1989-1 080405103

Universidad de Guadalajara

Facultad de Ciencias Biológicas

Alteraciones en Gónadas de Ratas Prenatalmente Expuestas a la Inhalación de Humo de Tabaco

Tesis Profesional

Para obtener el Título de:

Licenciado en Biología

P r e s e n t a :

Bertha Margarita Caratachea Gómez

Guadalajara, Jalisco. 1991.

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS

Expediente .....
Número 1232/89

SRITA. BERTHA MARGARITA CARATACHEA GOMEZ
P R E S E N T E . -

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido - aprobado el tema de Tesis "ALTERACIONES EN GONADAS DE PRODUC_ TOS DE RATAS EXPUESTAS DURANTE LA GESTACION A LA INHALACION - DE HUMO DE TABACO" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos a usted que ha sido aceptada como Directora de dicha Tesis la M.en C. Alma Rosa - del Angel Meza.

A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"
Guadalajara,Jal.,Octubre 6 de 1989
EL DIRECTOR

ING.ADOLFO ESPINOZA DE LOS MONTEROS CARDENAS

FACULTAD DE CIENCIAS

EL SECRETARIO

M.EN C. ROBERTO MIRANDA MEDRANO

c.c.p. La M.en C. Alma Rosa del Angel Meza, Directora de Tesis.Pte.
c.c.p. El expediente de la alumna.

'mjsd

Boulevard a Tlaquepaque y Corregidora, S. R.
Guadalajara, Jal.
Teléfonos 19-80-54 y 19-82-92

M en C. Carlos Beas Zárate.
Director de la Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Guadalajara
P R E S E N T E.

Estimado M. en C. Beas Zárate:

Por este medio comunico a usted que la señorita BERTHA MARGARITA CARATACHEA GOMEZ, pasante de la Licenciatura en Biología con número de registro 080405103 ha concluído satisfactóriamente el trabajo de tesis titulada: "Alteraciones En gónadas de productos de ratas expuestas durante la gestación a la inhalación de humo de tabaco", misma que realizó en el Dpto. de Investigación Científica de la Facultad de Medicina con apoyo financiero del Departamento de Investigación Científica y Superación Académica de la Universidad de Guadalajara.

Asimismo le informo que el presente manuscrito ha sido completamente revisado y cumple con las especificaciones señaladas en el reglamento de tesis de la Dependencia a su cargo, por lo que ruego a Ud. iniciar los trámites necesarios para la titulación.

Sin otro particular le saludo cordialmente.

A T E N T A M E N T E
"Piensa y trabaja"
Noviembre 15 de 1990.
El Director de tesis.

M en C Alma Rosa del Angel Meza.

c.c.p. Archivo.

1989-1 Registro 080405103

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

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS.

Trabajo de tésis que presenta BERTHA MARGARITA CARATACHEA GOMEZ.
para obtener el grado de Licenciatura en Biología.

" ALTERACIONES EN GONADAS DE RATAS PRENATALMENTE EXPUESTAS A LA INHALACION DE HUMO DE TABACO".

Enero de 1991.

A ti Madre de Guadalupe; por
éstas Bendiciones, por creer
en mí y en lo que hago.

A mi familia; por su comprensión
en los momentos más difíciles y
a quienes debo todo lo que soy,
con admiración y cariño.

A mis asesores:
M. en C. Alma Rosa del Angel Meza
M. en C. Jaoquín García Estrada
por su ayuda y confianza desinte-
resada para mi superación académica.

A Raúl Leonel de Cervantes M.
por su amistad, asesoría y entre-
namiento en el aspecto histológico.

A la Universidad y Facultad de Ciencias
Biológicas por brindarme la oportunidad
de realizar una carrera profesional.

Al Departamento de Investigación Científica y Supera-
ción Académica (DICSA), por su apoyo economico brindado.

Al Dpto. de Investigación de la Facultad de Med. Vet. y Zoot. así como a la Fac. de Medicina; por permitirme la realización del presente trabajo.

A mis amigos del Depto. de Investigación y del Dpto. de Patología; por su amistad y ayuda constante y desinterasada.

A ti Jorge por tu: Amor

Apoyo

Respeto

y

Paciencia

A todas aquéllas personas que de una u otro manera ayudaron a la formación de ésta tésis.

DIRECTOR DE TESIS

M en C Alma Rosa del Angel Meza.

ASESOR

M en C Joaquin Garcia Estrada

El presente trabajo se desarrolló en el Departamento de Investigación Científica de la Facultad de Medicina con financiamiento otorgado por el DICSA. de la U. de G.

ALTERACIONES EN GONADAS DE RATAS PRENATALMENTE EXPUESTAS A LA INHALACION DE HUMO DE TABACO.

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2-9
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	10
JUSTIFICACION	11
HIPOTESIS	12
OBJETIVOS	13
MATERIALES Y METODOS	14-17
RESULTADOS	18-23
DISCUSION	24-28
CONCLUSIONES	29
BIBLIOGRAFIA	30-33

RESUMEN

El humo de tabaco causa diferentes patologías que dependen del número de cigarrillos que se consumen y la duración de la exposición al humo del tabaco. Los productos de madres fumadoras nacen con bajo peso y frecuentemente muestran malformaciones músculo-esqueléticas, aparte de que aumenta el riesgo de muerte neonatal, se tienen reportes de que las crías hembras tienen mayor tolerancia que los machos a los efectos del tabaco. A fin de determinar alteraciones en productos prenatalmente expuestos al humo de tabaco en distintos períodos de su desarrollo se utilizaron 20 ratas Sprague-Dawley divididas en cuatro grupos de 5 animales; un control y tres experimentales: expuestos toda la gestación (E1), del día 8 al 21 (E2) o del 15 a 21 (E3). Se utilizó una cámara rectangular de 40 lt de capacidad en cuyo interior se incineraron 1.5 gr de tabaco antes de introducir cada rata dos veces al día por 10 min. Al nacimiento, 20 y 60 días de edad se registró el peso corporal, tamaño y peso gonadal de los productos, asimismo se seleccionaron al azar animales representativos de cada camada para perfusión intravascular bajo condiciones fisiológicas con una mezcla de formaldehído/glutaraldehído antes de separar ovarios o testículos que se procesaron histológicamente para analizar subjetivamente su citoarquitectura e identificar alteraciones atribuibles al tratamiento. No se encontraron diferencias en el número de crias nacidas control y experimentales, la progénie expuesta el último tecio gestacional reveló la mayor mortalidad (18%). A través del estudio no se observó un efecto relacionado con el tiempo total de exposición al comparar el tamaño y peso de los productos control y experimentales. Al nacimiento las hembras control tuvieron el mayor peso de ovarios ($P<0.05$), sin que se identificaran diferencias con las experimentales a los 20 y 60 días postnatales. El mismo fenómeno se observó en los machos, sin embargo en estos se identificaron alteraciones testiculares de diferente severidad; (inmadurez, aplásia, hipoplásia en algunas estructuras y azoospermia ocasional) relacionadas con el tiempo total de exposición, sin que pueda definirse su reversibilidad. En la mayoría de las madres se produjo una adaptación que permitio tolerar la presencia de compuestos tóxicos en el aire espirado, sin embargo los mecanismos protectivos maternos fueron insuficientes para permitir el desarrollo testicular normal, esto indica la presencia de compuestos tóxicos en el humo que afectaron los testículos inmaduros que resultaron particularmente vulnerables.

