
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



ALTERACIONES EN CORTEZA CEREBRAL DE RATAS
AL NACIMIENTO COMO RESULTADO DE LA EXPOSICION
ANESTESICA PRENATAL MATERNA A ETHER Y CLOROFORMO.
ESTUDIO HISTOLOGICO.

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

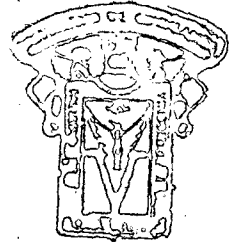
MIGUEL VAZQUEZ MARTINEZ

Asesor: M. en C. Joaquín García Estrada

GUADALAJARA, JALISCO

1986

† En memoria de mi hermano
Alfonso.



OFICINA DE
ESTUDIOS CIENTÍFICOS

A mis padres y hermanos. Gra
cias por el apoyo y la con--
fianza que siempre me han -
brindado.

A mi asesor, M. en C. Joaquín
García Estrada le agradezco -
su valiosa ayuda, que siempre
fue constante y desinteresada.

A X6chitl Calderón G., por su
colaboración y asesoría en el
procesamiento del material pa-
ra el estudio histológico.

A mis amigos: Esther, Cecilia
y Ricardo que ayudaron desinte-
resadamente en la realización
de este trabajo.

A todas las personas que de una
u otra manera ayudaron en la ela
boración de esta tesis.

GRACIAS.

MIEMBROS DEL JURADO:

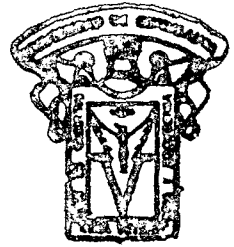
MVZ ENRIQUE LOPEZ PAZARON

MVZ ELENO AYALA GUZMAN

MVZ JORGE SALDAÑA SILVA

MVZ RAFAEL ESCALANTE MARTINEZ

MVZ MARIO ALBERTO RAMIREZ H.



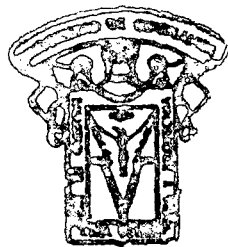
OFICINA DE
PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

ALTERACIONES EN CORTEZA CEREBRAL DE RATAS AL NACIMIENTO COMO RESULTADO DE
LA EXPOSICION ANESTESICA PRENATAL MATERNA A ETHER Y CLOROFORMO. ESTUDIO -
HISTOLOGICO.

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION CIENTIFICA
DE LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA. MODULO DE MORFOLOGIA EXPERI--
MENTAL.

INDICE:

	Pag.
Introducción	1
Planteamiento del problema	7
Hipótesis	8
Objetivos	9
Material y métodos	10
Modelo experimental	13
Resultados	14
Discusión	29
Conclusiones	33
Resumen	34
Referencias Bibliográficas	35



OFICINA DE
FUSIÓN CIENTÍFICA

INTRODUCCION.

Los anestésicos generales son sustancias que se utilizan para abolir la percepción de estímulos dolorosos, ocasionan una depresión progresiva y selectiva del Sistema Nervioso Central (SNC) hasta llegar a la inconciencia plena, esto depende del tipo de sustancia empleada y la dosis que se administre.

Las principales vías de aplicación son intravenosa e inhalatoria, los agentes volátiles al aspirarse sobrepasan la presión intra-alveolar y al mezclarse con el oxígeno se incorporan a la sangre que los transporta hasta el cerebro, este órgano tiene un flujo sanguíneo cercano a los 54 ml por c/100g de tejido/min., esto equivale a un 15 % del gasto cardíaco total, por lo que rápidamente recibe una cantidad importante de las sustancias anestésicas disueltas en la sangre y se inicia el efecto farmacológico depresivo de estas, siempre y cuando difundan libremente al parénquima cerebral.¹

Los anestésicos volátiles inician sus efectos en la corteza cerebral, continúan por la cuerda ganglionar y médula espinal donde afectan primero funciones sensitivas y después motoras, el bulbo es el centro nervioso más resistente a la depresión que provocan estos agentes y sólo se altera su funcionalidad normal en casos de sobredosis.²

Antecedentes:

El primer agente anestésico general que se empleó clínicamente fue el óxido nitroso (N_2O) y poco tiempo después el éter dietílico ($CH_3CH_2OCH_2CH_3$), éste ganó popularidad más rápidamente que el primero.^{3,4}

El éter se produce por la acción catalítica del ácido sulfúrico sobre el alcohol etílico; es un líquido incoloro muy volátil y flamable, se evapora a $31^{\circ}C$ y contiene 96-98 % de dietil éxido y el resto de alcohol y agua. Fue descubierto y sintetizado por Valerius Cordus en 1546, en un principio se le utilizó como solvente de grasas hasta que el 30 de marzo de 1842 se introdujo por primera vez en la anestesia quirúrgica por el Dr. Crawford W. Long de Jefferson, Georgia para extirpar un tumor de cuello.³⁻⁸

La primera demostración pública de la anestesia general con éter la efectuó el Dr. William T. G. Morton el 16 de octubre de 1846 en un hospital de Massachussets.^{3,9}

Los anestesiistas utilizaron ampliamente el éter, sin embargo se estudiaron otros productos como el cloroformo (CHCl_3) químicamente conocido como triclorometano. Es un compuesto halogenado preparado por cloración directa del metano, es refractario a la luz, se evapora a $61-62^\circ\text{C}$, no es flamable y es completamente insoluble en agua, se produjo independientemente en 1831 por Justus von Liebig en Alemania, por Soubeiran en Francia y por Samuel Guthrie en Nueva York, se utilizó por primera vez como anestésico general en 1847 por James Y. Simpson, Profesor de la Universidad de Edinburgo, Escocia. ³, 10-12

El cloroformo al igual que el éter se mezcla muy bien con el oxígeno, pero irrita en menor grado el tejido bronquial y tiene un período de inducción más corto, el riesgo de muerte por sobredosis es mayor con cloroformo. ³⁻⁸, 12

Desde los inicios de la anestesia clínica en la década de 1840, a ambos agentes se les consideró como anestésicos generales clásicos para cirugía mayor, conjuntamente con el óxido nitroso fueron los productos de uso más generalizado durante el siglo XIX tanto en humanos como en animales ³⁻⁸, 12

Uno de los usos más frecuentes para ambos productos fue la anestesia obstétrica, por lo que se discutió ampliamente la inocuidad de su acción en la hembra gestante y los fetos, sin poder llegar a definir con precisión la producción de efectos adversos, a pesar de esto, ambos agentes fueron bien aceptados por los médicos de la época. ¹⁰, 12, 13

Transporte placentario y vulnerabilidad fetal:

En 1842 la información sobre el paso de drogas a través de la placenta era contradictoria, Walter Channing realizó experimentos con éter que se aplicó a hembras como anestesia durante la labor de parto y afirmó que dicho agente no cruzaba la placenta, ya que él no detectó su olor característico en el cordón umbilical del producto, esto ocasionó que la anestesia con éter se utilizara en obstetricia sin ningún temor hasta que otros investigadores demostraron el transporte de varias sustancias a través de la placenta, entre ellas el éter y el cloroformo.

En estudios adicionales se comprobó que estos agentes circulan en la sangre fetal de manera sistémica, se determinó la presencia de metabolitos secundarios en la orina y sangre de fetos, así como en el líquido

amniótico cuando las madres fueron expuestas a éter y cloroformo antes del parto.¹³

Aun cuando se demostró el paso de los anestésicos volátiles de la sangre materna a la fetal, se comprobó que el coeficiente de solubilidad es menor en esta última, debido a las diferencias en la concentración y configuración de la hemoglobina, el contenido de proteína es menor en la hemoglobina fetal así como el contenido lipídico.^{14,15}

Cuando se estudió la acción de éter y cloroformo sobre el metabolismo trasplacentario se encontraron alteraciones en el intercambio gaseoso que ocasionan hipoxia del producto y un trastorno del metabolismo energético cerebral.^{13,16} Está demostrado que existe una acción directa adversa de los anestésicos volátiles sobre la actividad mitocondrial neuronal y la circulación sanguínea del producto y de la madre, en el primer caso las lesiones son más severas ya que se afecta directamente el desarrollo del sistema nervioso y la posterior funcionalidad de otros órganos.¹⁶⁻²⁰

Los efectos de estos agentes sobre el SNC del feto en etapas primarias o a término del desarrollo se basan en su alta solubilidad lipídica y en el elevado contenido de lípidos en el cerebro, además de que el tejido fetal es muy vulnerable por su inmadurez.²¹⁻²³ Debido a que el cerebro se desarrolla más aceleradamente en el último tercio de la gestación y puesto que los anestésicos volátiles ocasionan una alteración del metabolismo energético a nivel de corteza, la exposición prenatal a estos agentes afecta severamente el desarrollo cerebral del producto.^{16-18, 22-25}

Entre los factores responsables de la alteración cerebral se encuentran: el incremento del metabolismo energético en el cerebro fetal en respuesta a las intensas demandas fisiológicas, el aumento de la oxidación mitocondrial de los productos que se generan en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos y el flujo electrónico a nivel de cadena respiratoria, lo que trae consigo una aceleración del desarrollo encefálico, después de esta etapa la tasa metabólica se reduce.^{16,17, 23-28}

En el último tercio de la gestación también se incrementan las cantidades de lípidos cerebrales presentes tanto en membranas celulares como en terminales nerviosas, estos son: fosfátidos o fosfolípidos (50%),

incluyen cefalinas, lecitinas y esfingomielinas, los glucolípidos (25%) - formados por cerebrósidos, sulfátidos y gangliósidos, y un 25% de colesterol no esterificado y otros lípidos, en cerebros completamente desarrollados el 51-54% de los sólidos totales corresponde a los lípidos.²⁷⁻²⁸

La exposición crónica a concentraciones subanestésicas de éter en ratas adultas afecta en forma severa la fertilidad de las mismas y disminuye significativamente el peso de los productos al nacimiento.²⁹

Metabolismo y toxicidad general:

Debido a la solubilidad que presentan en sangre y tejidos corporales los anestésicos volátiles llegan fácilmente al cerebro y producen un aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, la cual está presente sólo en cerebros completamente desarrollados no en fetos y neonatos.^{12, 14, 24, 30}

