

Curso 2010/11
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/1
I.S.B.N.: 978-84-15287-17-9

DINESH SUNDER LALCHANDANI LALCHANDANI

**Efecto del ácido L-2 cloropropiónico sobre
la corteza cerebelosa de la rata:
estudio experimental**

Directores

**FRANCISCO JOSÉ VALLADARES PARRILLA
RICARDO GUTIÉRREZ GARCÍA**



SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS
Serie Tesis Doctorales

AGRADECIMIENTOS

Ante todo me gustaría agradecer la labor del Dr. Valladares, al cual debo más de un agradecimiento. Gracias por haber sido mi profesor, quien me enseñó a amar el estudio de la Medicina, cuando empezaba a dar mis primeros pasos en esta ciencia. Gracias por tu paciencia, por tu tiempo, tu esfuerzo y tu comprensión como director de esta Tesis, pero por encima de todo, agradezco tu amistad, sin la cual, muchas cosas no hubieran sido posibles.

También me gustaría dar las gracias al Dr. Ricardo Gutiérrez por su inestimable ayuda.

Gracias a la familia, por ayudarme, entenderme y aguantarme, sobre todo en los momentos difíciles, que no fueron pocos.

Gracias al Dr. Leopoldo Higa, por su amistad, por ser una gran ayuda profesional y personal, por mostrarme siempre cuál es el camino.

Y sobre todo a mi mujer, mi *primum movens*.

Sin tí, nada tendría sentido.

INDICE

1.Introducción.....	9
1.1 Características anatómicas	9
1.2 Características histológicas	10
1.3. Receptores NDMA	16
1.4. Características funcionales	19
1.5. Patología cerebelosa	26
1.5.1. Ataxia simétrica	29
1.5.2. Ataxia focal	31
1.5.3. Ataxias hereditarias	32
1.6. Patología experimental	37
1.6.1. Metoxi-azo-metanol	39
1.6.2. Haluros de alquilo	43
1.6.3. Difenilhidantoína	44
1.6.4. Metilmercurio	45
1.6.5. Acrilamida	47
1.6.6. Alcohol etílico	48
1.6.7. Harmalina e isogaína	50
1.6.8. Bilirrubina	51
1.6.9. Ácido kaínico	53
1.6.10. Volkensina	53
1.6.11. Vitronectina	54
1.6.12. Delta-9-tetrahidrocannabinol	56
1.6.13. Triclorfón	57

1.6.14. Ácido L-2-cloropropiónico	60
1.6.15. Radiaciones ionizantes	62
2. Planteamiento y Objetivos	65
3. Material y Método	68
3.1 Animal de experimentación	68
3.2. Estudio histológico	69
3.3. Descripción de las series	69
3.4. Técnicas histológicas	
convencionales	69
3.5. Técnicas de	
Inmunohistoquímica	74
3.6. Técnicas de microscopía	
electrónica	80
4. Resultados	86
5. Discusión	115
6. Conclusiones	130
7. Bibliografía	

INTRODUCCION

1.- GENERALIDADES DEL CEREBELO

1.1 Características Anatómicas.

El cerebelo es el componente más desarrollado del rombencéfalo, localizándose en la fosa posterior, tras la membrana tectoria y sobre el tronco del encéfalo, formando el techo del IV ventrículo. Se conecta con el tronco del encéfalo y con el resto del cerebro a través de los pedúnculos cerebelosos superior, medio e inferior. Consta de 2 hemisferios cerebelosos unidos entre sí por una zona central denominada vermis cerebeloso. Su superficie está profundamente plegada constituyendo los surcos. Estos, a su vez, subdividen el cerebelo en dos mitades: superior e inferior y delimitan las subdivisiones, lóbulos anterior, posterior y floculonodular dentro de cada hemisferio. Los surcos y los lóbulos se forman pronto en el desarrollo embrionario del cerebelo y tienen un marcado significado funcional. El lóbulo floculonodular es el primero en constituirse y está relacionado principalmente con el equilibrio, encontrándose separado del resto del cerebelo por el surco posteroexterno. El lóbulo anterior, localizado rostralmente al surco primario, se relaciona con la propiocepción (sentido de la posición), mientras que el resto del cerebelo tiene que ver con complejos procesos de control motor automático (Williams y Warwick, 1985).

1.2 Características Histológicas.

El cerebelo tiene una estructura semejante a la de los hemisferios cerebrales: la corteza cerebelosa (sustancia gris) forma láminas (pliegues) y laminillas en la superficie y rodea a la sustancia blanca, dentro de la cual se localizan los núcleos cerebelosos profundos (dentado, emboliforme, globoso y fastigial) (Ghez y Thach, 2000).

Los elementos celulares más destacados de la corteza cerebelosa son las neuronas (Purkinje, granulares, Lugaro, en cesta, estrelladas y Golgi - II), los astrocitos (astroglía protoplásmica y glía de Von Bergmann y Fañanás) y la microglía (Díaz-Flores y cols., 1977).

Las neuronas corticales cerebelosas se desarrollan en diferentes fases evolutivas. Las células de Purkinje se constituyen entre los días 14 -16 de la gestación, en el caso de la rata; en el momento del nacimiento se forma un estrato de aproximadamente 6 células de espesor que se transforman en una sola capa entre los 3 - 4 días postnatal.

Por otro lado las células granulares se forman, en la fase embrionaria, a partir de la capa germinal externa, entre los días 7 - 15 con un pico máximo entre los días 10 - 11 para,

posteriormente, migrar de la capa germinal externa, a la capa granular interna, tras el nacimiento.

Las hormonas tiroideas influyen en su desarrollo *in vivo*, mientras que el hipotiroidismo, en ratas, reduce su proliferación y migración; por otro lado, el hipertiroidismo causa maduración prematura de estas neuronas y un incremento en la muerte celular (Burgoyne y Cambray-Deakin, 1988; Benjamín y cols., 1988)

.

Las interneuronas de la capa molecular, en cesta y estrelladas se forman entre los días 6 – 7 del desarrollo embrionario, y las granulares, Golgi – II se forman entre y 10 – 11 de vida intrauterina, derivando de precursores localizados en las cercanías del IV ventrículo, los cuales migran a través de la sustancia blanca hacia la corteza cerebelosa (Zhang y Goldman, 1996).

La corteza cerebelosa está constituida por 3 capas celulares: la más externa, plexiforme o molecular, es de naturaleza sináptica fundamentalmente y contiene las neuronas estrelladas de axón corto y largo, las neuronas en cesta y las de Lugaro, adyacentes a las de Purkinje. La capa media se compone de las neuronas gigantes de Purkinje, cuyas dendritas se ramifican profusamente en la capa molecular y

cuyo axón atraviesa la capa de los granos y entra en la sustancia blanca.

La capa de los granos o granular es la más interna y está densamente poblada por las neuronas granulares (granos del cerebelo), de pequeño tamaño que tienen como neurotransmisor en sus axones (las fibras paralelas) el glutamato (Fonnum y cols. 1970; Ottersen, 1993), y por neuronas de Golgi – II, más grandes pero mucho menos numerosas, con GABA y glicina como neurotransmisores (Wilkin y cols., 1981, Delgado-García, 2001).

En la década de los años 90 del siglo XX, Mugnaini y Floris (1994) y Mugnaini y cols. (1997), describieron un nuevo tipo celular en la capa granular, denominado célula en cepillo (*brush cell*), cuyas conexiones y significado están en estudio (Álvarez-Vicente y cols., 2004). Respecto al componente glial destacan los astrocitos protoplásmicos, en las capas molecular y granular, y la neuroglía de Von Bergmann y Fañanás, con sus típicas imágenes en candelabro, en vecindad a las neuronas de Purkinje (Williams y Warwick, 1985).

La sustancia blanca adopta un patrón organizativo similar a un árbol de ramificación repetida, denominándosele "*árbol de la vida*" (Williams y Warwick, 1985). El componente celular

consta fundamentalmente de elementos gliales: astrocitos fibrosos y los oligodendrocitos que forman la vaina de mielina. Asimismo podemos localizar 3 tipos de fibras en la sustancia blanca: intrínsecas, aferentes y eferentes. Las intrínsecas conectan áreas diferentes del mismo hemisferio o el mismo área en ambos hemisferios. Las aferentes y eferentes conectan el cerebelo con otras partes del Sistema Nervioso Central.

Sus fibras se reúnen en 3 haces en cada hemisferio, denominados pedúnculos superior, medio e inferior (Williams y Warwick, 1985).

Las fibras aferentes forman la mayor parte de la sustancia blanca. Entran por los pedúnculos cerebelosos medio e inferior y terminan en la corteza cerebelosa, teniendo muchas de ellas conexiones colaterales en los núcleos profundos. Una gran proporción de estas fibras aferentes terminan como fibras musgosas en la capa granular. Estas fibras musgosas tienen terminales bulbosos o varicosos que hacen contactos sinápticos con las prolongaciones digitiformes de las dendritas de los granos, siendo glutamaérgicas en lo que respecta a la composición química del neurotransmisor (Fonnum y cols. 1970; Ottersen, 1993, Díaz-Flores, 1977). A continuación el axón granular asciende hasta la capa molecular, se bifurca en forma de T, constituye la fibra paralela y establece sinapsis con las espinas de las dendritas

más altas y finas de las neuronas de Purkinje. Finalmente el axón de la neurona de Purkinje entra en la sustancia blanca siendo este elemento la única eferencia cortical cerebelosa (Díaz-Flores, 1977).

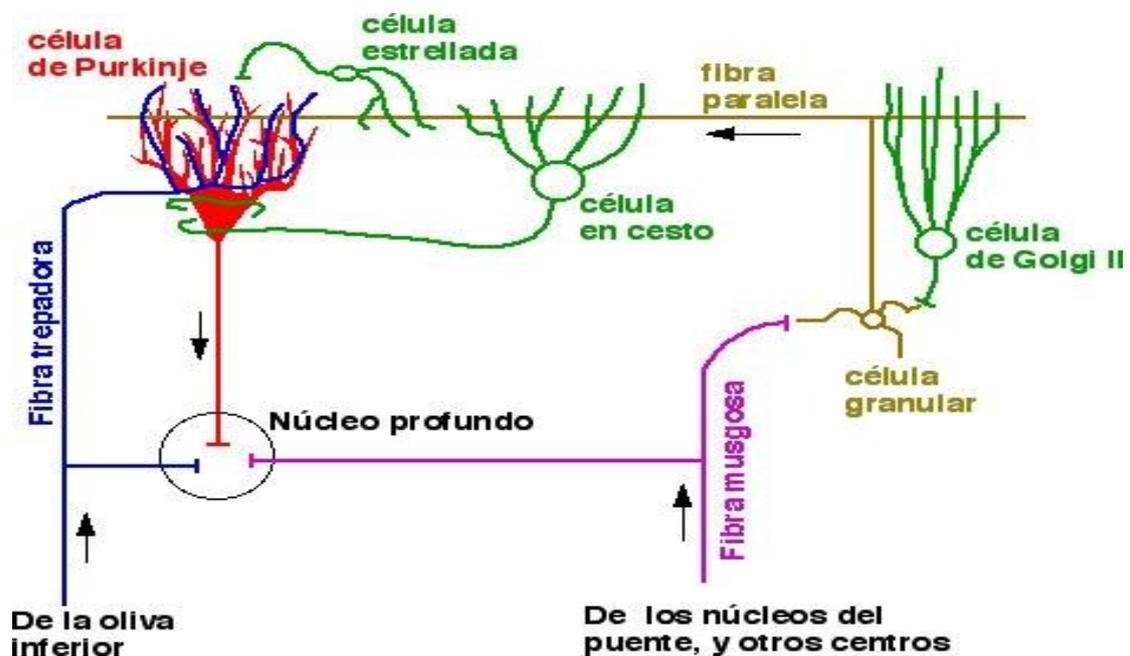
Una menor proporción de fibras aferentes lo constituyen las fibras trepadoras, cuyo origen está localizado en la oliva inferior. Los contactos sinápticos de estas fibras trepadoras (neurotransmisor glutamato) son realizados con las espinas de las ramas dendríticas gruesas de las neuronas de Purkinje.

Al igual que en el caso de las fibras musgosas la eferencia de la corteza cerebelosa es el axón de la neurona de Purkinje (Díaz-Flores, 1977, Williams y Warwick, 1985).

Como ya hemos indicado, las neuronas de Purkinje son las células productoras o eferentes de la corteza cerebelosa, teniendo como neurotransmisor al ácido - γ - aminobutírico (GABA) (Fonnum y cols. 1970; Ottersen, 1993). Con excepción de una minoría localizada en el lóbulo floculonodular, sus axones no abandonan el cerebelo, sino que se proyectan hacia los núcleos cerebelosos profundos. En estos núcleos nacen la mayoría de las eferencias cerebelosas. Los axones del grupo minoritario de neuronas de Purkinje se

proyectan directamente al tronco del encéfalo (Williams y Warwick, 1985).

Esquema resumen de los circuitos sinápticos de la corteza cerebelosa.



1.3 Receptores NMDA

Previamente hemos expuesto que los terminales axónicos de los granos cerebelosos, las fibras musgosas y las fibras trepadoras poseen como neurotransmisor el Glutamato, mientras que las células de Purkinje, y algunas interneuronas corticocerebelosas, emplean el GABA (ácido-gamma-aminobutírico) (Fonnum y cols., 1970; Ottersen, 1993). Por último las células de Golgi - II utilizan tanto

Glicina como GABA como neurotransmisores (Wilkin y cols., 1981).

Existen algunos ejemplos que demuestran que algunos de los parámetros bioquímicos del cerebelo son diferentes de los de otras regiones, pudiendo este hecho contribuir a la vulnerabilidad del mismo. El receptor NMDA en el cerebelo de la rata, ratón y humanos expresa fundamentalmente las subunidades NR1 y NR2C (Akazawa y cols., 1994; Watanabe y cols., 1994; Rigby y cols., 1996). La subunidad NR1 es expresada en la mayoría de las neuronas cerebelosas, mientras que la subunidad NR2B se expresa transitoriamente en las neuronas granulares durante las 2 primeras semanas de vida postnatal. En el cerebro la mayoría la mayoría de las células poseen las subunidades NR1 y NR2A. Así, el transportador del Glutamato de la membrana plasmática (GLAST) se localiza en los astrocitos cerebelosos mientras que GLT-1 predomina en el cerebro (Chaudhry y cols., 1995), el cerebelo tiene una alta actividad acetilcolinesterasa y unos relativamente bajos niveles de actividad de colinacetiltransferasa.

Con respecto a la expresión de los receptores NMDA en la corteza cerebelosa de ratas adultas y en estadios embrionarios, los grupos de investigación de Akazawa y cols (1994) y Watanabe y cols. (1994) han realizado un detallado estudio de los mismos usando técnicas de *hibridación in situ*.

Los cambios en el patrón de expresión de los cinco receptores NMDA (NR1, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D) durante el desarrollo embrionario son muy destacados. Así, en la capa granular externa las señales de hibridación de mRNAs para NR1, NR2A, NR2B y NR2C aparecían el día 3 postnatal, mientras que la expresión de señales de mRNA para NR2D eran nulas en todos los estadios del desarrollo. El mRNA para NR1 fue expresado en todas las neuronas corticocerebelosas de todas las fases embrionarias estudiadas. La positividad del mRNA para el NRA2 aparece en todas las células de Purkinje y granulares durante la segunda semana de vida postnatal; por otro lado las señales positivas del mRNA para el NR2B en las neuronas granulares se detectaron, transitoriamente, durante las dos primeras semanas tras el nacimiento. Con respecto a la expresión del NR2C, esta era manifiesta en las células granulares y gliales durante la segunda semana de vida postnatal, mientras que en el caso del NR2D solo se expresaba, transitoriamente, los primeros ocho días tras el nacimiento; este mismo hecho se puso de manifiesto en las células de Golgi - II y estrelladas de ratas adultas. Finalmente, en los núcleos cerebelosos, la expresión del mRNA de NR1, NR2A, NR2B y NR2D fue intensa, en mayor o menor medida, el día del nacimiento, mientras que la expresión del mRNA para el NR2C fue detectada por primera vez el día 14 de vida postnatal.

En resumen, los principales cambios en los patrones de expresión en la corteza cerebelosa, se observaron las 2 primeras semanas de vida postnatal, cuando el desarrollo y la maduración del cerebelo es más rápida. (Watanabe y cols., 1994).

1.4 Características Funcionales

Desde un punto de vista funcional, el cerebelo se divide en tres partes, pero de manera distinta a la división anatómica. El nódulo en el vermis y el flóculo flanqueador en el hemisferio de cada lado forman el *lóbulo flóculonodular*. Este lóbulo, que filogenéticamente es la parte más antigua del cerebelo, tiene conexiones vestibulares y está relacionado con el equilibrio. El resto del vermis y las porciones adyacentes mediales de los hemisferios forman el *espinocerebelo*, la región que recibe información propioceptiva del cuerpo así como también una copia del “plan motor” de la corteza motora. Al comparar el plan con la ejecución, suaviza y coordina los movimientos que se están realizando. El vermis se proyecta al área del tallo encefálico implicada con el control de los músculos axiales y proximales de las extremidades, mientras que los hemisferios proyectan a las áreas del tallo encefálico relacionadas con el control de los músculos distales de las extremidades. Las porciones laterales de los hemisferios cerebelosos se denominan *neocerebelo*. Filogenéticamente son las más recientes,

interactuando con la corteza motora en la planificación y programación de los movimientos (Ugawa, 2009).

1.4.1 Conexiones

El cerebelo tiene una corteza externa que está separada de los núcleos cerebelosos profundos por la sustancia blanca. Su entrada aferente va hacia la corteza y a través de colaterales, a los núcleos profundos. Hay cuatro núcleos profundos: *dentado*, *globoso*, *emboliforme* y *fastigio*. El globoso y el emboliforme algunas veces se conjuntan en una protuberancia llamada *núcleo interpuesto*. La corteza cerebelosa se proyecta a estos núcleos, y éstos proporcionan la única salida del espinocerebelo y el neocerebelo. La porción medial del espinocerebelo se proyecta a los núcleos fastigio y de ahí al tallo encefálico. Las porciones hemisféricas adyacentes del espinocerebelo se proyectan a los núcleos emboliforme y globoso, y de ellos al tallo encefálico. El neocerebelo se proyecta al núcleo dentado y de ahí directa o indirectamente al núcleo ventrolateral del tálamo.

Las vías aferentes transmiten información propioceptiva y sensorial desde todas las partes del cuerpo. Una parte de los mensajes propioceptivos se relevan en la oliva inferior y las fibras olivocerebelosas constituyen la entrada de fibras trepadoras excitadoras. A través de los núcleos pontinos,

llega información de todas las áreas motoras de la corteza cerebral (Brodal, 1987).

A continuación (Tabla 1) se muestran las vías aferentes cerebelosas con sus funciones, aunque existen otras múltiples vías que transmiten impulsos de los núcleos en el tallo encefálico a la corteza cerebelosa y a los núcleos profundos, así como entradas serotoninérgicas de los núcleos del rafe y noradrenérgica del locus ceruleus:

FASCICULOS AFERENTES	TRANSMITE
VESTIBULOCEREBELOSO	Impulsos vestibulares de los laberintos directos y por los núcleos vestibulares
ESPINOCEREBELOSO DORSAL	Impulsos propioceptivos y exteroceptivos del cuerpo
ESPINOCEREBELOSO VENTRAL	Impulsos propioceptivos y exteroceptivos del cuerpo
CUNEOCEREBELOSO	Impulsos propioceptivos, especialmente de la cabeza y el cuello
TECTOCEREBELOSO	Impulsos auditivos y visuales a través de los colículos inferior y superior
OLIVOCEREBELOSO	Información propioceptiva corporal por relevo en la oliva inferior
PONTOCEREBELOSO	Impulsos de la corteza cerebral motora y de otras regiones de la misma, a través de los núcleos pontinos

Tabla 1. Funciones de las principales aferencias cerebelosas

1.4.2. Lóbulo floclonodular.

Posee conexiones vestibulares. Los animales, tras la destrucción del mismo, caminan de manera tambaleante sobre una base amplia, tienden a caerse y rehúsan moverse sin apoyarse. Defectos similares se ven en niños con tumores

cerebelosos de la línea media (meduloblastoma), como signos precoces de la enfermedad (Hahn, 1950).

1.4.3. Cinetosis.

La ablación selectiva del lóbulo flocculonodular en el perro, anula la cinetosis. Ésta es debida a la estimulación repetida y excesiva del laberinto (Helling y cols, 1994).

1.4.4. Efectos sobre los reflejos miotáticos.

La estimulación de las áreas cerebelosas que reciben el aporte propioceptivo a veces inhiben o facilitan los movimientos provocados por la estimulación de la corteza cerebral. Las lesiones de las láminas I-VI y de las áreas paramedianas causan en animales de experimentación, espasticidad localizada a la parte del cuerpo que está representada en la parte destruida del cerebelo.

Sin embargo, la hipotonía es característica de la destrucción cerebelosa en el humano (Rodríguez-García y cols.,2004).

1.4.5. Efectos sobre el movimiento.

Excepto por los cambios de los reflejos miotáticos, tanto los animales de experimentación como el humano con lesiones de hemisferios cerebelosos no muestran anormalidades mientras permanecen en reposo. Sin embargo, cuando se mueven aparecen anormalías pronunciadas. Todos los movimientos están caracterizados por una incoordinación por

errores en la frecuencia, alcance, fuerza y dirección del movimiento. Es lo que se conoce como ataxia. Con lesiones circunscritas, la ataxia puede estar localizada en una parte del cuerpo.

Cuando únicamente está lesionada la corteza, las anormalidades del movimiento gradualmente desaparecen al presentarse la compensación. Las lesiones de los núcleos cerebelosos producen defectos más generalizados y las anomalías son permanentes.

Otros signos de la deficiencia cerebelosa en el humano aportan información adicional de la importancia del cerebelo en el control del movimiento. El denominador común de la mayor parte de los signos cerebelosos es la frecuencia, el alcance, la fuerza y la dirección inapropiados del movimiento. La ataxia se manifiesta no sólo en la marcha de amplia base, insegura, de los pacientes sino también en defectos de la destreza de los movimientos que intervienen en la producción del habla, de manera que resulta un lenguaje escándido. También es posible encontrar disimetría y temblor intencional en el movimiento.

El fenómeno de rebote, que es la incapacidad para detener un movimiento de manera brusca, por ejemplo, cuando se flexiona el antebrazo y se aplica resistencia a dicho

movimiento y de manera brusca suprimimos la resistencia, la respuesta normal es el cese inmediato de fuerza de flexión.

En condiciones patológicas, permanece la fuerza de flexión del antebrazo y este se movería dibujando un amplio arco hacia atrás. Este es uno de los motivos de la adiadococinesia, que es la incapacidad para ejecutar movimientos opuestos rápidamente alternantes.

También es posible apreciar en los pacientes con lesiones cerebelosas, la dificultad para ejecutar acciones que implican el movimiento simultáneo en más de una articulación.

Ellos fragmentan tales movimientos y los llevan a cabo en una articulación cada vez, fenómeno conocido como descomposición del movimiento (Stoodley y Schamahmann, 2010).

1.4.6. Cerebelo y aprendizaje.

El cerebelo participa en los ajustes aprendidos que hacen más fácil la coordinación cuando se efectúa una y otra vez una tarea determinada. Esta función se encuentra en los impulsos de entrada a través de los núcleos olivares. Cada célula de Purkinje recibe impulsos de 250.000 – 1.000.000 de fibras musgosas; pero a su vez tiene una única fibra

trepadora proveniente de la oliva inferior, la cual sinapta entre 2.000 – 3.000 veces con la célula de Purkinje. La activación de las fibras trepadoras produce una gran espiga compleja en la célula de Purkinje; además. Esta espiga puede originar de alguna manera la modificación a largo plazo del patrón de los impulsos provenientes de la fibra musgosa hacia esa célula de Purkinje en particular.

La actividad de la fibra trepadora se incrementa cuando es aprendido un nuevo movimiento y las lesiones selectivas del complejo olivar inferior suprimen la capacidad de producir ajustes a largo plazo en ciertas respuestas motoras (Seidler, 2010).

1.5.- PATOLOGÍA CEREBELOSA

Comparte, con la corteza cerebral y la médula espinal, numerosos tipos de lesiones de distinto origen y naturaleza tales como, infecciones, enfermedad vascular, hipoxia, desórdenes metabólicos, enfermedades desmielinizantes y degenerativas así como tumores (Hirano, 1997).

En general, la lesión patológica o experimental del cerebelo produce un conjunto de síntomas comunes a los distintos síndromes cerebelosos. Es de destacar que la siguiente descripción se refiere, sobre todo, a lesiones de tipo cortical,

ya que, normalmente, la lesión de los núcleos cerebelosos agrava aún más los efectos de la lesión en la corteza cerebelosa.

En la descripción clásica de los efectos de la lesión del cerebelo realizada por Holmes en 1939, se propone una tríada de déficits básicos que subyacen a todos los demás incluidos en el síndrome cerebeloso (Holmes, 1939; Lechtenberg, 1993).

Estos autores observan una disminución del tono muscular (hipotonía) de los grupos musculares afectados. Dicha hipotonía se acompaña de pérdida de fuerza muscular en la realización del movimiento y/o fácil fatigabilidad (astenia). El síntoma que completa la tríada es la atasia o incapacidad para mantener una postura estable.

En el estudio del paciente con lesión cerebelosa, la ataxia es un hallazgo neurológico frecuente e importante. Los síntomas y signos de la ataxia son alteración de la marcha, habla poco clara (disartria silabeante), visión borrosa secundaria a nistagmo, descoordinación manual y temblor intencional. Estos síntomas aparecen tanto en la afectación directa del cerebelo, como en la de sus vías aferentes y eferentes, incluidas las espinocerebelosas, y de las vías frontopontocerebelosas que se originan en la parte anterior del lóbulo frontal (Área 10 de Brodmann). Hay que distinguir la ataxia cerebelosa verdadera de la ataxia debida a

enfermedad vestibular o laberíntica, pues esta última provoca un trastorno de la marcha que se asocia a mareo, sensación de vahído o vértigo de cierta intensidad. La ataxia cerebelosa verdadera no se acompaña de estos síntomas vertiginosos y se manifiesta claramente por una marcha inestable secundaria al desequilibrio.

Una pérdida de fuerza en los músculos proximales de las extremidades inferiores y la variante de la polineuritis idiopática aguda (síndrome de Miller-Fisher) pueden simular el desequilibrio de la enfermedad cerebelosa. En el paciente con ataxia la velocidad de aparición y las características de los síntomas son importantes para determinar los posibles diagnósticos diferenciales (Tabla 2).

Tabla 2. ETIOLOGIA ATAXIAS CEREBELOSAS ADQUIRIDAS

SIGNOS SIMETRICOS Y PROGRESIVOS			SIGNOS FOCALES E IPSILATERALES		
AGUDA (horas a días)	SUBAGUDA (días a semanas)	CRONICA (meses a años)	AGUDA (horas a días)	SUBAGUDA (días a semanas)	CRONICA (meses a años)
Intoxicación: fenitoína, barbitúricos, Cerebelitis vírica aguda. Síndrome postinfeccioso.	Intoxicación: mercurio, disolventes, gasolina, colas; quimioterápicos citotóxicos. Alcohólico-nutricional. (carencia VitB ₁ y B ₁₂) Enfermedad de Lyme.	Síndrome paraneoplásico. Hipotiroidismo. Enfermedades hereditarias. Tabes dorsal.	Vascular: infarto, hemorragia o hematoma subdural cerebeloso. Infecciosa: Absceso cerebeloso.	Neoplásica: glioma o metástasis. Desmielinizante: Esclerosis múltiple, LMP relacionada con SIDA.	Gliosis estable secundaria a lesión vascular o placa desmielinizante. Lesión congénica: Malf. Dandy-Walker o Chiari.

