

ACCIÓN NEUROTÓXICA DEL N-HEXANO Y 2,5-HEXANODIONA EN GALLINAS JÓVENES

Neurotoxicity of N-hexane and 2,5-hexanodione in young chickens

Cárceles, C.; Sanjuán, M. A.; Escudero, E.; López, M. C.

Dpto. Ciencias Sociosanitarias. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. Campus de Espinardo

Recibido: 15 Octubre 1992

Aceptado: 26 Enero 1993

RESUMEN

Se ha estudiado la toxicidad inducida por los solventes hexacarbonados a nivel del sistema nervioso periférico (nervios ciático, tibial y peroneo) en gallinas de 1 mes de edad mediante la administración intraperitoneal de n-hexano y 2,5-HD durante 3 meses (5 días/semana).

La administración de 200 mg/Kg de 2,5-HD causó un síndrome neurotóxico caracterizado por ataxia de las extremidades inferiores, que progresó hasta parálisis. La dosis de 100 mg/Kg de 2,5-HD, provocó una sintomatología de alteración motora leve y poco clara. La administración de n-hexano a la dosis de 200 mg/Kg no causó síntoma alguno. La dosis de 200 mg/Kg de 2,5-HD causó, en las fibras nerviosas, la presencia de tumefacciones axonales a nivel paranodal, afectándose preferentemente las fibras mielinizadas de mayor tamaño. Con el curso de la intoxicación fueron predominando las lesiones correspondientes a una degeneración walleriana y se acentuó la gravedad de los signos clínicos.

Las dosis de 100 mg/Kg de 2,5-HD y de 200 mg/Kg de n-hexano, ocasionaron con mayor frecuencia tumefacciones axonales, no apreciándose una gran diferencia en la severidad de las lesiones en ambos grupos.

El nervio más afectado, en frecuencia y severidad, fue el tibial, seguido por el peroneo y el ciático. La distribución de las lesiones sugiere que ascendieron en sentido retrógrado a lo largo de los troncos nerviosos.

Palabras clave: N-hexano, 2,5-hexanodiona, neurotoxicidad, gallina.

ABSTRACT

The toxicity induce by hexacarbonated solvents in peripheral nervous system (ciatic, tibial and peroneus nerves) in young chickens one month old, produced by i.p. administration of n-hexane and 2,5-hexanedione during 3 months (5 days/week) has been studied.

The 200 mg/Kg of 2,5-HD administration caused a neurotoxic syndrome charactericed by leg ataxia which progressed to paralysis. The dose of 100 mg/Kg of this compound caused slight symptoms and the dose of 200 mg/Kg of n-hexane failed to produce any signs.

The dose of 200 mg/Kg of 2,5-HD showed, in nervous fibers, axonal paranodal swellings, and the bigger myelinic ones were preferably affected. Progressing the intoxication period prevailed wallerian degeneration lesions and the severity of clinic signs became more noticeable.

Doses of 100 mg/Kg of 2,5-HD and 200 mg/Kg of n-hexane produced axonal swellings more frequently, without strong difference in the severity of the injuries in both groups.

The tibial nerve was the most affected, followed by peroneus and ciatic nerves in all groups. The distribution of the changes in the nervous tissues suggest a retrograde spread of the damage along the nerve trunks.

Key words: N-hexane, 2,5-hexanodione, neurotoxicity, chicken.

INTRODUCCIÓN

El n-hexano es un solvente orgánico que actualmente está considerado un agente neurotóxico (SPENCER y SCHAUMBURG, 1985). El descubrimiento de las propiedades neurotóxicas del n-hexano se produjo en Japón en los años 60, más tarde se identificaron otros brotes de neuropatías industriales en Europa y USA (SPENCER *et al.*, 1980).

Este compuesto es ampliamente utilizado para múltiples aplicaciones comerciales e industriales y por ello cobra una especial importancia en toxicología industrial (SPENCER y SCHAUMBURG, 1985; AHONEN y SCHIMBERG, 1988). Se emplea profusamente como disolvente de pinturas, barnices, pegamentos, tintas y compuestos desengrasantes de piezas metálicas, en la producción de laminados, gomas y plásticos y, además, es un componente menor de la gasolina (ANDREWS y SNYDER, 1986).

El metabolito final del n-hexano, la 2,5-hexanodiona (2,5-HD) está considerado como el responsable de la neuropatía causada por estos compuestos (KRASAVAGE *et al.*, 1980; ABOU-DONIA *et al.*, 1982 y 1985b; MISUMI y NAGANO, 1984).

El descubrimiento de que otros compuestos con la misma estructura de gamma-dicetona que la 2,5-HD son capaces de reproducir el mismo cuadro lesional en el sistema nervioso, ha dado lugar al término *axonopatía de las gamma-dicetonas*, y a la hipótesis de que todos aquellos compuestos capaces de metabolizarse a gamma-dicetona resultan potencialmente neurotóxicos (MISUMI y NAGANO, 1984).

Estas neuropatías muestran una gran semejanza con múltiples enfermedades del sistema nervioso hereditarias o adquiridas de etiología desconocida (SPENCER *et al.*, 1980; SAYRE *et al.*,

1986; DECAPRIO, 1987). Por ello, el estudio de estas neuropatías tóxicas son útiles para intentar descubrir la patogenia de estas enfermedades.

El objeto de este estudio es investigar la acción neurotóxica del n-hexano y la 2,5-HD sobre el sistema nervioso periférico de animales jóvenes, ya que los trabajos encontrados hacen referencia a animales adultos de 12, 14 y 18 meses de edad.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Animales y administración de los compuestos

Se han utilizado 64 gallinas (*Gallus gallus*), de una estirpe de híbridos comerciales de crecimiento rápido, de tan sólo un mes de edad. En todo momento dispusieron de agua y comida *ad libitum* y se mantuvieron con iluminación permanente. Los animales fueron distribuidos al azar en 4 grupos de 16 individuos:

Grupo A: a los cuales se les administró 200mg/Kg de n-hexano.

