de realizar 10 cuantificaciones en distintas áreas seleccionadas al azar de 3 laminillas diferentes pertenecientes a cada uno de los grupos experimentales y el control, se distinguió claramente la capa germinal externa que se tiñó densamente con las técnicas utilizadas (hematoxilina-eosina y Kluver-Barrera); esta reveló un espesor mayor en los dos grupos experimentales, aunque no significativamente diferente al de los controles (Cuadro 1), en algunas preparaciones se observó una notable irregularidad en el espesor de esta capa a través de las folias (Fig. 2) mientras que en otros tejidos se apreció una aparente reducción en el número de células granulares distribuidas en todo el espesor de la zona germinal, esto sucedió en casos aislados (Figs. 5 y 6).

En el análisis semicuantitativo de la población de células de Purkinje se encontró una disminución significativa en su número en los dos grupos experimentales a través del estudio, particularmente en los animales expuestos a cloroformo (Cuadro 2), también se observó un desarreglo en la alineación de esta estirpe, ya que en algunas folias las células no estaban dispuestas en una monocapa (Figs. 8 y 9).

Las demás áreas cerebelares; sustancia blanca y núcleo cerebelar profundo, no revelaron alteraciones aparentes (Figs. 11 y 12), en la mayoría de los cortes se distinguieron claramente los núcleos de las células gliales desprovistas de citoplasma, así como numerosos somas neuronales de formas diversas y apariencia normal. En algunas células de Purkinje se pudo distinguir el inicio de su arborización dendrítica proyectada hacia la superficie de la folia

(Fig. 7), con la técnica de Kluver-Barrera solo se observaron las neuronas con el citoplasma teñido de azul, al igual que el núcleo, solo que este con mayor intensidad.

Invariablemente el cerebelo de las crías de madres expuestas al éter o cloroformo presentó trastornos, tanto en la velocidad de maduración, evidente por la migración retardada de células granulares externas, como en su citoarquitectura, también se observaron alteraciones en el desarrollo de las células de Purkinje, ya que estas aparecieron con un menor grado de diferenciación comparada con las de los cortes control.

ESPESOR DE LA CAPA GERMINAL EXTERNA DEL CEREBELO (um)
EDAD (hrs)

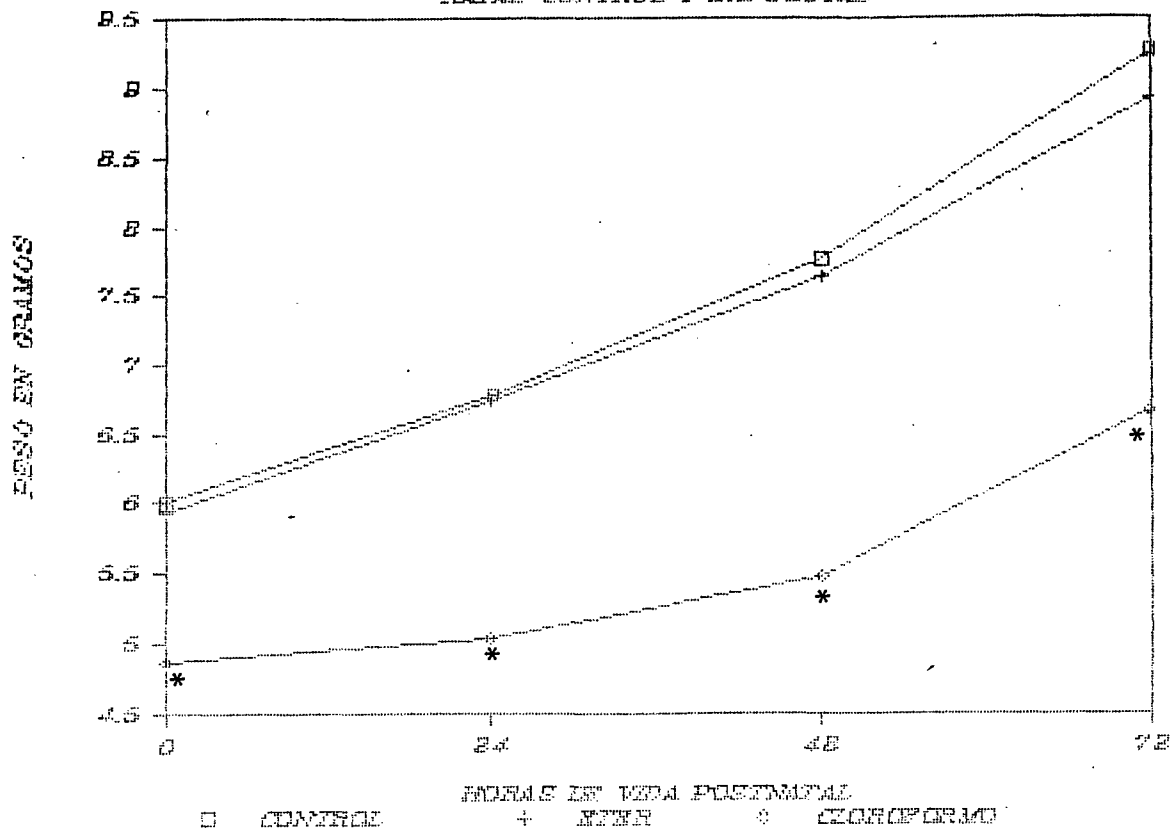
	24			48			72		
	X	DS	CV %	X	DS	CV %	X	DS	CV %
CONTROL	13.50 ± 2.97		22.0	13.25 ± 2.47		18.6	12.75 ± 2.08		16.3
ETER	15.75 ± 3.24		11.5	14.25 ± 2.07		14.5	14.00 ± 2.50		17.8
CLOROFORNO	15.30 ± 3.24		21.1	14.00 ± 2.00		14.2	14.00 ± 2.51		17.9

* Valores estadísticamente significativos. $P < 0.05$

Cuadro 1. Muestra las diferencias del espesor (um) de la capa germinal externa cerebelar que no fueron significativas ($P < 0.05$) entre los grupos experimentales y el control en las distintas etapas de estudio. X = media aritmética, DS = desviación estandar, CV = coeficiente de variación.