INTRODUCCION

El tabaco es una planta originaria de América, del orden Tubifloras, familia de las Solanáceas y género Nicotiana, miden de uno a dos metros de altura, sus hojas lanceoladas tienen hasta 70 cm de largo y flores en racimo [1], después de tratarse se consumen en forma de cigarrillo, cigarros, puros o pipa. [2]

El elemento activo del tabaco es el alcaloide nicotina, causa excitación, seguida de inhibición de las sinápsis en los ganglios simpáticos y parasimpáticos. El placer de fumar se debe en parte a la acción calmante de la nicotina sobre el sistema nervioso central (SNC), se absorbe rápidamente a través de todas las mucosas y más lentamente por inyección subcutánea o a través de la piel intacta.[3]

La nicotina es un veneno de fuerte toxicidad, la dosis letal es de 50 mg, sus efectos son comparables a los del ácido cianhídrico. Se calcula que una persona absorbe de 2.5 a 3.5 mg de nicotina después de fumar un cigarrillo.[4]

Aproximadamente el 30% del total de la nicotina en el humo hace contacto con la boca del fumador, la mayor parte de ésta pasa directamente al aire, por lo que resultan expuestas las personas que se encuentran junto al fumador especialmente en habitaciones pequeñas (fumadores pasivos).[5]

Mediante el uso de un monitor personal se ha estimado el nivel de exposición a la nicotina ambiental que resulta en individuos no fumadores en su ambiente habitual, la concentración promedio se calculó en menos de 45 mg/m^3 de aire en lugares donde se fuma, como dentro de carros, cafés, tiendas y

cantinas, mientras que la cantidad máxima estimada después de un dia de exposición fué de 310 mg, equivalentes a fumar activamente 0.31 cigarros ordinarios.[4]

Un 10% de la nicotina se elimina intacta por vía renal y el resto se degrada fundamentalmente en el hígado, en el humo del tabaco se han identificado unas 500 sustancias con importancia toxicológica, incluyendo la nicotina como; monóxido de carbono, alquitrán, arsénico, cromo, gases y vapores irritantes.[7]

Actualmente el número de fumadores mundiales continúa en aumento y como resultado de la exposición crónica se produce cancer pulmonar, bronquial, enfisema, asma y cardiopatías.[8] La principal substancia tóxica del tabaco es la nicotina, de otros compuestos nocivos no se han comprendido claramente sus efectos.[9]

Entre los principales indicadores de la evolución de un fumador se encuentran la nicotina, el tiocianato salival y el monóxido de carbono en el aire espirado.[10] A pesar de que existen antagonistas para nicotina que permitirían apoyar la retirada del hábito de fumar esto no sucede así, los pacientes muestran tendencia a fumar nuevamente dentro de los primeros 4 meses, puede resultar de utilidad el uso de gomas de mascar con nicotina, por otra parte, cuando se provoca la retirada súbita no resultan consecuencias adversas.[11] Sin embargo al parecer en el deseo de fumar interviene la funcionalidad mesolímbica y el sistema de monoaminas.[12]

A partir de la exposición aguda de ratas a nicotina o al humo de tabaco se produce analgesia, sin embargo después de repetir el tratamiento no se produce el mismo efecto por el desarrollo de tolerancia en muy corto periodo de tiempo, por otra

parte, el estres que resulta de la inmovilización tambien produce analgésia y tolerancia aunque en menor grado, lo que sugiere que en ambos fenómenos actuan mecanismos comunes, la información surgida de estos estudios también sugiere que existe una etapa inicial de tolerancia bien diferenciada seguida de dependencia como consecuencia del consumo prolongado de numerosos cigarrillos.[13]

En los productos de madres gestantes que fuman resultan diferentes clases de trastornos de severidad variable que dependen de factores como la edad, clase social y cuidados perinatales que recibe el feto; por esta razón, de los estudios con la población humana se obtienen resultados diferentes, esto no sucede con modelos animales con los que se logra un mejor control de las variables.[14]

Está demostrado que las hembras tienen una mayor tolerancia que los machos a los efectos de la nicotina, histológicamente se evidenció que estos últimos sufren severos trastornos en su capacidad reproductiva, aparte de trastornos hematológicos indicativos de procesos inflamatorios sistémicos manifestados por un incremento en el número de linfocitos y/o leucocitos polimorfonucleares.

Estos y otros resultados confirman que la nicotina tiene efectos adversos sobre la fertilidad de animales y humanos, contrariamente a lo que se habia afirmado anteriormente.[15]

Se ha establecido que existe una relación entre el hábito de fumar y la ocurrencia de preñez tubárica, entre mayor es el consumo de cigarros aumenta también el riesgo de este

trastorno, mismo que se reduce cuando las mujeres dejan de fumar antes de la concepción, sin que se haya establecido si la duración del hábito influye sobre lo anterior, al igual que otras condiciones como la edad en que se empezó a fumar, el número de cigarros al día y otras circunstancias, sin embargo está demostrado que esta patología es otra consecuencia del cigarro.[16]

Entre las patologías que resultan en productos de madres fumadoras están; bajo peso al nacimiento (en promedio 180 gr menos que los niños normales), presentación anormal durante el parto, malformaciones y parto prematuro,[17] además de que se potencian los efectos adversos resultantes por la anestesia materna.[18] Cuando las madres consumen más de 11 cigarros al día puede ocurrir muerte neonatal.[19] En estudios experimentales se ha demostrado que la nicotina provoca reducción del desarrollo del embrión de conejo "in vitro" en la etapa de blastocisto y de la síntesis de DNA.[20] En altas concentraciones la nicotina produce un efecto embriotóxico, sin embargo los niveles críticos necesarios para provocar este efecto difícilmente se alcanzan aun en fumadores bastante activos.[20]

Mediante estudios con microscopia de luz y de ultraestructura se ha demostrado que la nicotina tiene efectos gametotrópicos que son dosis dependientes, al parecer los trastornos que sufren los ovocitos (celulas sexuales) pueden considerarse como una respuesta inespecífica a la presencia de esta substancia. Estas células sufren trastornos en la organización de los componentes de membrana y en la estructura específica del complejo sinaptonémico, mientras que solamente con

altas dosis de nicotina se producen alteraciones en las células diploides ováricas.[21]

De las alteraciones maternas resultantes por la nicotina se han identificado anormalidades de la placenta,[21] isquemia placentaria con acumulación de metabolitos tóxicos,[22] ruptura prematura de membranas, hemorrágias durante el parto, placenta previa, desprendimiento retardado de membranas, aborto espontáneo y muerte perinatal.[22]

Como consecuencia de la isquemia placentaria pueden resultar embolia, muerte cerebral o hemorrágias subaracnoideas.[23] Junto con la isquemia placentaria se produce constricción de vasos sanguíneos uterinos con acumulación de hidrocarburos aromáticos e intoxicación por CO_2 con hiperplásia secundaria como respuesta placentaria compensatoria.[23]

Los abortos resultan con más de 10 cigarros diarios, particularmente cuando se asocia la nicotina con el alcohol y otras bebidas alcohólicas.[24]

Se ha podido demostrar que los fetos del sexo masculino resultan más afectados que las hembras, ocasionalmente el consumo de tabaco puede producir malformaciones congénitas como músculo-esqueléticas y hendiduras orales.[24] También resultan numerosas consecuencias adversas en los productos de madres fumadoras pasivas.[24]

A pesar de que no se han realizado suficientes trabajos que permitan comprender las alteraciones en madres gestantes en estudios con animales se ha establecido que el metabolito isotiocianato resultante del humo del tabaco se deposita en

los productos provocando toxicidad cuando se alcanzan altas dósis [25]

Cuando se daña el S.N.C. fetal como resultado de las alteraciones en el intercambio gaseoso transplacentario, y los efectos tóxicos que provocan diversos compuestos presentes en el tabaco se lesionan tambien las glándulas de regulación endócrina, entre estas la hipófisis, por lo que se manifiestan distintas anormalidades funcionales en los demás órganos que están regulados por ésta.[26]

A diferencia de las glándulas neuroendócrinas que tienen una importante influencia desde la vida prenatal y durante toda la vida del individuo, las gónadas desarrollan sus funciones mucho tiempo después del nacimiento, entre las principales está la producción de gametos para la reproducción de la especie y hormonas que permiten el desarrollo de los caractéres sexuales secundarios.[27]

Las actividades gonadales están reguladas por las gonadotrofinas del lóbulo anterior de la hipófisis, esta glándula desempeña un importante papel en los procesos reproductivos, al mismo tiempo, las hormonas producidas en los órganos genitales establecen un mecanismo de retroalimentación sobre la actividad hipofisiaria mediante el cual estimulan o inhiben la liberación de neurosecreciones según la concentración sérica de hormonas sexuales.[27]

El lóbulo anterior de la hipófisis está en estrecha relación funcional con el hipotálamo, donde se encuentran los principales centros reguladores del metabolismo y de la reproducción. A su vez, el hipotálamo está en conexión con el

tálamo y de esta forma establece relación con los órganos de los sentidos y la corteza cerebral. Por esta razón los fenómenos sexuales pueden estimularse o inhibirse a través de la percepción externoceptiva o la actividad cerebral.[20]

Los principales órganos de reproducción en el macho son los testículos, de la actividad secretoria de tres glándulas; vesículas seminales, próstata y glándulas bulbo-uretrales resulta un vehículo líquido para las células sexuales. Un sistema de conductos, el epididimo, los conductos espermáticos y la uretra, transportan la mezcla de células sexuales y de secreción exócrina que constituye el semen. El pene brinda la forma de introducir el semen al tracto reproductor de la hembra.[20]

La actividad funcional glándular femenina difiere fundamentalmente de la masculina, después de la pubertad la función ovular es periódica, por lo que la hembra solo puede fecundarse en ciertos momentos bién determinados.