1.5.1. Ataxia simétrica.

Una ataxia simétrica y progresiva puede clasificarse también, según su comienzo, en aguda, subaguda o crónica. Las formas reversibles y agudas son las producidas por la intoxicación con alcohol, fenitoína, barbitúricos y otros agentes. Son también causas de ataxia aguda o subaguda la intoxicación producida por la exposición al tolueno, la inhalación de gasolina, de pegamento, de pinturas en aerosol, la exposición al metil mercurio o al bismuto, o el tratamiento

con quimioterápicos como el fluoruracilo, el paclitaxel o el metotrexato (Bota y Dafer, 2009).

Los niños que sufren síndrome postinfeccioso, sobre todo después de la varicela, pueden presentar ataxia y leve disartria, ambas reversibles. Otras causas infecciosas poco frecuentes de ataxia adquirida son los virus de la polio, los Coxsackie, los virus echo, el virus de Epstein-Barr, la toxoplasmosis, la legionella y una proteína priónica responsable de la enfermedad de Creutzfeld-Jakob.

Una ataxia de la marcha subaguda que se presenta durante semanas o meses (degeneración subaguda cerebelosa del vermis) puede ser consecuencia directa de la combinación de alcoholismo y malnutrición. También se ha asociado con la ataxia la hiponatremia (Klockgether, 2010).

Existe un síndrome paraneoplásico que cursa con ataxia incapacitante de la marcha que puede ir asociada a mioclonía y opsoclonía. Se han asociado algunos autoanticuerpos específicos (Yo, Ri y PCD) que son responsables de la degeneración cerebelosa y que afectan principalmente al vermis. En ocasiones este síndrome puede anticiparse incluso al diagnóstico de la enfermedad tumoral (carcinoma de mama y ovario), pudiendo ser el primer síntoma de la enfermedad tumoral. La resección tumoral y la quimioterapia pueden

lograr la estabilización e incluso la mejoría del cuadro, aunque suponen un signo de mal pronóstico de la enfermedad neoplásica (Darnel y cols., 2006).

Una ataxia simétrica crónica de meses o años sugiere una ataxia hereditaria, de origen metabólico o por infección crónica. El hipotiroidismo es una causa reversible y de rápido tratamiento. Las enfermedades infecciosas que pueden manifestarse por ataxia son la sífilis meningovascular y la tabes dorsal debido a la degeneración de los cordones posteriores y de las vías espinocerebelosas medulares. La enfermedad de Lyme puede ocasionar ataxia.

1.5.2. Ataxia focal.

La ataxia focal aguda suele ser consecuencia de un proceso cerebrovascular, generalmente un infarto isquémico o hemorrágico. Estas lesiones producen de forma característica síntomas cerebelosos ipsilaterales, pudiendo cursar con alteraciones del nivel de consciencia debido a la compresión del tronco encefálico o a hipertensión intracraneal; pueden producirse signos de afectación de la protuberancia ipsilateral, como la parálisis de los pares craneales VI y VII.

La presencia de signos focales de ataxia aguda que empeoran de forma progresiva debe hacer sospechar cuanto antes la

existencia de un hematoma subdural de fosa posterior, un absceso, un tumor cerebeloso primario o metastásico o una lesión desmielinizante aguda de la esclerosis múltiple.

Muchas de estas lesiones representan verdaderas urgencias neurológicas. Los pacientes con SIDA y linfoma o LMP pueden presentar un síndrome cerebeloso focal agudo o subagudo. Causas de ataxia crónica focal son la esclerosis múltiple, las lesiones congénitas como la malformación de Chiari de tipo I y los quistes congénitos de fosa posterior o síndrome de Dandy-Walker (Ten Donkelaar y Lammens, 2009)

1.5.3. Ataxias hereditarias

De los síndromes que constituyen las ataxias hereditarias, algunos presentan una forma de herencia autosómica dominante o recesiva y otros están producidos por mutaciones mitocondriales y, por tanto, presentan un patrón de herencia materno (Teive, 2009).

En los últimos años se han realizado grandes progresos en la identificación de la base molecular de estos síndromes lo que ha permitido una clasificación genómica que a continuación se muestra (Tabla 3):

NOMBRE	LOCUS	CLINICA
AEC1 (herencia AD-1)	6q22-p23 con repeticiones CAG. Ataxina-1	Ataxia con oftalmoparesia, signos piramidales y extrapiramidales
AEC2(herencia AD-2)	12q-23-q24.1 con repeticiones CAG. Ataxina-2	Ataxia con movimientos sacádicos lentos y mínimos signos piramidales y extrapiramidales
Enfermedad de Machado-Joseph/AEC3 (herencia AD-3)	14q24.3-q32 con repeticiones CAG. EMJ-ataxina-3.	Ataxia con oftalmoparesia y signos piramidales, extrapiramidales y amiotrofia variables
AEC4 (herencia AD-4)	16q24-ter	Ataxia con movimientos oculares normales, neuropatía axonal sensitiva y signos piramidales
AEC5 (herencia AD-5)	Región centromérica del cromosoma 11	Ataxia y disartria; familia descendiente de los abuelos paternos del presidente Lincoln
AEC6 (herencia AD-6)	19p13 con repeticiones CAG en el gen alfa-1a de los canales de calcio dependientes de voltaje	Ataxia y disartria, nistagmo, leve pérdida de la sensibilidad propioceptiva
AEC7 (herencia AD-7)	3p14.1-p.21.1 con repeticiones CAG. Ataxina-7	Oftalmoparesia, pérdida de la visión, ataxia, disartria, respuesta plantar extensora, degeneración retiniana pigmentaria; gravedad variable
AEC8 (herencia AD-8)	13q21 con repeticiones CTG	Ataxia, disartria, nistagmo, espasticidad de MMII e hipopalestesia.
AEC10 (herencia AD-10)	22q	Ataxia, disartria, nistagmo, convulsiones parciales complejas y motoras generalizadas.
AEC11 (herencia AD-11)	15q14-q21.3 por ligamiento	Marcha lenta y ataxia de extremidades, disartria, nistagmo vertical, hiperreflexia
AEC12 (herencia AD-12)	5q31-q33 por ligamiento	Temblor, pobreza de movimientos, hiperreflexia, distonía, ataxia, disautonomía, demencia.
AEC13 (un solo caso)	6q27 con repeticiones CAG en el gen que fija la proteína TATA	Ataxia de la marcha y de las extremidades, hiperreflexia, respuestas plantares extensoras, disartria, disfagia, retraso mental profundo
Atrofia dentatorrubropalidoluisiana (AD)	12p12-ter con repeticiones CAG. Atrofina.	Ataxia, coreoatetosis, distonía, convulsiones, mioclonía, demencia.
Ataxia de Friedrich (A.recesiva)	9q13-q21.1 con repeticiones CAG intrónicas. Frataxina.	Ataxia, arreflexia, respuestas plantares extensoras, déficit de sensibilidad posicional, miocardiopatía, diabetes, escoliosis, deformidades en los pies, alteración del transporte de Fe desde las mitocondrias
Ataxia de Friedrich (A.Recesiva)	8q13.1-q13.3,déficit de alfa-TTP	Fenotípicamente igual a la anterior, con asociación de déficit de vitamina E
Síndrome de Kearns-Sayre (esporádico)	Perdida en el ADNmt y mutaciones de duplicación	Ptois, oftalmoplejia, degeneración retiniana pigmentaria, miocardiopatía, diabetes, sordera, bloqueo AV, aumento de proteínas en LCR, ataxia
Epilepsia mioclónica y síndrome de las fibras rojas rasgadas (herencia materna)	Mutación en el ADNmt o en el ARN ^l en 8344; también una mutación en 8356	Epilepsia mioclónica, miopatía con fibras rojas rasgadas, ataxia
Encefalopatía mitocondrial, acidosis láctica y ACV (MELAS)(herencia materna)	Mutación del ARN ^l en 8243; también en 3271 y 3252.	Cefalea, ACV, acidosis láctica y ataxia
Enfermedad de Leigh: encefalopatía necrotizante subaguda (herencia materna o AR)	Defecto del complejo V del ADNmt o defecto de la síntesis de una proteína mitocondrial (ambos con herencia materna); o defecto del complejo IV (AR)	Embotamiento, hipotonía, defectos de los PC, insuficiencia respiratoria, en RMN (T2) señales hiperintensas en ganglios basales, cerebelo o troncoencéfalo; ataxia
Ataxia episódica tipo 1 (AD)	12p; gen del canal de potasio, KCNA1	Episodios de ataxia de minutos de duración, provocados por sobresaltos o ejercicio, con miocimias en manos y cara; los signos cerebelosos son progresivos, responde a la fenitoína.
Ataxia episódica tipo 2 (AR)	19p13	Episodios de ataxia de días de duración, provocados por estrés o fatiga; con nistagmo de la mirada vertical inferior; provoca atrofia cerebelosa; signos cerebelosos progresivos; responde a la acetazolamida
Ataxia telangiectasia (AR)	11q22-q23; gen ATM que regula el ciclo celular, transducción de la señal mitogénica y recombinación meiótica	Telangiectasia, ataxia, infecciones pulmonares, neoplasias del sistema linfático; déficit de IgA e IgG, diabetes mellitus, cáncer de mama
Ataxia espinocerebelosa de comienzo infantil de Nikali y cols (AR)	10q23.3-q24.1	Ataxia infantil, neuropatía sensitiva; atetosis, hipoacusia, oftalmoplejia, atrofia óptica, hipogonadismo primario en mujeres

Tabla 3. CLASIFICACION GENOTIPICA DE LAS ATAXIAS ESPINOCEREBELOSAS

De estas formas hereditarias, haremos un especial hincapié en las siguientes:

- ATAXIA DE FRIEDREICH: Es la forma más frecuente de ataxia hereditaria, y representa la mitad de todas las ataxias hereditarias. Puede presentarse en su forma clásica o asociada a un síndrome de carencia de vitamina E determinado genéticamente; las 2 formas son clínicamente indistinguibles.

Se manifiesta antes de los 25 años de edad con una marcha tambaleante, caídas frecuentes y titubeos que empeoran progresivamente. Las extremidades inferiores se afectan con mayor frecuencia que las superiores. La disartria puede ser algunas veces el síntoma de debut y rar vez los primeros síntomas son la escoliosis progresiva, la deformidad de los pies (cavo, equinovaro), el nistagmo o la cardiopatía (miocardiopatía hipertrófica, que se manifiesta en un 90% de los pacientes). La mediana de la edad en el momento de la muerte es de 35 años, con una pronóstico mejor en mujeres (supervivencia a los 20 años es del 100 % en mujeres vs. 63% en varones).

Un pequeño porcentaje de pacientes presenta retraso mental moderado o síndromes psiquiátricos. Se ha encontrado una incidencia anormalmente alta de diabetes mellitus (20%)

asociada a resistencia insulínica y a disfunción de las células beta pancreáticas (Santos y cols., 2010).

Las principales lesiones anatomopatológicas se localizan en la médula espinal, las células de los ganglios de las raíces dorsales y los nervios periféricos. Puede existir ligera atrofia del cerebelo y de las circunvoluciones cerebrales. Los signos de esclerosis u de degeneración predominan en las vías espinocerebelosas, en las vías corticoespinales laterales y en los cordones posteriores. Se ha descrito la degeneración de los núcleos de los nervios glodofaríngeo, vago e hipogloso, así como de los núcleos cerebelosos profundos. La corteza cerebral es histológicamente normal con excepción de la pérdida de las células de Betz en la circunvolución precentral. Los nervios periféricos se ven muy afectados, con pérdida de las grandes fibras mielínicas. La densidad de las pequeñas fibras mielínicas es normal, aunque el tamaño de los axones y el grosor de la mielina están disminuídos. La anatomía patológica del corazón muestra la presencia de hipertrofia miocítica fibrosis, displasia fibromuscular vascular focal, con depósitos en la capa media o debajo de la íntima de material PAS positivo, miocitopatía con núcleos pleomórficos, y degeneración focal de los nervios mielínicos y amielínicos además de los ganglios cardíacos (Morral y cols., 2010).

- ATAXIA-TELANGIECTASIA (AT): Estos pacientes presentan en la primera década de la vida lesiones telangiectásicas

progresivas asociadas a déficit de la función cerebelosa y nistagmo. Las manifestaciones neurológicas son las mismas que las de la enfermedad de Friedreich, y esta enfermedad debe incluirse en el diagnóstico diferencial. Puede cursar con ataxia del tronco, ataxia de las extremidades, disartria, respuestas plantares extensoras, sacudidas mioclónicas, arreflexia y déficit sensitivo distal. En los pacientes con AT existe una incidencia elevada de infecciones pulmonares recurrentes y de neoplasias de los sistemas linfáticos y reticuloendotelial (Ries y cols., 1999).

También existe una mayor incidencia de cáncer. Se ha descrito la presencia de la hipoplasia tímica con inmunodeficiencia celular y humoral (IgA e IgG2), envejecimiento premauro y trastornos endocrinos como la diabetes mellitus insulino dependiente. Existe mayor incidencia de linfomas de Hodgkin como no hodgkinianos y leucemias agudas de células T. Las mujeres que son heterocigotas para AT presentan una mayor incidencia de cáncer de mama (Zhang, 2010).

En la AT, los defectos inmunológicos y la mayor susceptibilidad al cáncer se han relacionado con trastornos celulares. La exposición de cultivos celulares a las radiaciones ionizantes lentifica el índice de replicación del ADN y aumenta la frecuencia de aberraciones cromosómicas.

Las alteraciones histopatológicas más llamativas son la pérdida en la corteza cerebelosa de células de Purkinje, granulosas y en cesta, así como de neuronas en los núcleos profundos del cerebelo. Las olivas del bulbo raquídeo puede presentar también pérdida de neuronas. Existe así mismo una pérdida de neuronas del asta anterior de la médula espinal y de células de los ganglios de las raíces dorsales, junto con desmielinización de los cordones posteriores de la médula. El defecto del sistema linfático más frecuente es la hipogenesia o agenesia de timo. Los marcadores de laboratorio más consistentes son la elevación de la alfa-fetoproteína y niveles bajos de IgA, IgG y/o IgE en el suero (Aurais, 1998).

1.6. PATOLOGÍA EXPERIMENTAL

Nos centraremos fundamentalmente en diversas componentes químicos con probado efecto neurotóxico sobre elementos celulares de la corteza cerebelosa.

Es conocido que determinadas sustancias tienen la capacidad de lesionar, total o parcialmente, tanto al Sistema Nervioso Central como al Periférico; dichas sustancias denominadas Neurotóxicos pueden tener diferente naturaleza química, y modo de acción, así como afectar a neuronas, células gliales, fibras nerviosas, e incluso ganglios.

Una de las ventajas de estudiar los efectos tóxicos en el cerebelo, aparte de su relativamente simple estructura estratificada, es la posibilidad de aislar neuronas granulares para su estudio en cultivos; las células pueden ser obtenidas de cerebelos en desarrollo de rata o ratón (7-8 días) y crecer en condiciones de experimentación: estas neuronas pueden ser usadas entre 3-14 días, aunque lo más habitual es hacerlo a partir de 6 días de cultivo (Gallo y cols., 1982). Este tipo celular ha sido ampliamente utilizado en estudios toxicológicos, siendo, asimismo, de gran valor la facilidad con que las fibras musgosas pueden ser separadas de otros terminales nerviosos (Viennot y cols., 1991).

Existe un gran número de compuestos químicos y físicos que afectan al cerebelo, especialmente durante el desarrollo. Sustancias tóxicas, tales como la cicasina, metoxi-azo-metanol y arabinósido de citosina, cuando son administradas en fases tardías del desarrollo bloquean la formación de la capa granular de la cortical cerebelosa; estas sustancias tienen un marcado efecto por prácticamente todas las estructuras cerebrales, a excepción del bulbo olfatorio (Matsutani y cols., 1983, Chen y Hillman, 1989).

A continuación presentamos algunos de ellos.

1.6.1. Metoxi-azo-metanol (Metil-Azoxi-Metanol)

Esta droga es un agente citotóxico que provoca la muerte de células proliferantes por metilación de la posición 7 de la

guanina en los ácidos nucleicos (Matsumoto y Higa, 1966; Johnston y Coyle, 1982); administrada el día 5 del desarrollo, en la rata, provoca la muerte de los precursores de las células granulares de la corteza cerebelosa en la capa granular externa, no induciendo apoptosis en la glía de Von Bergmann, encontrándose ésta en fase proliferativa (Bejar y cols., 1985; de Barry y Gombos, 1989). En el estudio IHQ, tras tratamiento con el MAM, se comprueba una disminución de la positividad para el PCNA en los precursores granulares corticocerebelosos, debido a una menor proporción de este tipo celular (Lafarga y cols., 1997); por otro lado los núcleos PCNA positivos de las células gliales de Von Bergmann, dispuestas en la capa de neuronas de Purkinje, estaban preservados (Bejar y cols., 1985; De Barry y Gombos, 1989). En 1997 Lafarga y cols. realizan un estudio ultraestructural y citoquímico demostrando, en gel de electroforesis, que el patrón de fragmentación del ADN, dañado por el MAM, era de tipo apoptótico. Lafarga y cols. en 1998 estudiaron con técnicas IHQ para vimentina y GFAP las lesiones de la corteza cerebelosa en desarrollo tras la administración del MAM, determinando, en el caso de la vimentina, un patrón de tinción más marcado en las ramificaciones de las células gliales de Von Bergmann, concretamente en las ramas transversales que cruzan la capa molecular; en el caso de la capa granular externa embrionaria, estos procesos parecían englobar restos, únicos o en grupos, de precursores granulares necróticos; en cuanto a la GFAP se refiere, esta mostró una intensa expresión en la glía de Von Bergmann en

los animales control, pero la intensidad de la tinción aumentó en los procesos gliales a partir del día 2 de tratamiento con MAM (administración del MAM el día 5 del desarrollo embrionario).

Esta sobreexpresión de GFAP era particularmente marcada en la mitad distal de los citados procesos gliales, incluyendo los pies terminales que alcanzan la superficie pial. Tanto la GFAP como la vimentina pusieron de manifiesto que la disposición espacial de la glía de Von Bergmann estaba conservada estrictamente tras la administración del MAM (Gliosis isomórfica) (Lafarga y cols., 1998).

El estudio histoquímico con lectina de tomate, empleado para la identificación de células de la microglía, marcó solo vasos sanguíneos en la capa cortical del cerebelo control en el día 7 postnatal. Tras el tratamiento con MAM, la histoquímica de lectina reveló vasos sanguíneos y células microgliales ameboides distribuidas a través de la capa granular externa. La mayoría de estas células teñidas de la microglía tenían morfología redondeada y un diámetro que oscilaba entre 10μ – 15μ . La tinción combinada de lectina con vimentina confirmó que la microglía ameboide estaba localizada entre los procesos de la glía de Von Bergmann que atraviesan la zona externa de la capa molecular y la capa granular externa (Lafarga y cols., 1998).

Existen diferentes tipos celulares en la corteza cerebelosa que se desarrollan en fases distintas del período embrionario. El MAM ha sido empleado para determinar el momento de su formación. Las neuronas de Purkinje de la rata se constituyen durante los días 14-16 de gestación, en el momento del nacimiento constituyen una capa de aproximadamente 6 células de espesor, la cual se transforma en una capa simple a los 3-4 días postnatal. La capa germinal externa forma una estructura de aspecto “pantanosos” en el momento del nacimiento; por otro lado la capa granular se constituye entre los días 7-15 con un pico entre los días 10-11. Las neuronas en cesta y las estrelladas se forman entre los días 6-7 y 10-11 respectivamente. Las células de la granular migran desde la capa capa germinal externa a la granular interna en la fase postnatal (Fonnum y Lock, 2000).

Hay que destacar que las hormonas tiroideas participan de forma directa en el desarrollo de la capa granular cerebelosa; así, el hipotiroidismo reduce la proliferación y migración mientras que el hipertiroidismo causa maduración prematura de las neuronas granulares con incremento de muerte celular (Fonnum y Lock, 2000, Burgoyne y Cambray-Deakin, 1988).

El tratamiento de ratas embarazadas con MAM (día 14 de gestación), durante la formación de las células de Purkinje, provoca una intensa pérdida de estas neuronas en la vida

adulto; en relación con este fenómeno está el hecho de la reducción simultánea de neuronas granulares en la misma proporción, ya que el número de células de Purkinje y granulares permanece constante en la vida adulta (Chen y Hillman, 1989). Por otro lado la administración, en ratas, de MAM, en las primeras 24 horas de vida postnatal, estuvo acompañado por una intensa reducción en el número de células granulares, mientras que las neuronas de Purkinje no estaban afectadas (Chen y Hillman, 1989); bajo estas condiciones las células de Purkinje permanecen en algunos estratos y mezcladas con neuronas granulares; estas observaciones son consistentes con la conservación de las células de Purkinje tras la exposición postnatal a los rayos X (Altman y Anderson, 1972), y malnutrición (Hillman y Chen, 1981).

La administración de MAM a ratas y ratones en fases cercanas al nacimiento y durante la primera semana de vida, puede provocar un desarrollo anormal de otras áreas del cerebelo; estas modificaciones incluyen contactos sinápticos entre las fibras musgosas y las neuronas de Purkinje, alteraciones de la posición de las células de Purkinje así como la aparición de una capa granular ectópica (de Barry y cols., 1987; García-Ladona y cols., 1991). Asimismo, el tratamiento postnatal con MAM provoca una marcada disminución en el tamaño del cerebelo.

1.6.2. Haluros de alquilo

El cloruro de metilo (Chellman y cols., 1986), el bromuro de metilo en ratones (Eustis y cols., 1988), el tiofeno (Herndon, 1986) y el ácido L-2-cloropropiónico (Simpson y cols., 1996) provocan degeneración de las neuronas granulares en los animales adultos. Los haluros de alquilo citados (cloruro y bromuro de metilo) reaccionan con el glutatión, al cual se le asocia generalmente con una marcada acción detoxificante. Asimismo, el bromuro y el yoduro de metilo, metilan ciertas bases del ADN, constituyendo 3-metil-adenina, 7-metil-guanina y O⁶-metil-guanina, los cuales pueden ser detectados en el hígado y en el pulmón (Bolt y Gansewendt, 1993); fenómenos similares de afectación de la molécula de ADN se observan también con el triclorfón.

Algunos investigadores han propuesto que en su metabolismo, el glutatión conjuga a metil-cisteína y metanotiol, siendo éste el último metabolito tóxico; la deplección del glutatión con sulfoxina de butionina, en los ratones, reduce la toxicidad del cloruro de metilo (Chellman y cols., 1986); asimismo, en ratas, la sulfoxina de butionina incrementa la toxicidad y la lesión tisular producida por el yoduro o el bromuro de metilo (Thomas y Morgan, 1988; Chamberlain y cols., 1998).

1.6.3. *Difenilhidantoína*

Se ha comunicado que la difenilhidantoína produce malformaciones cerebelosas en niños recién nacidos, tras su administración intrauterina; de acuerdo con estas observaciones, la administración de difenilhidantoína en ratones neonatales provocó un incremento en las células apoptóticas de la capa germinal externa, una disminución de las células granulares y una reducida arborización de las dendritas de las neuronas de Purkinje (Ohmori y cols., 1999); en el ratón adulto la administración de difenilhidantoína provoca engrosamientos a lo largo del trayecto de los axones de las neuronas de Purkinje (Tauer y cols., 1998).

1.6.4. *Metil-mercurio*

El mercurio es un metal que es liberado a la atmósfera por medios naturales a través del vapor de mercurio que emite la corteza terrestre y por la combustión de desechos urbanos e industriales, tales como los combustibles fósiles. El mercurio llega a la cadena alimenticia, ya sea por medio del elemento que ocurre naturalmente (por ejemplo, el agua subterránea de los volcanes) o el mercurio presente en la contaminación del aire que se deposita en los ríos y lagos. Una vez en el agua, las bacterias transforman el mercurio en metilmercurio. Los grandes peces depredadores como el tiburón y el pez espada, absorben el metilmercurio del agua y lo ingieren cuando se alimentan de peces más pequeños que a su vez han ingerido algas contaminadas por este metal. El cation metilmercurio está normalmente asociado, o bien a un

simple anión, como un cloruro (Cl⁻), o a una molécula más grande, tal como una proteína, con cargas positivas y negativas. El catión metilmercurio es la forma más tóxica del mercurio, capaz de inhibir el desarrollo cerebral provocando cambios en el comportamiento y reduciendo las capacidades cognitivas y motrices. (Shiraki, 1979; Mokzran y cols., 1995).

El metil-mercurio es otro componente que tiene como diana a las células granulares de la corteza cerebelosa (Shiraki, 1979); esta sustancia también reacciona con la cisteína y la conjugación mimetiza el aminoácido neutro metionina, siendo transportado a través de la barrera hematoencefálica (Mokzran y cols., 1995).

La formación de radicales libres puede jugar también un destacado papel en los efectos tóxicos del metil-mercurio; es sorprendente que este compuesto que reacciona realmente con los grupos -SH provoque una degeneración específica de las neuronas granulares cerebelosas (Shiraki, 1979). Sin embargo, el cloruro de mercurio es un potente tóxico neuronal, aunque no específicamente para las de la corteza cerebelosa (Moller-Madsen y Danscher, 1986). El metil-mercurio se une a la cisteína entrando este complejo en la célula a través de un transportador de membrana. El mecanismo de toxicidad selectiva del metil-mercurio para el cerebelo no es conocido en su totalidad. Así, los acontecimientos de naturaleza oxidativa, parecen ser más importantes que efectos tales como la inhibición, inducida

por el metil-mercurio, de la síntesis de ARN o proteínas o defectos en la producción de ATP (Sarafian y Verity, 1991). La expresión de bcl-2 protege a las neuronas de la producción de radicales libres inducidos por el metil-mercurio; este fenómeno podría indicar que la permeabilidad mitocondrial participa en la generación de radicales libres (Sarafian y cols., 1994).

Desde el punto de vista histológico es un compuesto que tiene como célula diana a los granos cerebelosos (Shiraki, 1979). El mecanismo de acción consiste en reaccionar con los residuos de cisteína, y este conjugado mimetiza el aminoácido neutro metionina, siendo transpostado a través de la barrera hemato-encefálica (Mokzran y cols., 1995; Fonnum y Lock, 2000).

Otro compuesto relacionado con este metal es la sal cloruro de mercurio (Cl_2Hg), el cual es altamente tóxico para las neuronas, aunque no específicamente para las de la corteza cerebelosa (Moller-Madsen y Danscher, 1986).

1.6.5. Acrilamida

La acrilamida no solo provoca modificaciones en los axones de las neuronas del Sistema Nervioso Periférico, sino también en los axones de las neuronas pertenecientes al Sistema Nervioso Central, tales como las fibras musgosas, que son una de las dos clases de aferencias hacia la corteza cerebelosa (Cavanagh y Gysbers, 1983). Estudios

estereológicos realizados tras la exposición a acrilamida, describen una marcada disminución del volumen de las neuronas de Purkinje, así como del de las neuronas granulares; este hecho morfológico no va acompañado de una disminución en el número de células (Purkinje y granulares) (Overgaard-Larsen y cols., 1994).