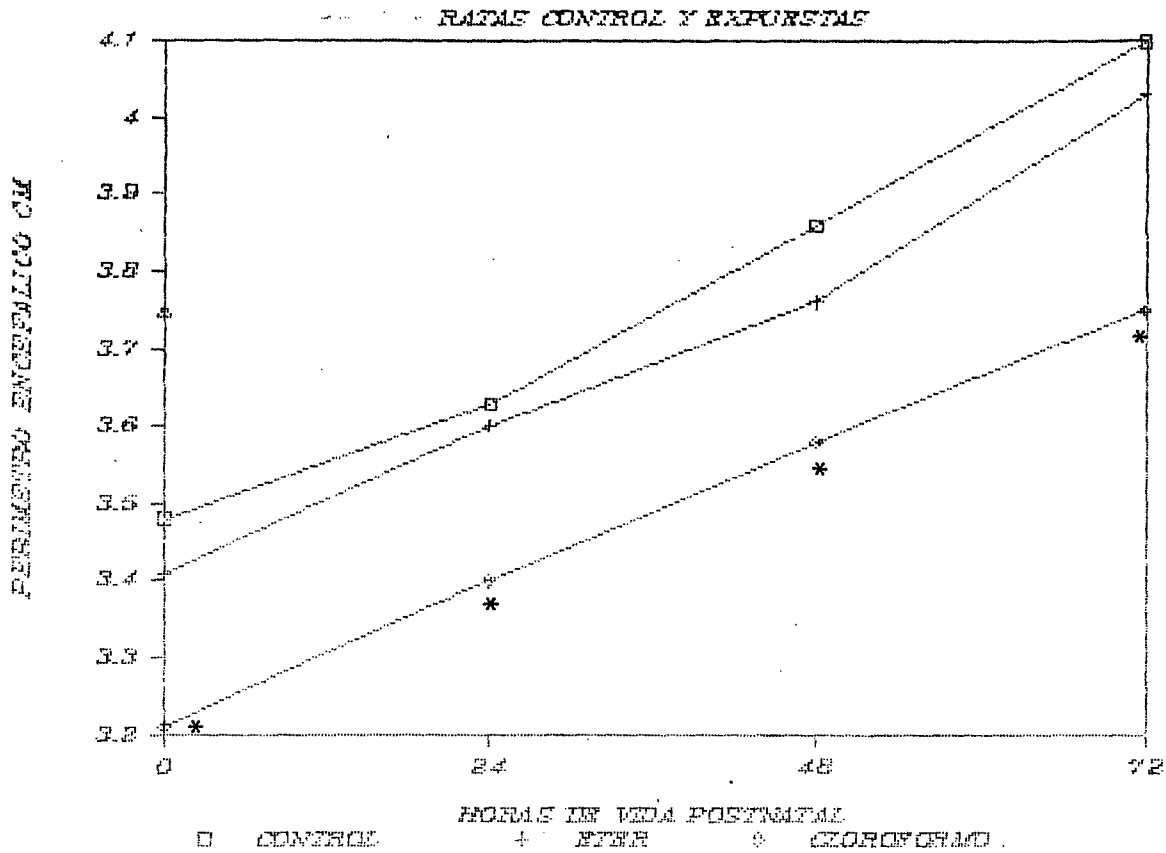
CAMBIOS EN EL PESO CORPORAL

RATAS CONTROL Y EXPUESAS



Gráfica 1. Presenta los cambios en el peso corporal de los productos desde el nacimiento hasta las 72 hrs. Las crías expuestas a cloroformo revelaron los valores inferiores, que resultaron significativos a una $P < 0.05$ (*).

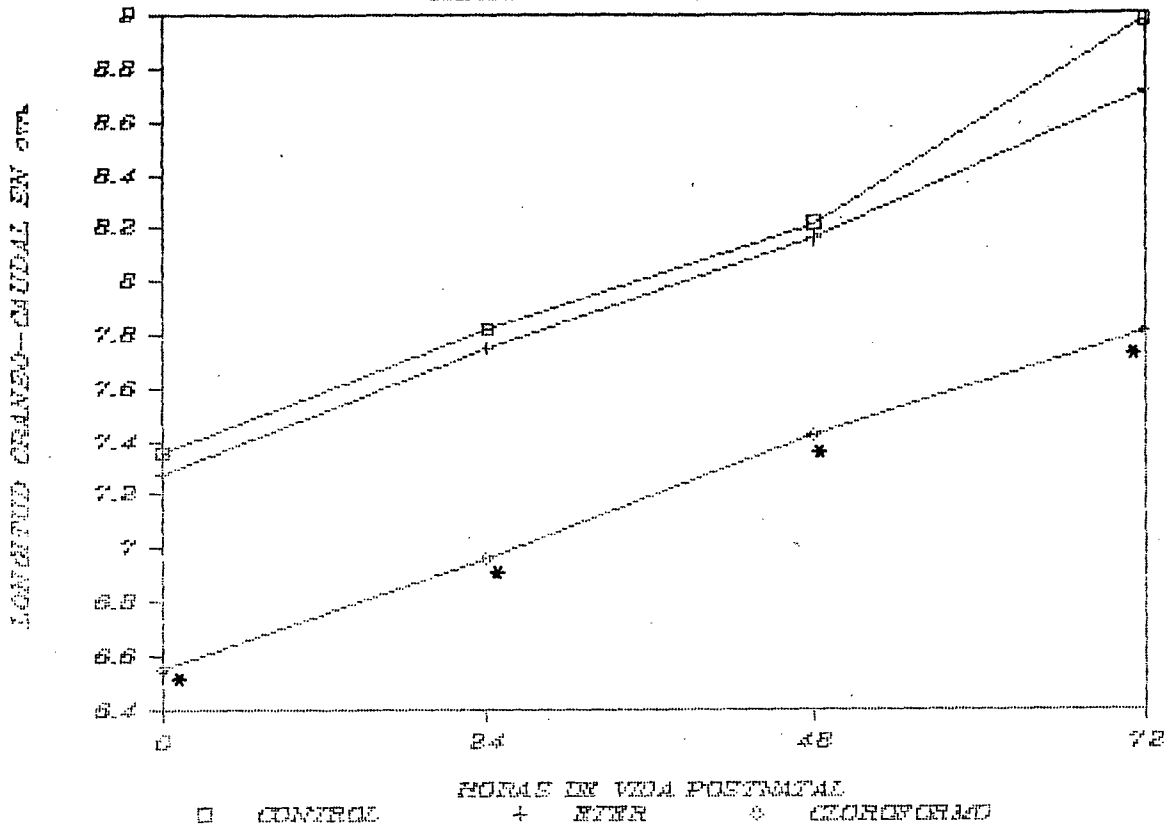
CAMBIOS EN LA DIMENSION DEL ENCEFALO



Gráfica 2. Permite apreciar las diferencias en el perímetro cefálico que resultaron significativas ($P < 0.05$ *) solo en el grupo o expuesto a cloroformo a partir del nacimiento, efectos menos severos se observaron en el grupo éter.

COMPARACION DEL TAMANO/EDAD.

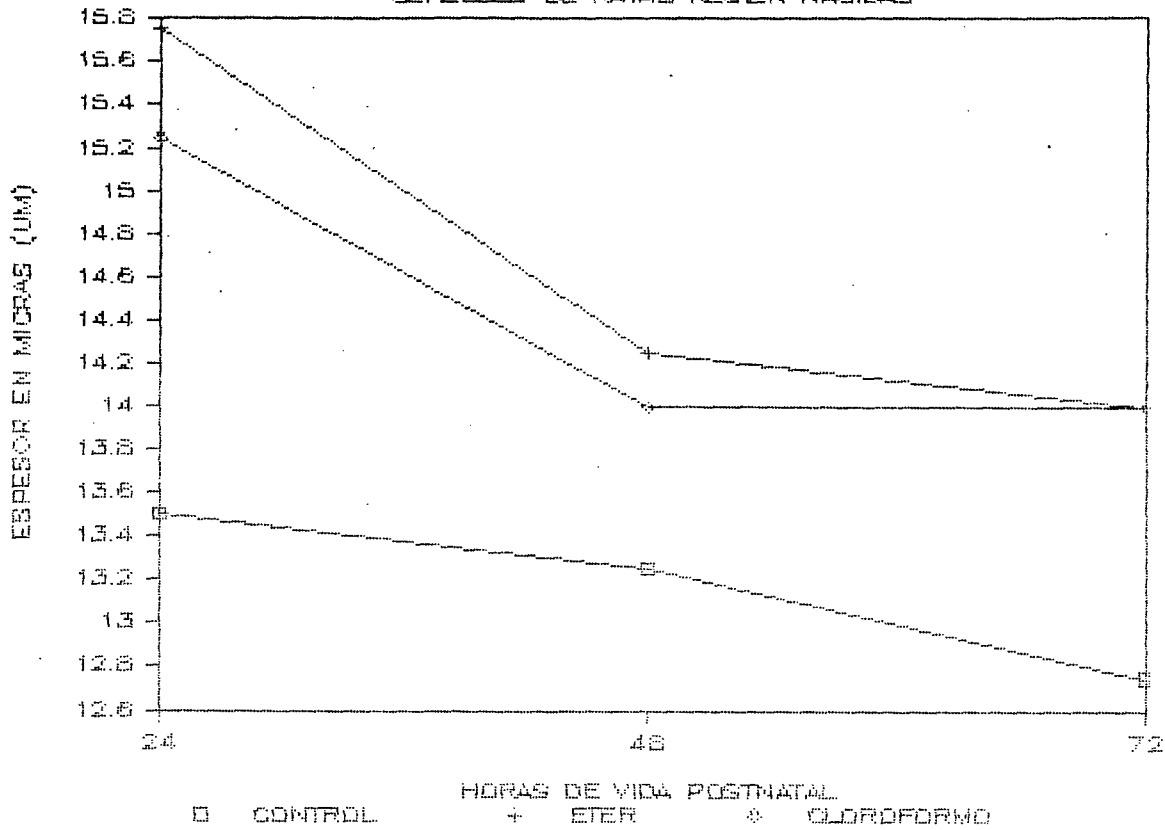
RATAS CONTROL Y EXPERIMENTAL



Gráfica 3. Se analizó la longitud craneo-caudal de todos los productos control y experimentales, solo se encontraron diferencias significativas en el grupo prenatalmente expuesto a cloroformo a través del estudio a una $P < 0.05$ (*).