Grupo B: a los cuales se les administró 200 mg/Kg de 2,5-hexanodiona.

Grupo C: a los cuales se les administró 100 mg/Kg de 2,5-hexanodiona.

Grupo D: animales que se utilizaron como blancos.

La elección de n-hexano y 2,5-HD se debe a que el n-hexano es el compuesto tipo dentro de la gama de los solventes hexacarbonados neurotóxicos, y la 2,5-HD es el metabolito directamente responsable de las alteraciones neurotóxicas atribuidas al n-hexano (KRASAVAGE *et al.*, 1980; MISUMI y NAGANO, 1984; etc.).

Se ha llevado a cabo una intoxicación de tres meses de duración, plazo de tiempo suficiente para provocar sintomatología y lesiones evidentes de neurotoxicidad en el caso de la 2,5-hexanodiona (ABOU-

DONIA *et al.*, 1982); DECAPRIO *et al.*, 1983).

Todos los animales fueron pesados semanalmente y observados diariamente para la detección de síntomas clínicos neurológicos o de otra índole. Las semanas pares de la experiencia se procedió al sacrificio de dos animales de cada grupo (excepto en la última semana que se sacrificaron para su estudio los animales sobrevivientes) destinados a tomar muestras de tejido nervioso periférico (nervio ciático, nervio peroneo y nervio tibial) para poder proceder a un estudio secuencial de la aparición y evolución de las lesiones.

Los compuestos se administraron 5 días/semana, mediante inyección intraperitoneal previa desinfección de la zona.

2. Evaluación sintomatológica de la neurotoxicidad

El progreso de los signos de neurotoxicidad se realizó estableciéndose cinco estadios, que abarcan desde un estado calificado de ataxia benigna hasta el estado de parálisis total (ABOU-DONIA, 1978), según el siguiente esquema:

- T1 → Ataxia benigna
- T2 → Ataxia evidente
- T3 → Ataxia severa
- T4 → Ataxia muy severa
- P → Parálisis

Tras alcanzar el estado de parálisis, los animales fueron sacrificados mediante la administración de pentotal sódico.

3. Toma de muestras de tejido nervioso

Para la toma de muestras, los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico y, finalizada la misma, eran sacrificados.

Se diseccionaron y tomaron muestras del nervio ciático, peroneo común, tibial y sus ramos lateral y medial, así como los ramos de éste último que inervan al músculo flexor digital profundo.

4. Métodos histológicos

4.1. **Estudio estructural:** las muestras de te-

jido nervioso tomadas para microscopía óptica fueron fijadas en una solución de formaldehído al 10% durante 48 horas, las piezas fueron incluidas en paraplast, realizándose cortes de 3-4 μ m. Las técnicas histológicas aplicadas fueron Hematoxilina-Eosina (H-E) y Lugol Fast Blue (LFB), ésta última para evidenciar las vainas de mielina en cortes histológicos de parafina (GABES, 1968).

4.2. **Estudio ultraestructural:** las muestras de tejido nervioso eran inmediatamente fragmentadas en trozos de 0'5-1 mm de espesor sobre una placa de cera con unas gotas de glutaraldehído al 3% en tampón cacodilato 0'1M, procediéndose según los métodos preconizados por WANSON Y DROCHMAN (1968) y SABATINI *et al.* (1962).

De los bloques obtenidos se hicieron cortes semifinos de 1 μ m de espesor y ultrafinos de 40 nm. Los cortes semifinos se tiñeron con azul de toluidina y los ultrafinos se contrastaron con acetato de uranilo al 2% y con citrato de plomo.

RESULTADOS

1. Síntomas clínicos

Los animales que recibieron por vía intraperitoneal 100 mg/Kg de 2,5-HD y 200 mg/Kg de n-hexano no desarrollaron signos clínicos evidentes de neurotoxicidad; sin embargo, con 200 mg/Kg de 2,5-HD sí aparecen síntomas de disfunción neurológica, llegando a alcanzar estos animales el estadio final de parálisis (Cuadro 1).

No todos los animales mostraron el mismo grado de sensibilidad a la 2,5-HD, entre los animales del grupo B los síntomas aparecieron de manera insidiosa y dispersa, los más sensibles comenzaron a mostrar signos de ataxia benigna en la cuarta semana de tratamiento (22-25 días) y los más resistentes a la sexta semana (36-41 días).

En algunos animales del grupo C, entre la décima y duodécima semana, se observó una alteración poco definida en el modo de andar de los animales que no podía incluirse en el primer grado de ataxia.

Los animales del grupo B comenzaron a mos-

Nº POLLO	DÍAS DESPUÉS DE COMENZAR LA DOSIFICACIÓN					
	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	P	TOTAL
47	-	-	-	-	-	-
57	-	-	-	-	-	-
36	25	-	-	-	-	-
2	22	25	-	-	-	-
104	25	-	-	-	-	-
40	25	-	28	34	-	-
58	33	-	37	38	-	-
14	-	36	38	40	-	-
9	31	33	36	37	40	9
96	31	36	37	40	44	13
81	30	37	44	47	-	-
15	31	37	40	44	50	19
106	37	41	44	47	52	15
28	37	46	54	61	68	31
23	41	46	55	61	65	24
X	30'67	36'50	41'30	44'90	53,17	18,50

CUADRO 1. Evolución de los síntomas clínicos de neurotoxicidad en los pollos del grupo B. En la última columna se especifica la duración de los síntomas desde su aparición hasta la parálisis. El pollo nº 96 fue sacrificado a la 7ª semana, en nº 104 se sacrificó a la 4ª semana y los pollos 40 y 81 murieron durante la experiencia.

trar síntomas de ataxia, en los diferentes grados, a los siguientes tiempos medios: T₁ a los 30'67 días; T₂ a los 36'50 días; T₃ a los 41'30 días; T₄ a los 44'90 días y P a los 53'15 días.

La duración media de los diferentes grados de ataxia en el mismo grupo fue la siguiente: T₁-4'88 días; T₂-4'50 días; T₃-3'60 días y T₄-4'83 días.