El éter y el cloroformo al igual que la mayoría de los anestésicos volátiles difunden de las vías respiratorias al torrente sanguíneo y ejercen su acción anestésica en el cerebro, luego regresan a los pulmones en un alto porcentaje donde se eliminan con el aire espirado, una cantidad importante de estas sustancias entra en contacto con el hígado para después excretarse como productos no volátiles en la bilis hacia el tracto digestivo y en la leche. En los riñones se metaboliza una pequeña cantidad del anestésico circulante y mediante la orina se excreta gran cantidad de dichos agentes.³¹⁻³³

Durante el metabolismo del éter, éste se une a algunos ácidos como el palmítico, esteárico y oleico, así como a glicéridos de diferente longitud de cadena, colesterol y otros productos como etanol, ácido acético y acetaldehído, esta forma se incorpora a la ruta metabólica de los mismos hasta su eliminación. El cloroformo se transforma en triclorometanol el cual a su vez se descompone en fosgenos (COCl_2) los cuales circulan en sangre en forma de gas, dichos fosgenos son oxidativamente desclorinizados a dióxido de carbono y iones cloro que se eliminan como tales.^{10, 31-35}

El cloroformo y éter producen náuseas por su acción irritante en ductos bronquiales aunque el éter es más severo, éste produce además nefrotoxicidad y daño hepático leve. El cloroformo por su parte causa depresión del músculo cardíaco e hipotensión arterial periférica, así como

hepatotoxicidad con áreas de necrosis, afecta ligeramente a los riñones y provoca hemólisis intravascular. 10, 12, 36-39

Usos del éter y cloroformo en la actualidad:

En los últimos años el éter y cloroformo han sido desplazados paulatinamente de la anestesia clínica por la introducción de nuevos productos anestésicos volátiles, algunos derivados de ellos mismos, como el viniteno (éter divinílico) y el fluoroxeno (éter vinílico) que tuvieron poca aceptación, el enflurano e isoflurano que son éteres halogenados y fluorinados, y principalmente el halotano, que pertenece al grupo de los hidrocarburos halogenados al igual que el cloroformo, el halotano es el más utilizado hoy en día. 3, 4, 7, 40, 41

Los anestésicos de aplicación intravenosa como los barbitúricos compiten con gran éxito, sin embargo, los volátiles tienen una gran importancia en animales, principalmente pequeñas especies de laboratorio donde el éter es muy utilizado y como recurso de emergencia para otras especies cuando no se dispone de otros productos.

Otro uso muy generalizado para estos compuestos y sus derivados es la industria por sus propiedades solventes de grasas, es por esto que la exposición de muchos trabajadores es repetida y constante por lo que pueden provocarse serias complicaciones en el S.N.C., tales como disminución de la percepción externa acompañada de retardo en la respuesta a los estímulos, esto sucede tanto en adultos como en infantes y especialmente en fetos cuando se exponen hembras gestante. 21, 42-44

Importancia de los anestésicos volátiles en medicina veterinaria:

Los agentes volátiles de uso más difundido en la actualidad son el enflurano, isoflurano, halotano y en menor proporción éter y cloroformo, últimamente se ha introducido el guayacol glicérfico éter en aplicación intravenosa. 6, 45-47

Los estudios en anestesia veterinaria sobre éter y cloroformo reportan efectos tóxicos en riñones e irritación del tejido bronquial y pulmonar a consecuencia del primero, así como hepatotoxicidad con necrosis y depresión cardíaca en el caso del cloroformo, también se mencionan algunos efectos carcinógenos y teratógenos como hidrocefalia, hipoplasia cardi

cal cerebral y disminución en el desarrollo por exposiciones repetidas a este último agente. 6, 45, 47-51

Por todo lo anteriormente expuesto se decidió hacer este estudio que tiene por objeto investigar las alteraciones que se producen en el SNC de fetos en desarrollo cuyas madres fueron expuestas a éter y cloroformo durante los últimos días de la gestación.

Hasta el momento estas alteraciones no han sido claramente entendidas, por lo que se considera importante aumentar el conocimiento disponible a este respecto, pues aunque estos agentes anestésicos son poco utilizados en clínica de humanos y animales, se usan rutinariamente en laboratorios para la ejecución de manejos cortos dolorosos y como métodos de eutanasia.

Otra de las razones para realizar este trabajo es la analogía química de éter y cloroformo con otros agentes anestésicos volátiles de uso más difundido como el enflurano, isoflurano y halotano, éstos a pesar de tener un índice de toxicidad más bajo que los primeros son capaces de atravesar la barrera placentaria y ejercer su acción sobre el metabolismo de los productos, su efecto es muy similar al de estos dos agentes por lo que producen alteraciones comparables. 4, 7, 12, 31, 38-41, 52-54

Debido a que el éter y cloroformo por mucho tiempo representaron el prototipo de los anestésicos volátiles generales, se eligieron como modelo experimental para este trabajo, cuyos resultados serán de utilidad para otros estudios semejantes con compuestos análogos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

El uso de anestésicos volátiles es frecuente en la actualidad, la mayoría de estos agentes actúan como solventes lipídicos por lo que tienen una elevada afinidad por membranas biológicas maternas y fetales. Puesto que el cerebro contiene una alta concentración de lípidos y es muy vulnerable durante la vida prenatal, es posible que la exposición materna a los vapores de estos anestésicos durante la última etapa de la gestación ocasione un daño apreciable en la citoarquitectura de la corteza cerebral de los productos que afecte la conducta y desarrollo psicomotor postnatal de éstos.

Debido a que no existen suficientes estudios que describan los efectos de tales solventes sobre el sistema nervioso de las crías, es necesario realizar un análisis estructural del encéfalo de estos animales ya que éste madura principalmente al final de la gestación.



OFICINA DE
CIENCIA Y TECNOLOGIA

HIPOTESIS:

SI LA EXPOSICION MATERNA A ETHER Y CLOROFORMO AFECTA EN FORMA SEVERA EL METABOLISMO CORTICAL CEREBRAL DE FETOS EN LA ULTIMA ETAPA DE LA GESTACION, SE PRODUCEN ALTERACIONES EN LA CITOARQUITECTURA NORMAL DE ESTA REGION.

OBJETIVO GENERAL:

Describir los cambios histológicos en corteza cerebral de ratas a las 24, 48 y 72 horas de vida postnatal como resultado de la exposición prenatal repetida a éter y cloroformo.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Establecer las características morfométricas de los productos control y experimentales: peso, longitud cráneo-caudal y perímetro cefálico en las diferentes etapas de estudio.
2. Realizar estudios descriptivos de las estirpes celulares presentes en la corteza cerebral, así como del arreglo y distribución de las mismas, mediante técnicas citoquímicas específicas para neuronas y neuroglia.

MATERIAL Y METODOS:

Para el presente trabajo se utilizaron 13 ratas hembras adultas de primer parto cepa Sprague-Dawley con peso entre 250 y 300 g, mantenidas en ciclos normales de 12 horas luz y 12 horas oscuridad, alimentadas con "Nutricubos" de Purina para pequeños roedores con un 23% de proteína y 2.5% de grasa. Se formaron 3 grupos, un control de tres animales y 2 - grupos experimentales de 5 cada uno, para éter y cloroformo respectivamente. Una vez que se determinó la etapa del estro se aparearon 3 hembras con un macho durante una noche y se estableció el día uno gestacional - por medio de citología exfoliativa vaginal.⁵⁵ Se mantuvo una observación constante sobre las hembras durante toda la gestación y se evitaron al máx^{imo} los factores estresantes.

Las ratas pertenecientes a los grupos experimentales desde el día 17 al 21 de la gestación se expusieron a los vapores de éter y cloroformo - 2 veces al día (mañana y tarde) hasta producir anestesia superficial, dentro de los primeros 10 min., la exposición se realizó en una cámara experimental de 30 cm de ancho, 40 de largo y 25 de altura, construida de -- cristal con marcos de aluminio, sellada y con un sistema de ventilación regulable.

Los animales del grupo control fueron sometidos al mismo manejo en - la cámara experimental pero sin exposición a los vapores anestésicos.

Al nacimiento se pesaron individualmente todos los animales en una balanza analítica "Bosch" y se midió la longitud cráneo-caudal y el perímetro cefálico. Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente para determinar la diferencia existente entre los tres grupos para cada uno de los parámetros. Se desarrolló un modelo aleatorizado, no balanceado y se aplicó el análisis de varianza y la prueba de Duncan para establecer la - significancia estadística de los valores.

Para el estudio histológico se seleccionaron animales al azar de cada uno de los grupos a las 24, 48 y 72 horas después del nacimiento para realizar perfusión intracardíaca y obtener el encéfalo completo. Del grupo del éter se sacrificaron 10 crías en cada etapa, a través del estudio se disminuyó de manera homogénea el número de animales en todas las camadas, del grupo de hembras expuestas a cloroformo se tomaron 5 animales a las 24 horas, 5 a las 48 y 6 a las 72, debido al número reducido de pro-

ductos nacidos vivos, en el grupo control se perfundieron 6 animales para cada período de tiempo.

Una parte de las crías (27%) se mantuvieron vivas hasta el final del experimento para poder determinar la evolución del peso corporal, longitud cráneo-caudal y perímetro cefálico durante el estudio.

Todos los animales se anestesiaron con éter inmediatamente antes de realizar la fijación de los tejidos por perfusión intracardíaca⁵⁶, para lo cual se practicó toracotomía amplia, se introdujo una aguja calibre 23 de 20 mm de longitud con un tope de plástico a 5mm del bisel en el ventrículo izquierdo y se cortó la aurícula derecha, se hizo pasar una solución lavadora inicial de Ringer-fosfatos con procaína (0.1%) y heparina (0.6%), pH 7.3 y 283 Mosm/L durante 4 min., posteriormente se continuó con una solución fijadora compuesta por glutaraldehído (2.5%) y formaldehído (1%) amortiguados en fosfatos 0.1 M con pH 7.3 y 584 Mosm/L durante 7-8 min. La perfusión se hizo a una presión de 130 cm de agua (99.58 mm de Hg), y las dos soluciones se calentaron previamente a 37°C.

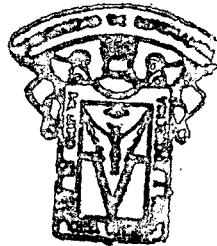
Al final de la perfusión se realizó craneotomía y se extrajo el cerebro completo, mismo que fue postfijado por inmersión durante 2 horas en la misma solución fijadora a 4°C, después los tejidos se lavaron en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M en tres cambios de 15 min. cada uno, posteriormente se separaron el tallo cerebral y los lóbulos olfatorios.

Todos los cerebros se cortaron en sentido medio sagital para dividir los dos hemisferios que luego se deshidrataron en series crecientes de etanol-xilol para finalmente ser incluidos en bloques de parafina⁵⁷, de este material se obtuvieron cortes de 2 μ m de espesor para ser teñidos mediante técnicas histoquímicas especiales.