También hay una gran diferencia en los fenómenos de multiplicación de los gametos, en los testículos las espermatogónias se dividen sin cesar durante toda la vida sexual del individuo para originar nuevos espermatozoides. En las hembras, por el contrario solo maduran algunos de los miles de folículos primordiales presentes en el ovario al nacimiento y el resto sufren atresia.

El ovario entra en actividad en la pubertad bajo la influencia de las gonadotrofinas del lóbulo anterior de la hipófisis, desde este momento el ovario desencadena fenómenos cíclicos de maduración folicular que afectan las demás

estructuras genitales (oviductos, útero, vagina) y al resto del organismo.[29]

Durante el período embrionario de multiplicación las gonias experimentan varias mitosis y dan lugar a espermatogonias y ovogonias que posteriormente se transforman en espermatocitos u ovocitos que después de la pubertad se convertirán en los gametos maduros destinados a la reproducción.[30]

En el presente trabajo se determinaron algunas de las alteraciones gonadales que resultan en productos machos y hembras de madres previamente expuestas a la inhalación de humo de tabaco en distintas etapas de la gestación, para también identificar la vulnerabilidad de los fetos según su sexo y el grado de desarrollo intrauterino, con el propósito de aumentar la información que permita comprender la fisiopatología que se realizó en productos humanos por el hábito de las madres de fumar en exceso.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existen algunos reportes sobre los distintos efectos que resultan en productos de madres expuestas a la inhalación de humo de tabaco, sin embargo no están completamente comprendidos los mecanismos fisiopatológicos de producción de lesión. Se sabe que la nicotina y la hipoxia son los principales agentes nocivos que afectan los fetos, además de otros compuestos químicos presentes en el humo y que al acumularse en los tejidos maternos o fetales pueden ocasionar distintos trastornos glandulares del S.N.C. y de los órganos que están regulados por este, por lo que en el presente estudio se analizarán los efectos sobre el desarrollo gonadal y corporal de crías prenatalmente expuestas al humo de tabaco durante distintos períodos de su desarrollo prenatal.

JUSTIFICACION

Debido al aumento creciente de fumadores activos, entre los que están incluidas madres gestantes, y por la falta de regulaciones sanitarias orientadas a disminuir el tabaquismo en nuestra sociedad, resulta necesario aumentar la información disponible sobre las alteraciones que resultan en productos de hembras gestantes fumadoras mediante el establecimiento de modelos animales, ya que existen reportes contradictorios de numerosas patologías gonadales y del S.N.C. de severidad variable que dependen principalmente de numerosas variables como duración de la exposición, edad de la madre, nivel educacional e ingreso económico entre otros.

HIPOTESIS

La inhalación de humo de tabaco por madres gestantes produce anoxia y acumulación tisular de sustancias tóxicas que afectan el desarrollo gonadal de los productos.

OBJETIVO GENERAL.

Determinar las alteraciones del desarrollo corporal y en la citoarquitectura gonadal de crías de ratas expuestas a la inhalación de humo de tabaco a partir de distintas etapas de la gestación.

OBJETIVOS PARTICULARES

1 Determinar las variaciones semanales en el peso corporal de madres gestantes durante la exposición al humo de cigarro y los posibles efectos sobre el número de crías al parto.

2 Registrar la longitud craneo-caudal, peso corporal y peso de las gónadas de las crías control y experimentales al nacimiento y a los 20 y 60 días de vida postnatal.

3 Analizar las diferentes clases de trastornos celulares en gónadas sobre los productos como resultado de la exposición al humo de tabaco en distintos períodos gestacionales.

4 Realizar un estudio histológico descriptivo en ovarios y testículos de animales recién nacidos control y experimentales y a los 20 y 60 días de edad.

MATERIALES Y METODOS.

Para el presente trabajo se utilizaron 20 ratas adultas *Sprague-Dawley* del segundo parto alojadas en jaulas individuales y mantenidas bajo condiciones de bioterio con temperatura y humedad controladas en ciclos de 12 horas luz-12 horas oscuridad, alimentadas a libre acceso con agua y Chow-Purina.

Mediante citología exfoliativa vaginal se determinó la etapa de proestro, en esta etapa se aparearon 3 ratas con un macho durante una noche y determinar el primer día de preñez mediante la identificación de espermatozoides en un frotis vaginal. Con las hembras gestantes se formaron cuatro grupos de 5 ratas cada uno, y se registró semanalmente el peso individual desde el primer día gestacional hasta el parto.

Los animales del primer grupo (E1) experimental fueron expuestos durante toda la gestación por 10 min 2 veces al dia con intervalo de 8 horas en una atmósfera saturada con humo proveniente de 1.5 gr de tabaco. Para lo anterior se utilizaron cigarros sin filtro con contenido normal de alquitran y de menor precio, debido a que están compuestos por tabaco que recibió el menor tratamiento para reducir la concentración de compuestos tóxicos.

El segundo grupo consistió de ratas que se expusieron del día 8 al 21 (E2) gestacional (a partir del segundo tercio de la gestación) bajo las mismas condiciones descritas. Para el tercer grupo los 5 animales fueron expuestos al humo de cigarro a partir del ultimo tercio de la gestación (E3) (15 a 21 días). Las

ratas restantes fueron las control (C) intactas que no se manipularon a través del estudio.

La exposición se realizó en una cámara hermética con paredes de cristal de 8 mm de espesor con 20 cm de alto, 20 cm de ancho y 35 cm de largo, en la parte superior de las dos paredes laterales se dejó un orificio circular de ventilación que se cerró durante la incineración del tabaco para saturar el ambiente, y se mantuvieron abiertos cuando se introdujeron simultáneamente dos ratas para la exposición.

Al momento del parto se determinó el número de productos nacidos vivos o muertos de las hembras control y experimentales y se registró el peso individual de las crías en una balanza granataria para pequeñas especies, para luego en forma aleatoria ajustar las camadas a 8 crías por rata. De los productos recién nacidos de cada rata se separaron 2 machos y 2 hembras que fueron sometidos a perfusión intracardiaca, para luego mediante disección fina se separaron las gónadas y registrar su peso (ovarios y testículos respectivamente). La diferenciación sexual de las crías se realizó con un aparato de transiluminación que permite distinguir la arteria testicular.

Para la perfusión se anestesiaron los animales con eter y una vez que se fijaron con cinta adhesiva a una base de madera se hizo toracotomía amplia para exponer el corazón e introducir en el ventrículo izquierdo una aguja corta biselada No. 23 para inmediatamente después hacer pasar una solución lavadora Ringer-Krebs con procaina al 0.1% y heparina (1,000 U.I./l) a 37ºC, pH 7.3, 0.1 M y 280 Mosm/l bajo una presion de 130 cm de agua por 3 min, seguida de una solución fijadora de

glutaraldehido al 2.5% y formaldehido al 1% amortiguados en solución de fosfatos 0.1 M pH 7.3 y 583 Mosm/l por 8 min. Después de la perfusión se postfijaron los tejidos por una noche a 4ºC en la misma solución fijadora.[31]

Cuando los productos control y experimentales alcanzaron 20 días de edad se hizo perfusión a dos machos y hembras de cada rata, por lo que solo quedaron 4 productos por madre que fueron destetados al día 21 postnatal para posteriormente perfundirse a los 60 dias bajo las mismas condiciones descritas.

Una vez postfijados los tejidos se lavaron mediante 2 cambios de 15 min con amortiguador de fosfatos 0.1 M y se deshidrataron en series crecientes de etanol y mezclas de etanol/xilol para luego incluirse en parafina orientados en sentido longitudinal para obtener cortes de 5 fm de espesor en un microtomo manual Américan Optical SL/20. El material se tiñó con hematoxilina-eosina para obtener fotomicrografías en un Fotomicroscópio Zeiss Fomi-III con pelicula Plus-x-Pan de 35 mm y ASA 125 en las que se hizo; a) identificación de las estirpes celulares gonadales, b) análisis de la densidad numérica, arreglo y distribución de las distintas poblaciones, c) aspecto celular individual, especialmente los indicios de maduración, d) identificación de posibles alteraciones de la población celular residente normal o la presencia de alteraciones tisulares e) definición de la intensidad del daño y su extensión.

El peso de las hembras durante la gestación y los parámetros morfométricos como; bajo peso al nacimiento, longitud cráneo-caudal y peso de gónadas de las crías se analizaron

mediante el método estadístico de varianza aleatorizado con un nivel de significancia de 0.05%.[32]

DISEÑO EXPERIMENTAL

20 hembras adultas Sprague-Dawley

ETAPA PRENATAL

5 ratas intactas (control)

5 ratas expuestas toda la gestación

5 ratas expuestas 2do. tercio gest.

5 ratas expuestas último tercio gest.