1.6.6. Alcohol etílico

El alcohol etílico o etanol está más a menudo unido al sistema GABA del cerebelo. El Sistema Nervioso en desarrollo es extremadamente sensible a este neurotóxico, el cual puede generar una condición denominada “Síndrome Alcohólico Fetal” (Harper y Kril, 1990).

En alcohólicos crónicos se observa con frecuencia atrofia de la porción anterior del vermis superior y áreas adyacentes de los hemisferios cerebelosos (Victor y cols., 1959). Su incidencia es muy elevada – casi el 27% de los alcohólicos y del 32% al 38,6% de los que presentan síndrome de Wernicke-Korsakoff (Torvik y cols., 1982; Harper, 1983) – y puede aparecer de forma aislada o asociada a otros procesos relacionados con el alcoholismo. Se afectan más los hombres que las mujeres. El cuadro clínico se instaura lentamente, con inestabilidad troncal, ampliación de la base de sustentación y marcha atáxica (Martínez y Rábano, 2002).

Macroscópicamente, existe disminución en el espesor de las laminillas cerebelosas y ensanchamiento de los surcos en el

vermis rostral y, en menor grado, en la cara superior de los hemisferios cerebelosos en zonas adyacentes al vermis. Desde el punto de vista histológico, las lesiones son más intensas en las crestas de las laminillas que en la profundidad de los surcos, al contrario de lo que ocurre en las lesiones hipóxicas. En las zonas afectadas existe pérdida de células de Purkinje, parcheada de células granulares, atrofia de la capa molecular y gliosis de Bergmann (Torvik y Torp, 1986; Phillips y cols., 1987); la pérdida de células de Purkinje es más marcada en alcohólicos con síndrome de Wernicke-Korsakoff (Phillips y cols., 1990). Con la técnica neurohistológica de Golgi se observa reducción de la arborización dendrítica y pérdida de espinas de las células de Purkinje restantes (Ferrer y cols., 1984).

La atrofia cerebelosa que ocurre en el alcoholismo crónico, posiblemente, guarda relación con el déficit de tiamina más que con el efecto tóxico directo del alcohol (Harper y Kril, 1990).

La administración de alcohol a primates no-humanos durante el embarazo muestra que la descendencia tiene una marcada reducción en el número de neuronas de Purkinje (Bonthius y cols., 1996).

Experiencias similares han sido llevadas cabo en ratas, donde los días más sensibles oscilaron entre el 4 y el 6; en días

posteriores los efectos nocivos del etanol eran mucho menos marcados (Thomas y cols., 1998). Por otro lado una exposición al etanol durante 5 meses provocó alteraciones en las espinas de las células de Purkinje, aun estando los animales controlados desde el punto de vista nutricional (Wenisch y cols., 1998).

El alcohol etílico administrado a ratas gestantes de entre 10-21 días, provoca. en la descendencia, modificaciones cerebelosas centradas en fusión de determinadas laminillas (V-VI) del vermis, aislamiento y escasez de neuronas de Purkinje así como granos ectópicos en la capa molecular constituyendo “rosetas” que rodean un material basófilo (Sakata-Haga y cols., 2001). En ratas adultas, a las cuales se les administraba este neurotóxico en la dieta durante al menos 5 meses, se demostró alteración de las espinas de las dendritas de las neuronas de Purkinje.

1.6.7. Harmalina e Isogaína.

La harmalina y la isogaína, dos alcaloides que excitan las neuronas de la oliva inferior, también activan las fibras trepadoras, las cuales liberan glutamato en los receptores de las células de Purkinje y como consecuencia de ello estas neuronas mueren por excitotoxicidad (O’Hearn y Molliver, 1997); este fenómeno puede ser iniciada por factores agonistas del glutamato así como por inhibidores del metabolismo neuronal; se caracteriza por una secuencia de reacciones que desembocan en una elevación del Ca^{2+}

intracelular y producción de radicales libres (Fonnum, 1998); estos hechos bioquímicos juegan un importante papel en la toxicidad cerebelosa, destacando las células granulares y de Purkinje ya que ambas poseen receptores glutamaérgicos.

1.6.8. Bilirrubina

Esta sustancia puede afectar al cerebro del niño recién nacido si la barrera hemato-encefálica no está totalmente desarrollada. Este síndrome neurológico está asociado con vulnerabilidad selectiva a los ganglios basales, ciertos núcleos principales cerebrales y las células de Purkinje de la corteza cerebelosa (Ahdab-Barmada y Moosy, 1984); el principal defecto bioquímico subyacente a la encefalopatía por bilirrubina no ha sido hasta la fecha determinado, aunque se apuntan como firmes candidatos un déficit metabólico, bloqueo en las funciones de las membranas plasmáticas y/o alteraciones enzimáticas.

El modelo animal por excelencia para el estudio de la neurotoxicidad inducida por la bilirrubina, es la rata Gunn, una cepa mutante que desarrolla ictericia inmediatamente después del nacimiento, así como hipoplasia cerebelosa, parálisis cerebral, pérdida de audición, problemas visuales y dentales y, en ocasiones, retraso mental (Yamamura y Takagishi, 1993; Conlee y Shapiro, 1997). Estudios en animales de experimentación han demostrado que las crías de ratas ictéricas Gunn eran más sensibles al agente

excitotóxico NMDA que sus hermanas heterocigóticas; en los animales homocigóticos, la lesión se incrementaba al bloquear la unión de la albúmina con la bilirrubina mediante un tipo de sulfonamida, la sulfadimetoxina: por el contrario las lesiones disminuían al tratarlas con el MK-801, lo que sugiere que, al menos en parte, la encefalopatía es debida a un mecanismo excitotóxico (MacDonald y cols., 1998). El período crítico para el daño causado por la exposición de la bilirrubina a las neuronas de Purkinje en la rata osciló entre el día 3 y el 12, siendo el 7 el más crítico (Keino y Kashiwamata, 1989). Un detallado estudio de las células de Purkinje durante la exposición a la bilirrubina en ratas Gunn (homocigóticas), mostró que las neuronas que experimentaron diferenciación eran las más susceptibles a la muerte celular. En posteriores estudios, que incluían cultivos celulares de neuronas granulares y células de neuroblastoma, se demostró su sensibilidad a la bilirrubina (Amit y cols., 1989).

1.6.9. Ácido Kaínico

Tiene acción sobre neuronas inmaduras y adultas de la médula espinal de la rata (Windenfalk y cols., 2001), neuronas auditivas cocleares del pollo (Shero y cols., 1998), capa CA3 del hipocampo del ratón mutante p53 (Kitamura y cols., 1998), y neuronas de la corteza límbica de ratas (Csernansky y cols., 1998). Asimismo, la administración de este ácido provoca lesiones permanentes del SNC, con

reacción astrogliar y microglial, así como aparición de calcificaciones distróficas (Gayoso y cols., 2003).

1.6.10. Volkensina

Son 2 potentes toxinas pertenecientes a la familia de “Proteínas inactivadoras de los Ribosomas” (IRPs). Se las ha utilizado fundamentalmente en experiencias sobre degeneración neuronal como consecuencia de lesiones de tipo inmune. En cultivos de microglía, se obtuvo un 50% de toxicidad tras una exposición de 24 horas a la volkensina (a una concentración de $2,2 \times 10^{-12} \text{M}$, e igualmente una inhibición de la síntesis de proteínas del 50%, empleando una dosis de $2 \times 10^{-14} \text{M}$ (Sparapani y cols., 1997). Los granos cerebelosos en cultivo sobreviven 24 horas a la acción de la volkensina, aunque su síntesis de proteínas está inhibida por el neurotóxico con una efectividad muy similar a la observada en los cultivos de astrocitos (Sparapani y cols., 1997).

Por otro lado, la volkensina, inyectada directamente en la corteza cerebelosa, provoca reacción astrogliar y microglial; así, la activación astrocítica, puesta de manifiesto mediante la PAGF, fue concomitante con signos tempranos de muerte neuronal, incrementándose progresivamente. La respuesta de la microglía, detectada mediante técnicas IHQ (OX-42), se puso de manifiesto al 2º día. A los 7 días, una intensa positividad para ED-1 reveló actividad fagocítica de la

microglía, persistiendo ésta durante la segunda semana (Cevolani y cols., 2001).

1.6.11. Vitronectina

Es una glicoproteína ligante de la heparina presente en el suero en cantidades que oscilan entre 200 – 400 μ /ml. Asimismo se localiza en numerosos tejidos como un componente de la matriz extracelular. Posee propiedades neurotróficas, induciendo la adhesión y crecimiento neuronal (Gladson y cols., 1997; Grabham y cols., 1992). También se ha señalado que posee propiedades reguladoras del complemento, de la coagulación y de los sistemas fibrinolíticos (Milis y cols., 1993; Preissner y Jenne, 1991; Sheehan y cols., 1995). Generalmente la vitronectina se colocaliza en puntos de activación del complemento, los cuales son reactivos para neoantígenos. Este hecho ha sido observado en la enfermedad renal y en cerebros afectados de la enfermedad de Alzheimer (Bariety y cols., 1989; McGeer y cols., 1992). En este último caso (Enfermedad de Alzheimer), la vitronectina se colocaliza con el péptido β -amiloide presente en las placas y ovillos neurofibrilares (Akiyama y cols., 1991; McGeer y cols., 1992). Este tóxico se une a células que expresan un grupo de receptores de integrinas que reconocen la secuencia de aminoácidos *Arg-Gly-Asp*. Aunque la vitronectina es producida fundamentalmente en el hígado (Seiffert y cols., 1994), otros tejidos y células pueden expresar Vn mRNA. Esto incluye cerebro, corazón, tejido adiposo y músculo esquelético de ratón (Seiffert y cols.,

1994). Asimismo se ha observado que ciertos tumores neuroblásticos humanos pueden asimismo expresar Vn mRNA (Gasque y cols., 1996; Gladson y cols., 1996).

En lo que respecta al cerebelo se ha demostrado su presencia, mediante técnicas IHQ, en las neuronas de Purkinje humanas. El patrón de localización intracelular parece sugerir que estas células son productoras de la sustancia pero que no se une a ellas (Walker y McGeer, 1998). Estos mismos investigadores demostraron que la Vn mRNA puede ser detectada en RNA extraído del cerebelo humano y del córtex temporal, de neuronas humanas diferenciadas a partir de la línea celular de teratocarcinoma NTera2, así como de células de dos líneas de neuroblastoma (indiferenciada una, ácido retinoico diferenciada SH-SY5Y la otra).

1.6.12. Delta - 9 – Tetra-Hidro-Cannabinol

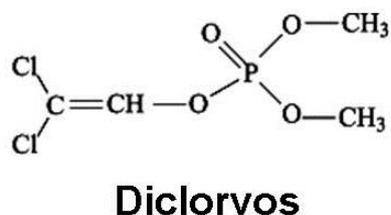
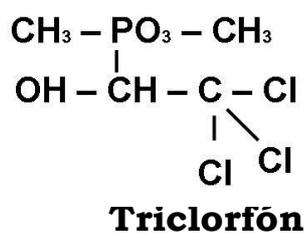
En un trabajo publicado en el año 2002, Suárez y cols. analizan la respuesta de las células astrogliales cerebelosas a la exposición pre y perinatal del tóxico δ - 9 – Tetra-Hidro-Cannabinol (THC), así como en tres estadios postnatales diferentes y en ambos sexos. Para determinar como afecta directamente el THC al desarrollo de la astroglia, investigaron los efectos del tóxico en los cambios morfológicos de los astrocitos, así como la expresión de dos marcadores selectivos del linaje de éstas células (Proteína ácida gliofibrilar, GFAP y Glutamina sintetasa, GS). Demostraron

que la administración de THC durante el desarrollo tiene efectos deletéreos sobre la maduración de las células gliales cerebelosas en desarrollo, pudiendo incluso interferir con la diferenciación astrogial mediante una vía dependiente del sexo. El efecto de los cannabinoides en el desarrollo de las células cerebelosas de la estirpe astrocítica (astrocitos y glía de Von Bergmann), es la reducción de la síntesis de proteínas, aunque tanto la GFAP como la GS disminuyen en la astroglia, no solo durante la exposición al THC, sino también en edades adultas (Suárez y cols., 2002). Estos datos sugieren que la exposición pre y perinatal al THC interfiere directamente con la maduración astrocitaria debido a alteraciones en la formación del citoesqueleto, puesta de manifiesto por la disposición irregular de los filamentos de GFAP, así como por la escasa expresión de GFAP observada en todas las etapas estudiadas. La exposición de THC durante del desarrollo puede, asimismo, modular la actividad glutamaérgica, aunque la expresión de GS está reducida en los cerebros expuestos al THC. La expresión de GS se incrementa progresivamente tras la ausencia de THC, recuperando los valores normales a los dos meses de retirado el tratamiento de THC (Suárez y cols., 2002).

1.6.13. Triclorfón

Esta sustancia es un compuesto organofosforado (Dimetilfosfito (fosfonato) de 2-2-2-tricloro-1-hidroxil-etilo) que se transforma de forma espontánea a diclorvos, un inhibidor de la acetil-colinesterasa. En medicina veterinaria se ha

empleado contra los ectoparásitos y endoparásitos así como en acuicultura contra los parásitos de los salmones (piojos). En medicina humana se ha empleado en el tratamiento de la esquistosomiasis y en ensayos clínicos de tratamientos contra la enfermedad de Alzheimer; cuando se administra triclorfon a cobayas embarazadas, la descendencia presenta signos de atrofia cerebelosa (Mehl y cols., 1994). En estos animales (cobayas) el período crítico oscila entre los días 40 y 50 de gestación (Hjelde y cols., 1998). Los efectos tóxicos pueden ponerse de manifiesto en numerosas partes del cerebro, siendo la más sensible el cerebelo, seguida de la médula espinal y el hipotálamo; en la corteza cerebelosa la lesión se caracteriza por la degeneración de las neuronas granulares en las capas interna y externa y como consecuencia de este hecho se produce una atrofia cerebelosa; una dosis única y elevada de triclorfón, administrada el día 42 de gestación, provoca que no se desarrolle el cerebelo por inexistencia de crecimiento celular; se ha comprobado que el triclorfón, y su metabolito activo, el diclorvos, metilan la adenina del ADN; Badawi en 1998 mostró que la administración de triclorfón a ratas, metilaba la 6-OH-guanina en el hígado y el riñón e inhibía la enzima reparadora del ADN O⁶-metil-transferasa en el hígado.



Existe una comunicación del efecto teratogénico del triclorfon en el ser humano; las mujeres de una pequeña aldea de Hungría consumieron pescado muerto a consecuencia de haber ingerido altas dosis de triclorfón; se asumió que las lesiones eran debidas a una trisomía, resultado de un error de la meiosis en la ovogénesis; cuando ovocitos de ratón fueron expuestos a triclorfón durante 3 horas en la fecundación, se produjeron aberraciones que afectaron a los cromosomas durante la metafase – II (Yin y cols., 1998).

Las observaciones ya descritas en la descendencia de cobayas tratados con el triclorfón, pueden ser reproducidos en cultivo empleando neuronas granulares cerebelosas de la rata, tras una exposición de diclorvos y triclorfón. Tras una corta exposición (3 horas), el diclorvos es mucho más tóxico que el triclorfón, mientras que después de 24 horas de tratamiento ambos componentes son igual de tóxicos; este fenómeno indica que el triclorfón ejerce su efecto tóxico principalmente a través de su transformación en diclorvos (Hjelde y cols., 1998; Mehl y cols., 1994).

Por otro lado, las células granulares cerebelosas murieron por exposición a agentes metilantes del ADN tales como el MAM, sulfonato de metil-metano e inhibidores del enzima O⁶-guanina-metil transferasa tales como la O⁶-benzil-guanidina;

por el contrario, el sulfonato de etil-metano, el etil-triclorfón y el dimetoato fueron mucho menos eficientes. Estas investigaciones sugieren que la metilación del ADN y la inhibición de su reparación puede ser un posible mecanismo de toxicidad; los estudios “in vitro” de Fonnum y Lock, en el año 2000, demostraron que el diclorvos inhibía asimismo un enzima de *Escherichia coli*, la O⁶-guanina-metil transferasa, que es muy similar a su equivalente humana; por otro lado, el diclorvos era letal para 2 cepas mutantes de *E. coli*, deficientes en la reparación del ADN; uno de los mutantes presentaba déficit de O⁶-guanina-metil-transferasa mientras que el otro mutante era deficiente en glicosilasas; esto demuestra que la metilación del ADN y la inhibición de su reparación por el diclorvos, contribuye a la lesión (Mehl y cols., 2000).

1.6.14. Ácido-L-2-Cloropropiónico

Ha recibido últimamente gran atención ya que, experimentalmente, se ha demostrado que presenta una alta especificidad por un tipo neuronal particular: la célula granular de la corteza cerebelosa (Jones y cols., 1995; Jones y cols., 1997; Lock y cols., 1995; Lock y cols., 1997; Williams y cols., 1999, Williams y cols., 2001a; Williams y cols., 2001b; Simpson y cols., 1996a; Simpson y cols., 1996b). Estos autores emplean el neurotóxico, tamponado con hidróxido sódico, a una dosis única de 750 mgs., o bien 3 dosis de 250 mgs. durante 3 días consecutivos a ratas albinas, vía oral, mediante sonda gástrica; en sus

observaciones aprecian necrosis granular a las 72 horas de finalizado el tratamiento, acompañado de un marcado edema pericelular, sobre todo alrededor de las neuronas de Purkinje, y una intensa reacción astrogial en las áreas de lesión de la capa granular cerebelosa.

Sorprendentemente éste ácido posee efectos tóxicos en los animales adultos y no durante el desarrollo. La lesión neuronal puede prevenirse por medio del MK-801, un antagonista del receptor NMDA (Widdowson y cols., 1996, Lock y cols., 1997); la toxicidad del ácido-L-2-cloropropiónico puede incrementarse si se administra conjuntamente con L-butionina-sulfomixina, un inhibidor de la síntesis del glutation, o bien disminuir por administración de un precursor del glutation, su éster isopropílico (Wyatt y cols., 1996); por consiguiente, el glutation antioxidante parece proteger contra los efectos tóxicos del ácido-L-2-cloropropiónico. Otros antioxidantes tales como la dimetiltiourea o aminoesteroides tienen escaso efecto “in vivo” (Widdowson y cols., 1997).

En el año 2000 Sturgess y cols., publicaron un trabajo acerca de la acción del ácido-L-2-cloropropiónico en cultivo de neuronas granulares; determinaron que la dosis tóxica se redujo con el aumento del tiempo de cultivo; durante el período comprendido entre los días 3 – 11 de cultivo, el nivel de glutation disminuyó en las neuronas. También en esta

situación, el antagonista del NMDA, MK-801, proporciona cierta protección contra la acción tóxica del ácido, aunque en menor proporción que “in vivo”; la vitamina E, un potente antioxidante y la ciclosporina A, un inhibidor de la permeabilidad mitocondrial, ofrecen una buena protección “in vitro”. Estos estudios indican que el efecto tóxico “in vitro” también incluye radicales libres del oxígeno; el efecto protector de la ciclosporina A sugiere que los radicales de oxígeno podrían estar asociados con la despolarización de la membrana mitocondrial y la producción de estos radicales libres por parte de las mitocondrias (Sturgess y cols., 2000).

1.6.15. Radiación Ionizante

La exposición a las radiaciones ionizantes destruye células en proceso de división y de migración. Así, las células de la capa granular externa del cerebelo en desarrollo son particularmente sensibles a la radiación; la exposición de ratas embarazadas a una dosis simple de cuerpo completo, de 0,5 Gy, en los días 17, 18, 19 o 20 de gestación, determina atrofia cerebelosa en las crías; estos resultados sugieren una relación directa entre migración, proliferación y maduración de las neuronas granulares y su inducción por las células de Purkinje (Ralcewicz y Persaud, 1995). Bajos niveles de irradiación de rayos-X al cerebelo a los 15 días del nacimiento, determina abundante pérdida de neuronas granulares, en cesta y estrelladas (Puro y Woodward, 1978). Cuando los rayos-X se dan entre los días 5-14 postnatales, el

91% de las neuronas granulares ha desaparecido en el día 35 (Bruni y cols., 1993).

Finalmente, y como resumen del apartado de neurotóxicos, podemos decir que el cerebelo es un órgano diana de numerosos compuestos químicos y físicos. Las neuronas granulares y las células de Purkinje son, con gran diferencia, los elementos celulares más propicios para la acción neurotóxica; algunos de estos componentes actúan a través de la producción, por excitotoxicidad, de radicales libres; una deficiencia de antioxidantes, tales como el glutatión, puede ser un importante factor en la génesis de la neurotoxicidad. En el caso del triclorfón, la inhibición de los mecanismos de reparación del ADN puede jugar un papel crucial en la muerte neuronal durante el desarrollo. Un mecanismo similar se postula para la neurotoxicidad mediada por haluros de alquilo.

2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

Por todo lo anteriormente expuesto en el apartado de Introducción, nos hemos planteado, en el presente trabajo de Tesis Doctoral, estudiar la acción de un Neurotóxico, el Ácido L-2-Cloro-Propiónico, sobre un área determinada del Sistema Nervioso Central, la corteza cerebelosa. Para ello utilizaremos la rata albina de experimentación (variedad *Sprague Dawley*).

Nos planteamos los siguientes objetivos:

1.- Valorar, desde el punto de vista histológico e inmunohistoquímico, la acción del neurotóxico, disuelto al 2% en el agua de bebida, sobre la corteza cerebelosa y la respuesta celular que este fenómeno origina, así como comprobar las posibles variaciones que se puedan producir, cuando se administra el ácido-L-2-cloropropiónico durante 3, 10 y 17 días.

Asimismo serán de gran interés para nosotros, y se estudiarán convenientemente, los fenómenos que afecten a las neuronas granulares corticocerebelosas, así como la posible implicación, o no, de otros elementos celulares que pudieran ser reactivos a la acción del neurotóxico.

2.- Estudiar la evolución de los animales de experimentación, y sus características morfológicas, tras haber ingerido el neurotóxico durante un período de tiempo fijo (6 y 21 días respectivamente) y cuando se obtengan las muestras

histológicas a los 20 y 100 días respectivamente de haber suspendido el tratamiento con el ácido-L-2-cloropropiónico.

3.- Finalmente, postularemos si este modelo experimental es factible para el estudio de la respuesta del Sistema Nervioso Central a un agente químico, específico en su neurotoxicidad.

3. MATERIAL Y MÉTODO

3.1. Animal de Experimentación.

Hemos utilizado en el presente trabajo de Tesis Doctoral ratas albinas (*Rattus norvegicus*) de la variedad Sprague Dawley, procedentes de las dependencias, localizadas en la Facultad de Medicina, del Estabulario de la Universidad de La Laguna. No se realizaron distinciones en cuanto al sexo de los animales, oscilando su peso entre 250-300grs., siendo alojados en cajas de plástico standard con alimentación convencional y agua “*ad libitum*”. Todos los procedimientos de estabulación y de experimentación siguieron la normativa, acerca del cuidado de los animales de experimentación de la Universidad de La Laguna y las recomendaciones de la Directiva de Helsinki sobre este mismo tema.

El neurotóxico empleado en nuestro estudio fue el Ácido-L-2-Cloropropiónico (Sigma-Aldrich Química, Madrid), administrado en los biberones del agua de bebida, en una proporción del 2%. A los animales control se les suministró únicamente agua.

Una vez cumplidos los días establecidos y en el momento de obtención de las muestras tisulares, se sacrificaron los animales con una sobredosis de dióxido de carbono (Oxican, Tenerife).

3.2. Estudio histológico.

Fue llevado a cabo con técnicas convencionales de microscopía óptica (Fijación en Formol 10%, inclusión en parafina, cortes en un microtomo de parafina de la marca Leica modelo RM2035 a 3 micras, teñidos con técnicas histoquímicas, tales como Hematoxilina-Eosina y Klüver-Barrera e inmunohistoquímicas: Proteína Ácida Gliofibrilar, Neurofilamentos, CD68 y PCNA).

Asimismo se realizaron inclusiones de microscopía electrónica, procediéndose a la fijación en glutaraldehído al 2,5 % en Tampón Millonig; la inclusión se llevó a cabo en resina EPON y los cortes semifinos, de 1 micra de grosor y teñidos con Azul de Toluidina, fueron observados en un Microscopio Nikon modelo Optiphot-2, con un sistema fotográfico acoplado.

3.3. Descripción de las Series.

3.3.1 Serie Control.

A los animales de esta serie no les fue administrado el neurotóxico Ácido L-2-Cloropropiónico, suministrándoseles únicamente agua.

Número de animales empleados: 10

3.3.2. Serie Experimental – A

Se establecieron 3 grupos denominados A1, A2 y A3 respectivamente, en función de los días de evolución que tuvieron los animales, tras la administración del neurotóxico.

Grupo – A1: 3 días de evolución tras la administración del neurotóxico

<i>Número de animales</i>	<i>Días de evolución</i>
<i>10</i>	<i>3</i>

Grupo – A2: 10 días de evolución tras la administración del neurotóxico.

<i>Número de animales</i>	<i>Días de evolución</i>
<i>10</i>	<i>10</i>

Grupo – A3: 17 días de evolución tras la administración del neurotóxico.

<i>Número de animales</i>	<i>Días de evolución</i>
<i>10</i>	<i>17</i>

3.3.3. Serie Experimental – B.

Se establecieron 2 grupos denominados B1 y B2 respectivamente, en función de los días de evolución que tuvieron los animales, tras la administración del neurotóxico y posterior retirada del mismo.

Grupo– B1: 6 días de evolución con el neurotóxico y 20 sin él.

<i>Número de animales</i>	<i>Días evolución con neurotóxico</i>	<i>Días evolución sin neurotóxico</i>
<i>10</i>	<i>6</i>	<i>20</i>

Grupo – B2: 21 días de evolución con el neurotóxico y 100 sin él.

<i>Número de animales</i>	<i>Días evolución con neurotóxico</i>	<i>Días evolución sin neurotóxico</i>
<i>10</i>	<i>21</i>	<i>100</i>

3.4. Técnicas Histológicas Convencionales

3.4.1. Hematoxilina-Eosina

- Hematoxilina de Harris para el diagnóstico citológico de Papanicolau (MERCK, 1.09253.0500).
- 2 grs. de Eosina disueltos en una mezcla de 140 c.c. de agua destilada, 640 c.c. de etanol 96% y 9 gotas de ácido acético.

TECNICA DE TINCIÓN CON HEMATOXILINA EOSINA.

- 1.- Desparafinar en Xilol e hidratar con etanol en gradaciones decrecientes (100%, 96%, 90%) hasta el agua destilada
- 2.- Teñir con Hematoxilina de Harris (1 minuto y 30 segundos)
- 3.- Lavar en agua corriente
- 4.- Teñir con Eosina (1 minuto)

5.- Deshidratar con etanol en gradaciones crecientes (90%, 96%, 100%)

6.- Aclarar en Carbolxilol, Xilol y montar en Eukitt

3.4.2. Klüver – Barrera

- *Solución de Trabajo – A*

Luxol Fast Blue 0,1% en etanol 96%

Ácido acético 10% (0,5 c.c.)

- *Solución de Trabajo – B*

Carbonato de litio 1% (15 c.c.)