ALTERACIONES EN CAPA GRANULAR EXTERNA

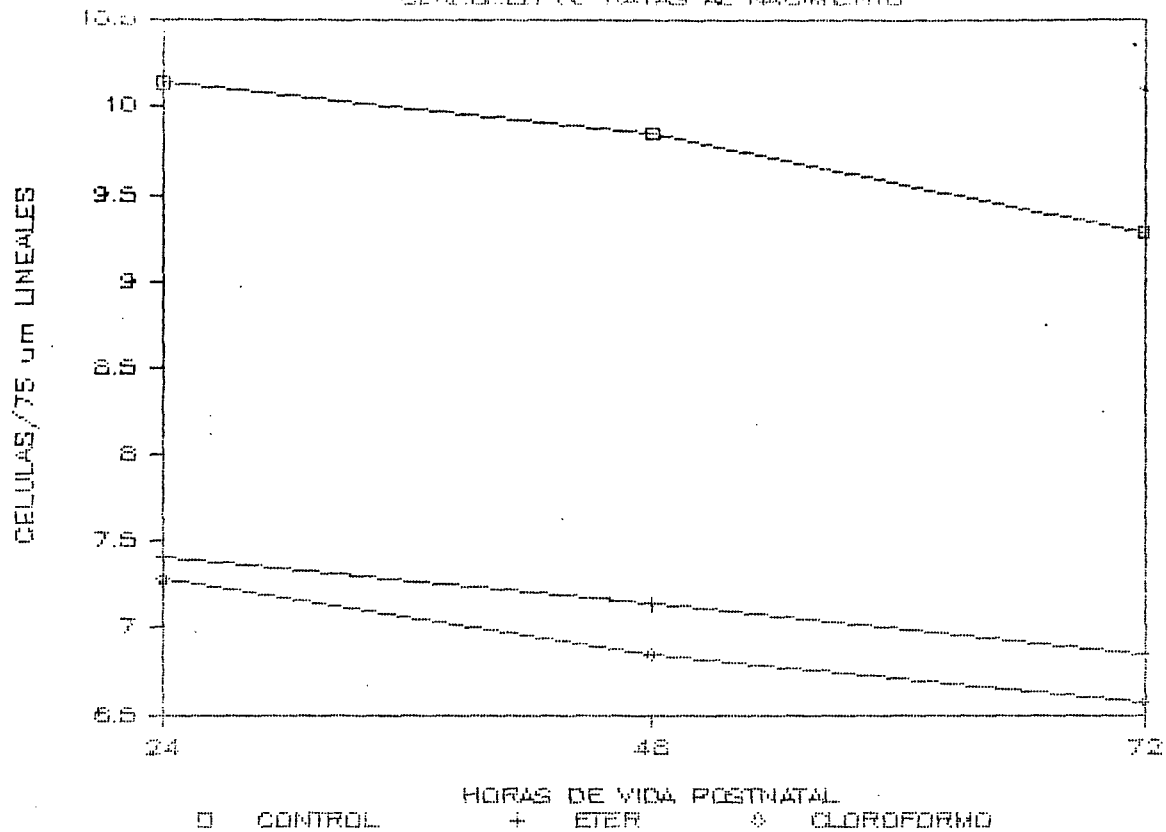
CEREBELO DE RATAS RECIENTE NACIDAS



Gráfica 4. Se muestran las diferencias en el espesor de la capa germinal externa de los tres grupos estudiados y en las diferentes edades, que sin embargo no fueron estadísticamente significativas respecto al control a una $P < 0.05$.

ALTERACIONES EN CELULAS DE PURKINJE

CEREBELO DE RATAS AL NACIMIENTO



Gráfica 5. Presenta la población de células de Purkinje presente en 75 μ m lineales de corteza cerebelar en crías de diferentes edades la diferencia entre los grupos experimentales y el control, resultó significativa a una $P < 0.05$.

FIGURA No. 1. Fotomicrografia que muestra un corte del vermis cerebelar de una rata control de 24 hrs. de vida, se observa la capa germinal externa (→), línea de células de Purkinje en la que están presentes algunas células granulares que emigraron (↗), la sustancia blanca (★) y el núcleo cerebelar (●), K-B 218 X.

FIGURA No. 2. Se muestra una sección del cerebelo de un animal de 24 hrs. de edad expuesto a éter, se aprecia la capa germinal externa con un espesor irregular (→), también se distingue la línea discontinua de células de Purkinje (↗), sustancia blanca (★) y el núcleo cerebelar (●) todas estas estructuras están menos diferenciadas que en la figura 1, K-B 218 X .

FIGURA No. 3. Fotomicrografia de un corte cerebelar de una rata de 24 hrs. de vida prenatalmente expuesta a cloroformo, se distingue la capa germinal externa (→), una irregular banda de células de Purkinje (↗), la materia blanca (★) y el núcleo cerebelar (●), K-B 218 X .

FIGURA No. 4. Fotomicrografia a mediana amplificación de un corte de cerebelo de animales control de 24 hrs. de vida en que se muestran algunas células de la capa germinal externa en migración (→), así como la ordenación incipiente de células de Purkinje (↗) y zona medular (★), K-B 830 X .

FIGURA No. 5. Corte de dos segmentos de folias de animales de 24 hrs. de vida expuestos a éter con una menor densidad celular en la capa germinal externa (→), células de Purkinje poco diferenciadas (↗) y zona medular (★), K-B 830 X .



FIGURA No. 6. Fotomicrografia correspondiente a una región de la corteza cerebelosa de un animal de 24 hrs. de vida prenatalmente expuesto a cloroformo en la que aparece la banda de células de Purkinje poco diferenciada () y la capa germinal externa con menor densidad celular y células en etapa de migración (), K-B 830 X .





FIGURA No. 7. Fotomicrografia a mayor amplificación de la parte profunda de una folia de animales control a las 72 hrs. de vida. Las células de Purkinje se distinguen en una monocapa (), también se aprecian células de la capa proliferativa (), células granulares en migración () y sustancia blanca (), K-B 850 X.




FIGURA No. 8. Corte de cerebelo de un animal de 48 hrs. del grupo expuesto a éter en el que se observan escasas células de Purkinje (), la capa germinal externa con amplio espesor () y escasas células granulares (), K-B 850 X.