2. Microscopía óptica

Las lesiones neurotóxicas comenzaron a apreciarse tan sólo en el nervio tibial de un animal del grupo B (200 mg/Kg de 2,5-HD), en la 2ª semana de intoxicación. Estas lesiones se calificaron de leves y consistieron en la aparición de tumefacciones axonales. Este animal no mostró signos clínicos evidentes de disfunción neurológica.

En la 4ª semana las lesiones fueron más evidentes y generalizadas, apareciendo en todos los animales del grupo B, y en especial en los nervios tibial y peroneo. Un animal de grupo C

(100 mg/Kg de 2,5-HD) mostró lesiones leves en los nervios tibial y peroneo. En esta misma semana los animales del grupo B presentaron signos de ataxia ligera, no observándose síntomas de deficiencia neurológica en los restantes animales.

En la 6ª semana, el grado de alteración que muestran los nervios tibial y peroneo de dos animales del grupo B se califica como de lesión severa, apreciándose tumefacciones axonales de gran tamaño y desmielinizadas, zonas extensas de degeneración walleriana y fenómenos de fagocitosis (Figura 1), presentando un grado de alteración menor el nervio ciático. Estos animales mostraban síntomas de ataxia severa. Un animal de grupo B fue sacrificado esta semana al presentar un cuadro clínico de parálisis flácida de las extremidades inferiores, en los nervios de este animal se aprecian lesiones muy severas, con áreas muy extensas de degeneración.

En los nervios de los animales de los grupos

A (200 mg/Kg de n-hexano) y C se observan lesiones de neurotoxicidad leves o dudosas.

En la 8ª y 10ª semana todos los animales del grupo B habían alcanzado el grado de parálisis (el pollo nº 96 en la 7ª), por lo que fueron sacrificados no llegando ninguno de ellos a la 11ª semana. Los nervios de estos animales mostraban lesiones severas o graves, el nervio más afectado era el tibial. Los nervios peroneo y ciático mostraban un estado de alteración importante, aunque ligeramente menor que la encontrada a nivel del nervio tibial (Figura 2).

En la 8ª, 10ª y 12ª semana, todos los nervios de los animales de los grupos A y C presentaban lesiones que consistían en tumefacciones axonales dispersas y desorganización y vacuolización de la vaina de mielina. El grado de alteración de los nervios fue bastante similar en ambos grupos, siendo los más afectados el tibial y el peroneo.

La aparición y evolución de las lesiones histopatológicas en los diferentes animales y grupos aparece reflejados en la Cuadro 2.

La observación de las muestras de tejido nervioso periférico en cortes semifinos teñidos con azul de toluidina confirma con más detalle las lesiones encontradas en los cortes histológicos de parafina.

Las fibras más afectadas son aquellas de mayor tamaño y por lo tanto más mielinizadas, mientras que las fibras de menor diámetro conservan su morfología normal.

Se aprecian tumefacciones axonales de situación paranodal en los nódulos de Ranvier (Figura 3) y en los animales del grupo B es frecuente encontrar imágenes de procesos degenerativos y también de regeneración.

3. Microscopía electrónica

Con microscopía electrónica se confirman las mismas lesiones descritas con anterioridad. La primera alteración que detectamos en el tejido nervioso es a nivel de axoplasma, y consiste en un aumento de los neurofilamentos hasta el punto en que se produce una pérdida de la imagen característica del axoplasma, en ocasiones con separación de los neurofilamentos del resto de los organoides axoplásmicos (Figura 4).

Las tumefacciones axonales a nivel paranodal

ejercen presión mecánica sobre las estructuras de los nódulos de Ranvier deformándolos. En las imágenes de degeneración walleriana de las fibras nerviosas se observa una separación total de las láminas de la vaina de mielina, transformándose en estructuras de morfología fusiforme de diverso tamaño que posteriormente sufren una desintegración gradual.

En las primeras fases de degeneración walleriana se observa, en alguna fibra nerviosa, el axoplasma fragmentado en porciones de morfología irregular por unas estructuras, de aspecto vesicular, que pueden ser prolongaciones del citoplasma de las células de Schwann adanoxales y cuyo significado puede ser la eliminación del axoplasma alterado (Figura 5).