Agua destilada (95 c.c.)

- *Solución de Trabajo – C*

Violeta de Crescilo 0,25% (120 c.c.)

Ácido acético 1% (1 c.c.)

TECNICA DE TINCIÓN COM KLÜVER-BARRERA.

1.- Desparafinar e hidratar hasta agua destilada

2.- *Solución de Trabajo – A* (24 horas, en estufa y tapado)

3.- Lavar en agua destilada

- 4.- Etanol de 96% (Eliminar el exceso de colorantes, 5 minutos)
- 5.- Lavar en agua destilada
- 6.- *Solución de Trabajo – B* (Diferenciar)
- 7.- Etanol de 70% (5 segundos)
- 8.- Lavar en agua destilada
- 9.- *Solución de Trabajo – C* (agua caliente bajo las preparaciones, 25”)
- 10.- Deshidratar a partir de Etanol de 96% y 100%
- 11.- Aclarar en Carbolxilol, Xilol y montar en Eukitt

3.5. Técnicas Inmunohistoquímicas.

Todo el estudio inmunohistoquímico fue realizado con kits reactivos comerciales (DAKO, Glostrup, Dinamarca).

Estas técnicas se llevaron a cabo utilizando un sistema automatizado de tinción y específico para este tipo de anticuerpos (Techmate Horizon, LJI Biosystems, EE.UU.) (Figs. 1A, 1B y 1C).



FECHA _____ OPERADOR _____
 PROTOCOLO _____

DAKO

DAKO TM HORIZON D.O.S.S. Sistema DAKO de Tinción Optimizada

	A	RATON/CONEJO	ANTICUERPO
	Dilución # _____	1 MONO POLI	1
	Dilución # _____	2 MONO POLI	2
	Dilución # _____	3 MONO POLI	3
	Dilución # _____	4 MONO POLI	4
	Dilución # _____	5 MONO POLI	5
	Dilución # _____	6 MONO POLI	6
	Dilución # _____	7 MONO POLI	7
	Dilución # _____	8 MONO POLI	8
	Dilución # _____	9 MONO POLI	9
	Dilución # _____	10 MONO POLI	10
	Dilución # _____	1 MONO POLI	1
	Dilución # _____	2 MONO POLI	2
	Dilución # _____	3 MONO POLI	3
	Dilución # _____	4 MONO POLI	4
	Dilución # _____	5 MONO POLI	5
	Dilución # _____	6 MONO POLI	6
	Dilución # _____	7 MONO POLI	7
	Dilución # _____	8 MONO POLI	8
	Dilución # _____	9 MONO POLI	9
	Dilución # _____	10 MONO POLI	10

OBSERVACIONES:

1C

ANTICUERPOS UTILIZADOS.

Anticuerpo anti – Proteína Ácida Gliofibilar.

Código: H0083

Anticuerpo anti – Neurofilamentos.

Código: N1591

Anticuerpo anti – CD68.

Código: H7122

Anticuerpo anti – PCNA.

Código: PC10

TECNICA DE LA INMUNOHISTOQUIMICA.

Los cortes se realizaron a partir de las muestras fijadas en Formol 10% e incluidas en parafina.

En general, para la realización de las técnicas inmunohistoquímicas, fueron necesarias las siguientes etapas: una vez realizados los cortes histológicos se colocaron en xilol (3 pases de de 15 minutos cada uno) y seguidamente dos pases de alcohol etílico absoluto de 10 minutos cada uno; se continuó la hidratación con un pase de etanol al 96% durante 5 minutos, otro pase de 5 minutos de etanol al 70% y por último 5 minutos en agua destilada.

A todos los anticuerpos empleados se les hizo un pretratamiento con tampón citrato en olla express. A partir del momento de hervir, se contabilizaron 2 minutos.

Enfriamiento: Las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente.

Como ya se indicó previamente se utilizó un dispositivo automatizado de tinción, en concreto el Techmate, modelo Horizon (DAKO). Este aparato consta de un brazo articulado donde se colocaron los portaobjetos con las diferentes muestras del estudio, de forma que a cada portaobjeto se le aponía otro para la misma determinación, dejando un pequeño espacio entre ambos, con la finalidad de que, al ser introducidos en diferentes soluciones, estas ascendieran por capilaridad y se pusieran en contacto con la muestra. Dicho brazo se desplaza en sentido horizontal y se coloca encima de una hilera de pocillos. Cada una de estas hileras de pocillos contenía un tipo de solución. Las soluciones para la visualización de las muestras vienen en un kit (DAKO), mientras que el anticuerpo primario está individualizado. Una vez el brazo alcanzaba una hilera de pocillos dada, realizaba un desplazamiento en sentido vertical y hacia abajo, quedando los portaobjetos introducidos parcialmente en ellos durante un tiempo determinado. Seguidamente, previo lavado y secado de las muestras, se desplazaba a otra hilera de pocillos y repetía la operación.

El contenido de las hileras de pocillos (Fig. 2) y su orden fue el siguiente:

- 1.- Un pase por tres hileras de pocillos con PBS
- 2.- Un pase por una hilera de pocillos con agua destilada
- 3.- Un pase de 25 minutos por una hilera de pocillos con el anticuerpo primario
- 4.- Un pase de 25 minutos por una hilera de pocillos con solución biotinilada (medio de visualización)
- 5.- Tres pases de 2 minutos y 30 segundos por una hilera de pocillos con un bloqueante de la peroxidasa endógena
- 6.- Un pase de 25 minutos por una hilera de pocillos con estreptoavidina –peroxidasa
- 7.- Tres pases de 2 minutos y 30 segundos por una hilera de pocillos con diaminobencidina
- 8.- Un pase de 2 minutos por una hilera de pocillos con Hematoxilina

El proceso total tiene una duración de 2 horas y 30 minutos.

3.6. Técnicas de Microscopía Electrónica

3.6.1. Tampones.

3.6.1.1. Tampón Millonig

SOLUCIONES STOCK.

Solución – A: Fosfato monosódico al 2,26% en agua destilada

Solución – B: Hidróxido sódico al 2,52% en agua destilada

Solución – C: Glucosa al 5,4% en agua destilada

Solución – D: Cloruro cálcico al 1% en agua destilada

SOLUCIONES DE TRABAJO.

Solución – A: 1660 c.c.

Solución – B: 340 c.c.

Solución – C: 200 c.c.

Solución – D: 10 c.c.

De la mezcla de las soluciones A y B se retiraron 200 c.c. y, a continuación, se añadieron las soluciones C y D.

El pH de la solución mezcla final osciló entre 7,2 – 7,4.

3.6.1.2. Tampón Cacodilato Sódico.

SOLUCIÓN STOCK.

Se disolvieron 2,14 grs. de Cacodilato sódico 0,2M en 500 c.c. de agua destilada y a continuación se añadieron 3,45 c.c. de

Ácido Clorhídrico 1N (3,6 c.c. de Ácido clorhídrico comercial disuelto en 21,4 c.c. de agua destilada).

SOLUCIÓN DE TRABAJO.

Solución Stock disuelta en agua destilada a partes iguales.

3.6.2. Líquidos fijadores.

3.6.2.1. Glutaraldehído.

Glutaraldehído comercial (10 c.c.)

Tampón Millonig (90 c.c.)

3.6.2.2. Osmio.

Disolvimos una ampolla de Tetróxido de Osmio (500 mgrs.) en 50 c.c. de Tampón Cacodilato sódico 0,1M. Se conserva en recipiente oscuro y en nevera.

3.6.3. Resina de Inclusión EPON

Este tipo de resina epoxídica es la mezcla de 4 componentes: Epikote 812, Anhídrido dodecenil succínico (DDSA), Anhídrido metil nádico (MNA) y N,N-Dimetil bencil amina (BDMA).

SOLUCIÓN DE TRABAJO DE LA RESINA EPON.

1.- Epikote 812 (13 c.c)

2.- DDSA (8 c.c.)

3.- MNA (7 c.c.)

4.- BDMA (16 gotas)

Estos reactivos se prepararon el día de la inclusión y fueron disueltos en un orden preciso: en primer lugar se mezclaron muy bien el Epikote 812 y el DDSA, procurando obtener una mezcla homogénea en cuanto a color, olor y apariencia; seguidamente se añadió el MNA y por último el BDMA, en donde se pudo apreciar ya el cambio de viscosidad de la mezcla, pasando a tener una consistencia más líquida; hasta el momento de uso se almacenó en nevera.

TÉCNICA DE INCLUSIÓN.

Una vez fijadas las muestras en Glutaraldehído, se lavaron en Cacodilato sódico (2 pases de 15 minutos cada uno), para, inmediatamente, realizar la post-fijación con el Osmio (1 hora – toda noche). Al día siguiente se lavaron en agua destilada y tampón cacodilato sódico (2 pases de 15 minutos cada uno). A partir de este momento comenzó la deshidratación con alcohol etílico en gradaciones crecientes y en pases de 15 minutos de duración cada uno (50% - 75% - 95% - 100% - 100%); a continuación se colocaron las muestras en óxido de

propileno (un pase de 15 minutos), óxido de propileno y mezcla final de la resina EPON a partes iguales (45 minutos y en agitación) y mezcla final de resina (1 hora). A partir de este momento se hicieron los bloques en unos dispositivos específicos, dentro de los cuales se coloca el número correspondiente a cada muestra y empleando la resina preparada previamente (Fig. 2).



Una vez realizados los bloques se cortaron a $1\mu\text{m}$ en un ultramicrotomo LKB modelo Ultratome III, utilizando cuchillas de vidrio, y los cortes semifinos obtenidos se montaron en un portaobjetos y fueron teñidos con azul de toluidina, resultante de la mezcla de 1 gramo de azul de toluidina, 1 gramo de Bórax y 50 c.c. de agua destilada. La observación microscópica se realizó con el microscopio Nikon

citado previamente en el apartado de las técnicas convencionales.

4. RESULTADOS

4.1. Serie Control.

Tanto las capas de la corteza (molecular, de células de Purkinje y granular) como la sustancia blanca cerebelosa de los animales pertenecientes a esta serie, no presentaban anomalías en su estructura (Fig. 1).

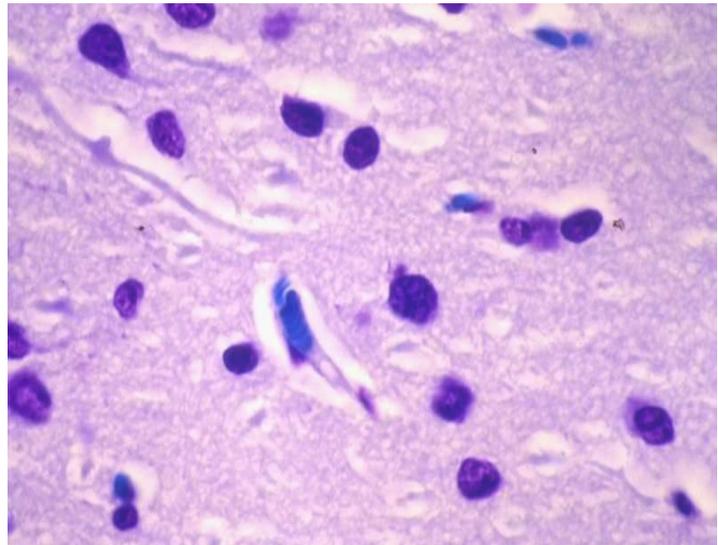
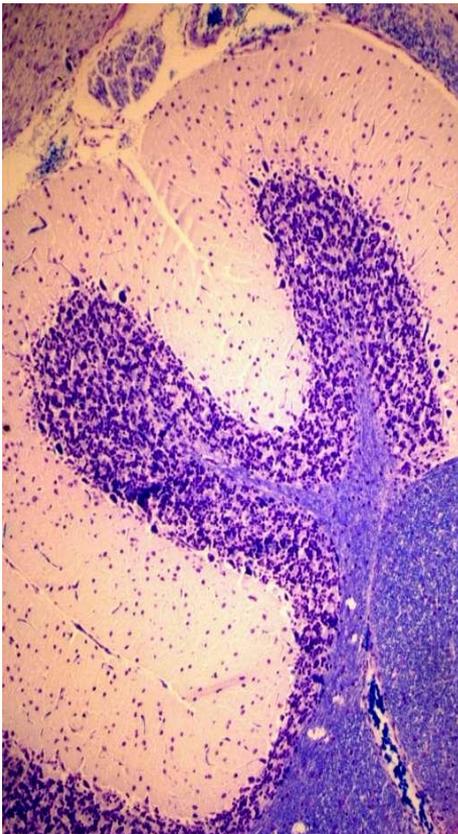


Fig. 1: Estructura histológica normal de la corteza cerebelosa y la sustancia blanca - Klüver-Barrera

Fig. 2: Capa molecular teñida con Klüver-Barrera; se observan núcleos de interneuronas, glía y vasos.

Así, la capa molecular mostraba su típica estructura con abundante componente fibroso y sináptico, destacando los núcleos de las neuronas en cesta y estrelladas, de las células gliales (Fig. 2), así como formaciones vasculares, prolongaciones dendríticas de las neuronas de Purkinje y de la glía de Bergmann (Fig. 3).

Con respecto a la capa de células de Purkinje, tampoco se apreciaban modificaciones, destacando su típico árbol dendrítico y voluminoso soma; en ocasiones eran evidentes algunos orgánulos como el RER (Grumos de Nissl), puestos de manifiesto con la técnica de Klüver-Barrera (Fig. 4). Al emplear la técnica inmunohistoquímica de los neurofilamentos, se destacaba la disposición de las dendritas en la capa molecular así como las cestas que rodean el soma de estas células, procedentes de las interneuronas de igual nombre localizadas en la molecular (Figs. 5-6).

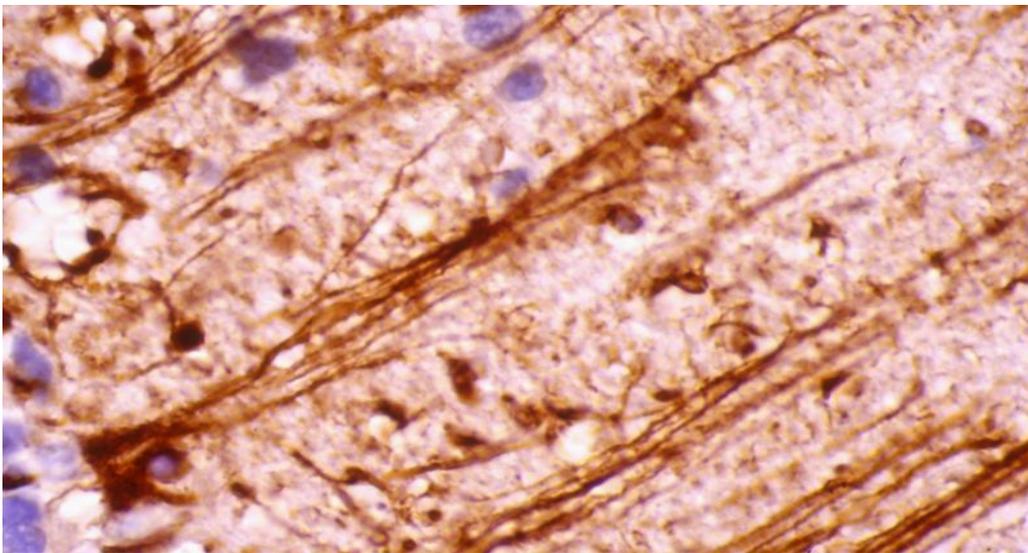


Fig. 3: Proyecciones de la Glía de Bergmann en la capa molecular (Proteína Ácida Gliofibilar - PAGF)



Fig. 4: Neurona de Purkinje con dendrita primaria y grumos de Nissl perinucleares - Klüver-Barrera

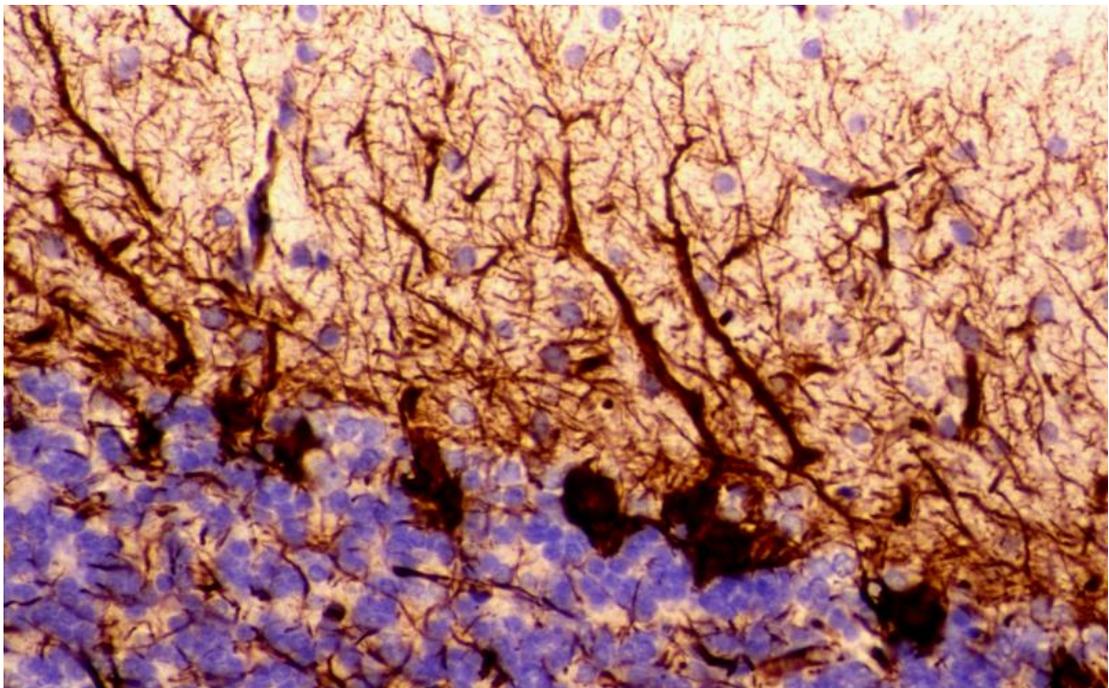


Fig. 5: Neuronas de Purkinje en las que se aprecian las ramas dendríticas principales en la capa molecular - NF

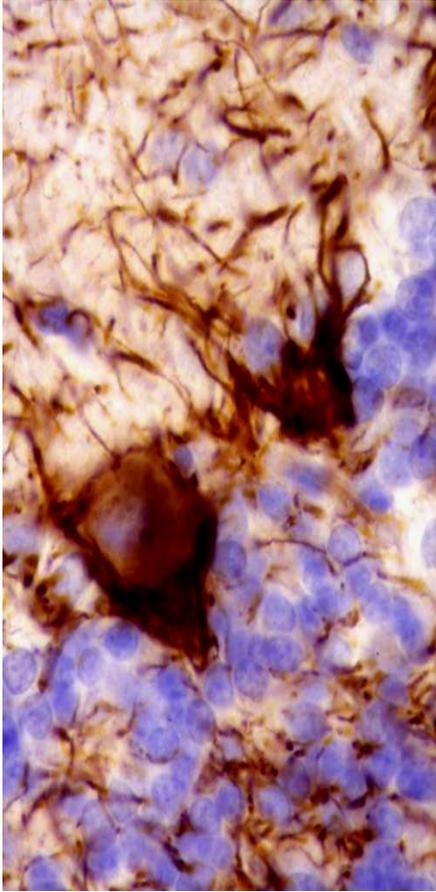


Fig. 6: Somas de neuronas de Purkinje rodeados por proyecciones axónicas de las

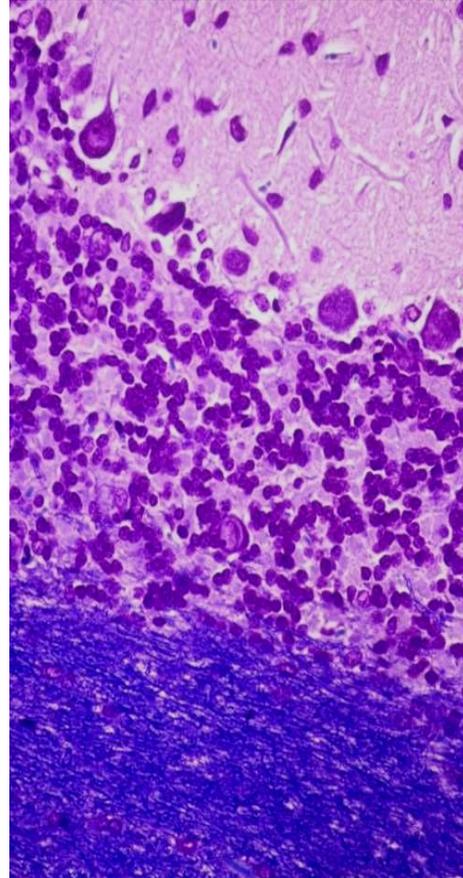


Fig. 7: Capa Granular con numerosos y pequeños granos. La sustancia blanca aparece teñida

Respecto a la capa granular, el elemento neuronal característico es el grano cerebeloso; conjuntamente con estas células se distinguían otras estructuras, tales como las interneuronas de Golgi – II, células gliales y elementos vasculares. Por otro lado, y subyacente a esta capa granular, se disponía un tracto de sustancia blanca que centraba las laminillas cerebelosas (Fig. 7).

Cuando se realizaron cortes semifinos se apreciaban mejor las características celulares de las neuronas granulares (núcleo redondo y cromatina perinuclear en grumos), así como la presencia de alguna de las interneuronas de Golgi – II (Fig. 8).

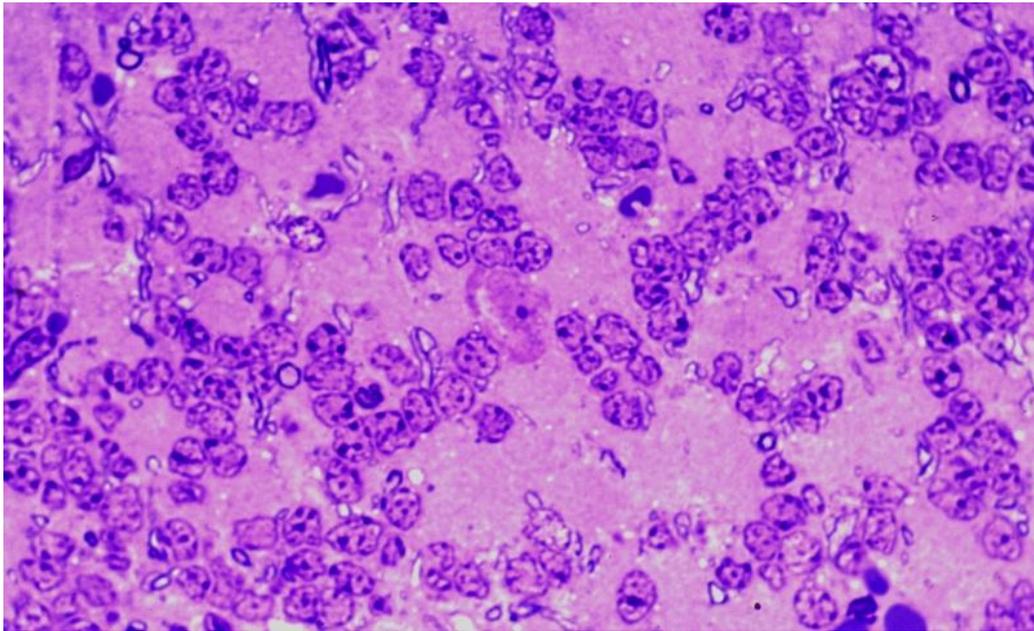


Fig. 8: Capa granular: se distinguen las características nucleares de los granos y una neurona de Golgi-II - AT

4.2. Serie – A.

Como ya se indicó en el apartado de Material y Métodos se establecieron 3 grupos (A1, A2 y A3), en función de los días de evolución de los animales, tras la administración del Ácido L-2-Cloropropiónico.

4.2.1. Grupo - A1: 3 días de evolución tras la administración del neurotóxico.

El estudio microscópico de las muestras de corteza cerebelosa mostró una estructura absolutamente normal de las mismas; tanto las capas molecular (Fig. 9), de células de Purkinje y granular no presentaban alteraciones neuronales, gliales ni vasculares (Fig. 10).

Cuando se tiñeron con PAGF, era evidente la distribución de los elementos gliales de naturaleza astrocítica, tales como la glía de Bergmann y los astrocitos protoplásmicos (Fig. 11) y fibrosos.

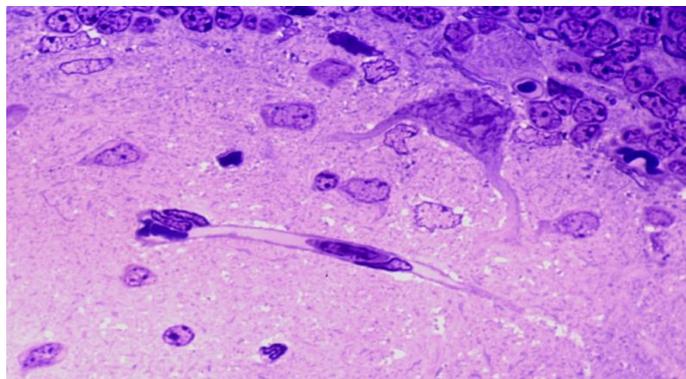


Fig. 9: Grupo - A1: Corte semifino, teñido con Azul de Toluidina, donde destaca un capilar en la molecular

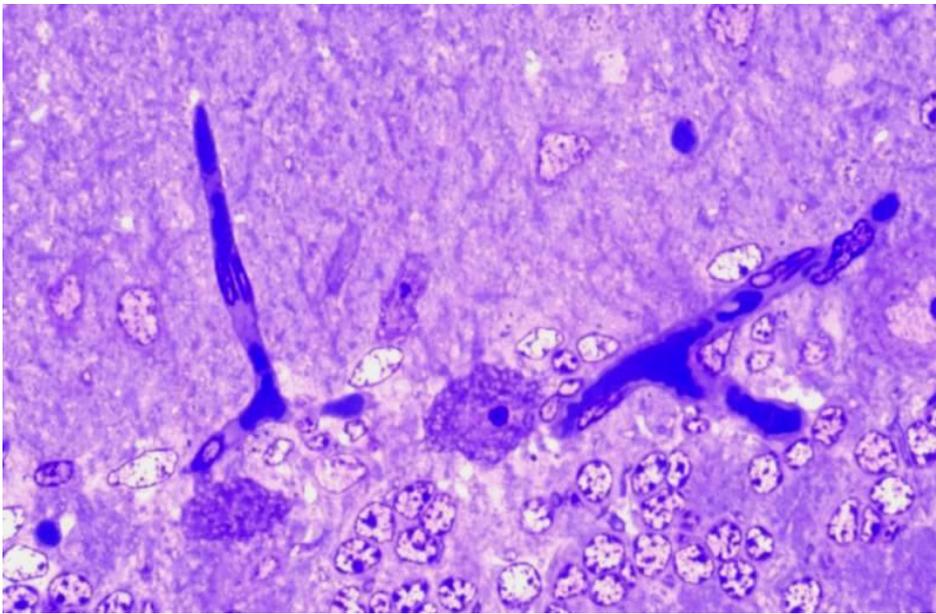


Fig. 10: Grupo - A1: Capilares, neuronas de Purkinje, molecular y granular, teñidos con Azul de Toluidina

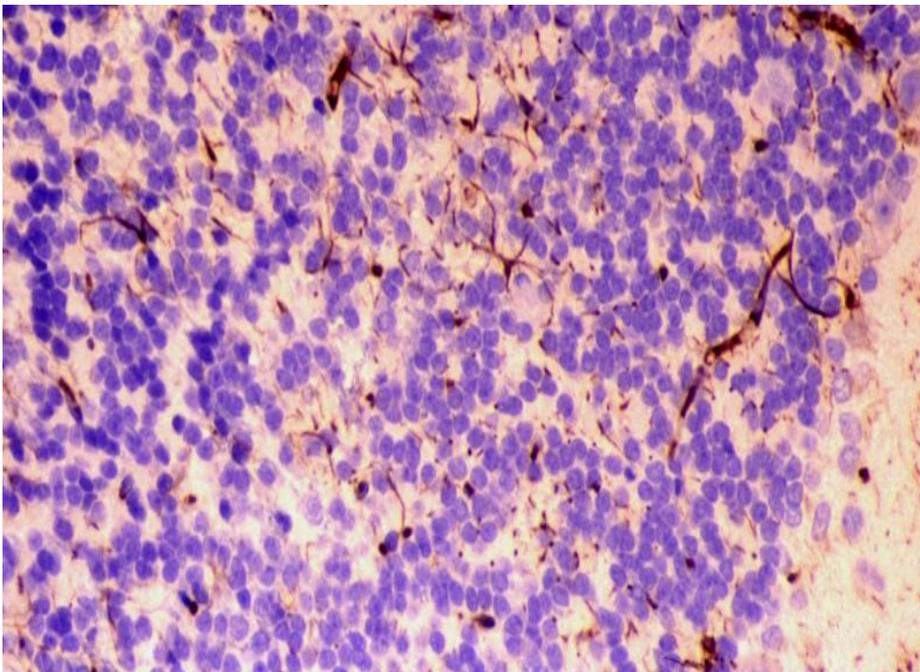


Fig. 11: Grupo - A1: Prolongaciones astrocitarias en la capa granular -

4.2.2. Grupo - A2: 10 días de evolución tras la administración del neurotóxico.

A partir del día 10 comenzaron las alteraciones en la corteza cerebelosa, visibles ya en aumentos panorámicos (Fig. 12):

edema pericelular alrededor de las neuronas de Purkinje (Fig. 13), con signos similares a los producidos en la hipoxia, necrosis de las células granulares (Figs. 14, 15 y 16) e hiperplasia de los elementos gliales astrocitarios (Figs. 17 y 18).