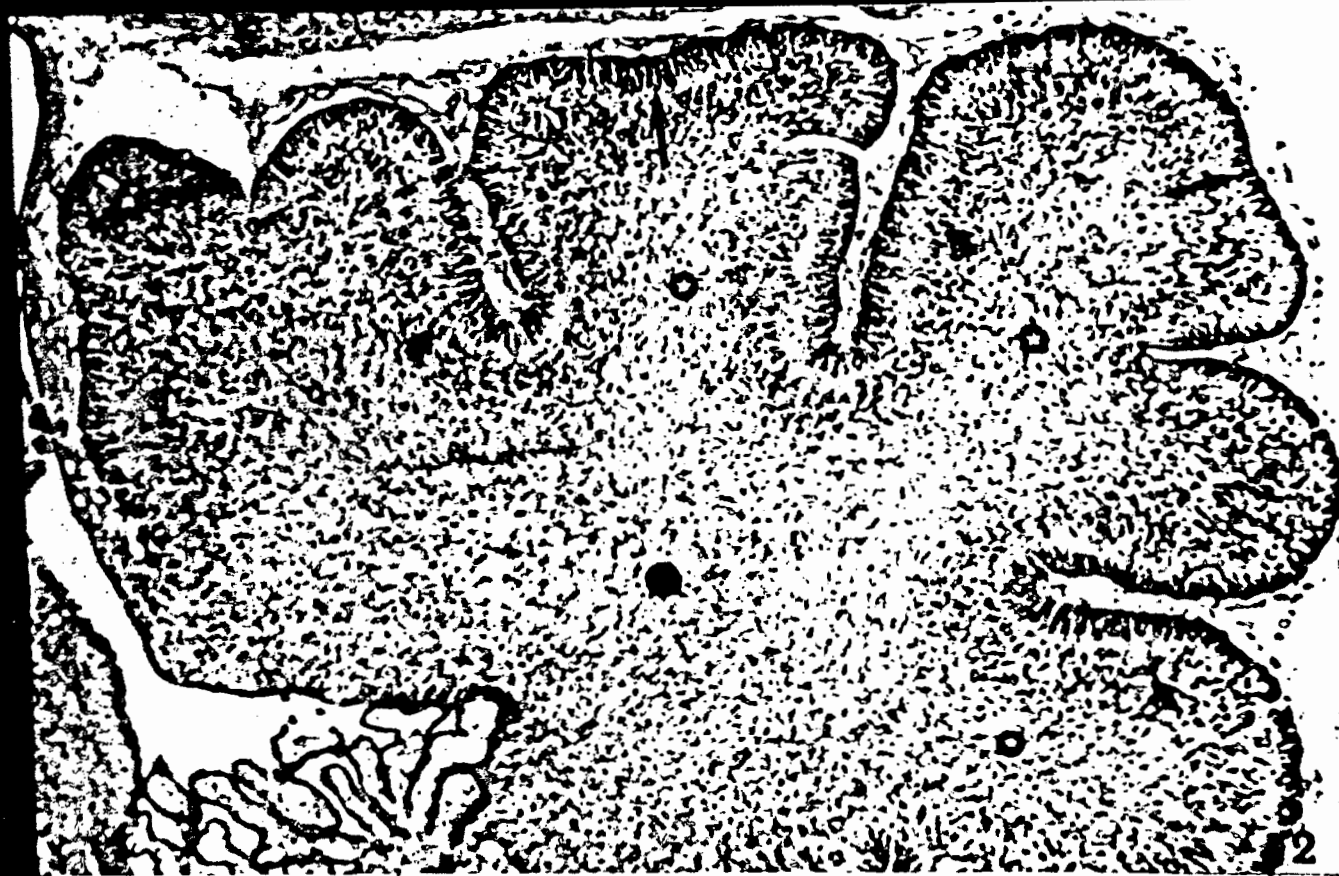
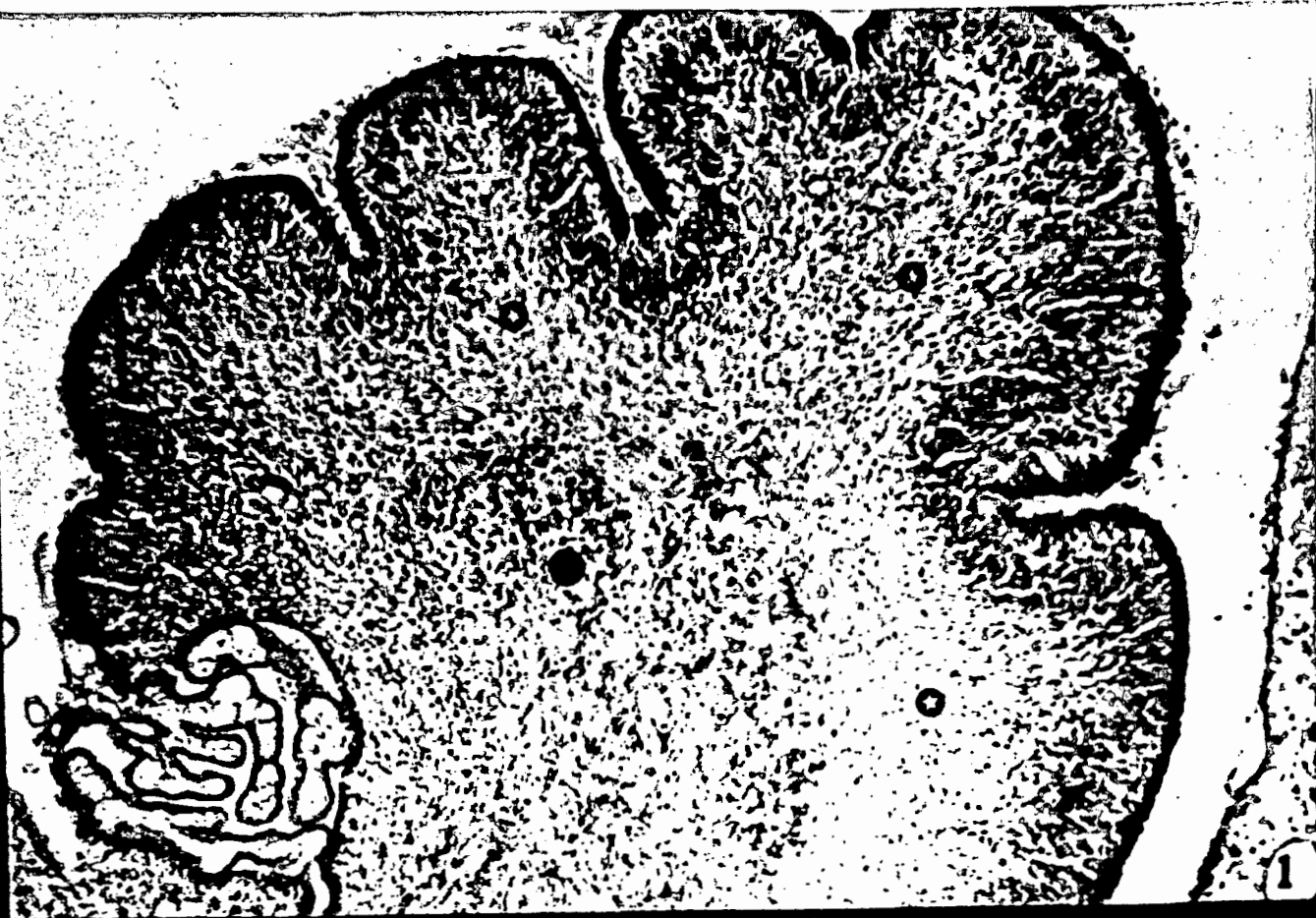
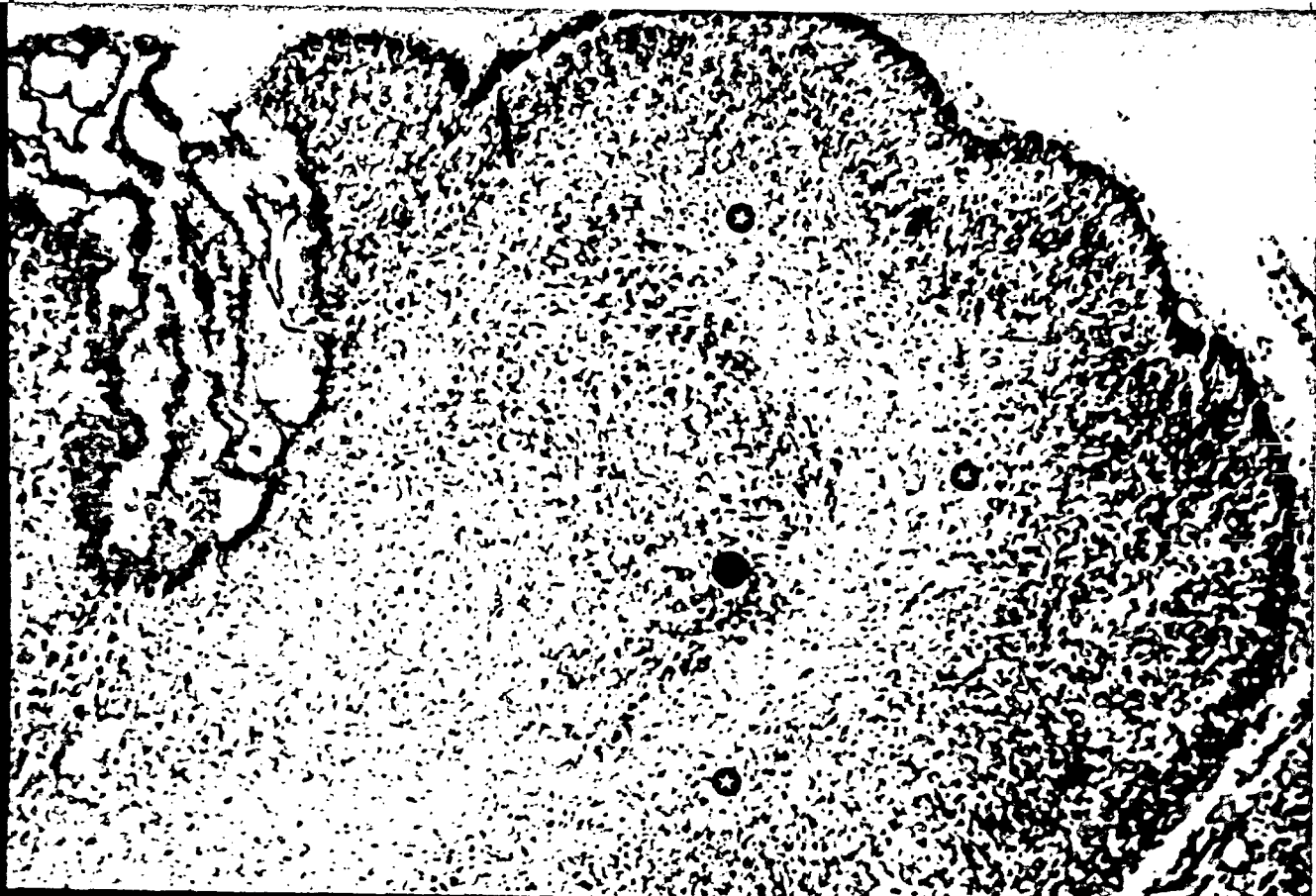
FIGURA No. 9. Parte inferior de la curvatura de una folia cerebelar de ratas de 72 hrs. de vida expuestas a cloroformo durante la vida prenatal, en la que se aprecia una distribución anormal de las células de Purkinje (), así como la capa germinal externa de límites irregulares () y algunas células granulares junto a las de Purkinje (), K-B 850 X.