De cada animal se tiñeron cortes provenientes de un hemisferio con la técnica Klüver-Barrera, específica para revelar la presencia de mielina y neuronas⁵⁸, la segunda mitad se tiñó con hematoxilina - eosina⁵⁹, se alternaron los hemisferios derecho e izquierdo para cada tinción en el orden progresivo de todas las muestras.

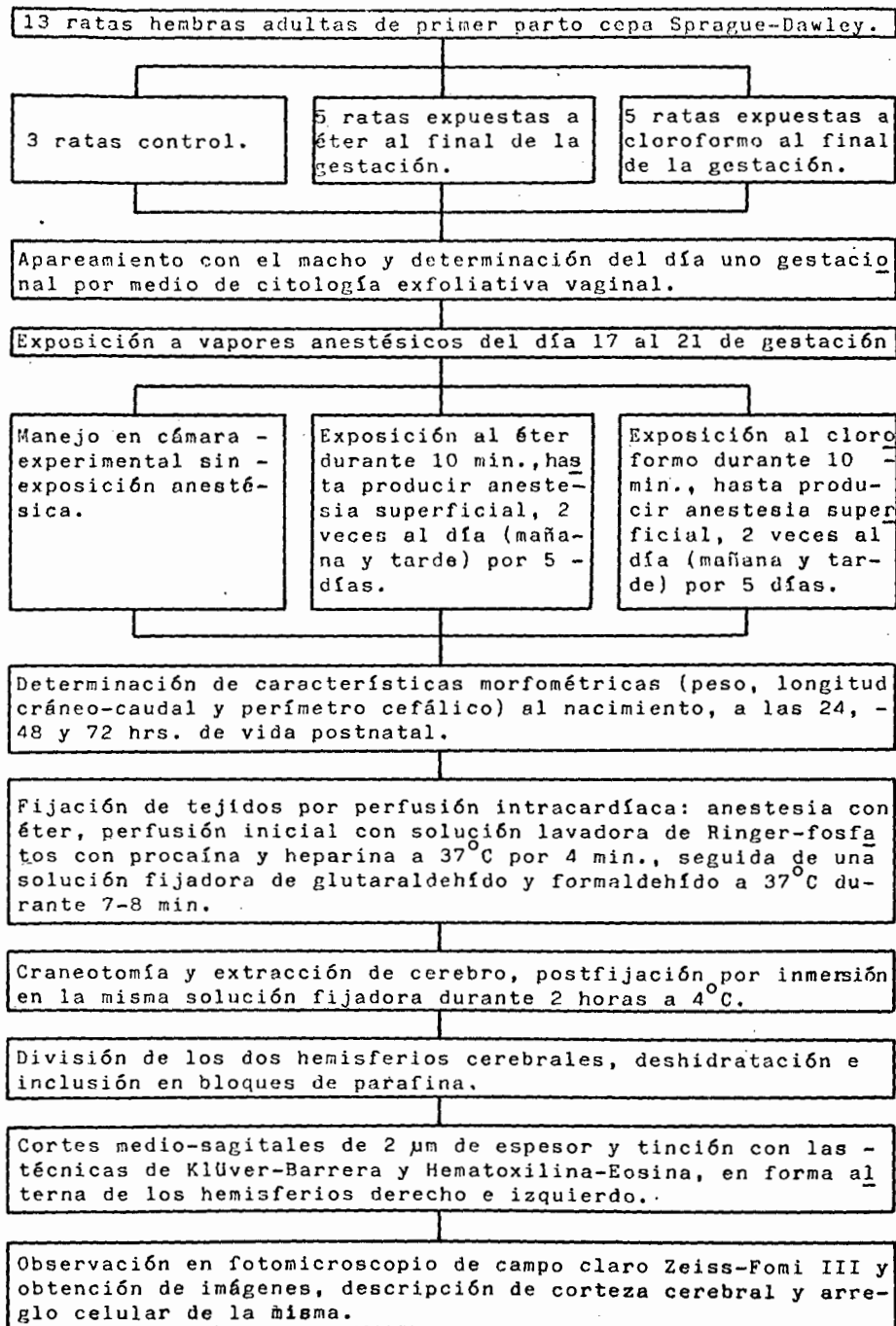
Después se hizo el montaje de las preparaciones para el análisis en un fotomicroscopio de campo claro Zeiss Fomi III, se obtuvieron imágenes de las diferentes áreas corticales utilizando película Plus-X-Pan ASA

125 de 35 mm para la impresión en papel y posterior estudio de las variaciones en la apariencia individual, arreglo y distribución de la población celular neuronal y glial.



OFICINA de
FUSIÓN CIENTÍFICA

MODELO EXPERIMENTAL



RESULTADOS:

En el grupo control nacieron alrededor de 10 productos por rata, este número fue semejante en los animales experimentales aunque las ratas expuestas a cloroformo presentaron un promedio menor de 8 crías por madre, pero con variación más amplia por lo que estadísticamente no hubo diferencias ($P > 0.05$).

El peso corporal promedio de las ratas recién nacidas pertenecientes al grupo de cloroformo fue el más bajo, las crías de madres expuestas a éter mostraron alteraciones menores que también fueron significativamente diferentes respecto al control ($P < 0.001$), el cuadro N° 1 muestra que existe una diferencia significativa para todos los parámetros entre los grupos experimentales y el control, excepto la longitud cráneo-caudal de los animales control y los del grupo con éter.

	CONTROL	ETER	CLOROFORMO
	n = 31	n = 33	n = 22
PESO CORPORAL \bar{X} (g)	6.25 \pm 0.51	* 5.89 \pm 0.50	* 5.04 \pm 0.92
	8.16 %	8.48 %	18.25 %
LONGITUD CRANEO-CAUDAL \bar{X} (cm)	7.26 \pm 0.35	7.20 \pm 0.45	* 6.72 \pm 0.36
	4.82 %	6.25 %	5.35 %
PERIMETRO CEFALICO \bar{X} (cm)	3.41 \pm 0.10	* 3.34 \pm 0.10	* 3.28 \pm 0.07
	3.81 %	2.99 %	2.13 %

* Difiere significativamente del control ($P < 0.001$)

CUADRO N° 1: (n)= número de animales estudiados en cada uno de los grupos experimentales y el control, (\bar{X})= media aritmética de los valores obtenidos en las determinaciones morfométricas al nacimiento, (%)= coeficiente de variación.

En el subgrupo de crías de los tres grupos que fueron seleccionadas al azar desde el momento del nacimiento para sacrificarlas hasta las 72 horas y que representan un 27% del total de productos nacidos vivos no se observaron diferencias para el peso corporal, longitud cráneo-caudal y pe rímetro cefálico entre el grupo control y el de exposición prenatal a éter, las ratas prenatalmente expuestas a cloroformo mantuvieron una diferencia estadísticamente significativa con los dos grupos anteriores ($P < 0.05$) para todos los parámetros mencionados y en las distintas etapas estudiadas, al nacimiento, 24, 48 y 72 hrs. (gráficas 1,2 y 3), no se hicieron evidentes todas las diferencias reportadas en el cuadro N^o.1 debido al número reducido de crías en este subgrupo.

Estudio histológico de corteza cerebral:

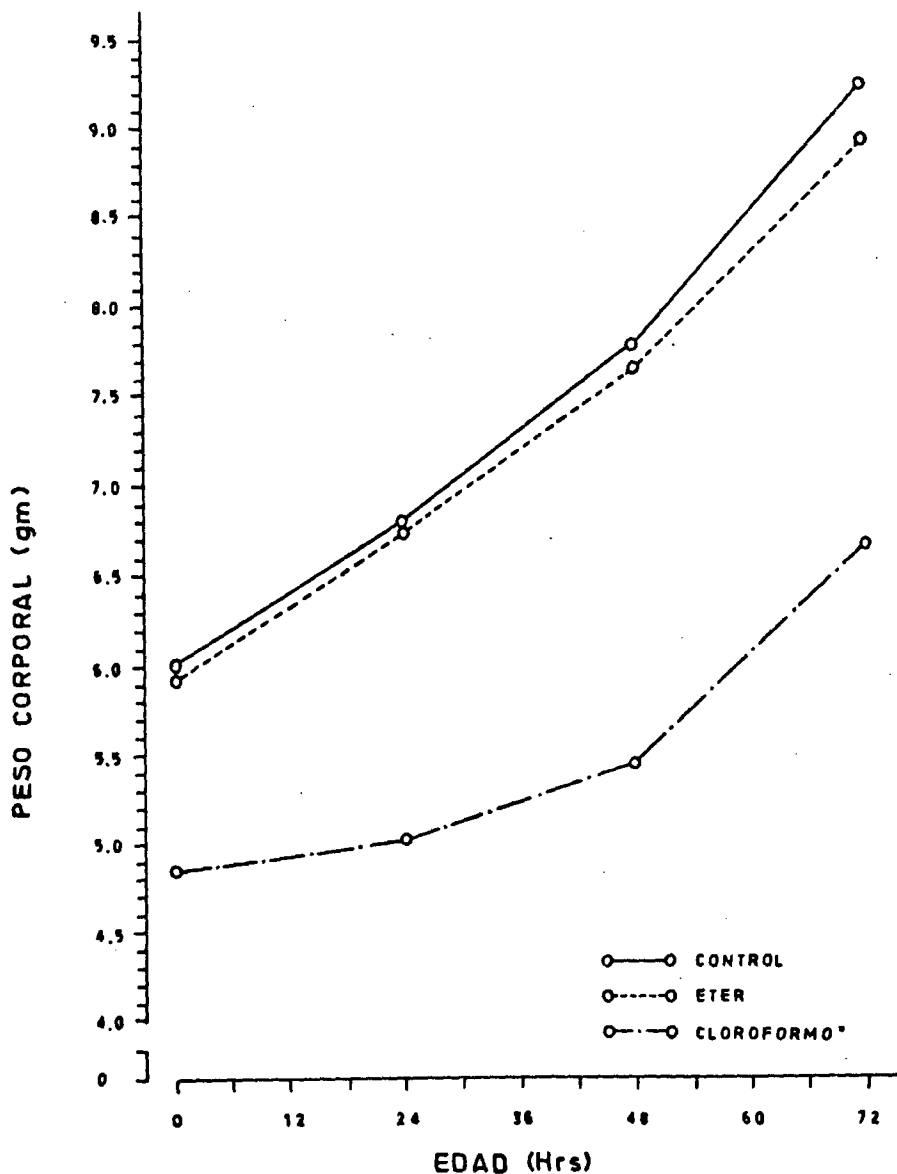
Se realizó el estudio en las regiones frontal, parietal y occipital de corteza cerebral de animales control y experimentales en cortes medio-sagitales de todas las muestras (dibujo). En los tejidos obtenidos a las 24, 48 y 72 hrs. de vida postnatal no se observaron diferencias entre el grupo control y los animales expuestos a éter y cloroformo.