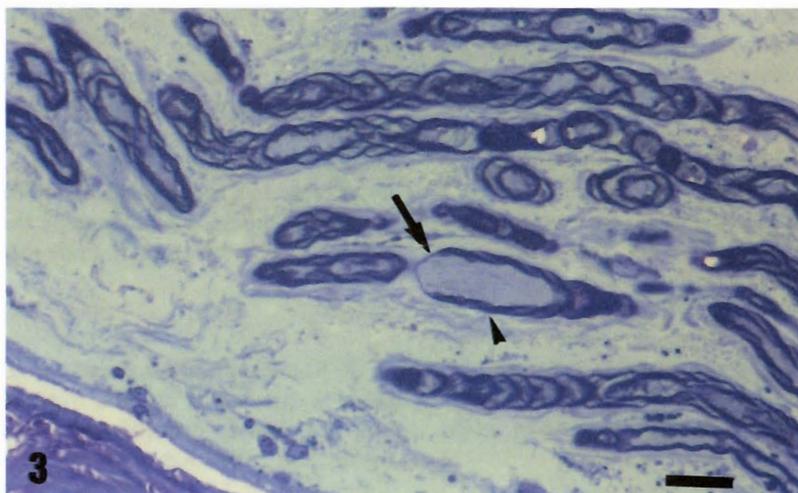
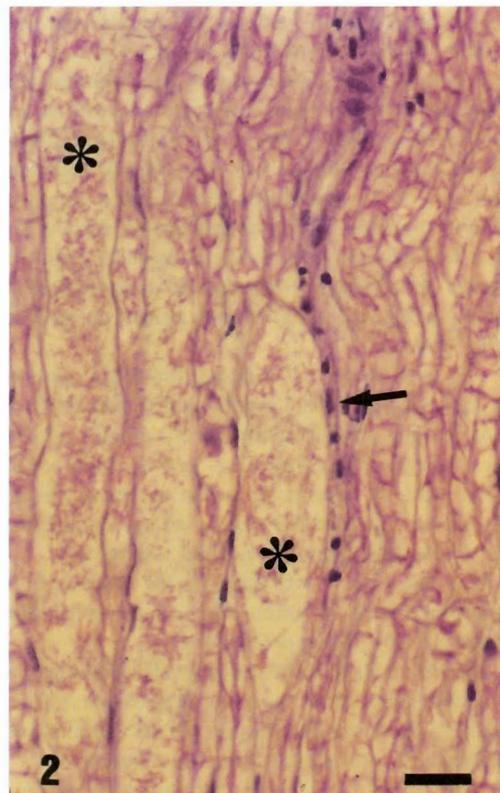
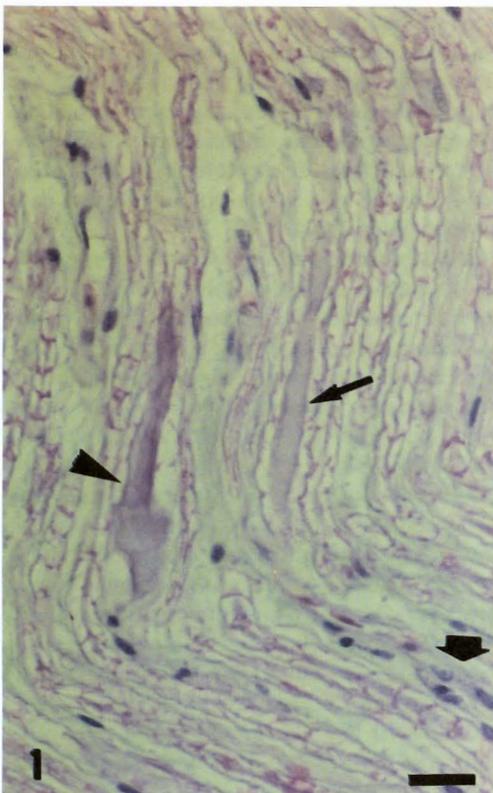
Coincidiendo con las alteraciones degenerativas, las células de Schwann, presentan un citoplasma más electrodens, con un incremento notable de gránulos electrodensos, vesículas y cisternas, alteraciones atribuidas a un incremento de su actividad metabólica. Se observan imágenes frecuentes de estas células con figuras de mielina y restos axonales o productos de la degradación de la vaina de mielina (Figura 6 que es la 30). También se destaca la presencia de macrófagos, con gránulos citoplasmáticos electrodensos, en las proximidades de los axones alterados.

Junto con estas imágenes de degeneración y fagocitosis, se aprecian agrupaciones de fibras nerviosas de diámetro pequeño que representan imágenes de procesos regenerativos de las fibras nerviosas (Figura 7).

En el grupo B son frecuentes las imágenes de fibras nerviosas en un estadio avanzado de degeneración walleriana y de fagocitosis de restos axonales y mielínicos; en los grupos A y C, las lesiones de mayor frecuencia son el aumento de los neurofilamentos y las tumefacciones, las lesiones degenerativas suelen ser de menor grado.

4. Peso

El peso medio del grupo testigo (D) en el curso de la experiencia fue de $2'61 \pm 0'54$ Kg; el del grupo A, tratado con 200 mg/Kg de n-hexano, fue de $2'56 \pm 0'84$ Kg; en el grupo B, tratado con 200 mg/Kg de 2,5-HD, fue de $1'99 \pm 0'52$ Kg y



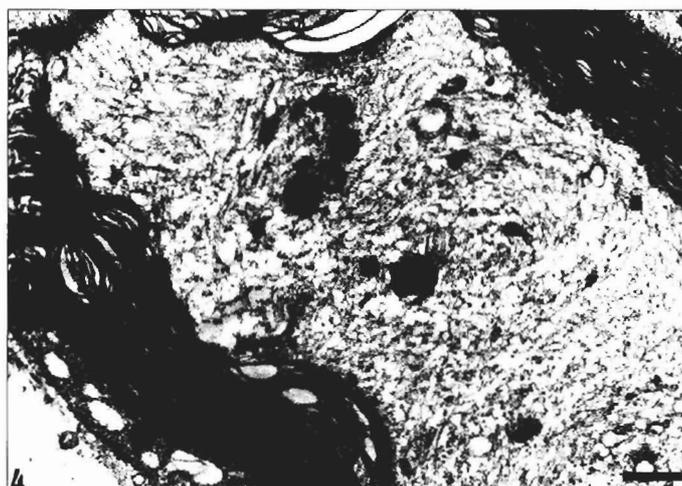


FIGURA 1. **Nervio peroneo** de un animal del grupo B, tras 6 semanas de tratamiento con 2,5-HD, se observa una gran tumefacción axonal desmielinizada (→) y otra donde se inician los procesos de fragmentación del axón (►), también se aprecia proliferación celular (◆) (H-E). Barra = 10 μ .

FIGURA 2. **Nervio ciático** de un animal del grupo B tras 6 semanas de tratamiento con 2,5-HD (H-E). Fenómenos de degeneración walleriana (*) y aumento del número de células entre las fibras degeneradas (→). Barra = 10 μ .

FIGURA 3. **Nervio tibial** de un animal del grupo C tras 10 semanas de tratamiento con 2,5-HD. Se observa una gran tumefacción paranodal (►) con adelgazamiento y retracción de la vaina de mielina (→) (Azul de toluidina). Barra = 10 μ .

FIGURA 4. Detalle de los axoplasmas de una fibra nerviosa del **nervio tibial** de un animal tratado con 2,5-HD del grupo C, tras 12 semanas de intoxicación. Obsérvese el incremento de neurofilamentos y pérdida de organización del axoplasma en la imagen. Barra = 0'79 μ .

