

Universidad de Guadalajara

Facultad de Ciencias Biológicas



Biblioteca de la Facultad
de Ciencias.

Alteraciones Cerebelares en Productos de Ratas
Expuestas Durante la Gestación a la Inhalación
de Humo de Tabaco

Tesis Profesional

Que para obtener el Título de:

Licenciado en Biología

Presenta:

Carlos Alberto Campos Bravo

Guadalajara, Jalisco, 1991.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS

Expediente

Número 1244/89

SR. CARLOS ALBERTO CAMPOS BRAVO
P R E S E N T E . -

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido -
aprobado el tema de tesis "ALTERACIONES CEREBELARES. EN PRO__
DUCTOS DE RATAS EXPUESTAS DURANTE LA GESTACION A LA INHALA__
CION DE HUMO DE TABACO" para obtener la Licenciatura en Biolo__
gía.

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.



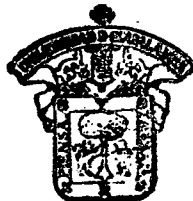
A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"
Guadalajara, Jal., Octubre 6 de 1989
EL DIRECTOR

ING. ADOLFO ESPINOZA DE LOS MONTEROS CARDENAS

FACULTAD DE CIENCIAS

EL SECRETARIO

M. EN C. ROBERTO MIRANDA MEDRANO



Biblioteca de la Facultad
de Ciencias.

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

'mjsd

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 el Señor Carlos Alberto Campos Bravo, Pasante de la Licenciatura en Biología con número de registro 081034567 ha concluido satisfactoriamente el trabajo de tesis titulado : " Alteraciones Cerebelares en 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 y Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia con apoyo financiero otorgado por el 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 Usted iniciar los tramites necesarios para la titulación.

Sin otro particular le saludo cordialmente.

A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"

Guadalajara, Jal., Abril 01 de 1991
EL DIRECTOR DE TESIS




M. en C. Alma Rosa del Angel Meza

Biblioteca de la Facultad
de Ciencias.

AGRADECIMIENTOS

A LA BIOLOGA ENMA MARTINEZ LIRA, SIN CUYA AYUDA NO HUBIERA SIDO POSIBLE REALIZAR ESTE TRABAJO DE TESIS.

A LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA, QUE POR MEDIO DE SU DEPTO. DE INVESTIGACION CIENTIFICA ME BRINDO LAS FACILIDADES PARA DESARROLLAR LA PRESENTE TESIS DE LICENCIATURA.

A LA BIOLOGA BERTHA MARGARITA CARATACHEA GOMEZ, POR SU VALIOSA COLABORACION EN EL PROCESO HISTOLOGICO DE LAS MUESTRAS.

A MIS ASESORES, POR SU CONSTANTE APOYO E INTERES EN QUE EL TRABAJO SE HICIERA ADECUADAMENTE.

Y MUY EN ESPECIAL A MI FAMILIA,
POR REALMENTE SERLO.

DEDICATORIA

TRABAJO DE INVESTIGACION
DEDICADO A TI, QUE COMPARTES
MI INTERES POR LA BIOLOGIA

EL PRESENTE TRABAJO SE DESARROLLO EN EL
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION CIENTIFICA
DE LA FAC. MED. VET. y ZOOT. Y FACULTAD
DE MEDICINA CON APOYO FINANCIERO OTORGADO
POR EL DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION
CIENTIFICA Y SUPERACION ACADEMICA DE LA
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA.

1989-1

081034567

UNIVERSIDAD D E GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ALTERACIONES CEREBELARES EN PRODUCTOS DE RATAS
EXPUESTAS DURANTE LA GESTACION A LA
INHALACION DE HUMO DE TABACO

T E S I S P R O F E S I O N A L
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :

LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A :

CARLOS ALBERTO CAMPOS BRAVO

DIRECTOR DE TESIS:

M en C ALMA ROSA DEL ANGEL MEZA

ASESORES:

M en C JOAQUIN GARCIA ESTRADA

M en C ESTHER ALBARRAN RODRIGUEZ

M.V.Z. JACINTO BANUELOS PINEDA

GUADALAJARA, JALISCO.