ETAPA POSTNATAL

Determinación de Parámetros Somatométricos

Perfusión con sol. glutaraldehido al 2.5% y formaldehido amortiguado en fosfato 0.1M pH 7.3, dos hembras y dos macchos al nacimiento, 20 y 60 días de edad.

Deshidratación, inclusión en parafina y cortes en microtomo de testículos y ovarios.

Tinción de cortes histológicos

Hematoxilina-Eosina

Observación al microscopio de cortes histológicos.

Análisis estadístico de los datos obtenidos.

RESULTADOS

Durante el estudio no se produjo adicción al humo debido a que siempre se observó cierta resistencia de las ratas a ingresar a la cámara, a lo largo del experimento esta se redujo por la manipulación repetida.

Efectos de la exposición prenatal activa al humo de tabaco sobre las madres y la progénie.

No hubo diferencias en el número de crías nacidas de los diferentes grupos control y experimentales. En las crías expuestas el último tercio de la gestación se produjo la mayor mortalidad (18.86%), en la progénie expuesta toda la gestación fué de 11.76%, en el grupo expuesto a partir del segundo tercio presentó el menor porcentaje de mortalidad (Cuadro 1). En todas las crías experimentales muertas se observó bajo peso corporal y severo retardo en el desarrollo intrauterino.

H E M B R A S.

Parámetros somatométricos.

Al nacimiento las crías provenientes de ratas expuestas a partir del segundo tercio de la gestación tuvieron el mayor peso corporal que no difirió de las expuestas el último tercio sobrepasó el de las control ($P<0.05$). A los 20 días de edad el grupo expuesto el último tercio alcanzó el mayor peso que fué significativamente diferente a los demás grupos experimentales y control que no difirieron entre si ($P<0.05$).

A los 60 días de edad el mayor peso corporal correspondió al grupo expuesto toda la gestación que fué superior al peso de las demás crías experimentales y control, ($P<0.05$) (Cuadro 3).

Al parecer no se manifestó ningún efecto sobre el peso corporal atribuible al tiempo total de exposición prenatal al humo de tabaco.

Tamaño.

Al nacimiento y 20 días de edad no hubo diferencias significativas entre los grupos experimentales y control, a los 60 días de edad la mayor longitud craneo-caudal correspondió a las crías control, que difirió de la progenie expuesta toda la gestación y la del último tercio sin que se manifestara ninguna relación dosis-respuesta.

Peso de ovarios.

Al nacimiento el grupo control presentó el mayor peso de los ovarios ($P<0.05$). A los 20 y 60 días no hubo diferencias significativas entre la progénie control y experimental ($P<0.05$), (Cuadro 3).

M A C H O S.

Peso corporal.

Al nacimiento, las crias de madres expuestas los días 8-21 gestacionales revelaron un peso significativamente mayor que los demás grupos experimentales y semejante al control ($P<0.05$).

A los 20 días de edad el mayor peso se encontró en la progénie expuesta en el último tercio gestacional que sobrepasó a los demás grupos ($P<0.05$). A los 60 días no hubo diferencias significativas entre los diferentes grupos, (Cuadro 2).

Tamaño.

Al nacimiento no hubo diferencias significativas en la longitud craneo-caudal de la progénie control y experimental ($P<0.05$).

A los 20 días de edad las crías expuestas el último tercio de la gestación tuvieron el mayor tamaño, significativamente diferente al de las crías expuestas toda la gestación. A los 60 días de edad el mayor tamaño correspondió a la progénie control ($P<0.05$), (Cuadro 2).

Peso testicular.

Al nacimiento los productos control revelaron el mayor peso (0.00846 gr) que difirió significativamente de todos los grupos experimentales, a los 20 y 60 días no se identificaron diferencias ($P<0.05$), (Cuadro 2).

Análisis histológico descriptivo.

Se estudiaron ovarios y testículos en diferentes planos de corte en las tres edades postnatales.

T E S T I C U L O S.

Se analizaron las siguientes estructuras; epitelio germinativo, tejido conectivo intersticial, túbulos, células de Leydig, espermatogónias, células de Sertoli y espermatozoides, (Fig. 1).

Al nacimiento y 20 días de edad no se encontró epitelio germinativo activo en ninguna de las muestras examinadas, a los 60 días se encontraron células germinales en todas las laminillas control examinadas, en la progénie expuesta toda la gestación se observó reducción (Cuadro 4), (Fig. 2 y 2a).

El tejido conectivo intersticial mostró un arreglo menos compacto en todas las muestras experimentales examinadas al nacimiento y 20 días de edad, resultaron afectados un mayor número de los productos prenatalmente expuestos toda la gestación y del día 8 a 21, (Cuadro 4), (Fig.3). A los 60 dias se conservaron las diferencias descritas entre las crias control y experimentales.

Al nacimiento la progénie expuesta toda la gestación reveló una menor cantidad de túbulos seminiferos, (Fig. 3) y en menor grado se afectaron los otros grupos experimentales. A los 20 días de edad se observó una cantidad reducida de túbulos en el grupo expuesto toda la gestación y menos severa en las crías expuestas desde el primer tercio. No se afectaron los productos expuestos el último tercio gestacional. A los 60 días solamente se observó un desarreglo celular tubular en la progénie expuesta

toda la gestación, sin que hubiera diferencias en el número de túbulos entre los demás grupos experimentales y el control, (Cuadro 4), (Fig. 3).

Células de Leydig; al nacimiento se encontró una menor cantidad en la progénie expuesta del día 1-21 gestacional, los demás grupos experimentales se afectaron en menor grado, a los 20 días se repitió el mismo fenómeno, solo que en el grupo 1-21 se observó indiferenciacion celular. A los 60 días todos los animales experimentales revelaron una menor cantidad de estas células, resultando más afectados los productos expuestos toda la gestación, (Cuadro 4), (Fig. 3).

Células de Sertoli; a través del estúdio no se identificaron diferencias en la apariencia y número de células de Sertoli control y experimentales, (Cuadro 4), (Fig. 4).

Espermatogónias; al nacimiento no hubo diferencias en la cantidad de espermatogónias control y experimentales, a los 20 y 60 días solamente un animal del grupo expuesto toda la gestación reveló disminución numérica, (Fig. 5a).

Espermatozoides inmaduros; se observaron claramente diferenciados en los tejidos de animales control de 60 días de edad, estuvieron completamente ausentes en todas las muestras de crías expuestas toda la gestación, (Fig. 6), en las que se observaron espermatogónias. Se encontraron espermatogónias en menor cantidad en la mayoría de los tejidos de productos expuestos del día 8 a 21 y el último tercio gestacional, el aspecto de éstos reveló inmadurez respecto a los controles, (Cuadro 4).

O V A R I O S

No se observaron diferencias en el arreglo del ovario de las crías control y experimentales en las diferentes edades.

Cuadro 1

TAMAÑO DE NACIMIENTOS Y PORCENTAJE DE MORTALIDAD

	NUMERO DE CRIAS NACIDAS	TAMAÑO PROMEDIO DE LA CAMADA	NUMERO DE CRIAS NACIDAS MUERTAS	% DE MORTALIDAD
CONTROL	45	9	3	6.25
E1	45	9	6	11.76
E2	53	10.6	1	1.85
E3	43	8.6	10	18.86

E1= Gestación completa E2= Segundo tercio gest. E3= Ultimo tercio gest.

Cuadro 2

Parámetros somatométricos de crias machos.

		D I A S			D E			E D A D		
		01			20			60		
	GRUPOS	n	X	D.E.	C.V.(%)	n	X	D.E.	C.V.(%)	n	X	D.E.	C.V.(%)
Peso corporal. (gr)	C	28	5.72 ab	± 0.86	15.10	11	37.17 b	±7.17	19.29	10	134.21 a	±10.12	7.54
	E1	30	5.44 b	± 0.58	10.72	14	29.37 b	±7.05	24.00	3	178.50 a	± 8.84	4.95
	E2	32	6.28 a	± 0.67	10.71	17	29.81 b	±5.75	19.28	9	149.13 a	± 7.40	11.89
	E3	28	5.69 b	± 0.77	13.68	10	49.31 a	±8.13	16.49	3	145.40 a	±42.89	29.59
Longitud craneo caudal. (cm)	C	28	6.37	± 0.40	6.43	11	15.9 ab	±1.59	10.0	10	36.20 a	± 1.53	4.44
	E1	30	6.07 a	± 0.35	5.81	14	14.9 b	±1.48	9.9	3	32.16 b	± 1.60	4.99
	E2	32	6.17 a	± 0.57	9.24	17	15.6 ab	±1.54	9.8	9	30.10 b	± 1.05	6.09
	E3	28	6.35 a	± 0.44	7.07	10	17.38 a	±1.83	10.3	3	29.56 b	± 4.05	13.70
Peso de testículos (gr)	C	5	0.0084a	±0.003	55.00	5	0.0226a	±0.0226	10.83	6	2.30a	±0.2099	9.12
	E1	5	0.0034b	±0.000	14.36	5	0.1898a	±0.0438	25.44	8	2.35a	±0.1324	5.63
	E2	5	0.0033b	±0.000	12.42	5	0.0237a	±0.0237	13.66	6	2.78a	±0.6304	22.67
	E3	5	0.0034b	±0.003	17.54	5	0.1903a	±0.1903	13.39	3	2.68a	±0.4872	18.17

C= Control E1= Gestación completa E2= Desde segundo tercio gest. E3= Ultimo tercio gest.
n= Número de muestras
Comparación con la prueba de Duncan para determin ar diferencias entre grupos a partir del análisis de varianza completamente aleatorio, las letras (a) y (b) representan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control y experimentales a un nivel de significancia $P<0.05$.