FIGURA 5. Corte transversal de fibras nerviosas del nervio peroneo de un animal del grupo A, tras 12 semanas de intoxicación con n-hexano, en donde se aprecian imágenes de compartimentalización del axoplasma (*) por estructuras de aspecto vesicular (→) Barra = 1'27 μ .

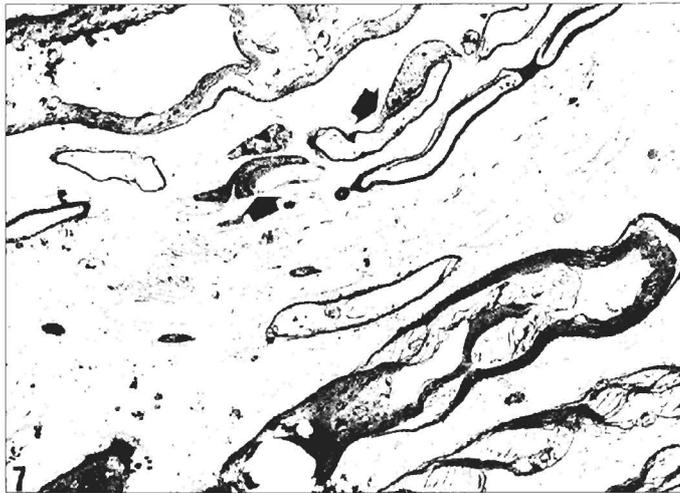
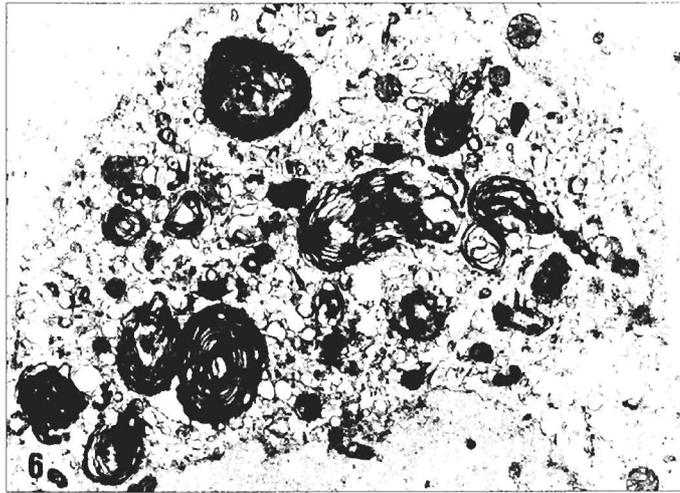


FIGURA 6. Nervio peroneo de un animal del grupo A intoxicado 12 semanas con n-hexano. Citoplasma de célula de Schwann conteniendo restos de mielina en formaciones concéntricas y multilaminares (■). Barra = 1'02 μ .

FIGURA 7. Nervio tibial de un animal del grupo C, tras 10 semanas de tratamiento con 2,5-HD, en la que se observa una agrupación de axones pequeños asociados a células de Schwann y presentando una lámina delgada de mielina (■). Barra = 4'54 μ .

		TIBIAL	PERONEO	CIÁTICO
2. ^a SEMANA	64A	-	-	-
	33A	-	-	-
	47B	+	±	-
	57B	±	±	-
	91C	-	-	-
	13C	-	-	-
4. ^a SEMANA	35A	-	+	-
	30A	-	-	-
	(T ₁) 36B	++	+	-
	(T ₂) 2B	++	++	+
	17C	±	-	-
	80C	+	+	-
6. ^a SEMANA	27A	+	+	+
	26A	±	±	±
	(P) 9B	++++	++++	+++
	(T ₄) 58B	+++	+++	++
	(T ₄) 14B	+++	+++	++
	12C	+	±	-
	82C	+	±	±
8. ^a SEMANA	70A	-	-	-
	43A	+	+	±
	(P) 15B	+++	++	++
	(P) 106B	++++	++	++
	75C	+	+	-
	56C	-	-	-
10. ^a SEMANA	84A	+	+	+
	1A	+	+	+
	(P) 28B	++++	++++	+++
	(P) 23B	++++	++++	+++
	93C	+	+	+
	45C	++	+	+
12. ^a SEMANA	22A	+	+	+
	39A	+	+	+
	21C	++	+	+
	107C	+	++	+
-	Sin lesión			
±	Lesiones dudosas.			
+	Tumefacciones escasas, mielina ligeramente alterada (desorganizada y vacuolizada).			
++	Tumefacciones más frecuentes, mielina más alterada (desorganizada y vacuolizada).			
+++	Lesiones severas (tumefacciones grandes y desmielinizadas, zonas de degeneración).			
++++	Lesiones graves (degeneración wallerina muy extensa, escasas tumefacciones).			

CUADRO 2. Grado de alteración histopatológica de los nervios tibial, peroneo y ciático de los pollos, de los diversos grupos, en las distintas semanas de la experiencia.

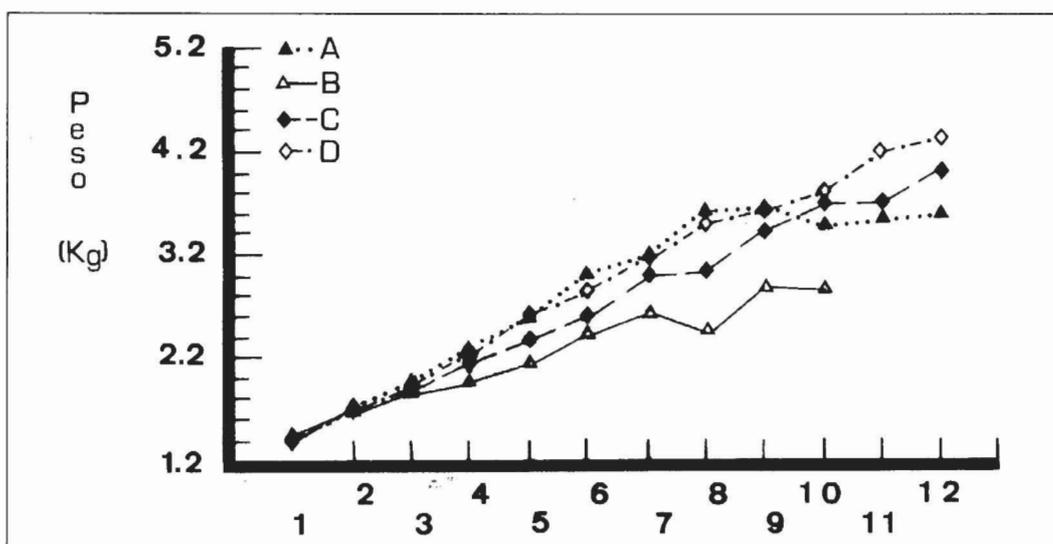


GRÁFICO 1. Evolución de los pesos medios de los animales pertenecientes a los 4 grupos de la experiencia.