1 9 9 1

INDICE

INTRODUCCION	3
ANTECEDENTES	6
JUSTIFICACION	11
HIPOTESIS	12
OBJETIVOS	13
MATERIALES Y METODOS	14
RESULTADOS	21
DISCUSION	31
CONCLUSIONES	36
BIBLIOGRAFIA	37

INTRODUCCION

El tabaco es una planta de la familia de las Solanáceas, de hojas anchas, tallo recto y flores rojizas, que se cultivaba y consumía en América desde épocas precolombinas.¹

Existen dos especies importantes de tabaco; Nicotiana tabacum (tabaco de Virginia) y N. rústica (tabaco rústico); ambas tienen numerosas variedades cultivadas.^{2,3}

La composición del humo depende del tipo de tabaco, forma en que se ha curado, como se fuma y de la técnica del fumador pero en general se han identificado unas 500 sustancias que pueden dividirse en cuatro grupos:

A) Nicotina: alcaloide que afecta de manera específica al Sistema Nervioso Central (S.N.C.).

B) Monóxido de carbono (CO): Gas incoloro e insaboro que al unirse a la hemoglobina provoca anoxia a los tejidos.

C) Alquitrán, arsénico, cromo, polonio radioactivo:

Estos compuestos son carcinógenos tóxicos, el primero de ellos se encuentra en cantidades importantes en el humo del tabaco.

D) Gases y vapores irritantes: Oxidos de nitrógeno, amoniaco, ácidos aldehidos y cetonas. Algunos de estos irritantes actúan como co-carcinógenos.

Varios de estos compuestos inhiben los movimientos ciliares del epitelio respiratorio y causan conjuntivitis, tos, obstrucción nasal y gastritis.^{3 - 5}

La información anteriormente señalada nos muestra que dentro de la farmacología del humo del tabaco se encuentran diversos componentes que afectan al S.N.C., del cual el cerebelo forma parte importante.

EL CEREBELO.

Durante el desarrollo prenatal cerebral, el metencéfalo en su parte dorsal experimenta una elevación y un engrosamiento que origina al cerebelo compuesto por: (1) una corteza o capa superficial de sustancia gris, la cual tiene contorno irregular debido a las folias cerebelares; (2) una sustancia blanca central donde se encuentran las prolongaciones celulares mielinizadas que sirven para la transmisión de impulsos electroquímicos entre los diferentes centros grises intraxiales y entre estos mismos y el sistema nervioso periférico y (3) cuatro pares de núcleos centrales, incrustados en la sustancia blanca. La región media es conocida como vermis el resto lo forman los hemisferios cerebelosos (lóbulos anterior y posterior) y el lóbulo floculonodular. 6.7

FUNCIONES DEL CEREBELO.

Las funciones más importantes del cerebelo son:

- 1) Coordinación de la motricidad.
- 2) Colaborar en la conservación del equilibrio.
- 3) Regulación del tono muscular. 6.7

NEUROGENESIS DEL CEREBELO.

Las células de Purkinje, nucleares y de Golgi se forman a

partir de las células germinativas del epéndimo, más tarde las células de Purkinje y de Golgi emigran hasta alcanzar su localización final en la corteza cerebelosa.

La capa germinativa externa es una zona que transitoriamente forma la corteza cerebelosa, en donde algunas células germinativas dan origen a los neuroblastos de las células granulosas que emiten pequeños axones precursores de las fibras paralelas y otras originan los neuroblastos de las células estrelladas y en canasta.^a

En la rata el cerebelo inicia su formación el día 13 embrionario (13 E) y su desarrollo termina alrededor del día 21 postnatal (21 P) y todavía sucede una aceleración en la maduración al día 30 P.^{9.10}

CEREBELO ADULTO.

La corteza cerebelosa de un individuo adulto histológicamente se divide en tres capas:

- La capa molecular (la más externa), está formada en gran parte por las fibras paralelas, por las arborizaciones dendríticas de las células de Purkinje y de las células de Golgi. Contiene además un escaso número de células estrelladas y en canasta.
- La capa de células de Purkinje, está dispuesta en un solo estrato, de la parte superior de cada célula emerge una dendrita que se ramifica en un solo plano transversal y establece contacto sináptico con las fibras paralelas. El axón también se ramifica atravesando la capa de células granulares hasta los núcleos cerebelosos, sus ramificaciones también hacen contacto con células de Golgi y de canasta.

- La capa granular interna es la más profunda y está formada en su mayor parte por células granulosas que entran en relación con las fibras musgosas y células de Golgi a través de sus dendritas. El axón de las células granulares asciende a la capa molecular formando las fibras paralelas que establecen contactos sinápticos con las espinas dendríticas de las células de Purkinje, de Golgi, estrelladas y en canasta.