FIGURA No. 10. Corte del vermis cerebelar de animales control en el que se observa el núcleo cerebelar (●), materia blanca (★), células de Purkinje (↗) y capa germinal externa (→), K-B 220 X.

FIGURA No. 11. Cerebelo de animales de 72 hrs. de vida del grupo expuesto a éter en el que se aprecia la zona medular (★), núcleo cerebelar (●), células de Purkinje (↗) y capa germinal externa (→), K-B 220 X.

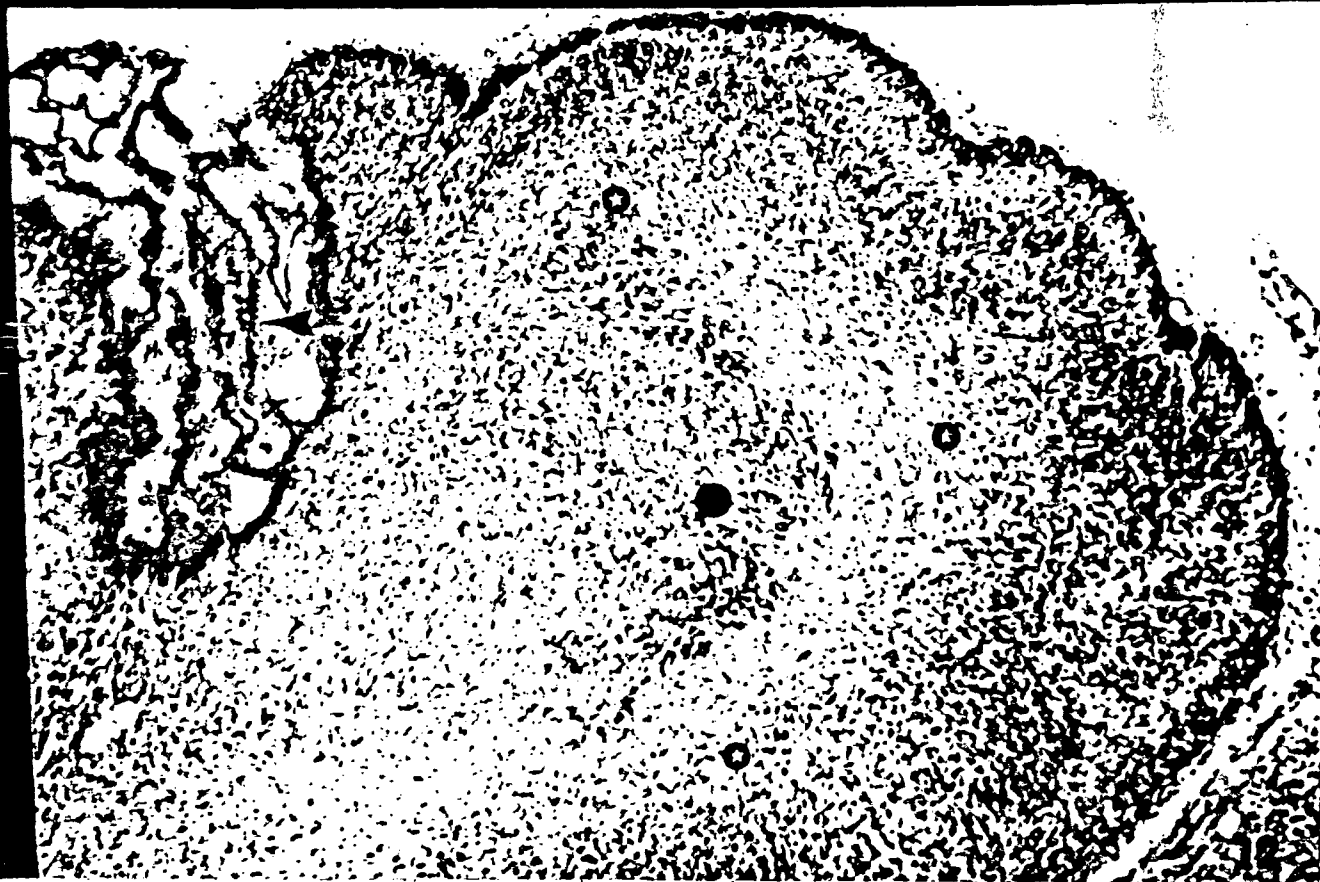
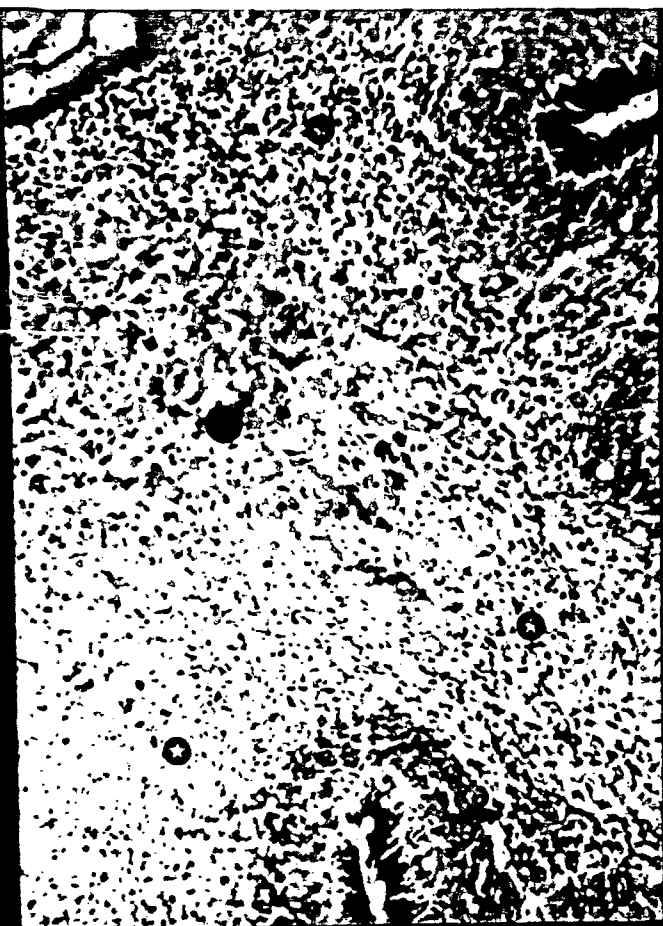
FIGURA No. 12. Fotomicrografía a baja amplificación de cerebelo de crías de 72 hrs. de vida en la que se distingue la falta de uniformidad del cerebelo en general. Zona medular (★), núcleo cerebelar (●), cuarto ventrículo (▶), K-B 220 X.