en el grupo C, tratado con 100 mg/Kg de 2,5-HD, fue de 2.45 ± 0.84 Kg.

Al elaborar cuadros en los que aparecen los valores medios de peso para cada intervalo de tiempo, junto con los errores interno y global y los límites de confianza del 95% podemos apreciar que con el grupo testigo (D) hay una tendencia marcada al incremento de peso con el tiempo. En el grupo A hay un incremento progresivo, pero a partir de la 8ª semana se estabiliza el peso hasta el final de la experiencia. En el grupo B se aprecia una ganancia seguida de una estabilización, y en el grupo C hay una tendencia progresiva al aumento de peso aunque sensiblemente inferior al grupo D (Gráfico 1).

Mediante el método de los mínimos cuadrados se ha regresionado el peso medio de cada grupo con el tiempo a fin de ver la evolución de la ganancia de peso en los mismos. Se observa en todos los casos un alto coeficiente de correlación. Las pendientes obtenidas son positivas como cabe esperar en datos que van aumentando con el tiempo, la mayor (0.28 ; $p < 0.05$) se obtiene en el grupo testigo, y la menor (0.17 ; $p < 0.05$) en el grupo B tratado con 200 mg/Kg de 2,5-HD. La pendiente en los grupos A y C, tratados con 200 mg/Kg de n-hexano y 100 mg/Kg de 2,5-HD respectivamente,

es igual: 0.24 ($p < 0.05$). Estos resultados nos informan que la ganancia de peso de los animales se ve alterada por acción de los productos empleados y que es la 2,5-HD la que mayormente repercute sobre la mencionada ganancia.

DISCUSIÓN

Tanto en los animales del grupo A, tratados con n-hexano, como en los de los grupos B y C, tratados 2,5-HD, se ha detectado el mismo tipo de lesión: tumefacciones axonales en las proximidades de los nódulos de Ranvier acompañadas, en etapas más avanzadas de la intoxicación, por fragmentación de los axones, degeneración walleriana y procesos de fagocitosis. Igual resultado obtienen diversos Dautores (KRASAVAGE *et al.*, 1980; POLITIS *et al.*, 1980; ABOU-DONIA *et al.*, 1982; GRIFFIN *et al.*, 1983; ABOU-DONIA *et al.*, 1985b; ROSENBERG *et al.*, 1987, etc.) y son similares a los obtenidos en intoxicaciones con otros compuestos hexacarbonados relacionados como el Metil-n-Butilcetona (MnBK), 2-hexanol, 2,5-hexanodiol, 5-hidroxi-2-hexanona (CAVANAGH y BENNETTS, 1981; ABOU-DONIA *et al.*, 1982; JONES y CAVANAGH, 1983; ABOU-DONIA *et al.*, 1985a).

Dosis de 200 mg/kg de n-hexano (Grupo A):

En este estudio se ha observado que, a igualdad de dosis (200 mg/Kg), la 2,5-HD resulta más neurotóxica que el n-hexano. Mientras que el n-hexano no causa sintomatología alguna y las lesiones nerviosas observadas son leves, la 2,5-HD provoca síntomas neurológicos evidentes de una neuropatía, que culmina con una parálisis flácida de las extremidades inferiores, y lesiones nerviosas severas o graves dependiendo del grado de neuropatía. Estos resultados concuerdan con los aportados por ABOU-DONIA *et al.* (1982 y 1985a y b) en gallinas adultas y KRASAVAGE *et al.* (1980) en ratas. La dosis de 100 mg/Kg de 2,5-HD ha mostrado una actividad neurotóxica muy similar a la dosis de 200 mg/Kg de n-hexano.

Al contrario que ABOU-DONIA *et al.* (1982) y PELLIN *et al.* (1987), no se observó en los animales síntoma alguno de debilidad o incoordinación motora durante las 12 semanas de tratamiento con 200 mg/Kg de n-hexano; pero, al igual que PELLIN *et al.* (1987), se apreciaron lesiones poco importantes en las últimas semanas de la experiencia.

Dosis de 200 mg/kg de 2,5-HD (Grupo B):

Con esta dosis se alcanza el primer estadio de ataxia a los 30'6 días y la parálisis a los 53'1 días, bastante más tarde que lo descrito por ABOU-DONIA *et al.* (1982): 21-26 días. Estos, tan sólo describen lesiones leves en los nervios periféricos de uno de los animales parálisis. Sin embargo, en este estudio aparecen lesiones severas y graves en los nervios periféricos de los animales sacrificados con síntomas de ataxia severa o parálisis. Incluso se observaron lesiones, aunque leves, en animales asintomáticos y en los primeros estadios de ataxia. Resultados similares obtienen DECAPRIO *et al.* (1983) en gallinas adultas, en las que aparecen fenómenos de parálisis a las 4-5 semanas y lesiones en la médula espinal y el nervio ciático.

Dosis de 100 mg/kg de 2,5-HD (Grupo C):

Si bien ABOU-DONIA *et al.* (1982) detectaron síntomas de neurotoxicidad en gallinas adultas y lesiones leves en los nervios periféricos, con esta dosis de 2,5-HD, en esta experiencia no se observaron síntomas claros de neurotoxicidad, pero sí lesiones evidentes en las últimas semanas de tra-

tamiento. Esto indica una neuropatía de curso más lento que la provocada por la dosis de 200 mg/kg del mismo producto.