Hay dos tipos de fibras aferentes a la corteza; Las fibras musgosas que terminan haciendo contacto sináptico con las células granulosas, y las fibras trepadoras que hacen contacto con las dendritas de las células de Purkinje.^{7.6.11}

ANTECEDENTES

El 12.5 % de las muertes entre los 35 y los 44 años, el 25 % entre los 45 y los 64 años, y el 20 % entre los 65 y los 74 años son atribuibles al hábito de fumar.

La mayoría de las estadísticas se basan en fumadores de cigarrillos, debido a que esta es la forma de consumo más generalizada y dañina del tabaco.¹²

El tabaco es una droga cuyo consumo forma hábito y un alto porcentaje de la población mundial lo consume; su principio activo es la nicotina que se encuentra en las hojas.² En altas dosis este alcaloide primero estimula, luego deprime y finalmente paraliza las células de los ganglios autonómicos periféricos, el encéfalo (especialmente el mesencéfalo) y la médula espinal, así como los músculos esqueléticos incluyendo el diafragma. Para el humano la

dosis letal de nicotina es de 40 mg., una cantidad contenida en 2 cigarrillos. Sin embargo, el tabaco es mucho menos venenoso de lo que se esperaría en base a su contenido de nicotina debido a que la mayor parte de esta se quema al fumar.^{12, 13}

Aproximadamente el 30 % de la nicotina alcanza con el humo del cigarro la boca del fumador. Se calcula que una persona absorbe de 2.5 a 3.5 mg. de la nicotina en un cigarrillo.^{3, 4, 14}

El monóxido de carbono que está presente en el humo del cigarro es 300 veces más afin a la hemoglobina (Hb) que el oxígeno, formando así la carboxihemoglobina (HbCO), la cual es incapaz de transportar oxígeno, lo que trae como consecuencia la anoxia tisular, los efectos resultantes dependen del grado y duración de la saturación de sangre con CO.^{3, 4, 12} La exposición a 4,000 ppm durante una hora es fatal, esto equivale al 80 % de HbCO en sangre.¹³

En un estudio realizado en placentas de mujeres que fumaron durante el embarazo se demostraron varias anomalías como: pausa de la membrana vasculosincitial, necrosis sincitial local y engrosamiento anormal de la membrana basal del trofoblasto, muchos de estos cambios pueden deberse a la isquemia placentaria y a la toxicidad del CO, por lo que la hiperplasia resulta como respuesta compensatoria.¹⁵ La infartación u obstrucción de la placenta tiene una importante relación con el retardo en el crecimiento intrauterino.¹⁶

Los daños mas sobresalientes que se han identificado en productos de mujeres fumadoras de cigarrillos son: nacimiento prema-

turo y bajo peso al nacimiento, también se presentan complicaciones como: rompimiento temprano de membranas, hemorragias, placenta previa, aborto espontáneo, embarazo imbrico y muerte perinatal.^{17,18}

Por otra parte, el humo de cigarro puede provocar malformaciones congénitas como hendidura oral (paladar hendido) o malformaciones musculoesqueléticas en productos de madres fumadoras.¹⁹

Se ha comprobado mediante la utilización de modelos animales que el fumar cigarros durante el embarazo induce a la hipoxia fetal a través de 2 mecanismos independientes; un efecto agudo causado por la nicotina que activa descargas adrenérgicas responsables de vasoconstricción, disminución de la perfusión sanguínea uterina y taquicardia fetal transitoria; también provoca un prolongado incremento en la concentración de HbCO con reducción sostenida de la oxigenación fetal.^{20,21}

En cuanto al S.N.C., en ratas recién destetadas expuestas durante la vida intrauterina al monóxido de carbono se observaron elevaciones del ADN y dopamina en el neocórtex, que es sensible a la hipoxia, por lo que se altera la proliferación neuronal y la sinaptogénesis.²²

En el cerebelo la hipoxia intermitente provoca modificaciones importantes en la actividad de algunas enzimas oxidativas y de la vía glucolítica en sinaptosomas; disminuye la actividad de la citocromo oxidasa y de la malato dehidrogenasa.²³

Para que la nicotina produzca un efecto embriotóxico directo se necesitan concentraciones mayores que las resultantes en la sangre de hembras gestantes fumadoras comunes.²⁴

Como resultado de la exposición a la nicotina durante la vida intrauterina el peso corporal de las crías de rata se reduce significativamente, la disminución es mayor cuando la exposición sucede durante la lactación. En ambas etapas se identificó nicotina en el cerebro de las crías, lo cual demuestra que los efectos neuroquímicos de este alcaloide son causados por acción directa, más que por efectos nutricionales.²⁵