Fig. 12: Grupo - A2: Corteza cerebelosa a los 10 días de administrado el NTx. Destaca la necrosis en laminillas v

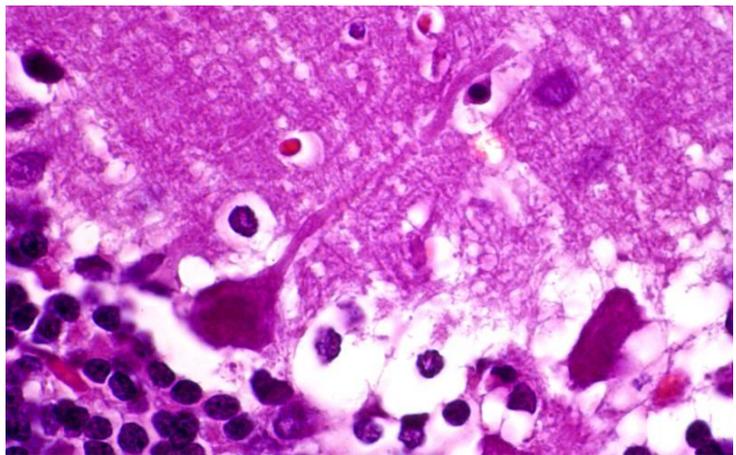


Fig. 13: Grupo - A2: Edema alrededor de una célula de Purkinje. Destaca su dendrita ascendente - HE

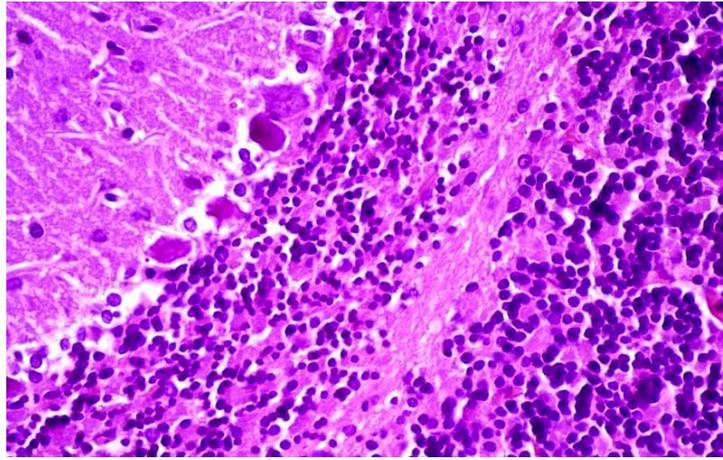


Fig. 14: Grupo – A2: Tracto de sustancia blanca separando neuronas granulares normales y necróticas - HE

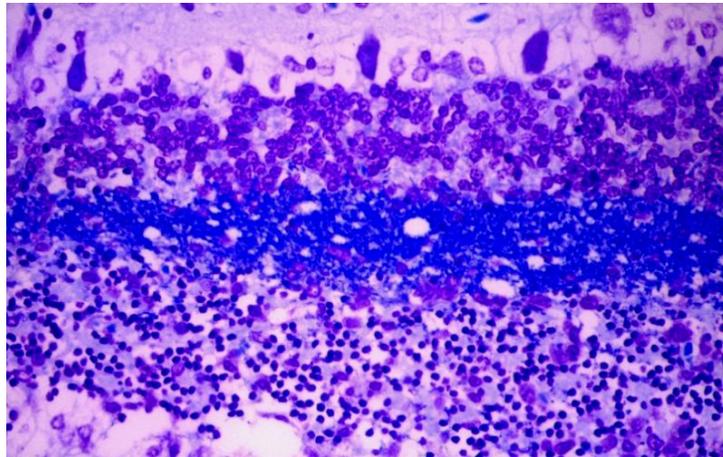


Fig. 15: Grupo – A2: Menor tamaño de granos necróticos adyacentes a un tracto de sustancia blanca - KB

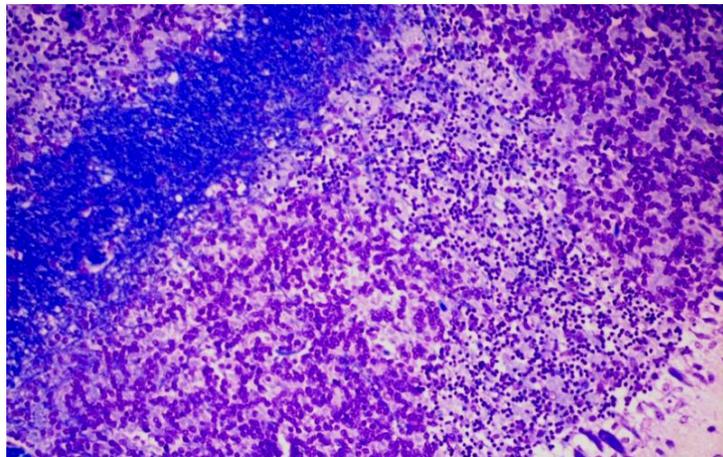


Fig. 16: Grupo – A2: Sustancia blanca y necrosis granular focal entre granos normales – Klüver-Barrera

Cuando se observaban con detalle los diferentes cortes, se puso de manifiesto que la necrosis de las neuronas granulares no seguía un patrón característico, sino que se producían necrosis focales en las laminillas, pudiendo, en ocasiones, afectar a prácticamente la totalidad de la misma.

Como se indicó previamente, de forma simultánea con la necrosis granular y las modificaciones edematosas de las neuronas de Purkinje, se produjo una hiperplasia de elementos gliales de naturaleza astrocítica. Este marcado hecho morfológico lo pusimos en evidencia cuando se realizaron técnicas IHQ para la Proteína Ácida Gliofibrilar (PAGF).

Esta proliferación astrocítica estaba localizada, principalmente, en las áreas de la granular donde se habían producido las necrosis de las neuronas características de este estrato de la corteza cerebelosa (Fig. 17).

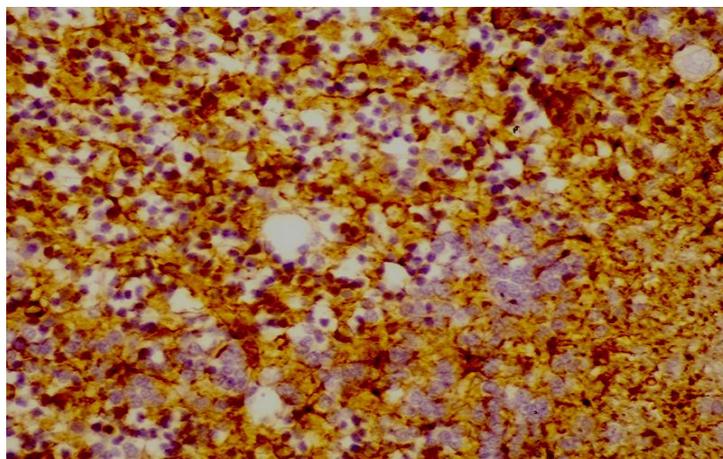


Fig. 17: Grupo - A2: Proliferación astrocítica en la capa granular afectada de necrosis. Se observan algunos granos normales -

Al realizar las observaciones a mayor aumento eran evidentes las características citológicas de los astrocitos proliferados: soma relativamente voluminoso, morfología estrellada y prolongaciones muy marcadas que se originaban del cuerpo celular y adquirían una disposición radial (Fig. 18).

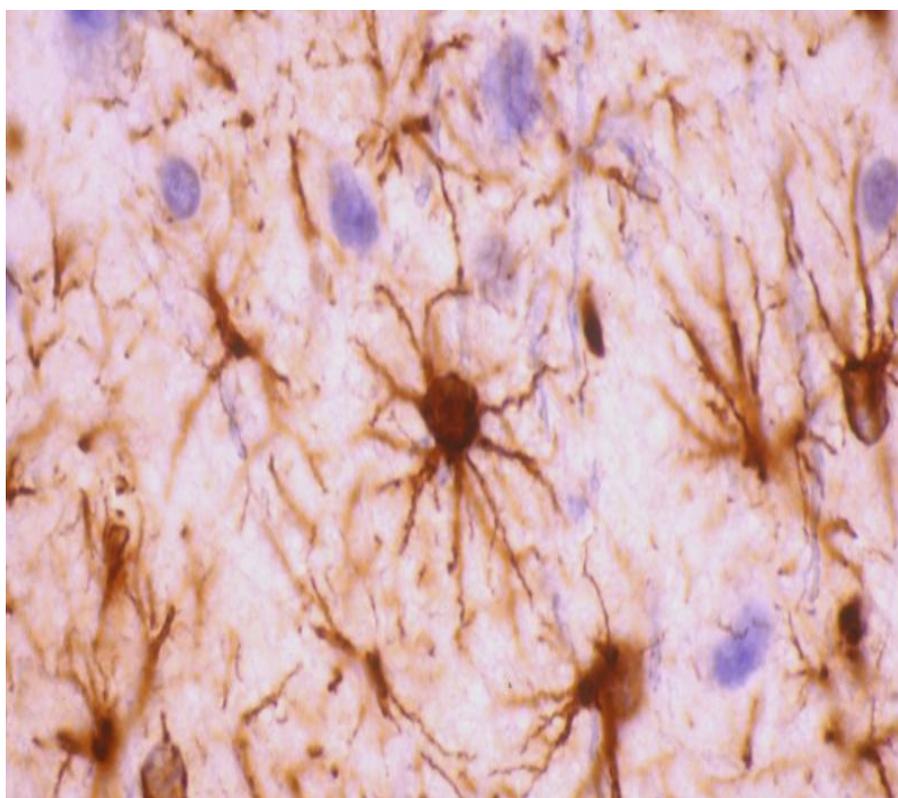


Fig. 18: Grupo – A2: Astrocitos hiperplásicos en la capa granular necrótica; se destacan claramente sus voluminosos somas así como las prolongaciones radiales
- PAGF

Asimismo, la hiperplasia astrocítica, aunque predominaba en la capa granular de la corteza, también era evidente en la sustancia blanca, sobre todo en las áreas adyacentes a la granular (Fig. 19).

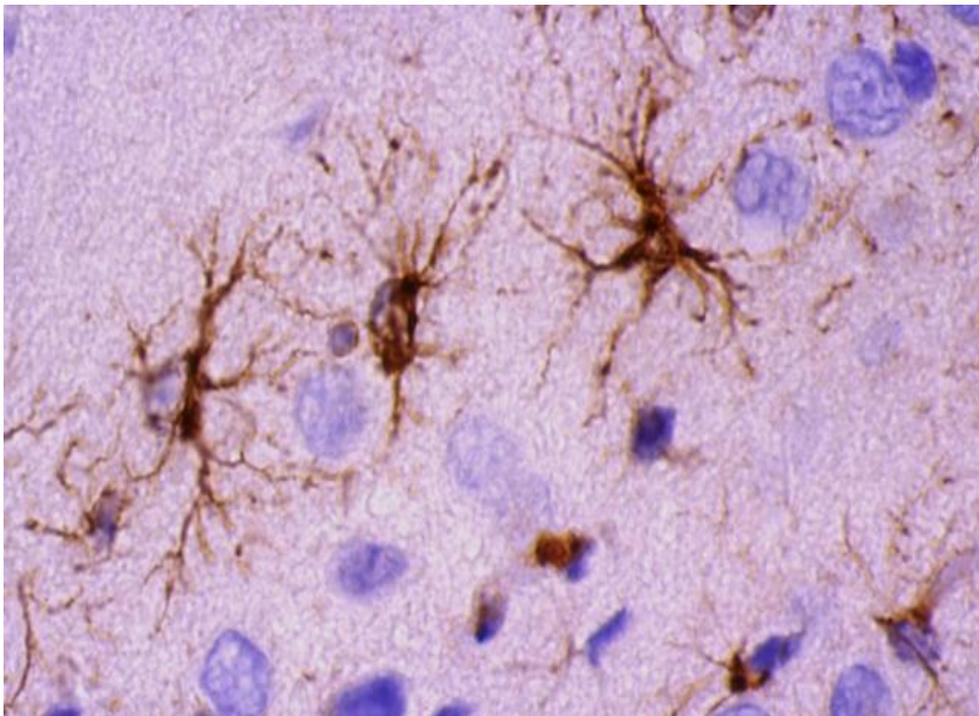


Fig. 19: Grupo - A2: Elementos astrocitarios dispuestos en la sustancia blanca próxima a las áreas necróticas de la capa granular - PAGF

Por otro lado, y también en la sustancia blanca, se pudo determinar gran número de astrocitos fibrosos en vecindad a los capilares sanguíneos, adoptando su característica disposición mediante los pedículos vasculares (Fig. 20).

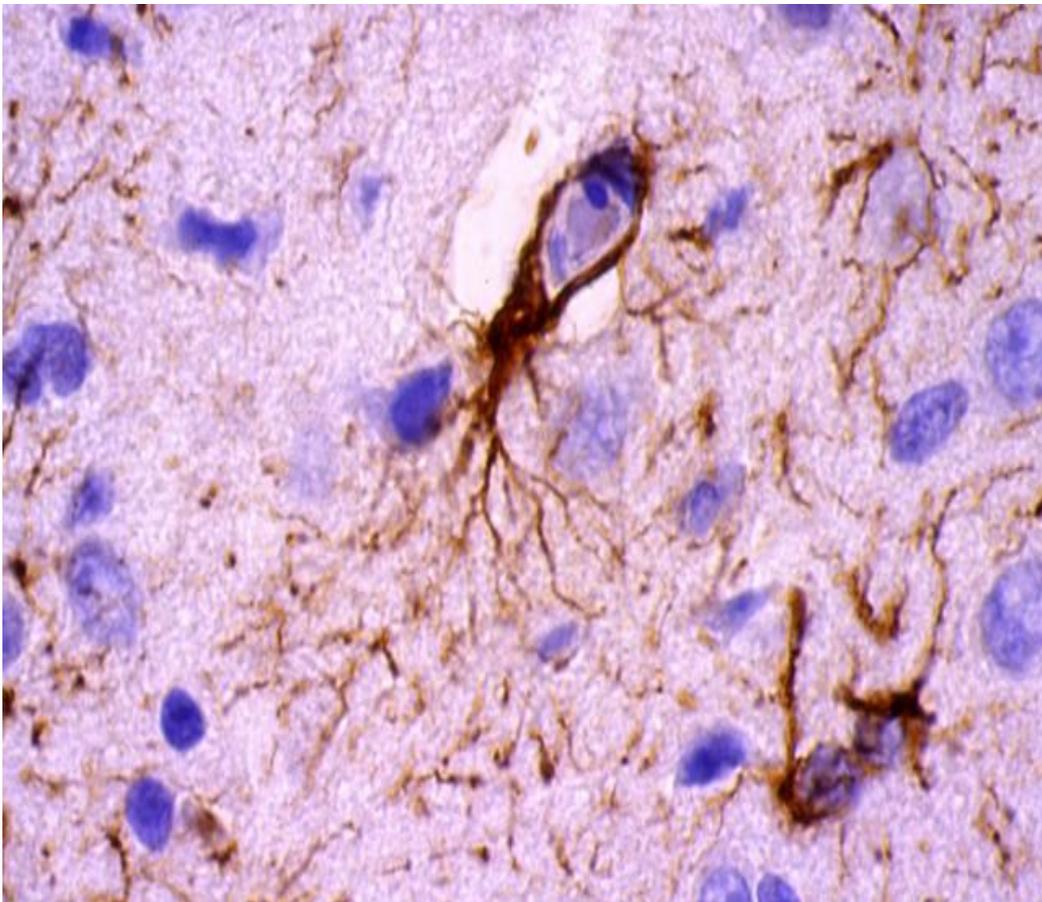


Fig. 20: Grupo A-2: Astrocito fibroso de disposición perivascular; se destacan claramente dos pedículos vasculares que rodean casi completamente al capilar sanguíneo - PAGF

4.2.3. Grupo - A3: 17 días de evolución tras la administración del neurotóxico.

A los 17 días, las alteraciones histológicas eran muy manifiestas: las laminillas cerebelosas estaban desestructuradas, con pérdida de la característica estratificación cortical (Fig. 21); en ocasiones no existían neuronas granulares sino restos celulares debidos a la acción del Neurotóxico (Fig. 22); esta ausencia de granos era ocupada por una proliferación celular de naturaleza astrocítica que incluso podía alcanzar la sustancia blanca y que se puso claramente de manifiesto cuando se empleaba la técnica de la Proteína Ácida Gliofibrilar (Fig. 23); ocasionalmente se presentaban focos dispersos de calcificación distrófica en las áreas de lesión de la capa granular y zonas adyacentes de la sustancia blanca (Fig. 24).

El estudio inmunohistoquímico con CD68 confirmó la presencia de elementos celulares de la estirpe macrofágica en la zona de lesión granular (Fig. 25); de igual modo, cuando empleábamos el PCNA se observó marcada positividad en las áreas lesionadas (Fig. 26).

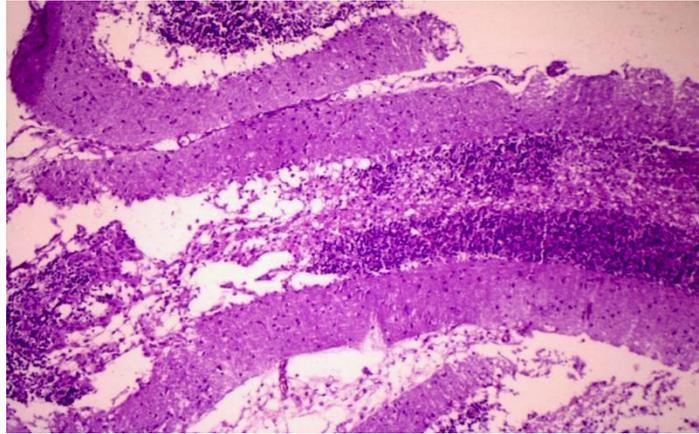


Fig. 21: Grupo A-3: Laminilla cerebelosa 17 días después de la acción del NTx. Se aprecia intensa necrosis en la capa granular así como desestructuración de la propia laminilla -

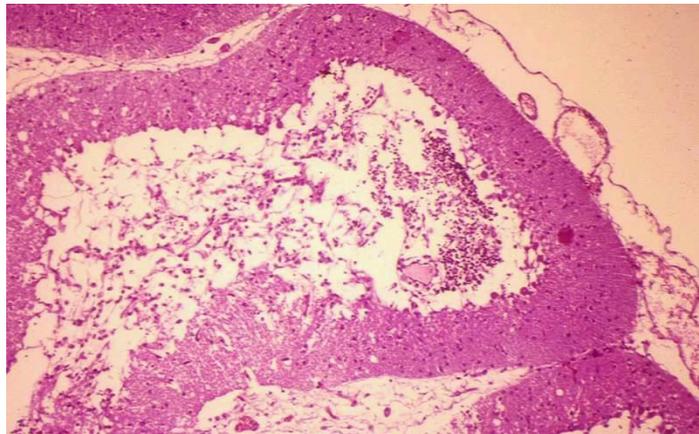


Fig. 22: Grupo A-3: Laminilla cerebelosa en la que se evidencia la inexistencia de neuronas granulares; únicamente se observan restos celulares. como consecuencia de la acción del

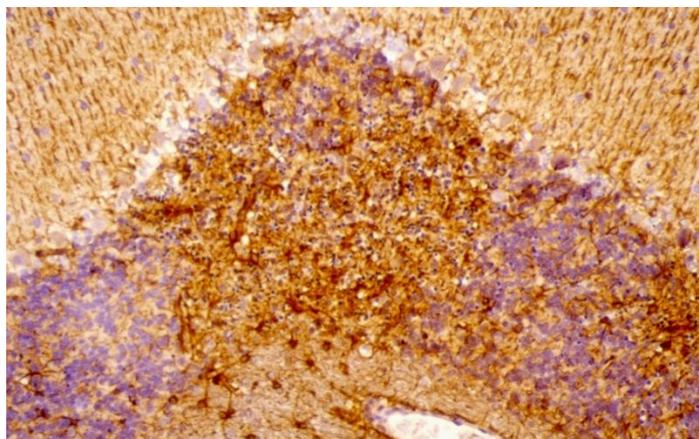


Fig. 23: Grupo A-3: Área necrótica granular de una laminilla cerebelosa que ha sido ocupada por una intensa proliferación astrocítica - PAGF

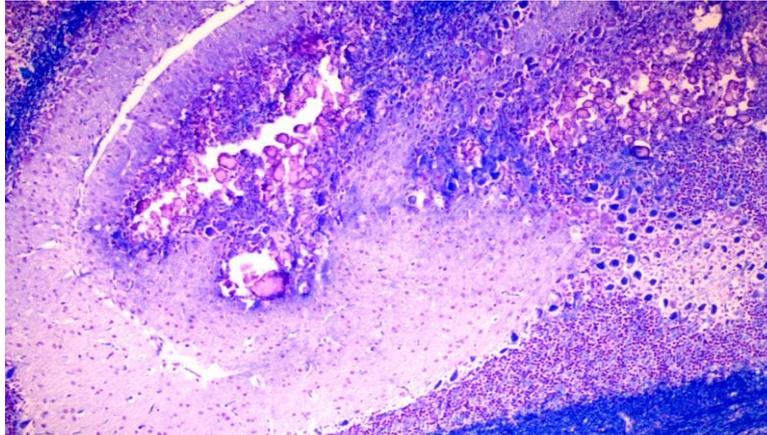


Fig. 24: Grupo A-3: Zonas de calcificación distrófica tras la acción del neurotóxico; se distinguen especialmente en las áreas granulares y en vecindad a la sustancia blanca subyacente –KB-

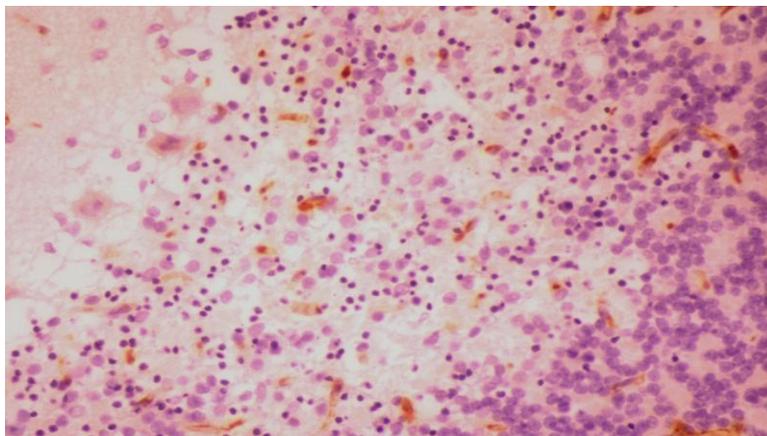


Fig. 25: Grupo A-3: Zona de lesión granular con elementos macrofágicos que muestran positividad para la técnica inmunohistoquímica del CD68

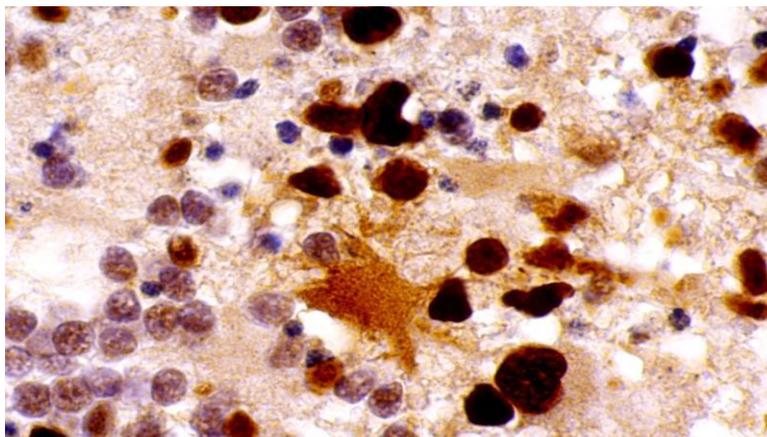


Fig. 26: Grupo A-3: Elementos celulares proliferantes en el área lesionada puestos de manifiesto con la técnica del PCNA

Cuando observábamos las laminillas afectadas por la acción del neurotóxico, se apreciaba como la necrosis de las neuronas granulares no era completa en cada laminilla, sino que existían focos necróticos en vecindad a otros normales; este hecho se puede observar en la Fig. 27, donde un tracto de sustancia blanca separa áreas con granos normales de otras con células granulares necróticas, puestas de manifiesto por su menor tamaño y condensación nuclear.