Cuadro 3

Parámetros somatométricos de crias hembras.

			DIAS DE EDAD										
			01				20				60		
	GRUPOS	n	X	D.E.	C.V.(%)	n	X	D.E.	C.V.(%)	n	X	D.E.	C.V.(%)
Peso corporal. (gr)	C	18	5.18 b	± 0.70	7.8	9	28.27 b	±7.05	24.08	3	126.65 b	± 3.72	2.94
	E1	21	4.95 b	± 0.75	15.0	11	28.70 b	±9.16	31.97	6	144.83 a	± 9.36	6.46
	E2	21	6.04 a	± 0.58	9.6	11	28.00 b	±5.86	20.92	3	97.52 b	±23.67	18.21
	E3	24	5.4 ab	± 0.77	7.0	11	44.40 a	±10.73	24.16	9	144.30 a	±16.42	11.70
Longitud craneo caudal. (cm)	C	18	6.11	± 0.61	7.8	9	14.60	± 1.08	7.39	3	34.55 a	± 1.53	4.44
	E1	21	5.99	± 0.38	6.4	11	15.31	± 1.63	10.64	6	31.63 b	± 1.04	3.28
	E2	21	6.12	± 0.35	5.7	11	15.00	± 1.22	8.18	3	29.75 ab	± 1.34	4.46
	E3	24	6.28	± 0.35	5.6	11	16.65	± 1.85	11.11	9	30.36 b	± 1.20	3.95
Peso de ovarios (gr)	C	5	0.0039a	±0.0028	68.00	5	0.1268	±0.0219	17.27	3	0.3951a	±0.0753	19.05
	E1	5	0.0023b	±0.0005	21.18	5	0.1374a	±0.0299	21.76	7	0.3489a	±0.1085	31.09
	E2	5	0.0018b	±0.0001	5.29	5	0.1470a	±0.0166	11.29	6	0.2542a	±0.0538	21.16
	E3	5	0.0021b	±0.0012	45.00	5	0.1337a	±0.0343	25.6	3	0.3238a	±0.0851	26.28

C = Control E1= Gestación completa E2= Desde segundo tercio gest. E3= Ultimo tercio gest.
n= Número de muestras
Comparación con la prueba de Duncan para determinar diferencias entre los grupos a partir del análisis de varianza completamente aleatorio, las letras (a) y (b) representan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control y experimentales a un nivel de significancia de $P<0.05$.

Cuadro 4

Alteraciones por la exposición prenatal al humo de tabaco en la organización celular testicular.

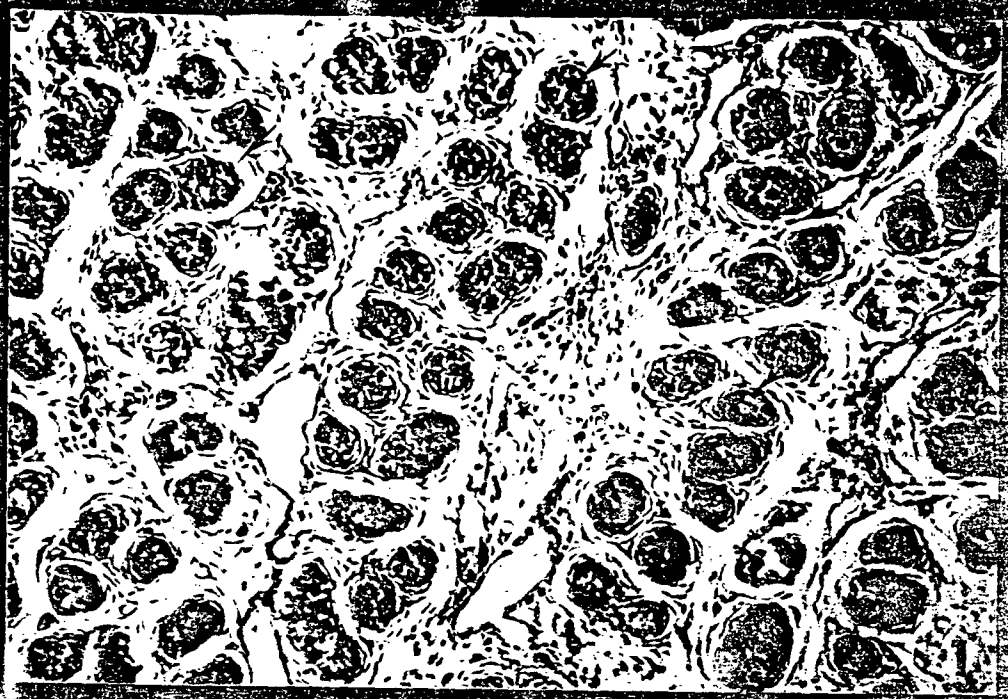
GRUPOS	Estructuras examinadas						
	AL NACIMIENTO						
	Epitelio germinativo (cantidad)	Tej. Conect. Intersticial	Tubulos (cantidad)	Celulas de Leydig (cantidad y aspecto)	Células de Sertoli (cantidad y aspecto).	Espermatogonias (cantidad)	Espermatozoides (cantidad)
CONTROL	No existe por inmadurez (5/5)	Compacto y denso (5/5)	Numerosos (5/5)	Abundantes y diferenciadas (5/5)	Abundantes y diferenciadas (5/5)	Numerosas (5/5)	No existen por inmadurez (5/5)
1-21	(5/5)	Escaso y disperso (3/5)	Escasos (3/5)	(5/5)	(5/5)	Escasas (1/5)	(5/5)
8-21	(5/5)	Escaso y disperso (3/5)	Moderados 4/5	(5/5)	(5/5)	(5/5)	(5/5)
15-21	(5/5)	(5/5)	Moderados (4/5)	(5/5)	(5/5)	(5/5)	(5/5)
	20 DIAS DE EDAD						
CONTROL	(5/5)	Compacto y denso (5/5)	Numerosos (5/5)	Abundantes y diferenciadas (5/5)	Abundantes y diferenciadas (5/5)	Abundantes (5/5)	(5/5)
1-21	(5/5)	Disperso y escaso (3/5)	Escasos (3/5)	Escasas e idiferenc. (3/5)	(1/5)	Escasas (2/5)	(5/5)
8-21	(5/5)	Disperso y escaso (2/5)	Moderados (4/5)	(5/5)	(5/5)	(5/5)	(5/5)
15-21	(5/5)	Disperso y escaso (2/5)	(5/5)	(5/5)	(5/5)	(5/5)	(5/5)
	60 DIAS DE EDAD						
CONTROL	Abundante (5/5)	Compacto y denso (5/5)	Arreglo celular Numerosos (5/5)	Moderadas y diferenciadas (5/5)	Abundantes y diferenciadas (5/5)	Abundantes (5/5)	Abundantes (5/5)
1-21	Escaso (3/5)	Disperso y escaso (3/5)	Desarreglo celular (3/5) y escasos	Escasos parcialmente diferenciadas (3/5)	(1/5)	(2/5)	Ausencia (5/5)
8-21	(5/5)	Disperso y escaso (2/5)	(5/5)	(4/5)	(5/5)	(5/5)	Moderados (5/5)
15-21	(5/5)	Disperso y escaso (2/5)	(5/5)	(4/5)	(5/5)	(5/5)	Moderados (5/5)

Fig. 1

Fotomicrografía a baja amplificación que muestra el arreglo histológico normal de un corte testicular al nacimiento, se aprecia la distribución organizada de grupos de túbulos (Flecha), así como abundante tejido conectivo en el que están presentes células de Leydig indiferenciadas (*) H/E, 544 x.