En todos los cortes se pudo observar claramente la definición de la - capa molecular que contenía algunos núcleos celulares, por debajo de ésta estaban presentes numerosas células granulares con un arreglo denso en - los primeros estratos (figs. 1 y 2).

En las capas corticales más profundas se observó un arreglo laminar - de neuronas cuya forma piramidal se distinguió claramente con la tinción de Klüver-Barrera, éstas se pudieron diferenciar perfectamente tanto de - las granulares superficiales como profundas. De las neuronas piramidales se desprendían las principales proyecciones nerviosas en una dirección -- ascendente hacia la región pial-glial, esto indica el sentido de la migra - ción de las células nerviosas de las capas superficiales hacia las más - profundas (figs. 3, 4 y 5).

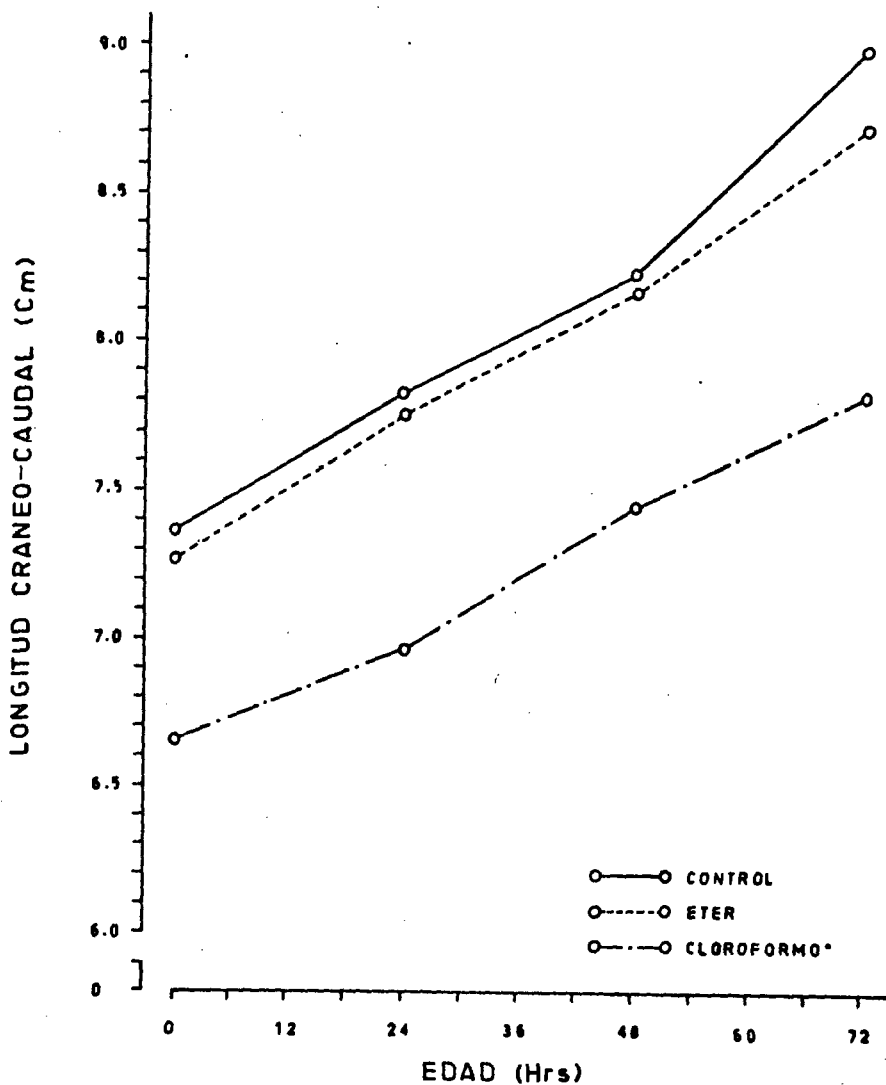
Los límites inferiores de la corteza se pudieron apreciar claramente en todas las laminillas estudiadas (figs. 6 y 7).

Las células gliales fueron menos numerosas que las neuronas y aparecieron en una disposición irregular en los diferentes grupos estudiados. En general se encontró un espacio celular reducido y el parénquima mostró



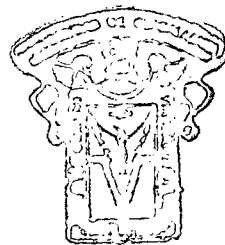
GRAFICA No.1: Variaciones del peso corporal durante las diferentes etapas estudiadas, 27 % de la poblacion. ($P < 0.05$).

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

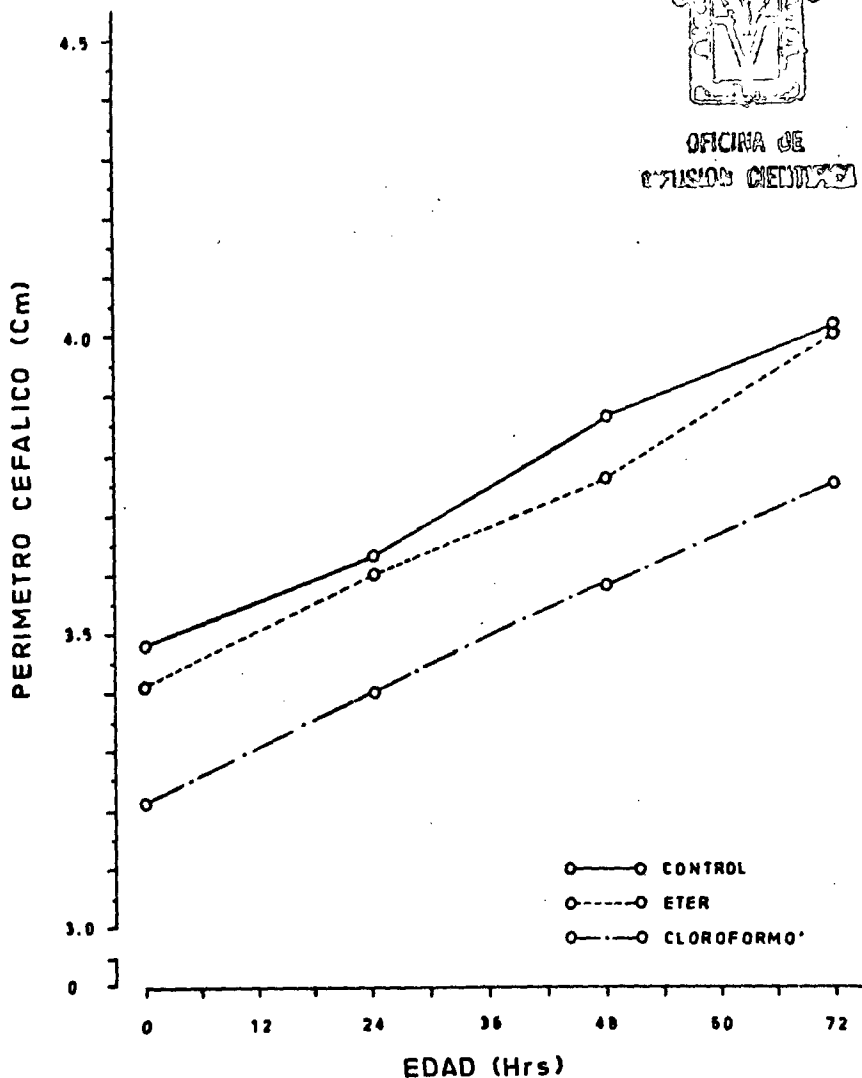


GRAFICA No. 2: Longitud Cráneo-Caudal del 27 % de la población total hasta las 72 hrs postnacimiento ($P < 0.05$).

• Difiere significativamente del control — ($P < 0.05$).

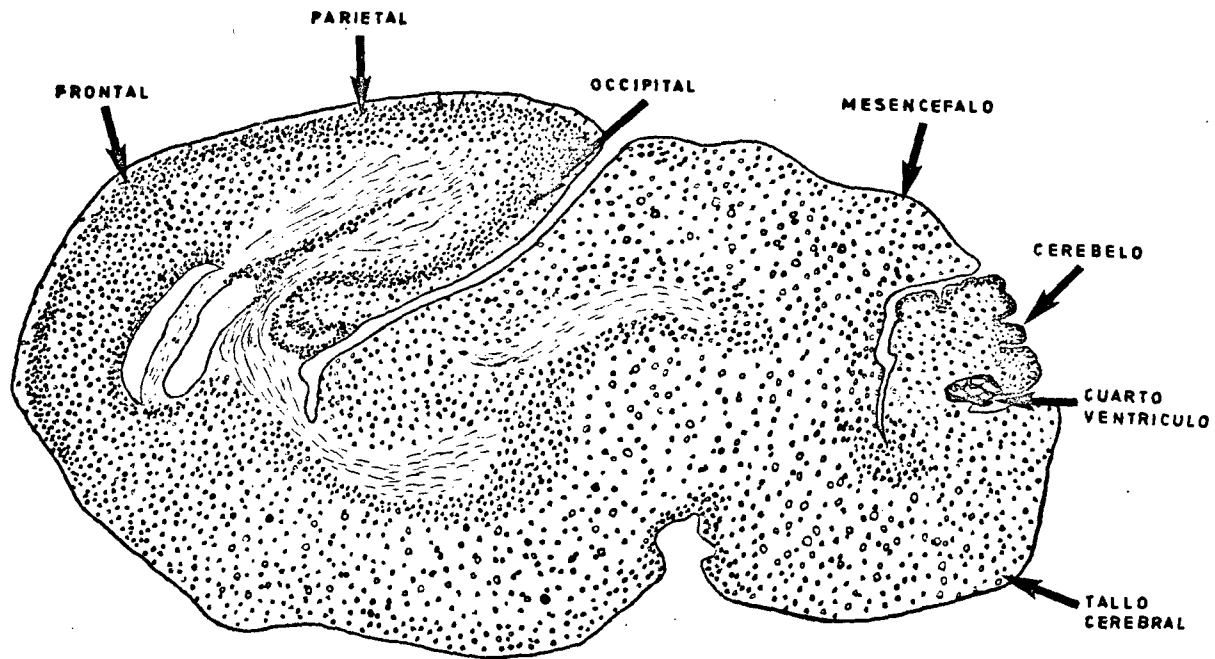


OFICINA DE
ESTUDIOS CIENTÍFICOS



GRAFICA No. 3 : Perímetro cefálico del 27 % de las ratas control y experimentales durante la etapa postnatal inmediata ($P < 0.05$).