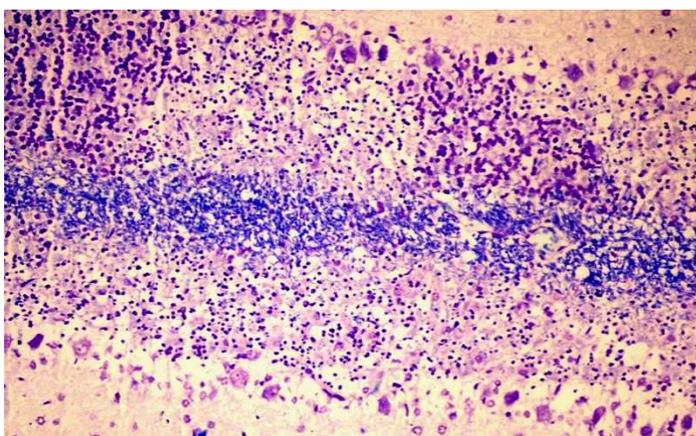


Fig. 27: Grupo A-3: Tracto de sustancia blanca que separa áreas granulares necróticas de normales – KB

En lo que respecta a las células de Purkinje, éstas presentaban edema perineuronal y modificaciones similares a las producidas por la hipoxia, (retracción nuclear e hiperchromatismo) (Fig. 28).

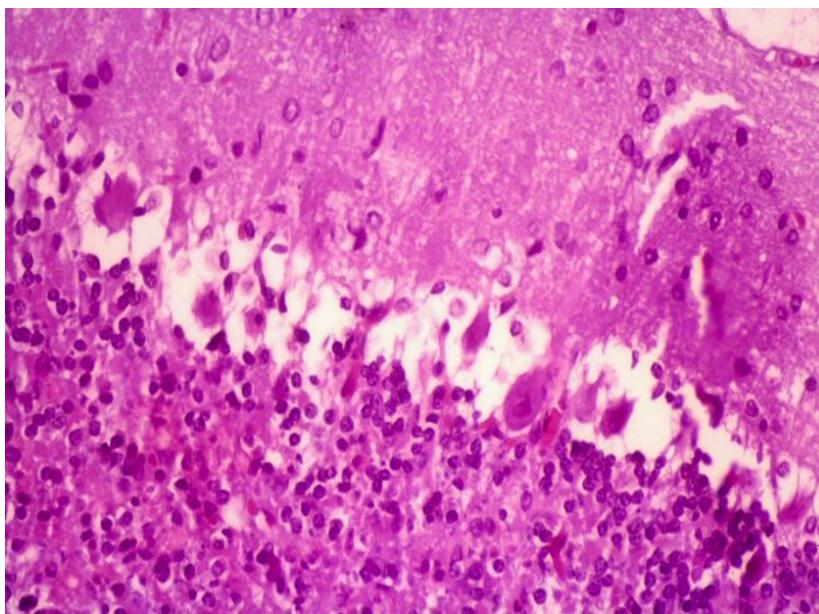


Fig. 28: Grupo A-3: Neuronas de Purkinje con marcado edema pericelular y ligeras modificaciones de las neuronas estrelladas- HE

La capa molecular no presentaba modificaciones tan marcadas como las ya señaladas en la capa granular, aunque se pudieron observar alteraciones en la misma, tales como descamación de la neuronas estrelladas y presencia de elementos macrofágicos (*gitterzellen*) (Figs. 29 y 30), e hiperplasia de la glía de Bergmann (Fig. 31).

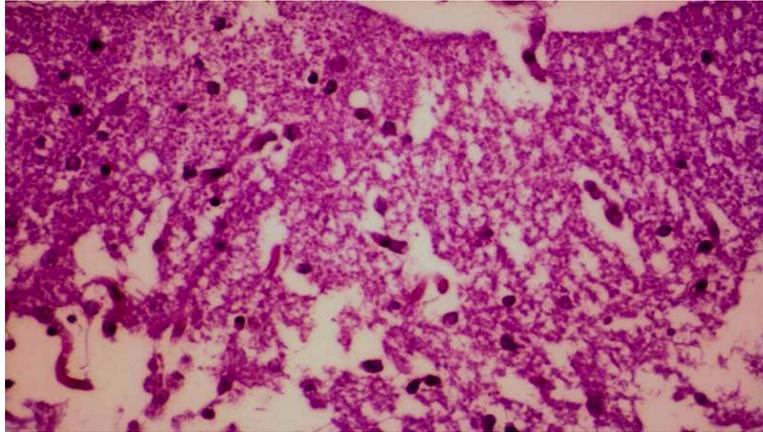


Fig. 29: Grupo A-3: Capa Molecular con alteraciones de las neuronas estrelladas y en cesta. Se aprecia la pérdida de continuidad de los elementos constituyentes, tanto celulares como fibrosos - HE

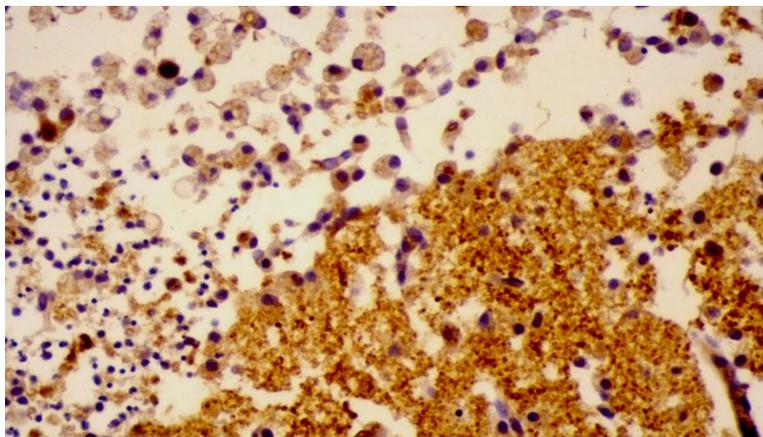


Fig. 30: Grupo A-3: Capa Molecular teñida con PAGF donde se aprecian las modificaciones de la misma, con descamación celular que se proyecta hacia la capa granular

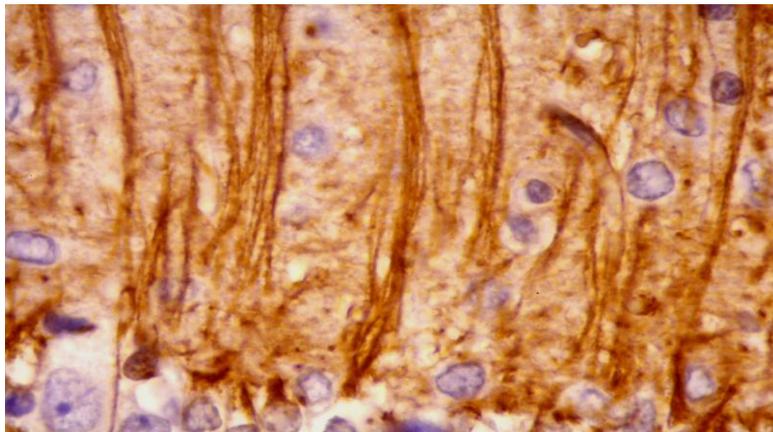


Fig. 31: Grupo A-3: Hiperplasia de la glía de Bergmann en la capa molecular. Obsérvense las proyecciones ascendentes que pueden alcanzar la membrana pial - PAGF

4.3. Serie – B.

De manera similar a la Serie – A se establecieron 2 grupos (B1 y B2), en función de los días de evolución de los animales, tras la administración del Ácido L-2-Cloropropiónico y posterior retirada del mismo.

4.3.1. Grupo – B1: 6 días de evolución con el neurotóxico y 20 sin él.

Macroscópicamente los animales mostraban déficits motores similares a los manifestados por los de los Grupos A2 y A3.

Desde el punto de vista histológico las muestras de corteza cerebelosa presentaban modificaciones estructurales que afectaban fundamentalmente a la capa granular.

Respecto a la capa molecular, no existían alteraciones histológicas significativas; únicamente se puso de manifiesto una mayor proporción de vasos sanguíneos dilatados y congestivos en las meninges, especialmente los de la piamadre (Fig. 32).

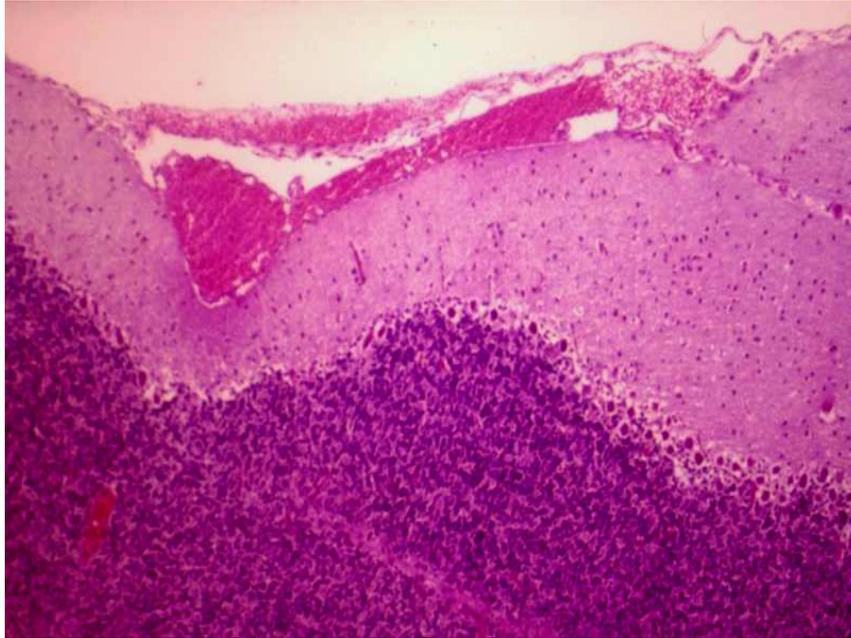


Fig. 32: Grupo B-1: Vaso congestivo y dilatado en la membrana pial de una laminilla cerebelosa. Obsérvese como la capa molecular no muestra modificaciones histológicas significativas - HE

Las células de Purkinje generalmente no presentaban anomalías citológicas, siendo en todo normales y similares a las de la Serie Control. Este hecho puede observarse en la Fig. 33, donde son muy evidentes las cestas que rodean al soma y la salida del axón, procedentes de las neuronas en cesta localizadas en la capa molecular. En algunos casos pusimos en evidencia cambios morfológicos similares a los que mostraban en la Serie A.

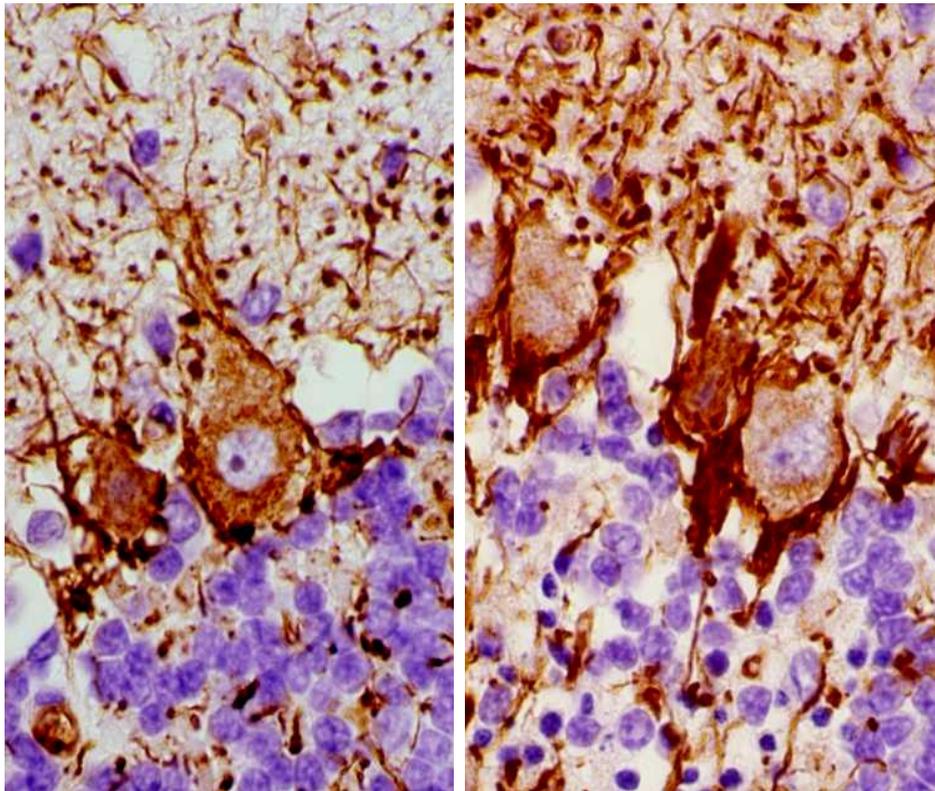


Fig. 33: Grupo B-1: Neuronas de Purkinje en las que se destacan claramente las proyecciones axónicas descendentes, originadas a partir de las neuronas en cesta de la capa molecular que rodean el soma - NF

Finalmente la capa granular mostraba alteraciones similares a las ya descritas en algunos grupos de la Serie A, a saber: retracción citoplásmica e hiper cromatismo nuclear y aparición de áreas necróticas que fueron ocupadas por una proliferación glial de naturaleza astrocítica, tal como se observa en la Fig. 34, donde se distinguen diversos astrocitos reactivos con sus características prolongaciones y soma voluminoso, teñidos con la técnica IHQ de la Proteína Ácida Gliofibrilar.

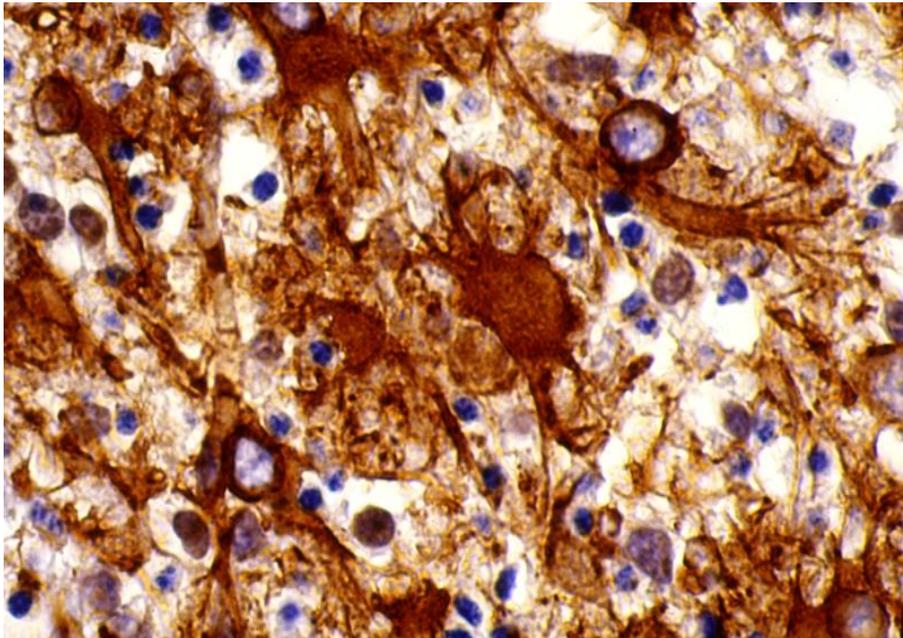


Fig. 34: Grupo B-1: Astrocitos proliferantes en la capa granular; se distinguen asimismo granos necróticos y destaca el voluminoso soma y las típicas prolongaciones radiales astrocitarias – PAGF

4.3.2. Grupo – B2: 21 días de evolución con el neurotóxico y 100 días sin él.

Con respecto a este último grupo experimental, indicar que las modificaciones histológicas de la corteza cerebelosa afectaban principalmente a las capas de células de Purkinje y granular.

Así, la capa molecular presentaba alteraciones similares a las del Grupo B1, estando restringidas a las meninges pial y dural con fenómenos de congestión y dilatación vascular (Fig. 35).

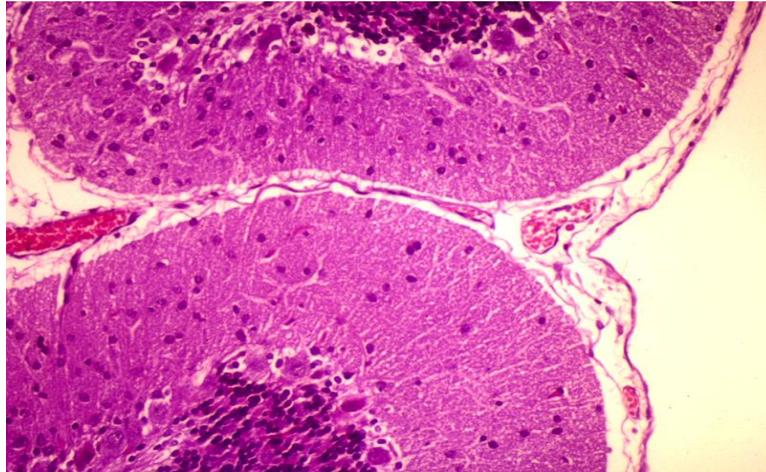


Fig. 35: Grupo B-2: Imagen de la capa molecular cerebelosa en un corte de H-E, donde se distinguen los núcleos de las interneuronas y estructuras vasculares, en la piamadre y duramadre, dilatados y congestivos

En lo que respecta a las neuronas de Purkinje, mostraban alteraciones citológicas muy similares a las ya descritas en el Grupo A3, consistentes en hipercromatismo nuclear y retracción citoplásmica (Fig. 36)

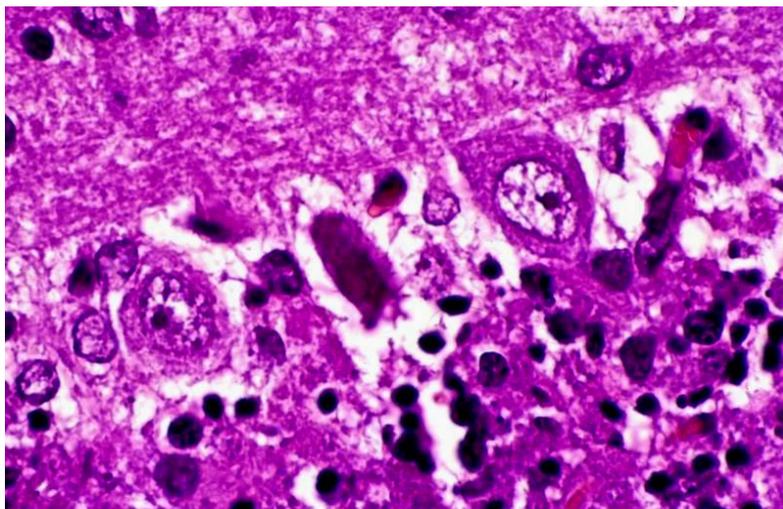


Fig. 36: Grupo B-2: Capa de células de Purkinje donde son evidentes los hechos morfológicos citados en el texto: retracción citoplásmica, hipercromatismo nuclear así como, en este caso, edema perineuronal--
H-E

Finalmente, la capa granular era la que presentaba mayores modificaciones, tanto de forma individual las neuronas granulares, como la propia estructura del estrato cortical cerebeloso (Fig. 37).

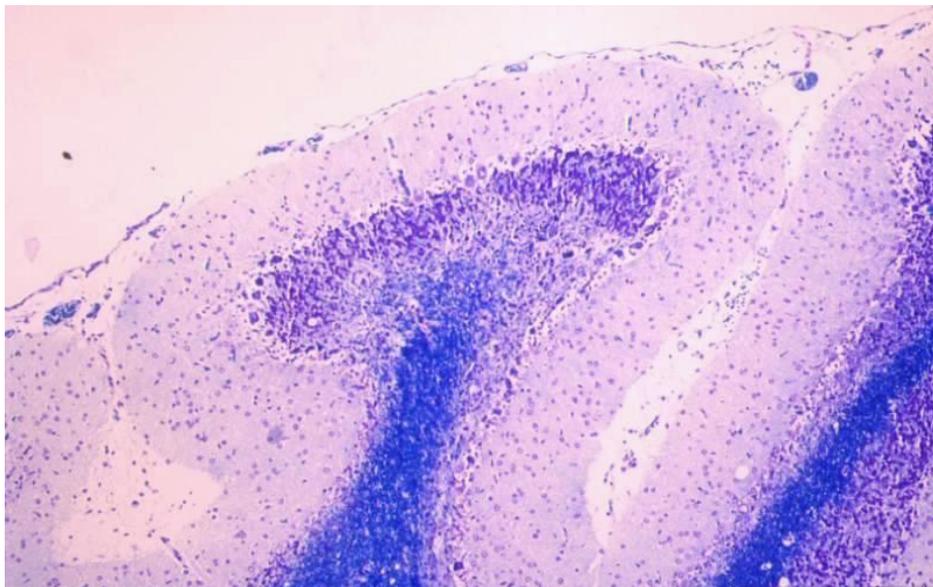


Fig. 37: Grupo B-2: Laminilla cerebelosa en la que se puede apreciar la pérdida de la continuidad normal del estrato granular cerebeloso. Por otro lado las células de Purkinje y la molecular no muestran modificaciones histológicas – KB

Los principales cambios morfológicos venían marcados por: intenso cromatismo nuclear y reducción del diámetro celular (Fig. 38), pérdida de contactos sinápticos en la capa molecular, a través de las fibras paralelas, así como de sus dendritas en los glomérulos, proliferación de astrocitos (Fig. 39), y fenómenos de calcificación distrófica en las áreas necróticas granulares (Figs. 40 – 41).

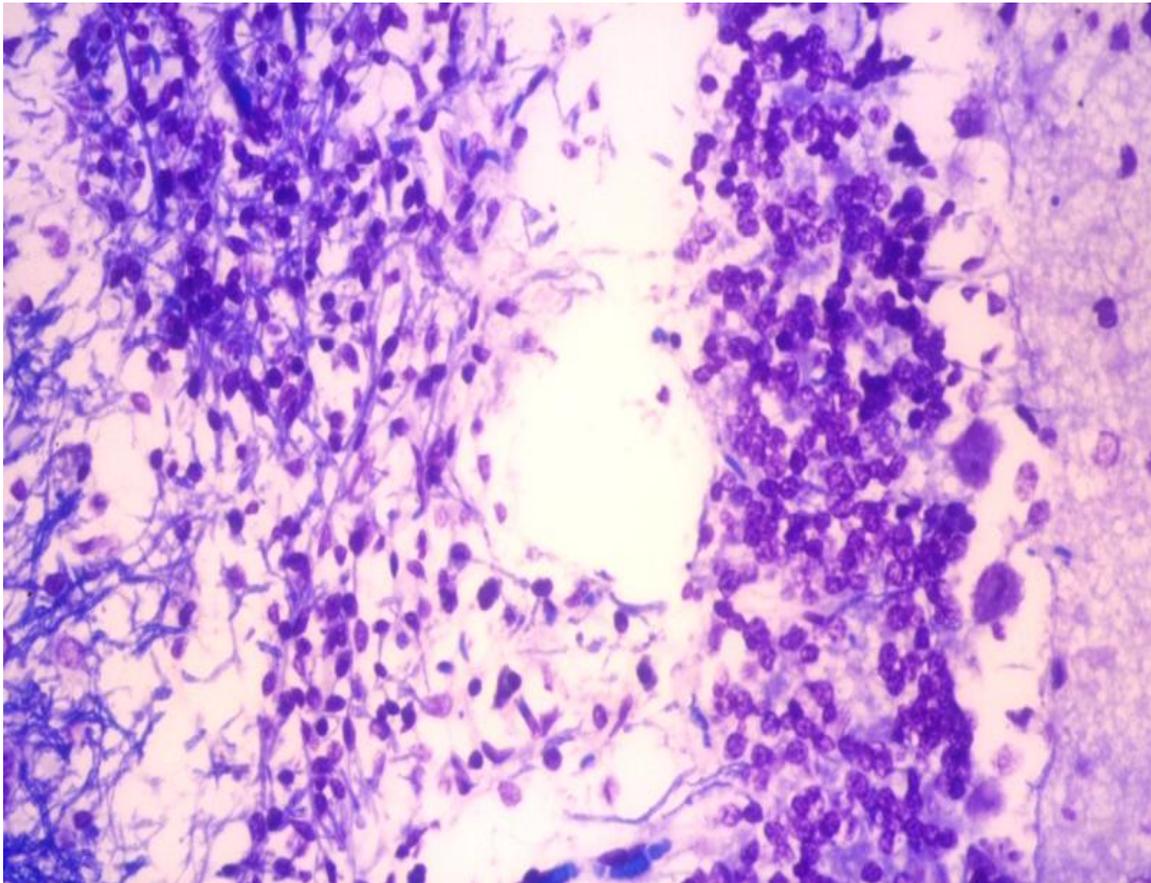


Fig. 38: Grupo B-2: Granos normales a la derecha y necróticos a la izquierda, donde se aprecia la reducción del tamaño así como el hiperchromatismo nuclear; subyacente a estas células se distingue la sustancia blanca – KB

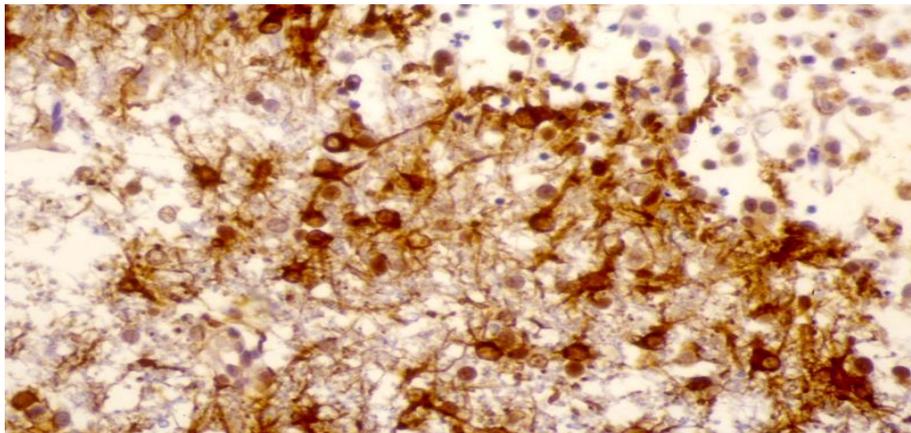


Fig. 39: Grupo B-2: Intensa proliferación astrocítica en las áreas granulares necróticas; se distinguen claramente los elementos gliales reactivos con sus

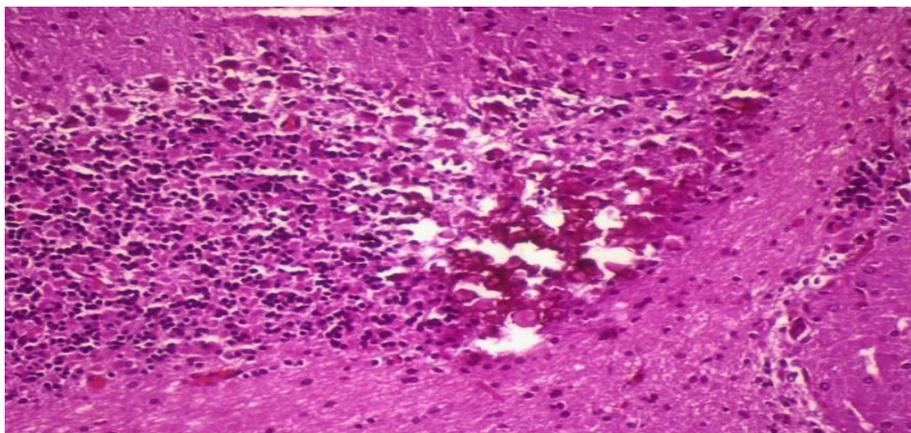


Fig. 40: Grupo B-2: Imagen panorámica de la capa granular donde se aprecian focos de calcificación distrófica y en vecindad a granos alterados (obsérvese su menor tamaño) – HE.