Fig. 2

Crías de 60 días de edad prenatalmente expuestas toda la gestación. Se observa una reducción en la población celular que compone el epitelio germinativo (Cabeza de flecha), Fig. 2a, Amplificación de un túbulo que muestra la reducción en la población celular correspondiente al epitelio germinativo (*) H/E, 212 x, 480 x.


1

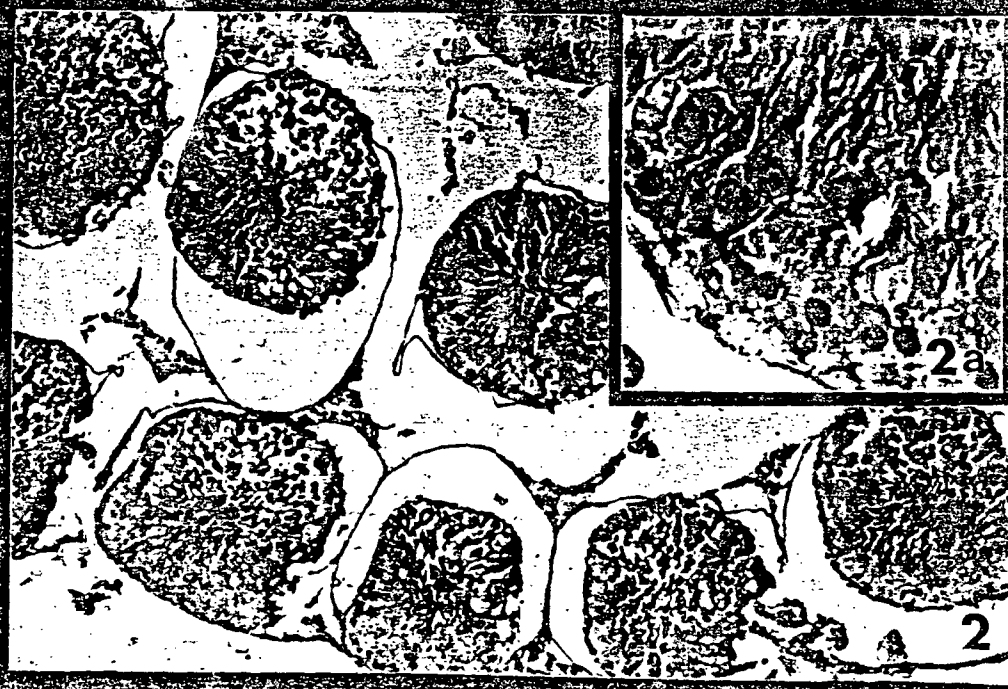
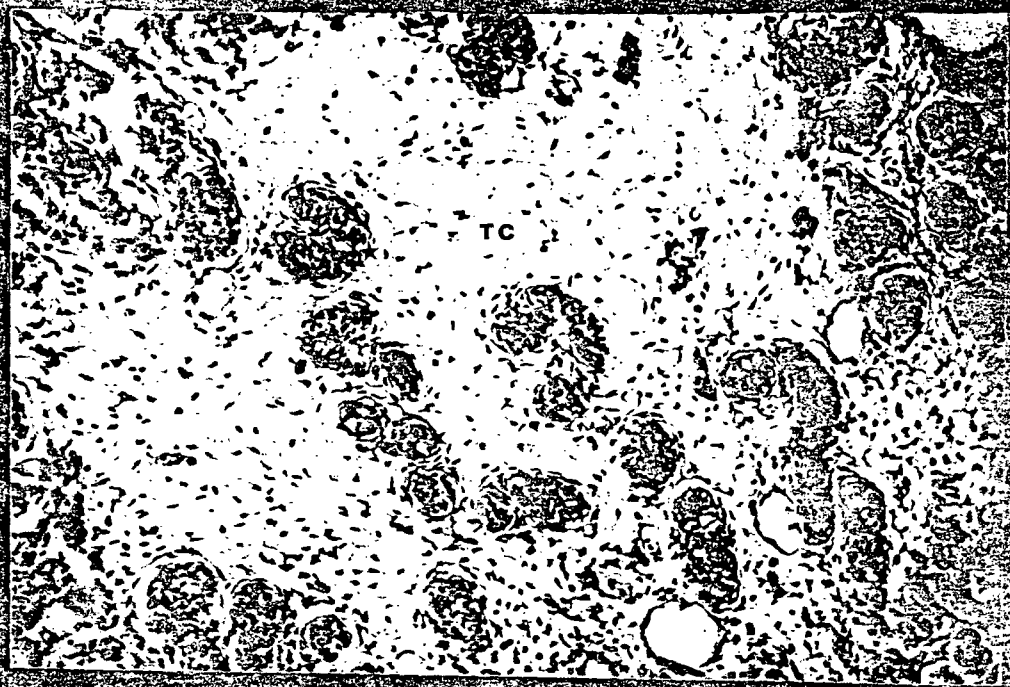

2a
2

Fig. 3

Animales recién nacidos expuestos toda la gestación. Se aprecia una disminución del lumen tubular (*) y reducción de la cantidad normal de tejido conectivo intertubular y las estirpes celulares presentes en éste (tc) H/E, 896 x.

Fig 4.

Control de 60 días de edad. Alta amplificación de un túbulo seminífero donde se observan las células de Sertoli (Flechas) y espermatozoides (Cabeza de flecha) en estadío inicial de maduración H/E, 752 x.


TC

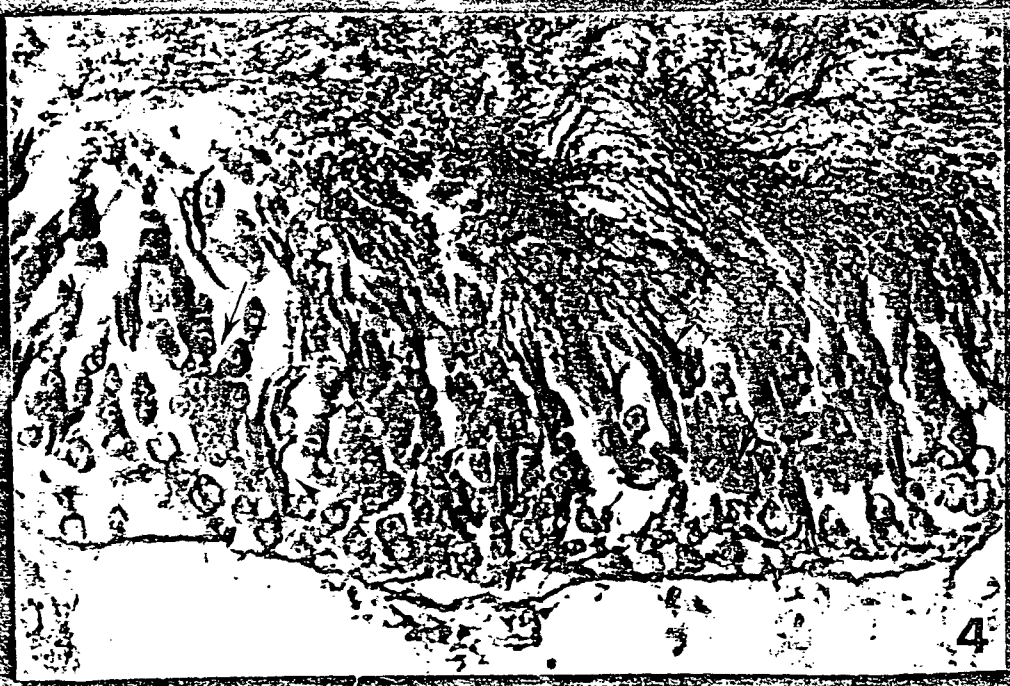
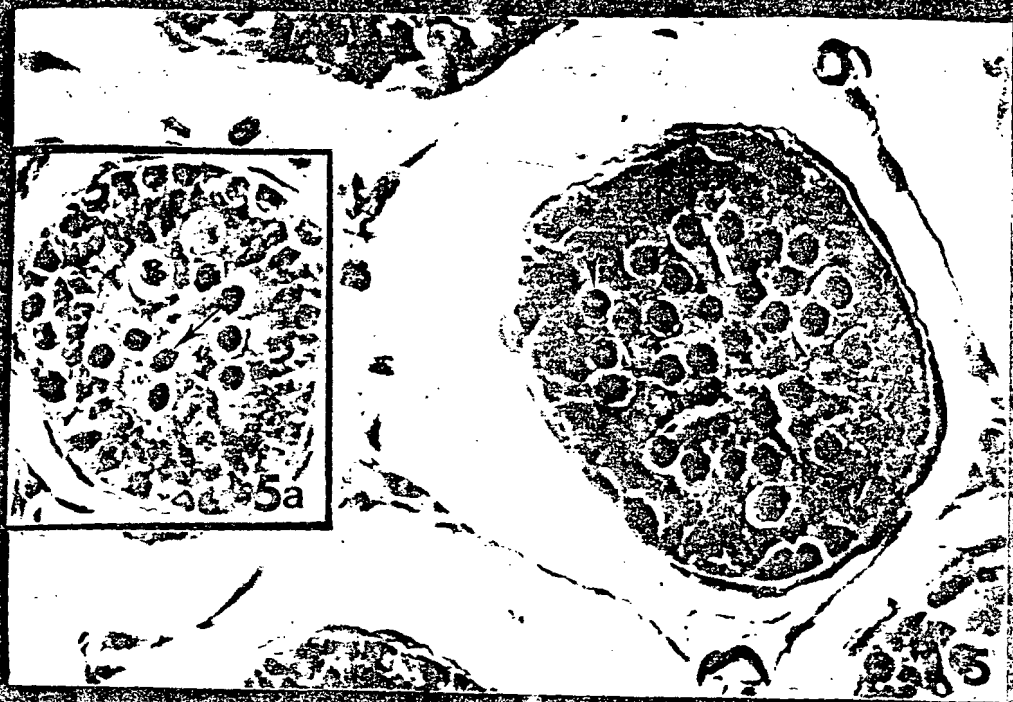