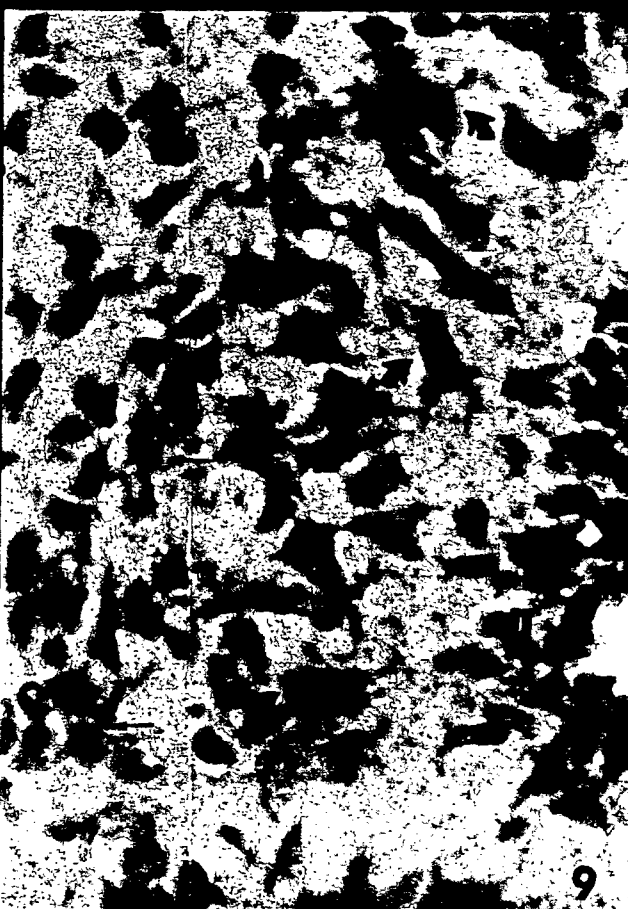
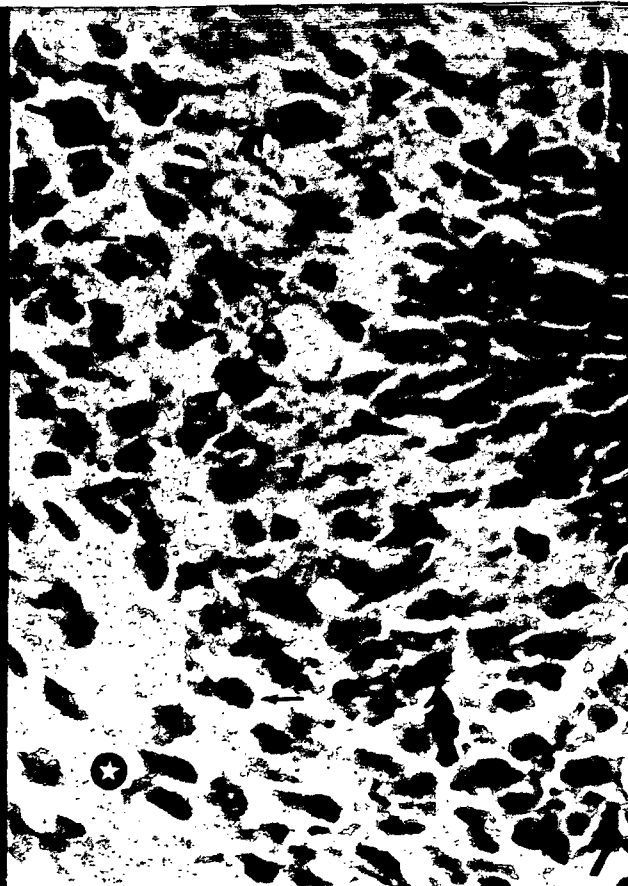




4

5





DISCUSION

La exposición crónica de ratas a éter o cloroformo al final de la gestación no afectó significativamente la prolificidad de las madres, probablemente debido al desarrollo fetal avanzado cuando ocurrió esta, lo que evitó la presentación de reabsorciones o abortos.

En un estudio con ratas preñadas se demostró que la anestesia profunda con halotano al 0.4% afectó el sistema cardiovascular de la madre y el desarrollo prenatal del feto por disminución hasta del 50% en la presión arterial sanguínea materna que provoca hipotensión, con reducción del aporte sanguíneo al útero, la restricción resultante del aporte transplacentario de aminoácidos, glucosa y oxígeno y la acumulación tisular de bióxido de carbono resultante del catabolismo fetal, por lo que se produce una desnutrición con hipoxia y acidosis fetal que provoca retardo del crecimiento intrauterino (13-15).

El cerebelo es particularmente vulnerable a la privación de nutrientes debido a que se encuentra en fase de neurogénesis durante la etapa perinatal de la rata, por lo que cuando se altera el metabolismo sistémico fetal la maduración de este órgano también se afecta notablemente, lo que no sucede con el cerebro (37,41).

En otros experimentos en que se aplicó anestesia con halotano al 2%, se redujo en un 58% la relación sangre/glucosa/cerebro en el feto, el estado energético disminuido del cerebro alcanza niveles críticos cercanos a la depleción completa de fosfocreatina, disminución en el contenido de ATP de 43% y aumento proporcional en los niveles de ADP y AMP, también se produce hipotensión y

bradicardia fetales que agudizan la incapacidad del cerebro para mantener sus funciones normales (13,20).

Se han descrito algunos trastornos vasculares generales por la anestesia con cloroformo en hembras preñadas, como bradicardia e hipotensión con consecuencias sobre el metabolismo del SNC fetal semejantes a las que se producen por halotano (17).

Al final de la gestación el feto tiene grandes demandas fisiológicas, la dependencia del metabolismo oxidativo aeróbico en la rata aumenta en la etapa perinatal y coincide con el incremento en la capacidad glucolítica después del nacimiento, como se demostró en cerebros de animales provenientes de ambas etapas que mostraron un aumento en la concentración de los intermediarios del ciclo del ácido cítrico y glucólisis (14).

Estas alteraciones metabólicas indican maduración de los sistemas enzimáticos cerebrales que intervienen en la producción de energía necesaria para el mantenimiento de la proliferación celular y aumento de volumen de los tejidos en desarrollo, estas modificaciones sugieren una importante participación mitocondrial y un mayor acarreo de electrones en la cadena respiratoria, por lo que se producen más moléculas de ATP a través de la fosforilación oxidativa (14,16).

Por lo anterior, para que el feto incremente su capacidad de utilizar el oxígeno molecular es necesario que suceda un aumento importante del número de mitocondrias presentes en la matriz citoplásmica celular.

La hipoxia fetal reduce el metabolismo energético celular, como consecuencia la actividad sintética cerebelar se inhibe

considerablemente, ocasionando retraso en el desarrollo del producto. En animales adultos se mantiene esta dependencia del cerebro a los niveles adecuados de oxígeno, ya que se sabe que cuando las concentraciones de este elemento disminuyen se produce pérdida de la conciencia.

En este estudio, las poblaciones celulares del cerebelo que resultaron más dañadas fueron las células granulares y de Purkinje, esto posiblemente se debió a que las primeras son las más numerosas en el cerebelo y las que más tardíamente maduran, mientras que las células de Purkinje presentan una mayor sensibilidad a los estímulos físicos o químicos debido a su gran capacidad funcional que tiene origen en sus numerosas conexiones interneurales, tal como se ha evidenciado en otros trabajos, en los que se puso de manifiesto que estas células son particularmente vulnerables durante ciertas etapas de su desarrollo (37).

En condiciones normales en la rata, al nacimiento solo algunas células granulares han emigrado desde la zona germinal externa para formar la capa granular interna y este evento continúa hasta el día 21 postnatal.