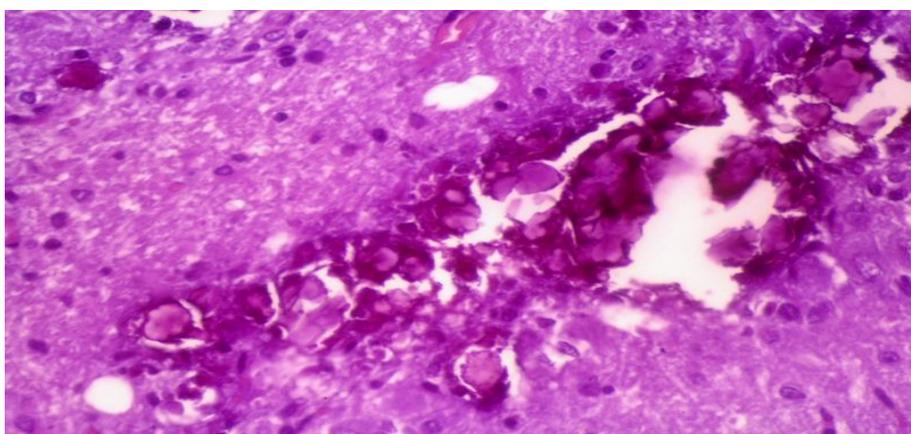


Fig. 41: Grupo B-2: Área granular necrótica con intensos focos de calcificación distrófica; en vecindad a los mismos se aprecia un tracto de sustancia blanca – HE

Al igual que en la Serie A, la necrosis de los granos no era completa, sino que se producía en focos necróticos, permaneciendo intactas zonas más o menos amplias del estrato granular.

5..DISCUSIÓN.

En el modelo experimental diseñado en la presente memoria, hemos administrado, disuelto en el agua de bebida, un neurotóxico (Ácido L-2-Cloropropiónico, AL2CP), con actividad primaria sobre las neuronas granulares de la corteza cerebelosa. Esta sustancia provoca retracción citoplásmica e hipercromatismo nuclear, junto con una disminución general del tamaño celular de las neuronas granulares y, de manera indirecta, alteración de las neuronas de Purkinje (Jones y cols., 1995-1997; Lock y cols., 1995, 1997; Williams y cols., 1999, 2001a, 2001b; Simpson y cols., 1996a, 1996b; Widdowson y cols., 1996, 1997; Wyatt y cols., 1996; Sturgess y cols., 2000; Duffell y Lock, 2004).

A continuación discutiremos nuestros resultados de una manera conjunta a los estudios realizados por otros autores, indicando en cada momento a que Grupo experimental nos estamos refiriendo. Así, nuestra Serie control no presentó anomalías histológicas reseñables mientras que de Vera y cols. (2004) encuentran, en sus grupos control (suero salino por un lado y suero salino con glicerol por el otro), una ganancia de peso de los animales estadísticamente significativa, cuando las comparaban con sus grupos experimentales.

El daño cerebeloso inducido por el AL2CP es similar al inducido por otros tóxicos tales como el metil mercurio y el cloruro de metilo (Chang, 1977; Rehul y Chang, 1979; Magos y cols., 1985; Syversen y cols., 1981; Svendsen y cols., 2010; Jiang y cols., 1985; Landry y cols., 1985; Eustis y cols., 1988) presentando como hechos histológicos comunes la necrosis de las neuronas granulares con escasa evidencia de lesión en la neuronas de Purkinje.

Los granos del cerebelo son las células diana que presentan antes cambios degenerativos, (a las 36 horas de administrado el AL2CP por vía oral y dosis única; Jones y cols., 1997); sin embargo a diferencia del metil mercurio no se ha obtenido evidencia de que el AL2CP provoque efectos adversos en el Sistema Nervioso Periférico. Aunque se reconoce que puede no haber reemplazo de las células granulares desaparecidas por la necrosis (con la consecuente atrofia cerebelosa y/o calcificación) es probable que algunos cambios nucleares puedan ser reversibles tales la condensación de la célula granular (núcleo y citoplasma); en el Grupo A1 nuestras observaciones fueron coincidentes con las referidas a la Serie Control, en los cuales no se pusieron en evidencia modificaciones histológicas; por lo tanto la estructura histológica corticocerebelosa se conservó (capa molecular, de neuronas de Purkinje y granular); Simpson y cols. en 1996,

encuentran hechos similares en su serie control (administración de agua destilada) en un estudio en el que administraron oralmente una dosis única del neurotóxico Ácido L-2-Cloropropiónico (AL2CP) de 750 mgs./kg. de peso corporal o 1 dosis diaria de 250 mgs./kg. durante 3 días; por el contrario de Vera y cols. en su trabajo de 2004 inducen signos de neurotoxicidad a las 72 horas de administrado el AL2CP, con manifiesta ataxia (oscilando desde la pérdida de coordinación motora a una ausencia total del control de la postura) y pérdida de peso; estos hechos se traducían, en el estudio histológico, en una severa necrosis granular, sin alteraciones aparentes en las células de Pukinje; las células de Golgi, estrelladas y en cesta tampoco mostraban ningún tipo de anomalía citológica; en cambio un marcado edema afectaba a las neuronas granulares y células de Purkinje provocando una destacada espongirosis del neuropilo; en sus investigaciones de Vera y cols. utilizaron una sonda para la ingesta oral del ácido, mientras que nosotros hemos utilizado dicho ácido (AL2CP) disuelto en el agua de bebida, con lo cual su acción es más lenta que mediante la técnica utilizada por los citados autores.

En el presente trabajo de Tesis Doctoral hemos puesto de manifiesto, en fases avanzadas de las experiencias, (Grupo A2, 10 días de evolución tras la administración del tóxico, modificaciones histológicas diversas: desde hiperplasia e

hipertrofia celulares, pasando por condensación nuclear y retracción citoplásmica de las neuronas granulares principalmente; así, tal y como expusimos en el apartado de Resultados a partir de los 10 días de ingesta del neurotóxico comienzan a identificarse modificaciones histológicas evidentes: lesiones necróticas multifocales en la capa granular con áreas sanas interpuestas, edema pericelular alrededor de las neuronas de Purkinje, y moderada hiperplasia e hipertrofia del componente glial, especialmente el astrocítico, puesto de manifiesto mediante la técnica de la Proteína ácida gliofibrilar (GFAP); Por otro lado estos hechos son coincidentes con los estudios de Simpson y cols. en 1996 cuando empiezan a encontrar alteraciones en las laminillas cerebelosas a las 36 horas de administrado el neurotóxico; dichas modificaciones estaban representadas por áreas focales de condensación de neuronas granulares y ocasionales necrosis de los granos, un marcado edema, reconocible como una vacuolización de la capa granular; en nuestro trabajo los hechos morfológicos parecen llevar un retraso en la formación de los mismos, sobre todo si los comparamos con el trabajo publicado por Simpson y cols. en 1996.

Asimismo los estudios al microscopio electrónico del grupo de trabajo de Jones y cols. (1997), describen fenómenos de condensación nuclear y citoplásmica de las neuronas

granulares; concretamente su núcleo presentaba un aspecto crenado, mientras que en el citoplasma las organelas membranosas (RER, REL y Golgi) aparecían dilatadas, con vesículas y contenido claro en su interior, siendo estos hechos morfológicos constantes.

Cambios precoces en la morfología cerebelosa de la rata han sido inducidos por una dosis simple de 10mg/Kg. de metil mercurio, apareciendo dichas alteraciones a los 3 días de la administración del tóxico (Syversen y cols., 1981); los cambios histológicos descritos por este autor comprenden principalmente condensación del núcleo de las neuronas granulares con aparente reversibilidad a su estado normal a los 7 días; asimismo leves retracciones de la células de Purkinje también fueron observadas; necrosis granular no fue observada en el nivel de dosis señalado de metil mercurio, aunque al aumentar la proporción y el número de dosis, se observaron muerte granular y vacuolización extracelular en la capa de los granos (Syversen y cols., 1981). Por otro lado, en la rata, las neuronas del ganglio espinal parecen ser más sensibles a la intoxicación por el metil mercurio que las neuronas granulares cerebelosas (Chang, 1977); por el contrario, no se observaron efectos adversos en el sistema nervioso periférico tras la administración de AL₂CP; Syversen y cols., 1981 han comunicado que las áreas cerebelosas de cambios tisulares tras la administración del metil mercurio

eran el vermis el nódulo floccular, una distribución con similitud a la observada por nosotros así como por Jones y cols. en 1997.

Los hechos morfológicos encontrados en nuestro trabajo son coincidentes con los observados por Shiraki en 1979 cuando determina, con otro tóxico, el metil-mercurio, que tiene como células diana a las neuronas granulares cerebelosas, provocando los mismos hechos histológicos que el AL2CP; esta forma química del mercurio reacciona con los residuos de cisteína que simulan al aminoácido metionina, siendo capaz de atravesar la barrera hemato-encefálica (Mokzran y cols., 1995; Fonnum y Lock, 2001).

En un estudio de las lesiones inducidas en la capa granular cerebelosa del ratón por inhalación de cloruro de metilo (Jiang y cols., 1985) observaron lesiones muy frecuentes en el paraflóculo ventral y mucho menos destacadas en otras áreas del cerebelo; estos investigadores describieron cambios histológicos tales como núcleos cariorréxicos y condensados así como leves fenómenos inflamatorios, y sin modificaciones de las células de Purkinje y de la vascularización.

Respecto al componente glial, como ya indicamos, se produjo principalmente una hiperplasia de células astrocíticas que fueron claramente identificadas con la técnica de la GFAP; Lafarga y cols (1998) estudiaron las lesiones de la corteza cerebelosa en desarrollo tras la administración de metoxi-azometanol (MAM) y determinaron una marcada expresión de los procesos gliales, mediante GFAP, en la glía de Von Bergmann a partir del segundo día de instaurado el tratamiento (día 5 del desarrollo embrionario); nosotros hemos encontrado que la proliferación astrocítica estaba localizada, no solo en las áreas necróticas granulares sino que también era manifiesta en la sustancia blanca, sobre todo en áreas adyacentes a la sustancia gris; esta proliferación de astrocitos que hemos puesto de manifiesto está en contradicción con los hechos descritos por Kitamura y cols. en 1998 cuando describen que tras la administración de Ácido Káínico a ratones salvajes y deficientes para p53, los astrocitos de p53^{-/-} eran relativamente resistentes a la acción del tóxico y solo se desarrollaba una hiperplasia astrocítica a partir del día 7 de comenzado el tratamiento

En nuestro Grupo A3 (17 días de evolución tras la administración del neurotóxico), las modificaciones histológicas corticales eran muy manifiestas, abarcando en ocasiones a la práctica totalidad de la corteza cerebelosa; así, las laminillas cerebelosas habían perdido su configuración típica y no existían neuronas granulares, estando ocupada

este área por una marcada proliferación de elementos celulares de naturaleza astrocítica; cuando se observaba con más detalle se ponían de manifiesto restos celulares, producto de la acción del neurotóxico; estos hechos estaban de acuerdo con los observados por el grupo de trabajo de Simpson y cols. (1996).

En nuestra Serie B (Grupos B1 y B2) las modificaciones morfológicas que encontramos son muy similares a las descritas para los diferentes grupos de la serie A; de forma resumida: necrosis granular, hiperplasia e hipertrofia de los astrocitos y de la glía de Bergmann y consiguiente desestructuración de las laminillas cerebelosas; en el caso del Grupo B1 se administró el AL2CLP durante 6 días y se le retiró posteriormente hasta alcanzar los 20 días totales de evolución: por otro lado, en el Grupo B2, tal como se describió en el apartado de Resultados, el neurotóxico fue administrado a los animales de experimentación disuelto en el agua de bebida durante 21 días y se les dejó evolucionar 100 días más.

González-Burgos y Alejandro-Gómez en su trabajo publicado en 2005 encuentran que tras la intoxicación con etanol de ratas en fase pregestacional, la descendencia, a los 21 días

del nacimiento, mostraba la capa granular cerebelosa engrosada; sus elementos celulares más destacados, los granos, presentaban dendritas más largas que aquellos correspondientes a su grupo control (administración de agua), cuando utilizaban una modificación original y propia del método de Golgi, aunque el número de dendritas permanecía constante en todos los grupos.

Por otro lado, estos mismos autores encuentran modificaciones evidentes en las células gliales de Von Bergmann; dichas alteraciones venían representadas por signos de inmadurez, tales como un menor número de engrosamientos en sus procesos astrocitarios; estos hechos no concuerdan con nuestros hallazgos ya que en nuestras series no existían modificaciones estructurales.

Cabe destacar que en 2 de nuestros grupos observamos fenómenos de calcificación distrófica; en el grupo A3 (17 días de evolución tras el tratamiento con el neurotóxico) este hecho se manifestaba de manera ocasional en las áreas lesionadas de la granular y próximas a la sustancia blanca; por el contrario en el grupo B2 estos depósitos eran más marcados aunque su localización y disposición eran muy similares a los del grupo A3.

Se han descrito calcificaciones, inducidas experimentalmente a animales de laboratorio, en lesiones de la médula spinal (Balentine y Spector, 1977) y en la isquemia cerebral (Kato y cols., 1995); asimismo, tras la inyección intracerebral de diferentes excitotoxinas, se han localizado depósitos cálcicos en diversas localizaciones del SNC tales como “substantia nigra” (Nitsch y Scotti, 1992), ganglios basales (Mahy y cols., 1995; Saura y cols. 1995), complejo amigdalóide y núcleos talámicos (Saura y cols. 1995); la patogénesis de las calcificaciones distróficas en el tejido nervioso no está resuelta hasta la fecha, aunque es generalmente aceptado que la necrosis celular o la apoptosis puede ser la base para los depósitos cálcicos (Kim y cols. 1995).

Calcificaciones cerebrales no-ateroscleróticas han sido relacionadas con la gliosis reactiva al incremento intracelular de calcio; así, tras lesión cerebral, se produce un incremento local en el número de células astrocíticas y microgliales; estas últimas aumentan en número desde el primer día a una semana después de la lesión (Acarin y cols. 1999a), mientras que el incremento de astrogliosis ocurre en un período más largo, con un máximo en la primera semana (Acarin y cols. 1999b) y permaneciendo durante varios meses con la consecuente formación de una cicatriz (Dusart y cols., 1991); estas reacciones astrocitarias y microgliales han sido

asociadas con la formación de los depósitos cálcicos (Saura y cols., 1995; Herrmann y cols., 1998)

La administración sistémica de ácido kaínico a ratas adultas provoca, en las primeras horas, un conjunto de síntomas motores (convulsiones límbicas) (Sperk y cols., 1983); este sistema ha sido considerado como modelo de convulsiones límbicas en el ser humano; las lesiones cerebrales observadas en ratas tratadas sistemáticamente con ácido kaínico no son uniformes, aunque en algunas áreas consisten en pérdida neuronal y sustitución por elementos gliales mientras que en otras localizaciones se han descrito necrosis y proliferación vascular (Gayoso y cols. 1994).

El mecanismo de acción por el cual el AL2CP ejerce su toxicidad no es conocido y permanece aún en estudio; inicialmente se piensa que la capacidad del AL2CP para disminuir el ácido láctico y la glucosa en sangre, con el incremento consiguiente de cuerpos cetónicos, puede ser un importante factor en la neurotoxicidad del ácido (Yount y cols., 1982); por otro lado Lock y cols. (1995) han sugerido que los cambios bioquímicos en el metabolismo de la glucosa no están relacionados con la necrosis granular cerebelosa inducida por el AL2CP, aunque los preceden unas 12 horas antes.

Se ha sugerido que el glutatión juega algún papel en la intoxicación granular cerebelosa por el metil mercurio y/o cloruro de metilo (Kornbrust y Bus, 1982; Landry y cols., 1985); en efecto, Wyatt y cols. (1995) encuentran depleción del glutatión en respuesta a la administración del AL2CP, incluso antes de cualquier signo de neurotoxicidad; esta disminución del glutatión, por exposición previa a óxidos de estireno, ha sido demostrada que exacerba la necrosis de las neuronas granulares en la rata, aunque el mecanismo de neurointoxicación permanece incierto (Beiswanger y cols., 1993).

La selectividad del AL2CP por las células granulares de la corteza cerebelosa sugiere un posible papel en la muerte celular mediada por aminoácidos excitatorios; aminoácidos excitatorios, tales como el ácido kaínico y el ácido glutámico, son conocidos que juegan un papel la neurotoxicidad del cerebelo y el hipocampo (Garthwaite y Wilkins, 1982; Garthwaite y Gilligan, 1984; Garthwaite y cols., 1986; Hajos y cols., 1986).

En términos de un posible mecanismo de acción del AL2CP, Widdowson y cols. (1995a) han demostrado una reducción significativa de las concentraciones de glutamato y aspartato y una reducción en los receptores NMDA y kainato del

cerebelo; además, el AL2CP es conocido que actúa como un agonista de los receptores NMDA de la corteza cerebelosa Widdowson y cols. (1995b).

Existe escasa evidencia de una respuesta inflamatoria al daño producido por el AL2CP, aunque Jones y cols. (1985) observaron ocasionales acúmulos de hematíes y leucocitos y, en fases avanzadas tras la administración del neurotóxico, leucocitos polimorfonucleares distribuidos de forma dispersa en la capa granular necrótica, lo que sugiere una permeabilidad alterada de la barrera Sangre-SNC. Jiang cols. (1985) describieron una moderada/severa distensión citoplásmica de los astrocitos adyacentes a las células de Purkinje (Glía de Von Bergmann), como consecuencia de la exposición de ratas al cloruro de metilo.

El edema pericelular alrededor de las neuronas de Purkinje asociado con la intoxicación por AL2CP es debido al exudado inflamatorio de los astrocitos adyacentes (Jones y cols., 1995) y la vacuolización, presente en las áreas profundas de la capa granular necrótica, es parcialmente debida a la acumulación de líquidos por los astrocitos, una forma de edema intracelular.

6. CONCLUSIONES

1.- El neurotóxico Ácido L-2-Cloropropiónico, administrado disuelto al 2% en el agua de bebida, se ha demostrado como un agente válido para el modelo experimental diseñado; por lo tanto creemos que es adecuado para el estudio de la respuesta celular en el Sistema Nervioso Central, concretamente de las neuronas granulares cerebelosas.

2.- Durante las diversas fases del estudio, los animales de experimentación no mostraron signos de alteraciones cerebelosas, tales como ataxia, modificaciones de la marcha, pérdida de equilibrio, etc.; creemos que este hecho está relacionado con pérdidas parciales de la estructura de las laminillas cerebelosas, las cuales serían compensadas con otras en las cuales la acción del neurotóxico no hubiera sido tan lesiva.

3.- La respuesta que se obtenía, por parte de las neuronas granulares cerebelosas, era siempre la misma, a partir de 7 días de evolución (retracción citoplásmica y nuclear e hipercromatismo y posterior necrosis), independientemente de los grupos tratados.

4.- La acción del Ácido L-2-Cloropropiónico provocó, secundariamente, alteraciones en las neuronas de Purkinje, tales como edema pericelular y picnosis nuclear; creemos que estos cambios degenerativos son una respuesta frente a

condiciones ambientales locales adversas, similares a las que se producen en la hipoxia.

5.- No solamente hubo una respuesta degenerativa en la corteza cerebelosa, sino también otra proliferativa (puesta de manifiesto mediante la técnica inmunohistoquímica del PCNA, antígeno nuclear de células en proliferación).

6.- La respuesta proliferativa celular que se estableció tras la administración del Ácido L-2-Cloropropiónico vino representada, en su mayor parte, por elementos de la estirpe glial, mayoritariamente astrocitos, y en menor medida por células de la microglía.

7.- La proliferación glial era fundamentalmente de naturaleza astrocitaria, y fue puesta de manifiesta mediante la técnica inmunohistoquímica de la Proteína Ácida Gliofibrilar; dicha proliferación ocupaba las áreas necróticas granulares, constituyendo una característica cicatriz.

8.- Un tipo especial de astrocito, la glia de Von Bergmann, sufrió hiperplasia e hipertrofia en todos los grupos con días de evolución igual o superior a 7, destacándose claramente en vecindad a las neuronas de Purkinje.

9.- En las áreas necróticas se dispusieron elementos celulares de la estirpe microglial, marcados con la técnica inmunohistoquímica del CD68 y en menor proporción que la astrogliá; dichas células presentaban en sus citoplasmas restos fagocitados de los granos necróticos y se disponían, ocasionalmente, en vecindad a estructuras vasculares.

10.- En fases avanzadas de la evolución de los animales de experimentación (Grupos A3 y B2) se producían focos de calcificación distrófica; opinamos que en la génesis de estas calcificaciones participan, como sustrato las neuronas granulares y de Purkinje, con la participación activa de los elementos celulares astrogliales y microgliales proliferantes.

11.- Las diferencias en la intensidad de los hallazgos histológicos encontrados por nosotros en nuestro trabajo y los de otros autores pensamos que se deben al hecho fundamental de la vía de administración del neurotóxico; en nuestro caso disuelto en el agua de bebida y en los de otros investigadores, dosificado oralmente mediante sonda.

7. BIBLIOGRAFÍA.

Williams PL, Warwick R: El Cerebelo. En Gray Anatomía, 36^a Edición. Tomo II. Barcelona. Salvat Editores. 1985. p.1003-1028.

Ghez C, Thach WT: The Cerebellum. En Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, eds. Principles of Neural Science. New York. Elsevier, 2000. p.832-854.

Díaz-Flores Feo L: Neurohistología. Vol. I. Lecciones básicas. Granada. Talleres Arte. 1977. p.253-303.

Burgoyne RD, Cambray-Deakin, MA: The cellular neurobiology of neuronal development: the cerebellar granule cell. Brain Res. 1988, 477:77-101.

Benjamin S, Cambray-Deakin MA, Burgoyne RD: Effect of hypothyroidism on the expression of three microtubule-associated proteins (1A, 1B and 2) in developing rat cerebellum. Neuroscience, 1988, 27: 931-939.

Zhang L, Goldman JE: Generation of cerebellar interneurons from dividing progenitors in white matter. Neuron, 1996, 16: 47-54.

Fonnum F, Storm-Mathiesen J, Walberg F: Glutamate decarboxylase in inhibitory neurons. A study of the enzyme in Purkinje cell axons and boutons in the cat. *Brain Res.*, 1970, 20: 259-275.

Ottersen OP: Neurotransmitters in the cerebellum. *Rev. Neurol (Paris)*, 1993, 149: 629-636.

Wilkin GP, Hudson AL, Hill DR, Bowery NG: Autoradiographic localization of GABAB receptors in rat cerebellum. *Nature*, 1981, 294: 584-587.

Delgado-García JM: Estructura y función del cerebelo. *Rev. Neurol.*, 2001, 33: 635-642.

Mugnaini E, Floris A: The unipolar brush cell: a neglected neuron of the mammalian cerebellar cortex. *J. Comp. Neurol.* 1994, 339: 174-180.

Mugnaini E, Diño M, Jaarsma D: The unipolar brush cells of the mammalian cerebellum and cochlear nucleus: cytology and microcircuitry. En De Zeeuw CI, Strata P, Voogd J, eds. *The Cerebellum: From structure to control*. Amsterdam: Elsevier; 1997.p.131-150.

Álvarez-Vicente MI, Llorens-Martín M, Lacruz-Pelea C, Toledano-Gasca A: Nueva células “en cepillo” (brush cell) o célula monopolar del cerebelo. Características y posible función. Rev. Neurol. 2004, 38: 339-346.

Akazawa C, Shigemoto R, Bessho Y, Nakanishi S, Mizuno N: Differential expression of five N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNA in the cerebellum of developing and adult rats. J. Comp. Neurol., 1994, 347: 150-160.

Watanabe M, Mishina M, Inoue Y: Distinct spatiotemporal expressions of five NMDA receptor channel subunit mRNAs in the cerebellum. J. Comp. Neurol., 1994, 343: 513-519.

Ugawa Y: Basic mechanism of magnetic human cerebellar stimulation and its clinical application. Rinsho Shinkeigaku 2009, Oct 49(10);621-8.

Brodal A: Anatomical studies of cerebellar fibre connections with special reference to problems of functional localization. Prog. Brain. Res., 1987;25 135-73.

Hahn R: galvanic vestibular threshold after flocculonodular lesion of the cerebellum in normal and labyrinthectomized animals. Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 1950 Jun;26(6) 934-5.

Helling K, Westhofen M: Experimental studies of motion sickness on board of a research ship. HNO., 1994, Apr;42(4): 214-9.

Rodríguez-García PL, Rodríguez-Pupo L, Rodríguez-García D: Clinical techniques for use in neurological physical examinations. Motor and reflex functions. Rev. Neurol., 2004 Nov 1-15;39 (9)848-59.

Stoodley CJ, Schmahmann JD: Evidence for topographic organization in the cerebellum of motor control versus cognitive and affective processing. Cortex, 2010, Jan 11.

Seidler RD: Neural correlates of motor learning, transfer of learning, and learning to learn. Exerc. Sport Sci. Rev., 2010, Jan;38 (1): 3-9.

Bota DA, Dafer RM: Acute methotrexate neurotoxicity with choreiform movements and focal neurological deficit: a case report. South Med J., 2009, Oct;102(10): 1071-4.

Klockgether T: Sporadic ataxia with adult onset: classification and diagnostic criteria. *Lancet Neurol.* 2010, Jan(9) 94-104.

Darnel RB, Posner JB: Paraneoplastic syndromes affecting the nervous system. *Semin. Oncol.*, 2006; 33: 270.

Ten Donkelaar HJ, Lammens M: Development of the human cerebellum and its disorders. *Clin. Perinatol.*, 2009, Sept 36(3) 513-20.

Teive HA: Spinocerebellar ataxias. *Arq. Neuropsiquiatr.*, 2009, Dec; 67(4): 1133-42.

Santos R, Lefevre S, Sliwa D, Seguin A, Lesuisse E: Friedreich's ataxia: Molecular mechanisms, redox considerations and therapeutic opportunities. *Antioxid. Redox Signal*, 2010, Feb 16.

Morral JA, Davis AN, Quian J, Gelman BB, Koeppen AH: Pathology and pathogenesis of sensory neuropathy in Friedreich's ataxia. *Acta neuropathol.*, 2010, Mar 26.

Ries L, Smith M, Gurney J et al: Cancer incidence and survival among children and adolescents: United States

SEER Program 1975-1995. Bethesda, MD: National Cancer Institute; 1999. Surveillance, Epidemiology and End Results Program publication, 99-4649.

Zhang N, Che J, Bai S, Wu Z, Cui Y, Zou W: Ataxia-telangiectasia mutated gene and breast cancer susceptibility. Sheng Wu Jing Cheng Wue Bao. 2010 Jan;26 (1) 9-15.

Rigby M, le Bouerdelles B, Heavens RP: The messenger RNAs for the the N-methyl-D-aspartate receptor subunits show region-specific expression of different subunit composition in the human brain. Neuroscience, 1996, 73: 429-447.

Chaudhry FA, Lehre KP, van Lookeren Campagne M, Ottersen OP, Danbolt NC, Storm-Mathisen J: Glutamate transporters in glial plasma membranes: highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry. Neuron, 1995, 15: 711-720.

Thach WT, Goodkin HP, Keating JG: The Cerebellum and the adaptative coordination of movement. Ann. Rev. Neurosci. 1992, 15: 403-442.