Al comparar los resultados obtenidos en la presente experiencia con otras anteriores, realizadas con animales adultos de la misma especie, parece que se aprecia una cierta resistencia respecto a la aparición de los síntomas de disfunción neurológica. Sin embargo, se observan lesiones importantes en los nervios periféricos de los animales con síntomas evidentes, e incluso en los animales con síntomas de ataxia leve o asintomáticos, aunque menos intensas y generalizadas.

Los resultados de esta experiencia, en los que aparecen lesiones en los nervios periféricos, contrastan con los de ABOU-DONIA *et al.* (1982) que, empleando las mismas dosis y vías de administración, indican ausencia de las mismas. Además, se constata aquí una aparición más tardía de los síntomas clínicos. Otros autores describen ligeras lesiones a nivel de nervios periféricos (DECAPRIO *et al.*, 1983; PELLIN *et al.*, 1987).

De acuerdo con CAVANAGH y BENNETTS, (1981); GRAHAM y GOTTFRIED, (1984) y GRAHAM *et al.* (1986), los animales de esta experiencia comenzaron a mostrar signos de neurotoxicidad cuando las lesiones degenerativas eran evidentes y se puede inferir que probablemente los animales jóvenes, que presentan un menor grado de desarrollo y organización del sistema nervioso, resultan más resistentes a la acción neurotóxica de los solventes hexacarbonados.

En este caso se han detectado lesiones importantes en los nervios periféricos de los animales con síntomas de ataxia y parálisis, y pueden observarse lesiones de menor intensidad en los animales con síntomas de ataxia dudosa o asintomáticos. Quizás, si ABOU-DONIA *et al.* (1982) hubiesen llevado a cabo estudios ultraestructurales, hubieran podido evidenciar lesiones a este nivel.

En el presente estudio se han detectado al microscopio óptico lesiones características de la neuropatía causada por hexacarbonados neurotóxicos en el grupo de animales tratados con 200 mg/Kg de n-hexano y 100 mg/Kg de 2,5-HD, y estas lesiones han tenido confirmación en el estudio mediante microscopía electrónica. Aunque fueron lesiones significativamente menos inten-

sas que las observadas en el grupo al que se administró 200 mg/Kg de 2,5-HD.

Asumiendo que los nervios periféricos sufren un proceso postnatal de crecimiento y que la mielinización de los mismos continúa después del nacimiento, es posible que en los animales jóvenes se precise un periodo de intoxicación más prolongado para que aparezcan los síntomas de neuropatía.

Los animales de esta experiencia comenzaron a mostrar síntomas graves de neuropatía cuando las lesiones degenerativas eran frecuentes y extensas en los nervios periféricos. Los animales del grupo B que mostraban un estado clínico de parálisis presentaban grandes extensiones en degeneración, mientras que en los animales de los restantes grupos las lesiones degenerativas fueron menos evidentes y comenzaron a detectarse con mayor frecuencia en las últimas semanas. Las imágenes de degeneración neurológica observadas en nuestros animales corresponden a una degeneración walleriana, (Figura 2), e implican de manera significativa a las fibras mielinizadas y de gran tamaño. Esto concuerda con las observaciones de CAVANAGH (1982), GRAHAM y GOTTFRIED (1984) y GRAHAM *et al.* (1986).

La causa de la degeneración walleriana que sufren las fibras nerviosas (Figura 2), parece deberse a que las masas crecientes de neurofilamentos que aparecen en el curso de la intoxicación alcanzan un tamaño que no les permite desplazarse a través de los nódulos de Ranvier. Además, existe una relación directa entre el diámetro de la fibra nerviosa y el grado de constricción a nivel del nódulo, de tal manera que los axones de mayor diámetro presentan mayor constricción a este nivel (CAVANAGH, 1982).

En el presente trabajo no ha sido posible determinar con certeza que tramo de los nervios se afecta en primer lugar, ya que encontramos que las lesiones se encuentran distribuidas por toda la muestra de tejido, pero sí se pudo apreciar que es el nervio tibial el primero en afectarse, seguido del peroneo y del ciático, lo que parece confirmar que las lesiones progresaron en sentido retrógrado, y se trata de una neuropatía tipo dying-back (POLITIS *et al.*, 1980).

Al realizar la necropsia de los animales no se han detectado alteraciones macroscópicas en los órganos internos, en lo que se coincide con DECAPRIO *et al.* (1982, 1983) y ABOU-DONIA *et al.* (1982, 1985a y b).

Peso: La pérdida de peso es un síntoma característico en la neuropatía por hexacarbonados en intoxicaciones experimentales y en casos clínicos detectados en la especie humana. ABOU-DONIA *et al.* (1982), detectaron, tras la administración intraperitoneal de 200 mg/Kg de 2,5-HD, una pérdida de peso de aproximadamente el 45% en gallinas adultas. En el presente estudio, al tratarse de animales en crecimiento no es posible hacer referencia al peso inicial. Sin embargo, se comprobó que el peso medio del grupo B a la 10ª semana es un 74'14 % del que tuvo el grupo testigo a la misma semana.

Aunque los autores anteriores señalan una pérdida de peso del 20% tras la administración intraperitoneal de 200 mg/Kg de n-hexano, en este estudio no se detectaron diferencias significativas en la ganancia de peso entre el grupo C y el grupo testigo. En esta experiencia, aplicando el test de Mann-Whitney para comprobar la existencia de un ajuste de los pesos de los cuatro grupos a distribuciones iguales, se deduce que el tratamiento con 200 mg/Kg de n-hexano es el que presenta una menor influencia sobre el peso de los animales ($Z = -0'2157$; $p = 0'8292$), siendo esta influencia más marcada para la 2,5-HD, y especialmente la dosis de 200 mg/Kg ya que la probabilidad de igualdad con el grupo testigo puede considerarse nula ($Z = -4'7767$; $p = D 1'7844 \cdot 10^{-6}$). La probabilidad de igualdad entre el grupo testigo y el grupo C, aunque algo baja, indica que las diferencias no son marcadas ($Z = -1'1631$; $P = 0'2448$).