Las células de Purkinje en los animales recién nacidos se encuentran distribuidas irregularmente entre la capa molecular y la sustancia blanca, entremezcladas con células granulares (Fig. 1). a los tres o cuatro días de vida postnatal se empiezan a arreglar en una monocapa (42-44), esto no sucedió en los tejidos de los animales experimentales de este estudio ya que se observó una aparente desorganización de estas células, lo que indica un retardo en el desarrollo cerebelar (Fig. 12), además la capa germinal

externa reveló un mayor espesor (Gráfica 4) debido a la presencia de células que no habían iniciado su migración (Figs. 5 y 6).

A las 72 h de edad en las crías experimentales las células de Purkinje se encontraron bastante desorganizadas (Figs. 8 y 9), se tienen reportes de que el desarrollo de estas células está sincronizado con la maduración de las microneuronas cerebelares, por lo que cuando se alteran se afectan también las otras estirpes interconectadas, por lo que resultan trastornos complejos de las funciones cerebelares (45).

Entre las principales poblaciones cerebelares están las células granulares, estrelladas, en canasta, de Golgi y del núcleo cerebelar profundo, el retardo en la maduración del cerebelo desencadena alteraciones de la funcionalidad específica de estas neuronas, por lo que es posible suponer que los daños funcionales son más graves de los que se observan en el estudio histopatológico, posiblemente las manifestaciones más notables correspondan a la actividad locomotora de la que el cerebelo es regulador.

El cerebelo recibe numerosas aferencias del cerebro y medula espinal por medio de las fibras musgosas y trepadoras las cuales realizan el contacto interneuronal a nivel de la corteza cerebelar. Las células de Purkinje hacen sinápsis con estas fibras y con las demás neuronas cerebelares, y por medio del cilindroeje se comunican con el núcleo cerebelar profundo o el núcleo vestibular lateral en donde se establecen sinápsis para las eferencias del cerebelo (46).

Las células granulares realizan numerosas sinapsis excitatorias con las fibras musgosas y neuronas cerebelares por medio de fibras paralelas y dendritas. La corteza cerebelosa posee la misma constitución celular en toda su extensión y su función depende del origen de sus aferencias y el destino de las eferencias.

Las funciones cerebelares se resumen en la coordinación de los grupos de músculos voluntarios y semivoluntarios que participan en movimientos simples o complicados como caminar, sentarse, correr, etc. y además en el equilibrio, por lo que las consecuencias patológicas que se pueden provocar por la alteración en la interacción neuronal del cerebelo son; hipotonia, astenia, asinèrgia, dismetria, ataxia y adiadoquinesis, entre los principales transtornos (46).

En base a la información previamente descrita es posible entender la vulnerabilidad del cerebelo en desarrollo a distintos agentes nocivos, ya que por la complejidad en su organización neuronal las alteraciones sobre una población celular provocan numerosos efectos secundarios.

Entre algunos de los agentes químicos que tienen una estructura molecular análoga a la del éter y cloroformo y que por lo tanto son potencialmente capaces de provocar daños semejantes se encuentran:

Eteres no Halogenados; metílico propílico (Metopril), isopropílico metílico, divinílico (Viniteno), metílico etílico, etílico N-propílico y etílico vinílico (Vinimar).

Eteres Cíclicos; ciclometílico (Cípromé), cicloetilico (Cipreth) y ciclopropílico.

Hidrocarburos Halogenados; halotano, tricloroetileno, cloruro etílico, halopropano y norflurano.

Hidrocarburos Cíclicos; ciclopropano y ciclobutano.

Hidrocarburos Alifáticos; etileno (Amileno), metano (Pentane) y acetileno (Crotonileno) (4-7).

La exposición a estos agentes inhalantes puede suceder de diversas formas ya que algunos son anestésicos de uso común tanto en la clínica humana como veterinaria, por lo que existe contacto con pacientes y personal médico, otros ya no se usan para este propósito por sus efectos secundarios adversos y características físicas de flamabilidad, explosividad, etc., sin embargo por su propiedad de solventes lipídicos se emplean ampliamente en la industria y en laboratorios químicos, por lo que sucede una exposición laboral.

En los tejidos experimentales examinados se observó una reducción de la cantidad normal de células de Purkinje y granulares (Grafica 5), esta depoblación posiblemente se debió al efecto neurocitotóxico del éter y cloroformo sobre estas poblaciones celulares indiferenciadas, se sabe que los agentes liposolubles difunden libremente a través de la placenta, por lo que alcanzan la circulación sistémica fetal y dañan el SNC debido a que todavía no se forma la barrera hematoencefálica en los productos, la formación de esta se completa aproximadamente hasta la tercera semana postnatal en la rata (45).

Por la exposición crónica que se provocó en el presente

estudio se alteró la ontogenia normal del SNC fetal y la integridad celular, ya que en algunos cortes de animales de las primeras horas de nacidos se observaron neuronas necróticas que posteriormente desaparecieron, esto se hizo evidente en el análisis semicuantitativo.

El cloroformo provocó alteraciones más severas que el éter posiblemente debido a que tiene un efecto más marcado sobre el sistema cardiovascular, causa depresión del miocardio y afecta al centro nervioso vasomotor por lo que resulta hipotensión con la consecuente disminución de la concentración normal de nutrientes y oxígeno (1-6).

En otros trabajos sobre la exposición del cerebelo inmaduro al etanol, barbitúricos, monóxido de carbono y otros agentes químicos, se han descrito alteraciones que van desde procesos degenerativos celulares reversibles y trastornos en la función enzimática, hasta necrosis, principalmente en la población celular granular y de Purkinje (30-40).

En el cerebelo de ratas recién nacidas de madres expuestas a etanol se encontró una reducción en el número de estas estirpes, sin que las demás células presentaran cambios morfológicos, después de una rehabilitación nutricional de dos meses, las células remanentes se reorganizaron de tal forma que su distribución fue semejante a la de los controles (37).

En general, nuestros resultados están de acuerdo con los reportados por otros autores en estudios semejantes, en los que también resultaron afectadas las dos poblaciones neuronales descritas con trastornos comparables (30-40) y que confirman la

mayor vulnerabilidad del cerebelo de animales en desarrollo a factores adversos, comparado con otras estructuras del SNC, ya que en otro estudio con éter y cloroformo bajo las mismas circunstancias no se apreciaron anomalías en la corteza cerebral de los productos (41).

En base a la naturaleza de las lesiones cerebelares observadas en este trabajo, que consistieron sobre todo en alteraciones de la citoarquitectura y disminución de la población celular, se puede inferir la posibilidad de una rehabilitación postnatal tardía, consistente en una reorganización celular del cerebelo, sin que se recuperen las células perdidas.

Hasta la fecha se han realizado pocos estudios fisiológicos en sujetos afectados durante el desarrollo del cerebelo para analizar las consecuencias funcionales resultantes, sin embargo es posible inferir que las funciones de equilibrio resultan de las más severamente afectadas en individuos adultos.

Los datos obtenidos en el presente estudio demuestran la mayor vulnerabilidad del cerebelo inmaduro a los factores extrínsecos nocivos aunque no es posible calcular la severidad de los efectos secundarios, también se pudo confirmar la mayor severidad del cloroformo, a pesar de que las lesiones que provocó no fueron graves, sin embargo debe evitarse el contacto prolongado de madres gestantes con solventes orgánicos, ya que a pesar del reducido tiempo total de exposición en este estudio se produjeron daños cerebelares y otras alteraciones corporales.

CONCLUSIONES

1.- La exposición crónica a cloroformo durante el último tercio de la gestación produjo retardo en el desarrollo corporal y alteraciones cerebelares en los productos

2.- Los trastornos corporales y del cerebelo de la progeñie prenatalmente expuesta a éter fueron de menor severidad.