• Difiere significativamente del control — ($P < 0.05$).



CORTE MEDIO-SAGITAL DEL CEREBRO COMPLETO DE RATAS RECIEN NACIDAS NORMALES DONDE SE APRECIAN LAS DIFERENTES REGIONES ESTUDIADAS DE CORTEZA CEREBRAL. ESCALA 1:25 .

su aspecto denso característico (figs. 8, 9 y 10). En las capas profundas de la corteza estaba presente un arreglo estratificado y la densidad celular neuronal fue menor que la de las regiones superiores, a través de todo el neuropilo se distinguieron espacios vasculares.

Tanto en los animales control como en los expuestos prenatalmente a éter y cloroformo de diferentes etapas (24, 48 y 72 hrs. de nacidos) no fue posible distinguir el núcleo de la totalidad de las células nerviosas con las técnicas de tinción utilizadas, el soma neuronal mostró un aspecto homogéneo, con Klüver-Barrera se observan claramente las proyecciones nerviosas en forma multidireccional (figs. 3, 4 y 5), especialmente de las células piramidales presentes a nivel medio y profundo.

No se encontró ninguna diferencia en los parámetros descritos entre los animales control y los expuestos prenatalmente a éter y cloroformo a través de las diferentes etapas del estudio.





Fig. No. 1: Fotomicrografia de la región parietal de la corteza cerebral de rata control de 24 horas de edad. Se observa la capa molecular (cm) en la cual están presentes núcleos celulares, células nerviosas de aspecto granular se localizan en las capas más superficiales sin arreglo definido (), en los estratos más profundos se aprecia un arreglo laminar de las neuronas () también se aprecian algunos espacios capilares en el parénquima (), Klüver-Barrera 218 x.

Fig. No. 2: Región occípito-parietal de corteza cerebral de rata de 24 horas de nacida expuesta a éter en el último tercio de la gestación. Se distingue la capa molecular cubierta por parte de tejido aracnoide (cm). Se pueden observar algunas proyecciones dendríticas en varias direcciones desde el soma neuronal (), así como una disposición organizada de las neuronas hacia las capas intermedias y profundas, Klüver-Barrera 218 X.

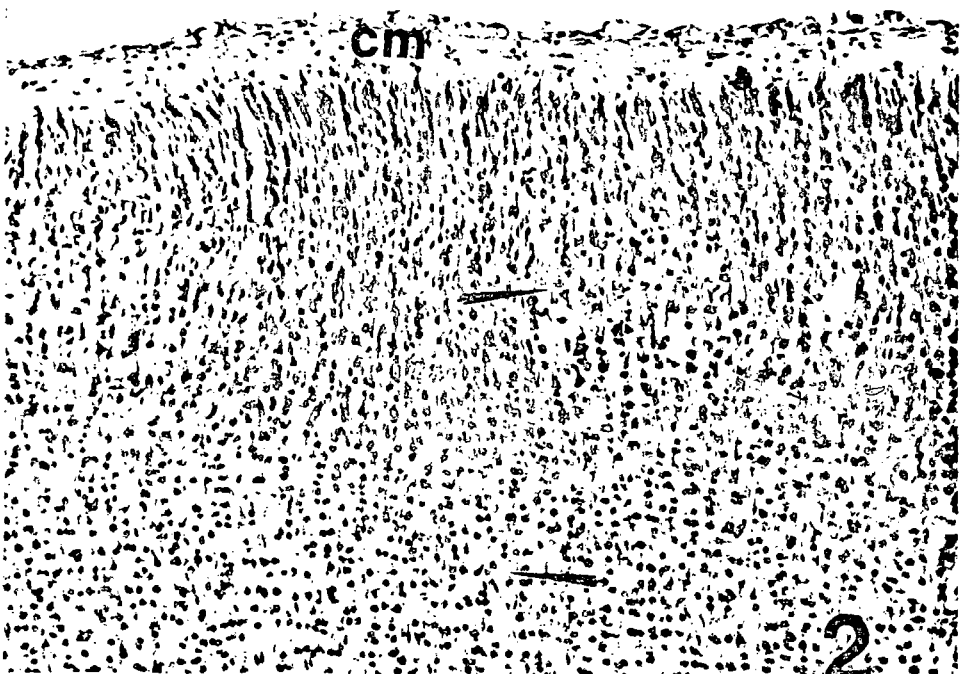




Fig. No. 3: Capas intermedias de la región cortical frontal de ratas con 48 horas de vida postnatal expuestas a éster antes del nacimiento. Se observan neuronas de forma piramidal con sus prolongaciones dendríticas en sentido ascendente (), así como algunas de forma granular (), el neuropilo muestra un aspecto denso característico, Klüver-Barrera 850 X.






Fig. No. 4: Estratos profundos de corteza cerebral frontal de ratas expuestas prenatalmente a cloroformo y sacrificadas 48 horas después del nacimiento, se observa el arreglo laminar de las células nerviosas con apariencia piramidal () y granular (), Klüver-Barrera. 850 X.

Fig. No. 5: Neuronas de capas profundas de corteza cerebral de animales control sacrificados a las 48 horas de vida, están presentes células de aspecto piramidal (), granular () y fusiformes (), se observa una tendencia hacia la delimitación de áreas particulares para las diferentes estirpes, Klüver-Barrera 850 X.

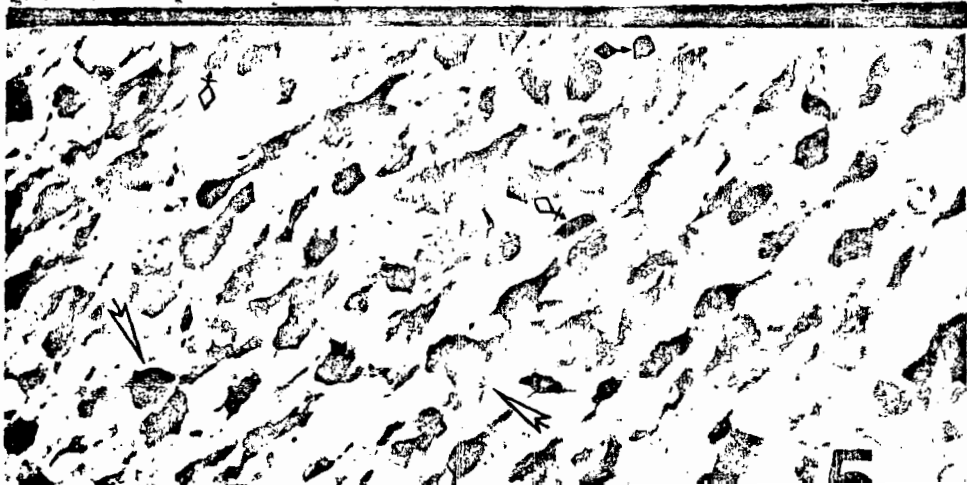
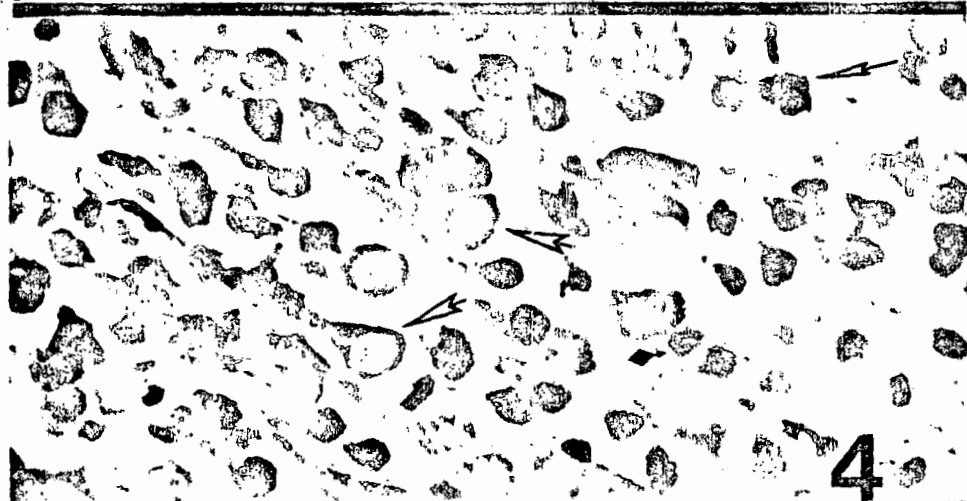
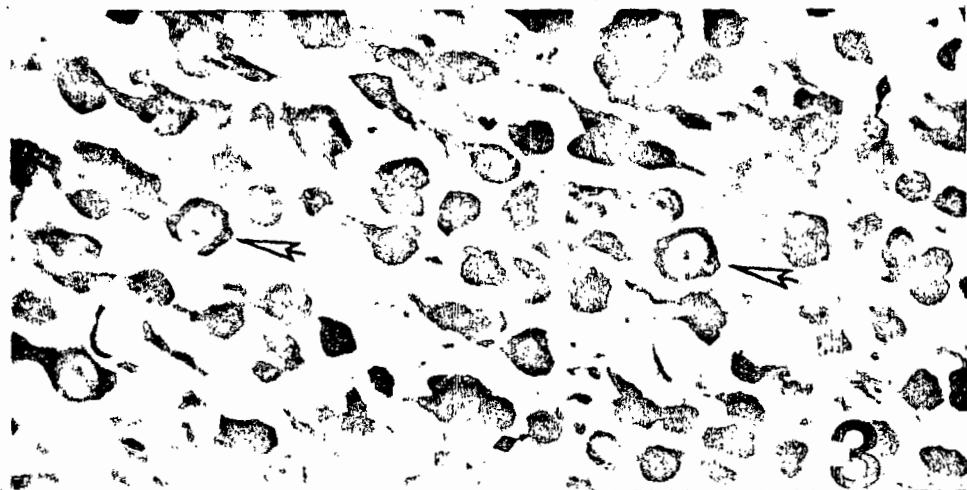


Fig. No. 6: Región occípito-parietal de corteza cerebral de animales control de 48 horas de nacidos que muestra estratos más profundos en los que están presentes principalmente neuronas de forma Piramidal (\blacktriangleright), el neuropilo se observa de especto denso y el límite de la profundidad de la corteza se aprecia claramente (\bullet); Klüver-Barrera 218 X.