BIBLIOGRAFÍA

- ABOU-DONIA, M.B., MAKKAWY, H.M., GRAHAM, D.G. 1982. The relative neurotoxicities of n-hexane, methyl n-butyl ketone, 2,5-hexanediol and 2,5-hexanedione following oral and intraperitoneal administration in hens. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 62: 369-389.

- ABOU-DONIA, M.B., LAPADULA, D.M., CAMPBELL, G., TIMMONS, P. 1985b. The synergism of n-hexane-induced neurotoxicity by methyl isobutyl ketone following subchronic (90 days) inhalation in hens: induction of hepatic microsomal cytochrome p-450. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 81: 1-16.
- ABOU-DONIA, M.B., MAKKAWY, H.M., CAMPBELL, G. 1985b. Pattern of neurotoxicity of n-hexane, methyl n-butyl ketone, 2,5-hexanediol and 2,5-hexanedione alone and in combination with O-ethyl O-4- nitrophenyl phenylphosphonothioate in hens. *Toxicol. Environ. Health* 16: 85-100.
- AHONEN, I., SCHIMBERG, R.W. 1988. 2,5-Hexanedione excretion after occupational exposure to n-hexane. *Br. J. Ind. Med.* 45: 133-136.
- ANDREWS, L.S. SNYDER, R. 1986. Toxic effects of solvents and vapors. En: Casarett and Doull's Toxicology. Klaassen; Amdur; Doull. eds. Macmillan, New York.
- CAVANAGH, J. B. 1982. The pattern of recovery of axons in the nervous system of rats following 2,5-hexanediol intoxication: a question of rheology. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 8: 19-34.
- CAVANAGH, J. B., BENNETTS, R. J. 1981. On the pattern of changes in the rat nervous system produced by 2,5-hexanediol. *Brain* 104: 297-318.
- DECAPRIO, A. P. 1987. n-Hexane neurotoxicity: a mechanism involving pyrrole adduct formation in axonal cytoskeletal protein. *Neurotoxicology* 8 (1): 199-210.
- DECAPRIO, A. P., OLAJOS, E. J., WEBER, P. 1982. Covalent binding of a neurotoxic n-hexane metabolite: conversion of primary amines to substituted pyrrole adducts by 2,5-hexanedione. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 65: 440-450.
- DECAPRIO, A. P., STROMMINGER, N. L., WEBER, P. 1983. Neurotoxicity and protein binding of 2,5-hexanedione in the hen. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 68: 297-307.
- GABES, M. 1986. Techniques histologiques. Masson. Paris.
- GRAHAM, D.G., SZAKAL-QUIN, G., MILAM, L. GOTTFRIED, M.R., ANTHONY, D.G. 1986. Pathogenic studies of the neurofilamentous neuropathies. *The Cytoskeleton.* 167-174.
- GRIFFIN, J.W., FAHNESTOR, K.E., PRICE, A.L. CORK, L.C. 1983. Cytoskeletal disorganization induced by local application of β β' -iminodipropionitrile and 2,5-hexanedione. *Ann. Neurol.* 14: 55-61
- JONES, H. B., CAVANAGH, J. B. 1983. Distortions of the nodes of Ranvier from axonal distension by filamentous masses in hexacarbon intoxication. *J. Neurocytol.* 12: 439-458.
- KRASAVAGE, J. W., O'DONOGHUE, J. L., DIVINCENZO, G. D. TERHAAR, C. J. 1980. The relative neurotoxicity of methyl-n-butyl ketone, n-hexane and their metabolites. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 52: 433-441.
- MISUMI, J. NAGANO, M. 1984. Neurophysiological studies on the relation between the structural properties and neurotoxicity of aliphatic hydrocarbon compounds in rats. *Br. J. Ind. Med.* 41: 526-532.
- PELLIN, M., VICEDO, J. L., VILANOVA, E. 1987. Sensitivity to tri-0-cresylphosphate neurotoxicity on n-hexane exposed hens as a model of simultaneous hexacarbon solvent and organophosphorus occupational intoxication. *Arch. Toxicol.* 59: 311-318.
- POLITIS, J. M., PELLEGRINO, R. G., SPENCER, P. S. 1980. Ultrastructural studies of the dying-back process: V. axonal neurofilaments accumulate at sites of 2,5-hexanedione application: evidence for nerve fibre dysfunction in experimental hexacarbon neuropathy. *J. Neurocytol.* 9: 505-516.
- ROSENBERG, C. K., GENTER, M. B., SZAKAL-QUIN, G. ANTHONY, D. C. GRAHAM, D. G. 1987. dl-versus meso- 3, 4-dimethyl-2,5-hexanedione: a morphometric study of the proximo-distal distribution of axonal swellings in the anterior root of the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 87: 363-373.
- SABATINI, D. D., BEN8CH, R. BARNETT, R. J. 1962. New means of fixation for electron microscopy and histochemistry. *Anat. Rec.* 142: 274.

- SAYRE, L. N. SHEARSON, C. N. WONGNON-GROLRIT, T. NEDORI, R. GANBETTI, P. 1986. Structural basis of gama-diketone neurotoxicity: non-neurotoxicity of 3,3-dimethyl-2,5-hexanedione, a gama-diketone incapable of pyrrole formation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 84: 36-44.
- SPENCER, P. S. SCHAUNBURG, H. H. SABRI, N.I. VERONESI, B. 1980. The enlarging view of hexacarbon neurotoxicity. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 7: 279-356.
- WANSON, J. C. DROCHNAN, P. 1968. Epoxy technique inclusion for electron microscopy. *Cell. Biol.* 38: 130.
- Scand. J. Work Environ Health 11 (1): 53-60.