3. Entre las alteraciones más importantes del cerebelo de ambos grupos experimentales se observó un retraso en la migración de células granulares presentes en la capa germinal externa y desorganización de las células de Purkinje, así como disminución del número normal de estas dos estirpes.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- SIDNEY ORTH O. (1969): Agentes Volátiles; Farmacología Médica. Ed. La Prensa Médica Mexicana. Mex. p. 106-120.
- 2.- VANDAM L.D. (1969): Captación y transporte de los anestésicos y periodos de la anestesia. Farmacología Médica. Ed. La Prensa Médica Mexicana. Mex. p. 90-98.
- 3.- LUM W.V. y JONES E..W. (1983): Anestésicos Inhalados; Anestesia Veterinaria. Ed. Uteha. Mex. p. 106-120.
- 4.- MEYER JONES L. (1982): Anestésicos por Inhalación; Farmacología y Terapeutica Veterinaria . Ed. Uteha. Mex. p. 134-152.
- 5.- COLLINS V.J. (1978): Anestésicos Inhalados; Anestesiología. Ed. Interamericana. p. 2-6.
- 6.- GRAY T.C. y NUNN J.F. (1976): Efectos circulatorios, respiratorios y metabólicos de los anestésicos por inhalación; Anestesia General. Ed. Salvat, tomo I. Mex. p. 483-503.
- 7.- TERREL R.C. (1984): Physical and chemical properties of anaesthetics agents. Br J Anaesth, 56 suppl 1:3s-6s.
- 8.- COHEN E.N. (1981): Metabolism of the volatile anaesthetics. Br J Anaesth, 53 suppl 1:49s-62s.
- 9.- MAZZE R.I. (1984): Metabolism of the inhaled anaesthetics: Implications of enzyme induction. Br J Anaesth, suppl 1:27s-38s.
- 10.- HALSEY M.J. (1984): Reassessment of the molecular structure functional relationships of the inhaled general anaesthetics, 56 suppl 1:9s-24s .
- 11.- CATON D. (1977): Obstetric anesthesia and concepts of placental transport; A historical review of nineteenth century. Anesthesiology 43:100-112.
- 12.- COHEN E.N. (1978): Toxicity of inhalation anaesthetics agents. Br J Anaesth 50:665-676.

- 13.- VANUCCI R.C. (1978): Oxidative metabolism in fetal rat during maternal anesthesia. *Anesthesiology* 48:238-247.
- 14.- HOLZTMAN S.D. (1978): Maternal anesthesia and fetal neuropharmacology. *Anesthesiology* 48:235-246.
- 15.- AL-ABRAK M.H., MIRA K.M. y EL- AYYAT A. (1979): Effect of repeated administration of subanaesthetic concentrations of ether and halothane on the rat. *Br J Anaesth* 51:385-391.
- 16.- FORSTER A., VAN HORNK, MARSHAL L.F. y SHAPIRO H.N. (1978): Anaesthetics effects on blood-brain barrier during acute arterial hipertension. *Anesthesiology* 49:26-34.
- 17.- PAINE J.P. (1981): Chloroform in clinical anesthesia. *Br J Anaesth*, 52 suppl 1:11s-15s.
- 18.- HUTCHENS K.S. y KUNG M. (1985): Experimentation with chloroform. *Am J Med* 78:715-718.
- 19.- LOPEZ AD. y AGUIRRE V. (1975): Procedimiento técnico de los extendidos celulares; Técnica de Papanicolaou (modificada): Introducción al citodiagnóstico. Univ. de Guad. p 49-73.
- 20.- BIELH R.D., TWEED W.A, COTE J., WADE J.G. y SITAR D. (1983): Effect of halothane on cardiac output and regional flow in the fetal lamb in utero. *Anesth Analg* 62:489-492.
- 21.- WASSEF M. (1985): Transient biochemical compartmentalization of Purkinje cells during early cerebellar development. *Dev Biol* 111:129-137.
- 22.- TRINER L., VULLIEMOZ Y. y VEROSKY M. (1981): Halothane effects on cGMP and control of motor activity in mouse cerebellum. *Anesthesiology* 43:193-198.
- 23.- 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. p. 289-298.

- 24.- MULLER V. y HEMSEM H. (1984): Regional differences in the structure of Purkinje cells of the rat. *Brain Res* 42:243-251.
- 25.- CALVET J. y CAMACHO-GARCIA R. (1985): The Purkinje cell dendritic tree; A computer-aided study of its development in the cat in culture. *Brain Res* 331:235-250.
- 26.- FERIA VELASCO A. y KARNOVSKI M.J. (1970): Preservación optima del sistema nervioso central por perfusión con glutaraldehido para estudio estructural. *Arch Invest Med Mex.* 1:201-217.
- 27.- MARTOJA R. y MARTOJA-PIERSON A. (1970): Histología general y citología; Inclusión: Técnicas de histología animal. Toray-Masson. S.A. Barcelona Esp. p. 24-76.
- 28.- KLUVER H. y BARRERA E. (1953): Methode for myeline and nerve cells. *J Neuropath Exp Neurol* 12:400-412.
- 29.- DISBREY B.D. y RACK J.H. (1970): Haematoxolin and eosin, Harris haematoxilin and eosin; Histological laboratory methode. Ed. E. and S. Livingstone, Inglaterra, p. 99-143.
- 30.- FISHMAN R.H.B., ASHER ORNOY y YANAI J. (1983): Cerebellar degeneration after early exposure to phenobarbital in mice. *Exp neurol* 79(1): 212-222.
- 31.- BIGGIO G., GUIDOTTI A. y COSTA E. (1977): On the mechanism of the decrease in cerebellar cyclic GMP content elicited by opiate receptor agonist. *Naunyn-schmiedebergs Arch pharmacol* 296:117-121.
- 32.- YU WA-HUA A. (1976): The effect of 5-bromodeoxiuridine on the postnatal development on the rat cerebellum. A biochemical study. *Brain Res* 118:281-291.
- 33.- STORM J.E. y FLETCHER L.D. (1985): Alteration in postnatal ontogeny of cerebellar norepinefrine content following chronic prenatal carbon monoxide. *J Neurochem* 45:965-969.
- 34.- SYVERSEN TORE L.M., TOTLAND G. y FLOOD R.P. (1981): Early morphological changes in rat cerebellum caused by single dose of

methilmercury. Arch Toxicol 47:101-112.

35.- MARES V., E. SCHERINI, M. BIGIOGERA y G. BERNOCHI (1986): Influence of CIS- dichlorodiamine platinum on the structure inmature rat cerebellum. Exp Neurol 9:246-248.

36.- YANAI J. y WAKNIN S. (1985): Comparison on the effect of barbiturate and ethanol given to neonates on the cerebellar morphology. Acta Anat 123:145-147.

37.- BAUER-MOFFETT C. y ALTMAN J. (1977): The effect of ethanol chronically administered to preweanling rats on cerebellar development: a morphological study. Brain Res 119:249-268.

38.- TAKEUCHI Y., HISANAGA N., YUICHIRO O., TOYOAKI O., HAGAMUCHI Y. y SUSUMO O. (1981): Cerebellar disfunction caused by sniffing of toluene containing thinner. Ind Health 19: 163-169.

39.- FREDRICK J. SEIL, BLANK N.K. y LEIMAN A.L. (1979): Toxic effects of kainic acid om mouse cerebellum in tissue culture. Brain Res 161:253-265.

40.- STEVENS W.C., EGER E.I., WHITE A., HALSEY M.J., MUNGER W., GIBBONS R.D., DOLAND W. y SHARGEL R. (1974): Comparative toxicities of halothane, isoflurane and diethyl ether in subanesthetics concentrations in laboratory animals. Anesthesiology 42:408-419.

41.- GARCIA-ESTRADA J., VAZQUEZ-MARTINEZ M. y GARZON- DE LA MORA 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 5:32-35.

42. ALTMAN J. (1972): Postnatal development on the cerebellar cortex in the rat; I : The external germinal layer and the transitional molecular layer. Comp. Neur. 145:353-398.

43.- ALTMAN J. (1972): Postnatal development on the cerebellar cortex in the rat; II : Phases in the maturation of Purkinje cells and of molecular layer. Comp. Neur. 145:399-464.

44.- ALTMAN J. (1972): Postnatal development on the cerebellar cortex in the rat; III : Maturation of the components of the granular layer . Comp. Neur. 145:465-514.

45.- ALTMAN J. and BAYER A. (1978): Prenatal development on the cerebellar system in the rat; I : Citogenesis and histogenesis of the deep nuclei and cortex of the cerebellum. J. Comp. Neur. 179:23-48.