4

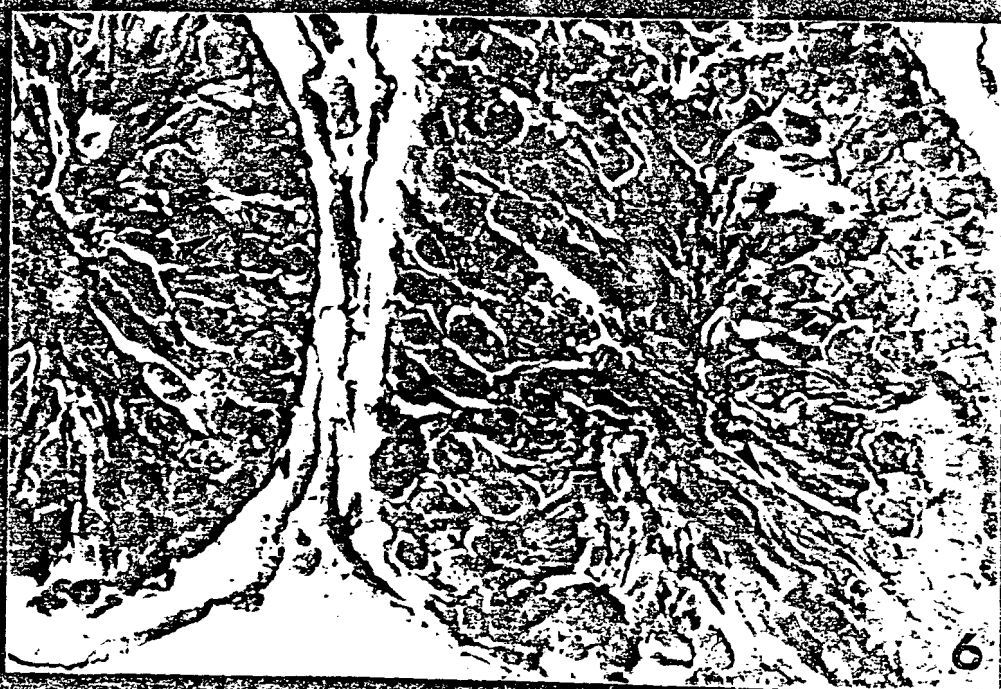
Fig. 5

Moderada amplificación de túbulos seminíferos de una cría control de 20 días de edad que revela abundantes espermatogónias (Cabeza de flecha), Fig. 5a Se muestra la cantidad disminuida de espermatogónias en un corte de testículo de una cría expuesta toda la gestación (Flecha) H/E, 416x, 480x.

Fig. 6

Animales expuestos toda la gestación de 60 días de edad. Se observa la ausencia completa de espermatozoides en túbulos (Cabeza de flecha) H/E, 640 x.


5a
5


6

DISCUSION

Durante la exposición al humo no se provocó estres a las ratas, éstas mantuvieron un consumo normal de alimento y agua, por lo que la manipulación no provocó efectos adversos adicionales a los del humo como ha sido previamente reportado por otros estudios semejantes.[13] Dentro de la cámara las ratas sufrían irritación de las fosas nasales, por lo que se frotaban constantemente la nariz, ésta molestia desapareció posteriormente, la presencia de los dos orificios laterales de ventilación en la cámara permitió controlar su ventilación, ya que regularmente se acercaban a aspirar aire fresco cuando el humo les provocaba malestar.

La resistencia permanente a ingresar a la cámara indica que no se desarrolló adicción al humo como se ha descrito en otros modelos de autointoxicación con ratas.[13]

La mortalidad observada en las crías experimentales fué atribuible al hecho de que la exposición al humo afectó con más severidad a los productos con menor desarrollo intrauterino, todas las crías que murieron manifestaron aspecto de inmadurez músculo-esquelética, indicativa de que pudo haber ocurrido incapacidad respiratoria por desarrollo incompleto del centro respiratorio y/o pulmones, (Cuadro 1).

Los efectos adversos resultantes por la exposición al humo del tabaco durante diferentes periodos de la gestación no se manifestaron homogéneamente en toda la progénie posiblemente debido a que no se alcanzó la acumulación suficiente de combuestos toxicos en la atmósfera experimental, la baja frecuencia de exposición y los mecanismos adaptativos que

desarrollaron las madres para tolerar los niveles crecientes de carboxihemoglobina circulante en sangre, mediante la estimulación de cuerpos carotídeos y modificación de la presión parcial de gases en alveolos, además de aceleración en los mecanismos de depuración hepato-renales, sobre todo por la inducción de enzimas microsomales específicas en el hígado. [33]

Lo anterior se evidenció al comparar los efectos resultantes entre los grupos sometidos a diferente tiempo total de exposición, las hembras expuestas toda la gestación no revelaron alteraciones notablemente mayores que las observadas en los otros grupos experimentales, mismas que se hubieran manifestado por reabsorciones embrionarias o abortos, además de trastornos severos en el desarrollo normal de la progénie, (Cuadro 1).

Asimismo, resultó evidente la diversidad de respuestas entre compañeros de camada control y experimentales, ésta se debió a las limitaciones en la regulación materno-fetal que ocasiona diferente tamaño y peso corporal según el número de productos por madre (Cuadro 2,3). Lo anterior se debe al mecanismo de nutrición hemato-placentario que suministra diferentes cantidades de nutrientes a los productos según su localización intrauterina, aparte que no sucede la fecundación simultánea de todos los óvulos liberados, por lo que las diferencias en la edad embrionaria se reflejan en distinta vulnerabilidad prenatal.

A través del estudio no pudo identificarse una relación directa causa/efecto entre duración de la exposición y anormalidades de los productos.

Las condiciones experimentales del presente modelo pueden compararse a las situaciones donde mujeres gestantes consumen un bajo número de cigarrillos durante la gestación (menos de 6), éste no corresponde a un modelo de intoxicación aguda, cuyo equivalente en humanos implicaría el consumo diario de 10 cigarrillos o más, independientemente de las situaciones donde sucede exposición pasiva por períodos prolongados de tiempo, como en el interior de autobuses, cafés, tiendas y cantinas.

A pesar de que no se manifestaron diferencias entre los productos machos y hembras experimentales para los parámetros somatométricos evaluados, la toxicidad del humo de tabaco se evidenció en el exámen histológico gonadal de los machos. Se afectó el desarrollo testicular normal a pesar de los mecanismos protectivos maternos desarrollados, (Figs. 3 y 6), (Cuadro 4).[33]

Estos datos no están de acuerdo con los reportados por otros autores quienes afirman una mayor vulnerabilidad de las hembras a los efectos de la nicotina [15], la susceptibilidad de los machos se debe al distinto patron de desarrollo de las células germinales en la vida postnatal.[33]

En las hembras inmaduras los gonocitos primarios aparecen en el saco vitelino del embrión de 20 días y luego migran a las gónadas, al tercer mes las ovogónias entran en meiosis 1 y se detienen en el diplonema hasta la pubertad, donde los cromosomas quedan en un estado no condensado. Cuando el óvulo sale del folículo se produce el primer glóbulo polar, la segunda división meiótica tiene lugar si hay fecundación, por lo tanto estás células no presentan demandas matabólicas. En el caso de la espermiogenesis no existe una interrupción tan prolongada de los

cambios maduracionales ya que en el embrión masculino los gonocitos migran a los tubos seminíferos y la meiosis comienza en la pubertad.[34,35]

Por otra parte, un hallazgo constante fué la conservación de las características normales histológicas en la población de células de Sertoli, esta estirpe ha sido reportada como más resistente a efectos nocivos adversos (Fig. 4),[34] posiblemente lo anterior se deba a su diferente línea de diferenciación celular y mecanismo de nutrición, ya que por estar más distales de los capilares sanguíneos el fluído intersticial actúa con un sistema amortiguador para mantener constante el medio ambiente intercelular.