Fig No. 7: Corteza parietal de animales prenatalmente expuestos a -cloroformo y sacrificados a las 48 horas, se observa la capa molecular (cm), la mayor densidad neuronal se localiza en la capa granular externa (\bullet), la delimitación cortical se aprecia perfectamente (\blackstar), Klüver-Barrera 218 X.

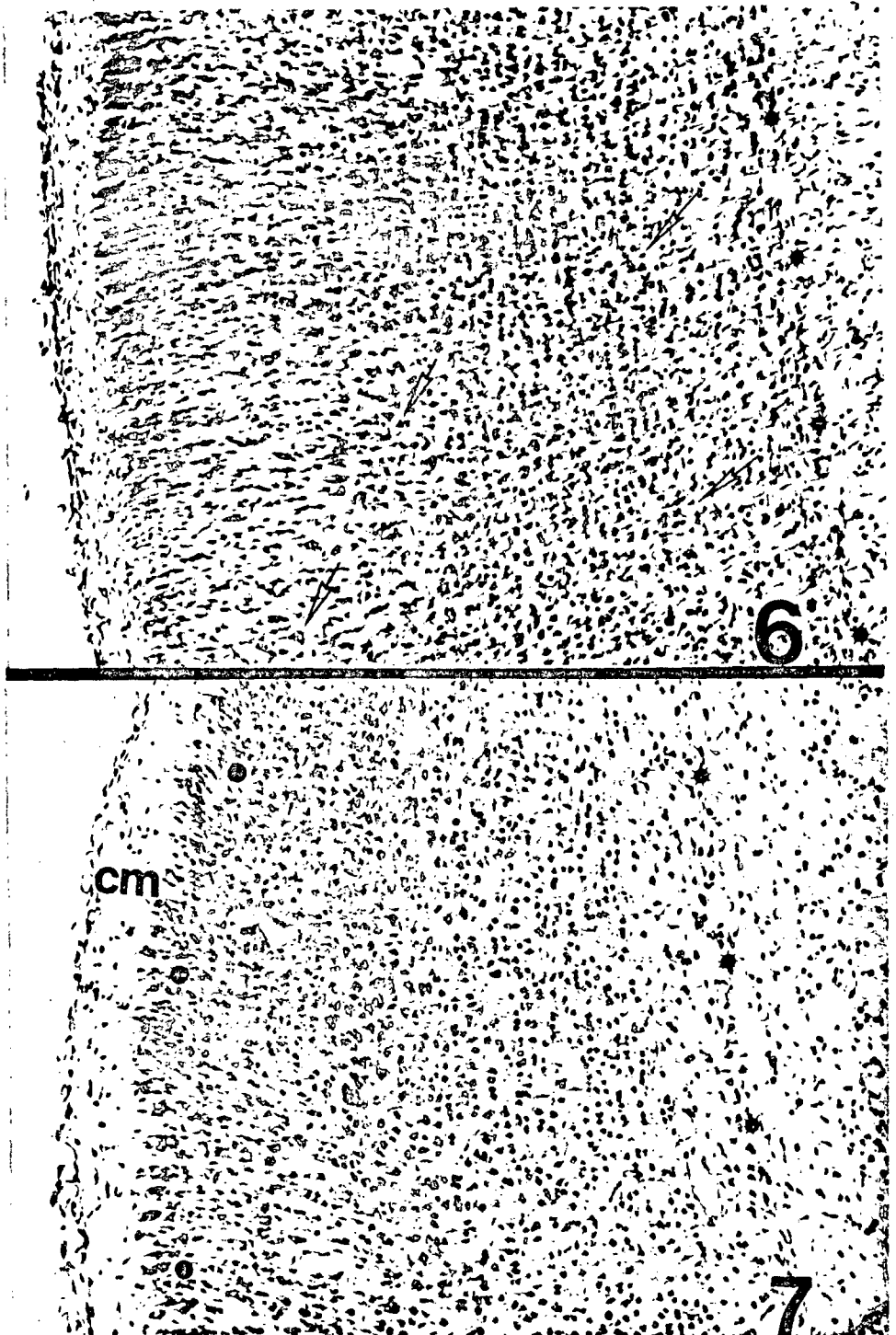





Fig. No. 8: Región intermedia de corteza cerebral parietal de ratas a las 72 horas del nacimiento expuestas a los vapores de éter en el último tercio de gestación. Están presentes células nerviosas de forma piramidal con sus respectivos nucleolos () de aspecto normal, junto a éstas se observan núcleos de células gliales de menor tamaño (), así como una célula del endotelio vascular, () Hematoxilina-Eosina 850 X.







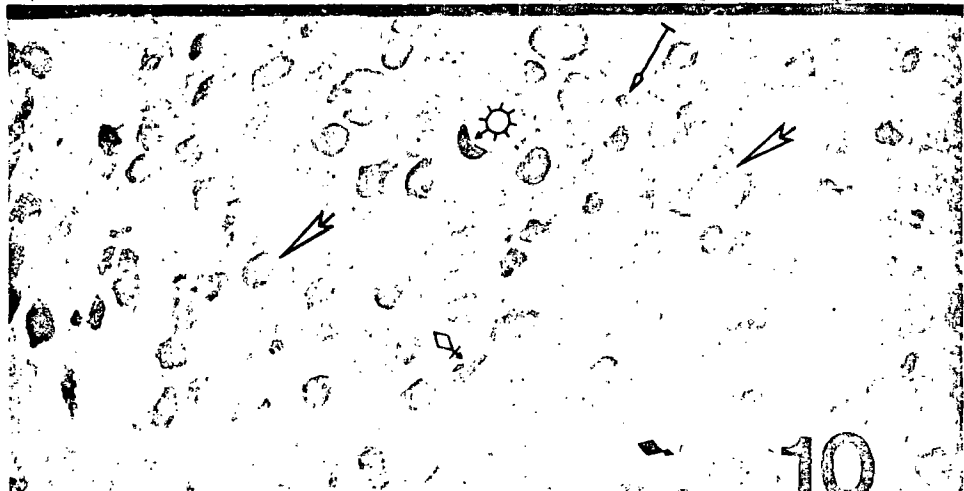
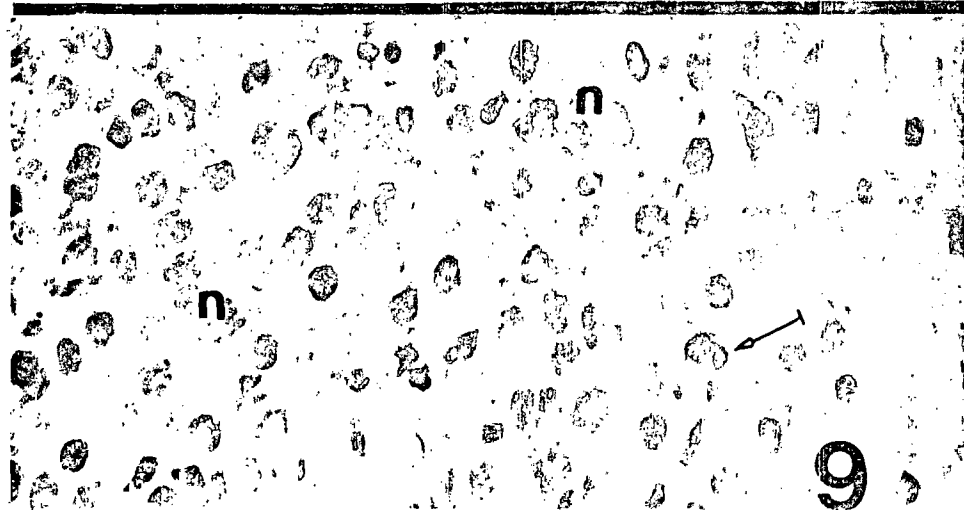
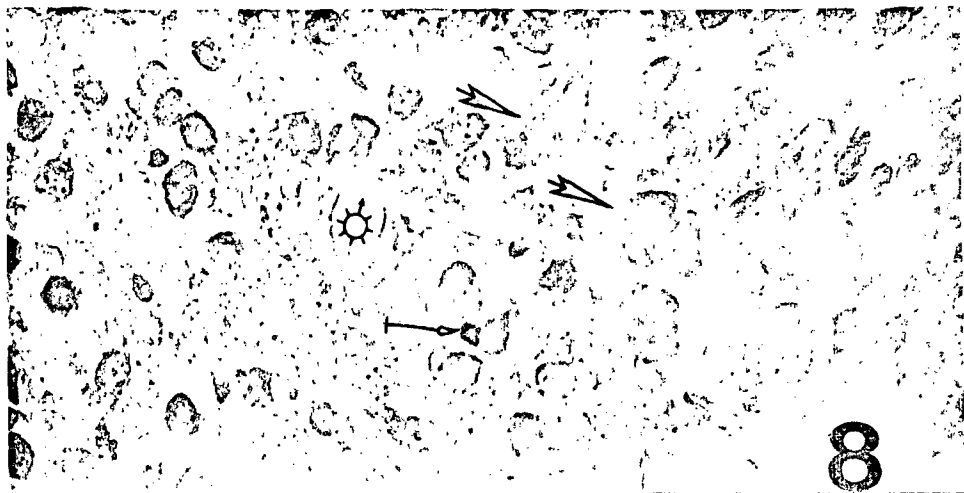
Fig No. 9: Estrato intermedio de la región frontal de corteza cerebral de animales con exposición prenatal a cloroformo sacrificadas a las 72 horas de vida postnatal donde aparecen neuronas (n) y células de neuroglia (), el parénquima cortical es de aspecto denso en sus elementos, Hematoxilina-Eosina 850 X.

Fig No. 10: Población celular de los estratos intermedios de corteza cerebral occipital de ratas control donde se encuentran células nerviosas y de glia (), las primeras de mayor proporción y con diferentes formas: piramidales (), fusiformes () y granulares (), existe un espacio intercelular escaso, se aprecia claramente una célula del endotelio vascular () Hematoxilina-Eosina 850 X.



DISCUSION:

En el presente trabajo se encontró que la exposición prenatal a los vapores de éter y cloroformo no tuvo efecto sobre el índice de nacimientos, el promedio de animales nacidos en las ratas experimentales fue ligeramente inferior al de los controles, sin embargo los primeros presentaron una variación muy amplia en el número de crías por madre.