Hirano A: Neurons and Astrocytes. En : Textbook of Neuropathology. Richard L. Davis y David M. Robertson, Eds. 3ª edición. Williams & Wilkins, Baltimore, 1997.

Holmes, G: The Cerebellum of man. Brain, 1939, 62: 1 – 30.

Lechtenberg L: Signs and symptoms of cerebellar disease. In Lechtenberg, L. ed. Handbook of cerebellar diseases. New York: Marcel Dekker, 1993, p. 31-44.

BriceA: Friedreich ataxia. 2003.
<http://www.orpha.net/data/patho/GB/uk-friedreich.pdf>.

Aurais A: Ataxie télangiectasie (syndrome de Louis Bar). 1998. <http://www.orpha.net/data/patho/FR/louisbar.html>.

Gallo V, Ciotti MT, Coletti A, Aloisi F, Levi G: Selective release of glutamate from cerebellar granule cells differentiating in culture. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1982, 79: 7919-7923.

Viennot F, Artault JC, Tholey G, De Barry J, Gombos G: An improved method for the preparation of rat cerebellar glomeruli. J. Neurosci, Methods, 1991, 38: 51-62.

Matsutani T, Tamaru M, Hayakawa Y, Nagayoshi M, Nakahara T, Tsukada Y: A neurochemical study of developmental impairment of the brain caused by the administration of cytosine arabinoside during the fetal or neonatal period of rats. *Neurochem. Res.*, 1983, 8: 1295-1306.

Chen S, Hillman DE: Regulation of granule cell number by a redetermined number of Purkinje cells in development. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, 1989, 45: 137-147.

Matsumoto A, Higa HH: Studies on methylazoxymethanol, the aglycone of cycasin: methylation of nucleic acids in vitro. *Biochem. J.*, 1966, 98: 20C-22C.

Johnston MV, Coyle JT: Cytotoxic lesions and the development of transmitter systems. *Trends Neurosci.* 1982, 5: 153-156.

Bejar A, Roujansky P, de Barry J, Gombos G: Different effect of methylazoxymethanol on mouse cerebellar development depending on the age of injection. *Exp. Brain Res.* 1985, 57: 279-285.

De Barry J, Gombos G: Immunohistochemistry with anticalbindin and antineurofilament antibodies in the cerebellum of methylazoxymethanol- treated mice. *J. Neurosci.* 1989, 23: 330-336.

Lafarga M, Lergo A, Andrés MA, Polanco JI, Calle E, Berciano MT: Apoptosis induced by methylazoxymethanol in developing rat cerebellum: Organization of the cell nucleus and its relationship with DNA and rRNA. *Cell Tissue Res.* 1997, 289: 25-38.

Lafarga M, Andrés MA, Calle E, Berciano MT: Reactive gliosis of immature Bergmann glia and microglial cell activation in response to cell death of granule cell precursors induced by methylazoxymethanol treatment rat cerebellum. *Anat. Embryol.* 1998, 198: 111-122.

Fonnum F, Lock EA: Cerebellum as a target for toxic substances. *Toxicol. Letters*, 2000, 112-113: 9-16.

Altman J, Anderson WJ: Experimental reorganization of the cerebellar cortex. 1. Morphological effects of elimination of all microneurons with prolonged X-irradiation started at birth. *J. Comp. Neurol.*, 1972, 146: 355-406.

Hillman DE, Chen S: Vulnerability of cerebellar development in malnutrition. I. Quantitation of layer volume and neuron numbers. *Neuroscience*, 1981, 6: 1249-1262.

de Barry J, Gombos G, Klupp T, Hamori J: Alteration of mouse cerebellar circuits following methylazoxymethanol treatment during development: immunohistochemistry of GABAergic elements and electron microscopic study. *J. Comp. Neurol.*, 1987, 261: 253-265.

García-Ladona FJ, de Barry J, Girard C, Gombos G: Ectopic granule cell layer in mouse cerebellum after methylazoxymethanol (MAM) treatment. *Exp. Brain Res.*, 1991, 86: 90-96.

Chellman GJ, White RD, Norton RM, Bus JS: Inhibition of the acute toxicity of methyl chloride in male B6C3F1 mice in glutathione depletion. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1986, 86: 93-104.

Eustis SL, Haber SB, Drew RT, Yang RS: Toxicology and pathology of methyl bromide in F344 rats and B6C3F1 mice following repeated inhalation exposure. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 1988, 11: 594-610.

Herndon RM: Thiophene induced granule cell necrosis in the rat cerebellum. An electron microscopic study. *Exp. Brain Res.*, 1968, 6: 49-68.

Simpson MG, Wyatt L, Jones HB, Gyte AJ, Widdowson PS, Lock EA: Neuropathological changes in rat brain following oral administration of 2-chloropropionic acid. *Neurotoxicology*, 1996, 17: 471-480.

Bolt HM, Gansewendt B: Mechanisms of carcinogenicity of methyl halides. *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, 1993, 23: 237-252.

Thomas DA, Morgan KT: Olfactory toxicity: studies of methyl bromide. *CIIT Activ.*, 1988, 8: 1-7.

Chamberlain MP, Lock, EA, Gaskell BA, Reed CJ: The role of glutathione S-transferase and cytochrome P-450-dependeant metabolism in the olfactory toxicity of methyl iodide in the rat. *Arch. Toxicol.*, 1998, 72: 420-428.

Ohmori H, Ogura H, Yasuda M, Nakamura S, Hatta T, Kawano K, Michikawa T, Yamashita K, Mikoshiba K:

Developmental neurotoxicity of phenytoin on granule cells and Purkinje cells in Mouse cerebellum. *J. Neurochem.*, 1999, 72: 1497-1506.

Tauer U, Knoth R, Volk B: Phenytoin alters Purkinje cell axon morphology and targeting in vitro. *Acta Neuropathol.*, 1998, 95: 583-591.

Shiraki H: Neuropathological aspects of organic mercury intoxication including Minimata disease. En: Venken PJ, Bruyn GW (Eds.), *Handbook of Clinical Neurology*. Amsterdam, 1979, 36: 83-145 .

Mokrzan EM, Kerper LE, Ballatori N, Clarkson TW: Methylmercury-thiol uptake into cultured brain capillary endothelial cells on amino acid system. *L. J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 1995, 272: 2177-2184.

Moller-Madsen B, Danscher G: Localization of mercury in CNS of the rat. I. Mercuric chloride (HgCl₂) per os. *Environ. Res.* 1986, 4: 29-43.

Sarafian T, Veriry MA: Oxidative mechanisms underlying methyl mercury neurotoxicity. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 1991, 9: 147-153.

Sarafian T, Vartavarian L, Kane DJ, Bredesen DE, Verity MA: Bcl-2 expression decreases methyl mercury-induced free-radical generation and cell killing in a neural cell line. *Toxicol. Lett.*, 1994, 74: 149-155.

Cavanagh JB, Gysbers MF: Ultrastructural features of the Purkinje cell damage caused by acrylamide in the rat: a new phenomenon in cellular neuropathology. *J. Neurocytol.*, 1983, 12: 413-437.

Overgaard-Larsen J, Tandrup T, Braendegaard H: The volume of Purkinje cells decreases in the cerebellum of acrylamide-intoxicated rats, but no cells are lost. *Acta Neuropathol.*, 1994, 88: 307-312.

Harper CG, Kril JJ: Neuropathology of the alcoholism. *Alcohol Alcohol.*, 1990, 25: 207-216.

Victor M, Adams RD, Mancall EL: A restricted form of cerebellar cortical degeneration occurring in alcoholic patients. Arch. Neurol. 1959, 71: 579-688.

Torvik A, Lindboe CF, Rodge S: Brain lesions in alcoholics. A neuropathological study with clinical correlations. J. Neurol. Sci. 1982, 56: 233-248.

Harper C: The incidence of Wernicke's encephalopathy in Australia. A neuropathological study of 131 cases. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, 1983, 46: 593-598.

Martínez A, Rábano A: Efectos del alcohol etílico sobre el sistema nervioso. Rev. Esp. Patol., 2002, 35: 63-76.

Torvik A, Torp S: The prevalence of alcoholic cerebellar atrophy. A morphometric and histological study of autopsy material. J. Neurol. Sci. 1986, 75: 43-51.

Phillips SC, Harper CG, Kril, JJ: A quantitative histological study of the cerebellar vermis in alcoholic patients. Brain, 1987, 110: 301-314.

Phillips SC, Harper CG, Kril, JJ: The contribution of Wernicke's encephalopathy to alcohol-related cerebellar damage. *Drug Alcohol Rev.* 1990, 9: 53-60.

Ferrer I, Fábregues I, Pineda M, Gracia I, Ribalta T: A Golgi study of cerebellar atrophy in human chronic alcoholism. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 1984, 10: 245-253.

Bonthius DJ, Bonthius NE, Napper RM, Astley SJ, Clarren SK, West JR: Purkinje cell deficits in non-human primates following weekly exposure to ethanol during gestation. *Teratology*, 1996, 53: 230-236.

Thomas JD, Goodlett CR, West JR: Alcohol-induced Purkinje cell loss depends on developmental timing of alcohol exposure and correlates with motor performance. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, 1998, 105: 159-166.

Wenisch S, Fortmann B, Steinmetz T, Kriete A, Leiser R, Bitsch I: 3-D confocal laser scanning microscopy used in morphometric analysis of rat Purkinje cell dendritic spines after chronic ethanol consumption. *Anat. Histol. Embryol.*, 1998, 27: 393-397.

Sakata-Haga H, Sawada K, Hisano S, Fukui Y: Abnormalities of cerebellar foliation in rats prenatally exposed to ethanol. *Acta Neuropathol.(Berlin)*, 2001, 102: 36-40.

O'Hearn E, Molliver ME: The olivocerebellar projection mediates ibogaine-induced degeneration of Purkinje cells: a model of indirect, trans-synaptic excitotoxicity. *J. Neurosci.*, 1997, 17: 8828-8841.

Fonnum F: Excitotoxicity in the brain. *Arch. Toxicol. Suppl.*, 1998, 20: 387-395.

Ahdab-Barmada M, Moossy J: The neuropathology of kernicterus in the premature neonate: diagnostic problems. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1984, 43: 45-56.

Yamamura H, Takagishi Y: Cerebellar hypoplasia in the hyperbilirubinemic Gunn rat: morphological aspects. *Nagoya J. Med. Sci.*, 1993, 55: 11-21.

Conlee JW, Shapiro SM: Development of cerebellar hypoplasia in jaundiced Gunn rats: a quantitative light microscopic analysis. *Acta Neuropathol.*, 1997, 93: 450-460.

McDonald JW, Shapiro SM, Silverstein FS, Johnston MV: Role of glutamate receptor-mediated excitotoxicity in bilirubin-induced brain injury in the Gunn rat model. *Exp. Neurol.*, 1998, 150: 21-29.

Keino H, Kashiwamata S: Critical period of bilirubin-induced hypoplasia in a new Sprague-Dawley strain of jaundiced Gunn rats. *Neurosci. Res.*, 1989, 6: 209-215.

Amit Y, Chan G, Fedunec S, Poznansky MJ, Schiff D: Bilirubin toxicity in a neuroblastoma cell line N-115: I. Effects on Na⁺ K⁺ ATPase (3H)-thymidine uptake, L-(35S)-methionine incorporation and mitochondrial function. *Pediatr. Res.*, 1989, 25: 364-368.

Widenfalk J, Lundströmer K, Jubran M, Brené S, Olson L: Neurotrophic factors and receptors in the immature and adult spinal cord after mechanical injury or kainic acid. *J. Neurosci.*, 2001, 21: 3457-3475.

Shero M, Salvi RJ, Chen L, Hashino E: Excitotoxic effect of kainic acid on chicken cochlear afferent neurons. *Neurosci. Lett.* 1998, 257: 81-84.

Kitamura Y, Ota T, Matsuoka Y, Okazaki M, Kakimura J, Tooyama I, Kimura H, Shimohama S, Gebicke-Haerter PJ,

Nomura Y, Taniguchi T: Kainic acid-induced neuronal loss glial changes in the hippocampal CA3 of p53-deficient mouse. *Neurosci. Lett.* 1998, 255: 57-60.

Csernansky JG, Csernansky CA, Kogleman L, Montgomery EM, Bardgett ME: Progressive neurodegeneration after intracerebrovascular kainic acid administration in rats: implications for schizophrenia ? *Biol. Psychiatry*, 1998, 44: 1143-1150.

Gayoso MJ, Al-Majdalawi A, Garrosa M, Calvo B, Díaz-Flores L: Selective calcification of rat brain lesions caused by systemic administration of kainic acid. *Histol. Histopath.* 2003, 18: 855-869.

Sparapani M, Buoamici L, Ciani E, Battelli MG, Ceccarelli G, Stirpe F, Contestabile A: Toxicity of ricin and volkensin, two ribosome-inactivating proteins, to microglia, astrocyte, and neuron cultures. *Glia*, 1997, 20: 203-209.

Cevolani D, Bentivoglio M, Strocchi P: Glial reaction to volkensin-induced selective degeneration of central neurons. *Brain Res. Bull.* 2001, 54: 353-361.

Gladson CL, Dennis C, Rotolo TC, Kelly DR, Grammer JR: Vitronectin expression in differentiating neuroblastic tumors: integrin alpha v beta mediates vitronectin-dependent adhesion of retinoic acid-differentiated neuroblastoma cells. *Am. J. Pathol.* 1997, 150: 1631-1645.

Grabham PW, Gallimore PH, Grand RJA: Vitronectin is the major serum protein essential for NGF-mediated neurite outgrowth from PC12 cells. *Exp. Cell Res.* 1992, 202: 337-344.

Milis M, Morris CA, Sheehan MC, Charlesworth JA, Pussell PA: Vitronectin-mediated inhibition of complement evidence for different binding sites for C5b-7 and C9. *Clin. Exp. Immunol.* 1993, 92: 114-119.

Preissner KT, Jenne D: Structure of vitronectin and its biological role in haemostasis. *Thromb. Haemostasis*, 1991, 66: 123-132.

Sheehan M, Morris CA, Pussell BA, Charlesworth JA: Complement inhibition by human vitronectin involves non-heparin binding domains. *Clin. Exp. Immunol.* 1995, 101: 136-141.

Bariety J, Hinglais N, Bhakdi S, Mandel C, Rouchon M, Kazatchkine M: Immunohistochemical study of complement S protein (vitronectin) in normal and diseased human kidney: relationship to neoantigens of the C5b-9 complex. *Clin. Exp. Immunol.* 1989, 75: 76-81.

McGeer PL, Kawamata T, Walker DG: Distribution of clusterin in Alzheimer brain tissue. *Brain Res.* 1992, 579: 337-341.

Akiyama H, Kawamata T, Dedhar S, McGeer PL: Immunohistochemical localization of vitronectin, its receptor and beta-3 integrin in Alzheimer brain tissue. *J. Neuroimmunol.* 1991, 32: 19-28.

Seiffert D, Crain K, Wagner NV, Loskutoff DJ: Vitronectin gene expression in vivo: evidence for extrahepatic synthesis and acute phase regulation. *J. Biol. Chem.* 1994, 269: 19836-19842.

Gasque P, Thomas A, Fontaine M, Morgan BP: Complement activation on human neuroblastoma cell lines in vitro: route of activation and expression of functional complement regulatory proteins. *J. Neuroimmunol.* 1996, 66: 29-40.

Gladson CL, Hancock S, Arnaold MM, Fave-Petersen OM, Castleberry RP, Kelly DR: Stage-specific expression of integrin alpha V beta3 in neuroblastic tumors. *Am. J. Pathol.*, 1996, 148: 1423-1434.

Walker DG, McGeer PL: Vitronectin expression in Purkinje cells in the human cerebellum. *Neurosci. Lett.* 1998, 251: 109-112.

Suárez I, Bodega G, Ramos JA, Fernández-Ruiz JJ, Fernández B: Neuronal and astroglial response to pre- and perinatal exposure to delta-9-tetra-hydrocannabinol in the rat substantia nigra. *Dev. Neurosci.*, 2000, 22: 253-263.

Mehl A, Schanke TM, Johnsen BA, Fonnum F: The effect of trichlorfon and other organophosphates on prenatal brain development in the Guinea Pig. *Neurochem. Res.*, 1994, 5: 569-574.

Hjelde T, Mehl A, Schanke TM, Fonnum F: Teratogenic effects of trichlorfon (metrifonate) on the Guinea Pig brain, Determination of the effective dose and the sensitive period. *Neurochem. Int.*, 1998, 32: 469-477.

Badawi AF: O⁶-methylguanine and O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase activity in tissues of BDF-1 mice treated with antiparasitic drugs. *Toxicol. Lett.*, 1998, 94: 199-208.

Mehl A, Rolseth V, Gordon S, Bjoraas M, Seeberg E, Fonnum F: Brain hypoplasia caused by exposure to trichlorfon and dichlorvos during development can be ascribed to DNA alkylation damage and inhibition of DNA alkyltransferase repair. *Neurotoxicology*, 2000, 21: 165-173.

Jones HB, Wyatt I, Simpson M, Lock EA: Ultrastructural alterations in the cerebellum of rats following L-2-chloropropionic acid administration. *Hum. Exp. Toxicol.*, 1995, 14: 367.

Jones HB, Jenkins CR, Simpson M, Lock EA: Ultrastructural pathology and cytochemical investigations of L-2-chloropropionic acid-induced neurointoxication of the rat cerebellum. *Acta Neuropathol. (Berlin)*, 1997, 93: 241-251.

Lock EA, Gyte A, Widdowson PS, Simpson M, Wyatt I: Chloropropionic acid-induced alterations in glucose metabolism status: possible relevance to cerebellar granule cell necrosis. *Arch. Toxicol.*, 1995, 69: 640-643.

Lock EA, Gyte A, Duffell SJ, Simpson M, Wyatt I: Neuroprotection afforded by MK-801 against L-2-chloropropionic acid-induced cerebellar granule cell necrosis in the rat. *Toxicology*, 1997, 123: 41-51.

Williams RE, Jones P, Lock EA, Bachelard HS: Biochemical and neurotoxicological effects of L-2-chloropropionic acid on rodent brain. *J. Neurochem.*, 1999, 73: 362-371.

Williams RE, Lock EA, Bachelard HS: Neuroprotective effects of MK-801 on L-2-chloropropionic acid-induced neurotoxicity. *J. Neurochem.*, 2001a, 76: 1057-1065.

Williams RE, Prior M, Bachelard HS, Waterton JC, Checkley D, Lock EA: MRI studies of the neurotoxic effects of L-2-chloropropionic acid on rat brain. *Mag. Reson. Imaging*, 2001b, 19: 133-142.

Simpson MG, Wyatt I, Gyte A, Widdowson PS, Mistry P, Brown E, Pringle JH, Lock EA: Chloropropionic acid induces early necrosis of granule cells in the rat cerebellum. *Hum. Exp. Toxicol.*, 1996a, 14: 368.

Simpson MG, Wyatt I, Jones HB, Gyte A, Widdowson PS, Lock EA: Neuropathological changes in rat following oral

administration of L-2-chloropropionic acid. *Neurotoxicology*, 1996b, 17: 471-480.

Widdowson PS, Wyatt I, Gyte A, Simpson MG, Lock EA: L-2-chloropropionic acid-induced neurotoxicity is prevented by MK-801: possible role of NMDA receptors in the neuropathology. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1996, 136: 138-145.

Wyatt I, Gyte A, Simpson MG, Widdowson PS, Lock EA: The role of glutathione in L-2-chloropropionic acid-induced cerebellar granule cell necrosis in the rat. *Arch. Toxicol.*, 1996, 70: 724-735.

Widdowson PS, Gyte A, Upton R, Foster JR, Coutts CT, Wyatt I: Calpain activation and not oxidative damage mediated L-2-chloropropionic acid-induced cerebellar granule cell necrosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1997, 142: 248-255.

Sturgess NC, Rustad A, Fonnum F, Lock EA: Neurotoxic effect of L-2-chloropropionic acid on primary cultures of rat cerebellar granule cells. *Arch. Toxicol.*, 2000, 74: 153-160.

Racelwicz TA, Persaud TV: Effects of prenatal exposure to low dose ionizing radiation on the development of the

cerebellar cortex in the rat. *Histol. Histopathol.*, 1995, 10: 371-383.

Puro DG, Woodward DJ: Physiological properties of afferents and synaptic reorganization in the rat cerebellum degranulated by postnatal X-irradiation. *J. Neurobiol.*, 1978, 9: 195-215.

Bruni JE, Persaud TV, Huang W, Froese G: Postnatal development of the rat CNS following in utero exposure to a low dose of ionizing radiation. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 1993, 45: 223-231.

Duffell S, Lock EA: Re-evaluation of archival material for neuronal cell injury produced by L-2-chloropropionic acid in the rat brain. *Neurotoxicology*, 2004, 25: 1031-1040.

De Vera N, Camón Ll, Martínez E: Putrescine as a marker of effects of 2-chloropropionic acid in the rat brain. *Neuroscience Letters*, 2004, 362: 209-212.

Svendsen K, Syversen T, Melo I, Hilt B: Historical exposure to mercury among Norwegian dental personnel.

Scand J Work Environ Health. 2010 May; 36 (3): 231-41.
Epub 2009 Dec 1.

Jones HB, Wyatt I, Simpson MG, Jenkins CR, Bowdler AI, Lock EA: Ultrastructural alterations in the cerebellum of rats following L-2-chloropropionic acid administration . Human and Exp Toxicol 1995; 14:367.

Lock EA, Gyte AJ, Widdowson PS, Simpson MG, Wyatt I: Chloropropionic acid-induced alterations in glucose metabolic status: Possible relevance to cerebellar granule cell necrosis. Arch Toxicol 1995; 69:640-643.

Widdowson PS, Wyatt I, Lock EA: Interaction of L-2-chloropropionic acid at N-methyl-D-aspartate receptors in rat brain. Human and Exp Toxicol 1995a 14:370

Wyatt I, Gyte AJ, Widdowson PS, Lock EA. The effect of L-2-chloropropionic acid on glutathione concentration in the rat. Human and Exp Toxicol 1995; 14:368.

Chang LW: Neurotoxic effects of mercury: A review. Environ Res 1977; 14: 329-379.

Reuhl KR, Chang LW: Effects of methylmercury on the development of the nervous system: A review. *Neurotoxicology* 1979; 1:21-55.

Magos L, Brown AW, Sparrow S, Bailey E, Snowden RT, Skipp WR: The comparative toxicology of ethyl and methylmercury. *Arch Toxicol* 1985; 57: 260-267.

Jiang XZ, White R, Morgan KT: An ultrastructural study of lesions induced in the cerebellum of mice by inhalation exposure to methyl chloride. *Neurotoxicology* 1985; 6: 93-104.

Balentine JD and Spector M: Calcification of axons in experimental spinal cord trauma. *Ann. Neurol* 1977. 2: 520-523

Kato H, Araki T, Itoyama Y and Kogure K. Calcium deposits in the thalamus following repeated cerebral ischemia and long-term survival in the gerbil. *Brain Res. Bull.* 1995. 38: 25-30.

Nitsch C and Scotti AL: Ibotenic acid-induced calcium deposits in rat substantia nigra. Ultrastructure of their time-dependent formation. *Acta Neuropathol.* 1992. 85: 55-70.

Mahy N, Bendahan G, Boatell M L, Bjelke B, Tinner B, Olson L and Fuxe K: Differential brain area vulnerability to long-term subcortical excitotoxic lesions. *Neuroscience* 1995. 65: 15-25.

Saura J, Boatell ML, Bendahan G and Mahy N: Calcium deposit formation and glial reaction in rat brain after ibotenic acid-induced basal forebrain lesion. *Eur. J. Neurosci.* 1995. 7: 1569-1578.

Stewart GR, Olney JW, Schmidt RE and Wozniak DF: Mineralization of the globus pallidus following excitotoxic lesions of the basal forebrain. *Brain Res* 1995. 695: 81-87.

Kim KM. Apoptosis and calcification. *Scann Microsc* 1995. 9: 1137-75; discussion 1175-1178.

Acarin L, Gonzalez B, Castro AJ and Castellano B: Primary cortical glial reaction versus secondary thalamic glial response in the excitotoxically injured young brain:

microglial/macrophage response and major histocompatibility complex class I and II expression. *Neuroscience* 1999a. 89: 549-565.

Acarin L, González B, Hidalgo J, Castro AJ and Castellano B: Primary cortical glial reaction versus secondary thalamic glial response in the excitotoxically injured young brain: astroglial response and metallothionein expression. *Neuroscience* 1999a. 92: 827-839.

Dusart I., Marty S. and Peschanski M: Glial changes following an excitotoxic lesion in the CNS--II. Astrocytes. *Neuroscience* 1991. 45: 541-549.

Herrmann G, Stunitz H and Nitsch C: Composition of ibotenic acid-induced calcifications in rat substantia nigra. *Brain Res.* 1998. 786: 205-214.

Sperk G, Lassmann H, Baran H, Kish SJ, Seitelberger F and Hornykiewicz O: Kainic acid induced seizures: neurochemical and histopathological changes. *Neuroscience* 1983. 10: 1301-1315.

Gayoso MJ, Primo C, Al-Majdalawi A, Fernández JM, Garrosa M and Iñiguez C: Brain lesions and water-maze

learning deficits after systemic administration of kainic acid to adult rats. *Brain Res* 1994. 653: 92-100.

Landry TD, Quast JF, Gushow TS, Mattsson JL: Neurotoxicity of methyl chloride in continuously versus intermittently exposed female C57BL/6mice. *Fund Appl Toxicol* 1985. 5: 87-98.

Eustis SL, Haber SB, Drew RT, Yang RSH: Toxicology and pathology of methyl bromide in F344 rats and B6C3F1 mice following repeated inhalation exposure. *Fund Appl Toxicol* 1988. 11: 594-610.

Yount EA, Felton SY, O' Connor BL, Peterson RG, Powell RS, Yum D, Harris RA: Comparison of the metabolic and toxic effects of chloroperopionate and dichloroacetate. *J Pharmacol Exp Ther* 1982. 222: 501-508.

Kornbrust DL, Bus JS: The role of glutathione and cytochrome P-450 in the metabolism of methyl chloride. *Toxicol Appl Pharm* 1982. 67:246-256.

Bieswanger CM, Mandella RD, Graessle TR, Reuhl K, Lowndes HE: Synergistic neurotoxic effects of styrene oxide

and acrylamide; Glutathione-independent necrosis of cerebellar granule cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 1993. 118: 233-244.

Garthwaite J, Wilkins GP: Kainic acid receptors and neurotoxicity in adult and immature rat cerebellar slices. *Neuroscience* 1982. 7: 2499-2514.

Garthwaite J, Gilligan GP: Sinate-glutamate interactions in rat cerebellar slices. *Neuroscience* 1984. 11: 125-138.

Garthwaite G, Hajos F, Garthwaite J: Ionic requirements for neurotoxic effects of excitatory amino acid analogues in rat cerebellar slices. *Neuroscience* 1986. 18: 437-447.

Hajos F, Garthwaite G, Garthwaite J: Reversible and irreversible neuronal damage caused by excitatory amino acid analogues in rat cerebellar slices. *Neuroscience* 1986. 18: 417-436.

Widdowson PS, Gyte AJ, Simpson MG, Wyatt I, Lock EA: Neurochemical changes in rat brain following L-2-chloropropionic acid-induced damage to cerebellar granule cells. *Human and Exp Toxicol* 1995b. 14: 369.