En el presente estudio no fué posible determinar la severidad de las alteraciones reproductivas, sería necesario realizar estudios genéticos especializados que revelaran posibles alteraciones cromosomales después de períodos prolongados de exposición a elevadas dósis de los compuestos tóxicos del tabaco.

Por todo lo anteriormente expuesto, resulta evidente que el tabaco es potencialmente capaz de alterar la fertilidad de los animales, sin que sea posible determinar la severidad de éstos cambios, ya que aún en los casos más severos observados en el presente estudio, donde estaban completamente ausente los espermatozoides (Fig. 6), es posible que con la edad suceda diferenciación y desarrollo posterior de éstos.

Los hallazgos más importantes de este estudio consistieron en demostrar la vulnerabilidad de testículos inmaduros a bajas dosis de exposición materna al humo, lo que demuestra que no

existió ninguna barrera hemato-placentaria o hemato-testicular que restringiera el ingreso de los compuestos tóxicos presentes en el humo inhalado del tabaco incinerado.

CONCLUSIONES

1.- No hubo diferencias en el número total de las crías nacidas control y experimentales.

2.- La mayor mortalidad neonatal (18.6%) se produjo en la progénie prenatalmente expuesta del día 15-21 gestacional, seguida del grupo expuesto toda la gestación.

3.- A través del estudio no se observó una relación causa-efecto en las crías experimentales respecto a los parámetros somatométricos evaluados en machos y hembras.

4.- Solamente se identificaron alteraciones histológicas gonadales en productos machos, la severidad de estas estuvo relacionada con el tiempo total de exposición.

5.- Las alteraciones testiculares fueron; desarrollo incompleto, disminución de la población celular en determinadas estirpes y ocasionalmente ausencia completa de espermatozoides, sin que pueda determinarse la reversibilidad de la azoospermia.

6.- No se produjo adicción al humo pero si tolerancia materna a la hipoxia y los demás efectos toxicos del humo.

BIBLIOGRAFIA

1.- Gaddum J. H. (1955). Farmacology. Edit. Reverté, S.A. p. 230.

2.- Vean, L. B. (1973). Historia de las drogas. Edit. Bruguera. p. 304.

3.- Kuschinafy, G. y Lullman H. (1968). Manual de Farmacología. p. 10-328.

4.- Muramatsu, M., Umemura, S., Fukui J., Arai, T. y Kira, S. (1987). Estimation of personal exposure to ambient nicotine in daily environment. Int Arch Occup Environ Healt., 59; 545-550.

5.- Farmacología Drill: (1969) Edit. Fournier, S.A. p. 577.

6.- Rusticalli, B. y Mocci, C. (1982). Smoking and pregnancy; clinical and social considerations. Dif Soc. 61; 116-120.

7.- Wertelecki, W., Hoff, C. y Zansky, S. (1987) Maternal smoking grater effect on males, fetal tobacco syndrome. Teratology, 35; 317-320.

8.-Stookey, G. K., Olson, B. L. y Drook, C. A. (1987) Evaluation of biochemical validation measures in determination of smoking status. J. Dent. Res. 66; 1597-1601.

9.- Tonnensen, P. y Gunnersen, A. B. (1987) Attemps to break the smoking habit in hospital staff: A pilot experiment. Ugeskr Laeg., 149; 1765-1767.

10.-Rowell, P. P., Carr, L. A. y Garner, A. C. (1987) Stimulation of tritiated dopamine release by nicotine in rat nucleus accumbeus. J. Neurchem., 48: 1449-1454.

11.- Mousa, S. A., Aloyo, V. J. y Van-Loon, G. R. (1988) Tolerance to tobacco smoked and nicotine-induced analgesia in rats. Pharmacol. Biochem. Behav., 31; 263-268.

12- Boracchi, P. I., De-Scrilli, C. A., Cortinovis, M., Milani, C., Bertulessi, A., Marconi, G., Parsi, G., Zuliani, G. y Bevilacquia, A. (1987) Smoking habit in pregnancy and sociodemographic backgroup in six Italian Centres. Genus., 42; 53-70.

13.-Bell, B. A. y Ambrose, J. (1982) Smoking and the risk of stroke. Acta Neurochir., 64; 1-8.

14.- Riesenfeld, A. y Oliva, H. (1988). Effects of nicotine on fertility, citology and life span of male rats. Acta Anat. 131; 171-176.

15.- Chow, W. H., Daling, J. R., Weiss, N. S., y Voigt, L. F. (1988) Maternal Cigarrete smoking and tubal pregnancy. Obstet. Gynecol., 71; 167-170.

16.-Van-Der Veen, F. y Fox, H. (1982) Effects of cigarette smoking on the human placenta; A light microscopic and electron microscopic study placenta. Acta Anat., 131; 243-256.

17.-Bounannd, G., Lenzato, G. y Maisto, F. (1984) Smoking in pregnancy; Smoke-addicted pregnant women give birth lean body mass alewborns. Osp. Ital. Pediatr. (Spec-Chir), 19; 16-22.

18.-Hjalmarson y Agneta, J. M. (1984) Effect of nicotine chewing gun smoking cessation; A randomized, placebo controlled, double blind study. JAMA., 522; 2835-2838.

19.- Stern, R. A., Prochaske, J. O. y Velicer, W. F. (1987) Stages of adolescent cigarette smoking acquisition: Measurement and sample profiles. Addict. Behav., 12; 319-330.

20.- Ignateva, E. L., Kurilo, G. V., Mardanova, y Sheveleva, G. A. (1987) Analysis of the damaging effect of various doses

of nicotine on female sex cell in rat fetuses. Tsitol. Genet. 21; 91-94.

21.-Balling, R. y Beir, H. M. (1985) Direct effects of nicotine on rabbit preimplantation embryons. Toxicology, 34; 309-314.

22.-Eriksen, P. S., y Marsall, K. (1987) Circulatory changes in the fetal aorta after maternal smoking. Br. J. Obstet. Gynecol., 94; 309-314.

23.-Eldon, M. A., Luecker, P. W., Macgee, J. y Ritschel, W. A. (1987) The effect of acute withdrawal from cigarette smoking on indocyanine green and antypirine clearance. J. Clin. Pharmacol., 27; 226-232.

24.- Helminki, K., Peritti, M., y Saloniemi, I. (1983) Smoking and the ocurrence of congenital malformations and spontaneous abortions; Multivariate analysis. Am. J. Obstet. Gynecol., 145; 61-66.

25.- Bottoms, S. F. y Kuhnert, B. R. (1982) Maternal passive smokin and fetal serum thiocyanate levels. Am. J. Obstet. Gynecol., 144; 787-791.

26.- De la Torre González, P. (1987) Alteraciones del desarrollo testicular prenatal de ratas por efecto de la exposición materna a cloroformo y eter. "Estudio histológico". Tesis de licenciatura. Universidad de Guadalajara. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

27.- Erich Kolb. (1974). Fisiologia Veterinaria. Edit. Acribia Volumen 2, 2a. ed. pp. 735-763.

28.- Marshall, P. T. y Hughes, G. M. (1980) Physiology of mammals and other vertebrates. Second Edition Cambridge University Press, Second Edition pp. 313-324.

29.- Fawcet M. D. (1986) Histology. W.B. Saunders Company. p.p. 851-900.

30.- Windle W. F. (1977). Histologia. Edit. McGraw-Hill. p.p. 522-577.

31.- Feria-Velasco, A. y Karnovsky, M. J. (1970) Preservación óptima del sistema nervioso central por perfusión con glutaraldehído para estudio ultraestructural. Arch. Inv. Med. (Méx.) 1; 201-220.

32.- Murray R. Spiegel. (1961). Estadística. McGraw-Hill Inc, U.S.A.

33.- Beaudion A. R. (1980) Embryology and Teratology. The laboratory rat. vol.11. pp. 86-92.

34.- De Robertis y De R. (1980). Biologia Celular y Molecular. Edit Ateneo, décima edición. pp. 379-391.

35.- Avers J. CH. (1983). Biologia Celular. Edit. Iberoamericana. pp. 447-453.