La exposición de las hembras gestantes a los vapores de estos dos agentes durante los últimos 5 días de la gestación no fue suficiente para alterar en forma severa la fertilidad; Al-Abrek y colaboradores señalaron en un estudio semejante que la exposición a un 4 % de éter en el aire inspirado por 15 min./día, 6 días a la semana durante 3 meses en ratas hembras y machos disminuyó severamente la fertilidad, este efecto fue todavía más severo cuando se expusieron ratas a un 0.5 % de halotano bajo las mismas condiciones.²⁹ Asimismo se reportó un elevado índice de mortalidad después del nacimiento ya que un 80 % de las crías murieron dentro de las primeras 24 hrs. de vida postnatal. En el presente trabajo no se registraron muertes de recién nacidos.

Al parecer los anestésicos volátiles empleados no produjeron alteraciones orgánicas sobre los fetos que afectaran su capacidad de supervivencia.

Cuando se realizó el análisis morfométrico de los animales control y experimentales recién nacidos se encontró que las ratas expuestas a cloroformo tuvieron las crías de menor peso corporal, perímetro cefálico y longitud cráneo-caudal, el éter produjo un efecto similar en los primeros dos parámetros, aunque no tan severo, los resultados fueron comparables a los de los controles ya que la diferencia con éstos solamente fue significativa cuando se analizaron los valores de toda la población, la significancia se pierde si se compara únicamente los valores de una parte de la población (27%). El cloroformo mantuvo sus diferencias en ambas estimaciones y en las diferentes etapas estudiadas.

Se observó que las diferencias encontradas al nacimiento entre los tres grupos se mantuvieron hasta las 72 hrs. de edad en que se sacrificaron las últimas crías, lo anterior sugiere que probablemente el retardo en el crecimiento intrauterino provocado por los anestésicos tiene una

lenta recuperación.

Para explicar el mecanismo que produce esa desaceleración en el desarrollo corporal de los productos por el efecto de los anestésicos se han postulado las siguientes circunstancias fisiológicas:

Los anestésicos volátiles provocan una hipotensión arterial en los animales adultos, esto trae como consecuencia una disminución del aporte de sangre al útero y como resultado decrece la disponibilidad y difusión de nutrientes y O_2 para los fetos, esta deprivación puede alterar el desarrollo de los mismos.¹⁶

La hipotensión arterial también reduce la velocidad de excreción de CO_2 de la sangre fetal y materna (generalmente aumenta la presión parcial de este gas durante la anestesia) y ocasiona una acidez de la sangre que junto a la hipoxia altera el metabolismo energético oxidativo de los productos de tal forma que se reduce la fosforilación oxidativa y por lo tanto la disponibilidad de energía celular es menor.¹⁶

Según Vanucci (1978) el halotano produce un incremento de la glucosa sanguínea debido a la secreción refleja de la epinefrina que resulta de la hipotensión arterial y/o del incremento de lactato en la sangre por la misma causa, éste es un producto terminal de la vía glucolítica; a pesar de haber una mayor concentración de glucosa en sangre, la cantidad disponible de ésta por el cerebro es menor debido a la inhibición del mecanismo enzimático, la enzima fosfocreatinina se encuentra saturada, como consecuencia disminuye la cantidad de ATP y aumentan el ADP y AMP y se altera el equilibrio metabólico cerebral, por esto el feto es incapaz de utilizar adecuadamente todos los nutrientes necesarios.¹⁶ Los efectos del cloroformo son semejantes pero de mayor severidad.^{7, 32}

Se ha descrito que el cloroformo tiene un marcado efecto cardiodepresor y produce además hemólisis intravascular en animales adultos, estos trastornos alteran el aporte de nutrientes y O_2 a través de la placenta materna y se afecta directamente el desarrollo del producto.^{31, 39}

Batrak y colaboradores propusieron que el éter produce una interrupción de la fosforilación oxidativa, especialmente en las poblaciones neuronales presentes en el hipocampo, este fenómeno aunado a la hipoxia reduce el recambio energético neuronal y es particularmente severo a nivel de

corteza cerebral.²⁵

De lo anterior se deduce que existe una relación directa entre las alteraciones del metabolismo energético fetal y su desarrollo corporal.

En el estudio de al-Abtrak y colaboradores el éter afectó significativamente el peso corporal de las crías al nacimiento, sin embargo el tamaño fue normal.²⁹

No se observaron alteraciones en la corteza cerebral de las crías experimentales, las neuronas y células gliales mostraron una apariencia normal, también la disposición de las diferentes estirpes celulares presentaron un arreglo semejante al de los controles.

Posiblemente no se produjeron alteraciones estructurales debido al estado de maduración en que se encontraba el cerebro al término de la gestación, además del período de exposición que fue corto, está reportado que el cerebro de la rata después del día 14 de gestación sufre una aceleración en su desarrollo y por consiguiente se aumenta la actividad metabólica, debido a la afinidad de los agentes anestésicos por las membranas biológicas se produce una alteración de los sistemas multienzimáticos asociados con éstas y el efecto es diferente según la edad en que se realice la exposición.^{17,26}

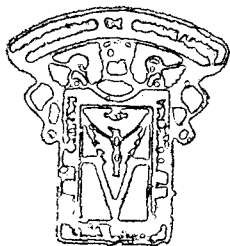
En el presente trabajo se inició la exposición de las ratas gestantes a los vapores anestésicos a partir del día 17 del período gestacional, tiempo en el cual el cerebro había alcanzado un cierto grado de maduración, sin embargo, la ausencia de lesiones estructurales no implica que exista una funcionalidad normal ya que se presentan trastornos del sistema nervioso cuyas manifestaciones no tienen una repercusión física evidente; las crías de ratas expuestas mostraron una actividad locomotora menos intensa que la de los animales control, sin embargo no se cuantificó dicha alteración.

Lo anteriormente señalado tiene apoyo en estudios realizados por Sir John Snow quien reportó daños fisiológicos reversibles poco después del nacimiento en productos humanos cuyas madres fueron anestesiadas con éter durante la labor de parto.¹³

Asimismo Batrak y Zakopka encontraron que después de la anestesia con

éter los reflejos condicionados se recuperan hasta los 7 días después --- de la exposición, la recuperación tarda 24 días cuando la anestesia se realiza con fluorotano. ⁶⁰

En base a lo anterior, es posible suponer que los efectos de los anestesísicos volátiles sobre la corteza cerebral de ratas expuestas en el último tercio del desarrollo intrauterino no provocan daños en la organización del tejido cortical, aunque sí un retardo en el crecimiento y maduración de otros órganos, especialmente en el caso del cloroformo. La capacidad de recuperación de las lesiones depende del tiempo en que se realice la exposición y la duración de la misma.



OFICINA DE
COMISION CIENTIFICA

CONCLUSIONES:

1. No se observaron alteraciones en la citoarquitectura y apariencia individual de la corteza cerebral de los animales expuestos a los agentes anestésicos.
2. El cloroformo produjo disminución del tamaño de los animales recién nacidos por retardo en el crecimiento intrauterino.
3. Los efectos causados por el éter sobre el desarrollo intrauterino de los productos fueron poco severos.
4. La exposición a los vapores de éter o cloroformo durante los últimos 5 días de la gestación de ratas no afectó el número de crías.
5. Los resultados obtenidos sugieren que bajo condiciones de exposición más prolongadas que las del presente trabajo y en etapas más tempranas de la gestación los solventes lipídicos son capaces de producir alteraciones severas en los fetos.

RESUMEN:

CON EL OBJETO DE ESTUDIAR LOS EFECTOS QUE PRODUCEN LOS ANESTESICOS VOLATILES ETER Y CLOROFORMO SOBRE LA CORTEZA CEREBRAL Y EL DESARROLLO -- PRENATAL DE FETOS DE RATAS SE EXPUSIERON 5 HEMBRAS GESTANTES RESPECTIVAMENTE A LA INHALACION DE ESTAS SUBSTANCIAS EN EL ULTIMO TERCIO DE LA GESTACION, DOS VECES AL DIA POR 10 MIN., DURANTE 5 DIAS, 3 RATAS CONTROL FUERON SOLAMENTE MANIPULADAS EN LA CAMARA DE EXPOSICION.

INMEDIATAMENTE DESPUES DEL NACIMIENTO SE DETERMINO LA LONGITUD CRANEO-CAUDAL, PERIMETRO CEFALICO Y PESO CORPORAL, LAS MEDICIONES SE REPITIERON A LAS 24, 48 y 72 HRS. DE VIDA POSTNATAL, SE SELECCIONARON AL AZAR 2 CRIAS POR CAMADA A LAS 24 HRS. DE VIDA PARA SER PERFUNDIDAS POR VIA INTRACARDIACA CON SOLUCION DE GLUTARALDEHIDO- FORMALDEHIDO Y REALIZAR EL ESTUDIO HISTOLOGICO DE LAS DIFERENTES REGIONES DE LA CORTEZA CEREBRAL, EL PROCEDIMIENTO SE REPITIO A LAS 48 y 72 HRS.; CORTES MEDIO-SAGITALES DEL CEREBRO COMPLETO SE TIÑERON CON KLUVER-BARRERA Y HEMATOXILINA-EOSINA PARA REALIZAR EL ANALISIS DESCRIPTIVO EN FOTOMICROSCOPIO.

SE ENCONTRO UNA DISMINUCION EN LOS TRES PARAMETROS MORFOMETRICOS ESTUDIADOS EN LOS PRODUCTOS DE LAS HEMBRAS EXPUESTAS A CLOROFORMO ($P < 0.001$), EL ETER SOLAMENTE REVELO ALTERACIONES SIGNIFICATIVAS EN EL PESO CORPORAL Y PERIMETRO CEFALICO DE LAS CRIAS ($P < 0.001$), LAS DIFERENCIAS SE MANTUVIERON A TRAVES DE TODO EL ESTUDIO.

NO SE OBSERVARON ALTERACIONES ESTRUCTURALES EN LAS DIFERENTES REGIONES DE LA CORTEZA CEREBRAL (FRONTAL, PARIETAL Y OCCIPITAL) DE LOS ANIMALES EXPUESTOS A ETER O CLOROFORMO DURANTE LA ULTIMA ETAPA DEL DESARROLLO PRENATAL. EL RETARDO EN EL CRECIMIENTO INTRAUTERINO PROVOCADO POR LOS SOLVENTES POSIBLEMENTE FUE CAUSADO POR INTERFERENCIA EN EL METABOLISMO ENERGETICO DE LOS PRODUCTOS AL DISMINUIR EL APORTE DE NUTRIENTES Y O_2 A TRAVES DE LA PLACENTA MATERNA, LAS ALTERACIONES PRODUCIDAS SON DE NATURALEZA FUNCIONAL REVERSIBLE YA QUE NO SE OBSERVARON LESIONES ESTRUCTURALES, PROBABLEMENTE POR EL CORTO PERIODO DE EXPOSICION Y EL GRADO AVANZADO DEL DESARROLLO CEREBRAL.

BIBLIOGRAFIA:

1. LEROY D. VANDAM: Captación y transporte de los anestésicos y períodos de la anestesia. Farmacología Médica. La Prensa Médica Mexicana. México, 1969. P 90.
2. A. ALEXANDER: Anestesia, períodos de anestesia con cloroformo o éter. Técnica Quirúrgica en Animales y Temas de Terapéutica Quirúrgica. Edit. Interamericana. México, 1981. P 48.
3. O. SIDNEY ORTH: Anestesia general; agentes volátiles. Farmacología Médica. La Prensa Médica Mexicana. México, 1969. P 106.
4. TERREL RC, 1984: Physical and Chemical properties of anaesthetic agents. Br J Anaesth 56 suppl 1:3s.
5. NULAND SB, 1984: The origins of anesthesia. Con Med 48 (3):171.
6. L. MEYER JONES: Anestésicos por inhalación. Farmacología y Terapéutica Veterinarias. UTHEA. México, 1980. P 139.
7. HALSEY MJ 1984: A reassessment of the molecular structure functional relationships of the inhaled general anaesthetics. Br J Anaesth 56 suppl 1:9s.
8. FROST EAM, 1984: Inhalation anaesthetic agents in neurosurgery. Br J - Anaesth 56 suppl 1:47s.
9. CRAWFORD WM, 1984: More on the ether operation (letter). N Engl J Med 310 (8):534.
10. PAYNE JP, 1981: Chloroform in clinical anaesthesia. Br J Anaesth 53 suppl 1:11s.
11. FRANCO GRANDE, 1977: The early days of chloroform anesthesia. Rev Esp Anesthesiol Reanim 24 (3):214.
12. J.C. KRANTZ Jr; C. JELLEF CARR: Central Nervous system; the general - anesthetics. The Pharmacologic Principles Medical Practice. Waverly - Press Inc. Baltimore, EUA, 1969.P 89.
13. CATON D, 1977: Obstetric anesthesia and concepts of placental transport. A Historical Review of nineteenth century. Anesthesiology 46 (2):132.
14. GIBBS CP; MUNSON ES; THAM K M, 1975: Anesthetic solubility coefficients for maternal and fetal blood. Anesthesiology 43 (1):100.
15. MELVIN J. SWENSON: Blood circulation and the cardiovascular system; - physiological properties and cellular and chemical constituents of blood fetal and adult hemoglobin. Vail-Ballou Press Inc., EUA, 1984. P25

16. VANUCCI RC, 1978: Oxidative metabolism in fetal rat during maternal anesthesia. *Anesthesiology* 48 (4):238.
17. HOLZTMAN SD, 1978: Maternal anesthesia and fetal neuropharmacology. *Anesthesiology* 48 (4):235.
18. KUSHCHINSKAYA AI, 1981: Effects of ether anesthesia on Na, K+, ATPase activity in different brain structures. *Fiziol ZH* 27 (4):517.
19. LASSEN NA, 1978: Cerebral circulation and anaesthesia. *Acta Anaesthesiol Scand* 70 suppl:53.
20. SIESJO BK, 1979: Brain metabolism and anaesthesia. *Acta Anaesthesiol Scand* 70 suppl:56.
21. CHENOWET MB, 1978: Inhalation anesthetics. *Fed Proc* 37 (11):2501.
22. GYGAX P; SCHWEIZER A, 1975: Proceedings: The influence of anesthesia - on cortical microflow and EEG in arterial hypotension. *Arzneim Forsch* 25 (10):1678.
23. DOROVINI-ZIS K; DOLMAN CL, 1977: Gestational development of brain. *Arch Pathol Lab Med* 101 (4):192.
24. HIRATA Y; SHIGA T, 1983: Cronology of human brain development. *No To Shinkei* 35 (7):643.
25. BATRAK GE; KHRUSTALEV SI; YAROSH AK, 1979: Comparative rate of oxidative phosphorylation in different segments of the brain cortex of intact animals under narcosis and hypoxia. *Farmakol Toksikol* 42 (2):99.
26. CLANDININ MT; CHAPPEL JE; LEONG S; HEIM T; SWYER PR; CHANCE GW; 1980: Intrauterine fatty acid accretion rates in human brain. Implications of fatty acid requirements. *Early Hum Dev* 4 (2):121.
27. BERNARD L. OSER: Nervous tissue. *Hawk's Physiological Chemistry*. Mc - Graw-Hill Book Company. Nueva York, 1965. P 233.
28. W.R. KLEMM: Design and basic functions of the nervous system. *Dukes' Physiology of Domestic Animals*. Vail-Ballou Press Inc. EUA, 1984.P 581.
29. al-ABRAK MH, MIRA KM, el-AYYAT A, 1979: Effect of repeated administration of subanaesthetic concentrations of ether and halothane on the rat. *Br J Anaesth* 51 (4):385
30. FORSTER A; VAN HORNK; MARSHAL LF; SHAPIRO HN, 1978: Anesthetic effects on blood-brain barrier function during acute arterial hypertension. - *Anesthesiology* 49 (1):26.
31. COHEN EN, 1981: Metabolism of volatile anaesthetics. *Br J Anaesth* 53 suppl 1:49s.

32. MAZZE BI, 1984: Metabolism of the inhaled anaesthetics: Implications of enzyme induction. *Br J Anaesth* 56 suppl 1:27s.
33. DAVIS PA; HAJRA AK, 1978: Stereo Chemical specificity of the biosynthesis of the alkyl ether bond in alkyl ether lipids. *J Biol Chem* 254 (11):4760.
34. WONG H; ADDISON RF; LAW FC, 1981: Uptake, metabolism and elimination of diphenil ether by trout and stickleback. *Bull Environ Contam Toxicol* 26 (2):243.
35. LINGG RD; KAYLOR WH; PYLE SH; DOMINO MN; SMITH CC; WOLFE GF, 1982: Metabolism of bis (2-chloro-ethyl) ether and bis (2-chloroisopropyl) ether in the rat. *Arch Environ Contam Toxicol* 11 (2):173.
36. CLEMENS TL; HILL RN; BULLOCK LP; JOHNSON WD; SULTATOS LG; BESELL ES, 1979: Chloroform toxicity in the mouse: role genetic factor on steroids. *Toxicol Appl Pharmacol* 48 (1 pt 1):117.
37. FEINGOL A; HOLADAY DA, 1979: Citotoxic potencies of volatile anesthetics (letter). *Anesthesiology* 50 (3):273.
38. COHEN EN, 1978: Toxicity of inhalation anaesthetic agents. *Br J Anaesth* 50 (7):665.
39. HUTCHENS KS; KUNG M, 1985: " Experimentation" with chloroform. *Am J Med* 78 (4):715.
40. ADAMS AP, 1981: Enflurane in clinical practice. *Br J Anaesth* 53 suppl 1:27s.
41. EGER EI 2d, 1984: The pharmacology of isofluorane. *Br J Anaesth* 56 - suppl 1:71s.
42. TORKELSON TR, 1976: The toxicity of chloroform as determined by single and repetead exposure of laboratory animals. *Am Ind HyG Assoc J* 37 (12):697.
43. ELLIOT T, 1978: Escaping anesthetic gases may affect neurophysiological functions (news). *JAMMA* 240 (18):1839.
44. BARNA B; ADORJAN K; HARGITAY Z, 1978: Working conditions and health damage of anesthesiologist. National survey. Incidence of gestational - and genetic disorders. *Orv Hetil* 119 (40):2433.
45. SEDGWICK CJ, 1979: Veterinary anesthesia ventilation. *Mod Vet Pract* 60 (2):126.
46. TAYLOR PM; HALL LW, 1985: Clinical anaesthesia in the horse: Comparison of enflurane and halothane. *Equine Vet J* 17 (1):51.
47. BROUWER GJ, 1985: Use of guaiacol glycerin ether in clinical anaesthesia in the horse. *Equine Vet J* 17 (2):133.

48. MACPIERSON, 1979: Chloroform anesthesia in the bovine (Letter). *N Vet Rec* 104 (24):559.
49. LOKKEN P; STEKIEIV J, 1978: Chloroform carcinogen effect in animals. *Tidsskv Nor Laegeforen* 98 (22):1019.
50. LLORENTE P; GOMEZ CAPILLA JA; COTRINA JL; GALERA H, 1979: Teratogenic effect of various anesthetics. *Rev Esp Anestesiol Reanim* 26 (2):137.
51. DAVIDSON IW; SUMNER DD; PARKER JC, 1982: Chloroform: A review of its metabolism, teratogenic, mutagenic, and carcinogenic potential. *Drug Chem Toxicol* 5 (1):1.
52. GJEDDE A; HINDFELT B, 1975: Whole-brain flow and oxygen metabolism in the rat after halothane anaesthesia. *Acta Anaesthesiol Scand* 19 (4): 310.
53. HARP JR; NILSSON L; SIESJO BK, 1976: The effect of halothane anaesthesia upon cerebral oxygen consumption in the rat. *Acta Anaesthesiol Scand* 20 (1):83.
54. DAVISON LA; STEINHELBER JC; EGER EI 2d, 1975: Psychological effects of halothane and isofluorane anesthesia. *Anesthesiology* 43 (3):313.
55. G. LOPEZ A; O. AGUIRRE V: Procedimiento técnico de los extendidos celulares, técnica de Papanicolaou (modificada). Introducción al citodiagnóstico. Universidad de Guadalajara, 1975. P49.
56. FERIA VELASCO A; KARNOVSKY MJ, 1970: Preservación óptima del sistema nervioso central por perfusión con glutaraldehído para estudio ultraestructural. *Arch Invest Med Mex* 1 (3):201.
57. R. MARTOJA; M. MARTOJA-PIERSON: Histología general y citología; inclusión. *Técnicas de Histología Animal*. Toray-Masson, S.A. Barcelona, España, 1970. P 24.
58. KLUVER H; BARRERA E, 1953: Methode for myeline and nerve cells. *J. Neuropath Exp Neurol* 12:400.
59. B.D. DISBREY; J.H. RACK: Haematoxylin and eosin, Harri's haematoxylin and eosin. *Histological Laboratory Methods*. E. and S. Livingstone. Inglaterra, 1970. P 99.
60. BATRAK GE; ZAKOPKA VM, 1978: Effects of ether and fluorothane on higher nervous activity. *Farmakol Toksikol* 41 (5):533.