El cerebelo es un sitio primario para los trastornos motores producidos por vasopresina o nicotina, estas sustancias producen postración, atonía y ocasionalmente convulsiones. Al lesionar el cerebelo con ácido kaínico los trastornos motores desaparecen debido a la destrucción selectiva de las neuronas de Purkinje.²⁶

La administración local de nicotina a las células de Purkinje en el cerebelo de rata reduce sus descargas eléctricas espontáneas en forma reversible y dosis-dependiente, lo que demuestra la capacidad inhibitoria de la nicotina para esta estirpe celular. Los efectos de la nicotina en la descarga celular son mediados por receptores ganglionares estereoespecíficos y sensitivos a la mecamilamina,^{27,28} bloqueador ganglionar que antagoniza la inhibición de las células de Purkinje, mas no la excitación sináptica.

La información anteriormente señalada evidencia claramente que el cerebelo y específicamente las células de Purkinje sirven como un buen modelo para realizar estudios en cuanto a la farmacología de la nicotina en el S.N.C..²⁷

Por otra parte, el cerebelo permite identificar poblaciones bien definidas de células nerviosas cuya morfología y localización se conoce con toda precisión y siguen invariablemente un patrón de distribución regular. De esta manera, mediante la identificación de alteraciones estructurales por microscopia de luz o microscopia electrónica de transmisión es posible inferir las consecuencias funcionales resultantes de los trastornos que provoca la nicotina en el S.N.C..²⁸

VULNERABILIDAD DEL CEREBELO

Al retardo en la maduración cerebelar se debe su mayor vulnerabilidad en el periodo perinatal a los efectos de numerosas sustancias como el thiner, aguarras, etanol, ácido kaínico y CO, sobre todo en especies altriciales como la rata.^{29,30} Asimismo, otras situaciones metabólicas como desnutrición, exposición a radiaciones, abuso de barbitúricos, exposición repetida a anestésicos volátiles o a otras sustancias neurocitotóxicas, también producen distintas clases de lesiones cerebelares.³¹

Así pues, el cerebelo por su patrón asincrónico de maduración en comparación con el cerebro, y debido a su organización celular resulta un modelo adecuado de experimentación para realizar estudios orientados a conocer los trastornos morfológicos maduracionales del S.N.C. en productos expuestos al humo de tabaco durante el desarrollo intrauterino.

JUSTIFICACION

Actualmente el consumo de cigarrillos está en constante aumento, por lo que cada vez se afecta un mayor número de personas, no solo los fumadores activos sino también los llamados "fumadores pasivos". En ambas categorías se encuentran numerosas madres gestantes, cuyos productos tienen el riesgo de resultar afectados en grado variable por la inhalación del humo de tabaco.

Por lo anterior, es necesario aumentar la información disponible acerca de las alteraciones fetales cerebelares que resultan en dicho proceso, tomando en cuenta la vulnerabilidad de este órgano a las condiciones que genera este hábito y utilizando para ello modelos animales, con los que se obtienen resultados confiables, ya que en modelos humanos dichas alteraciones se ven influenciadas por diversos factores como; nivel socioeconómico y educacional, estado de salud y medio ambiente en que se desenvuelve la madre, entre otros. Con la información que se genere será posible aumentar la comprensión sobre la fisiopatología del proceso y proponer el establecimiento de medidas sanitarias preventivas laborales o en casos particulares de adicción.

HIPOTESIS

La exposición de madres gestantes a la inhalación del humo de tabaco produce alteraciones en la citoarquitectura del cerebelo fetal, relacionadas con el desarrollo intrauterino.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Estudiar las alteraciones histopatológicas en el cerebelo de la progenie de ratas expuestas a la inhalación de humo de tabaco en diferentes periodos gestacionales.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Registrar y analizar las variaciones en el peso semanal de las ratas desde el inicio de la preñez hasta el parto.
- 2) Cuantificar el número de productos nacidos por madre.
- 3) Comparar el peso corporal, longitud cráneo-caudal y perímetro cefálico de productos control y experimentales al nacimiento y a los 20 días de edad.
- 4) Registrar la anchura y peso cerebelares en crías control y experimentales al nacimiento y a los 20 días de edad.
- 5) Determinar los efectos de la exposición intrauterina al humo de tabaco sobre la morfología celular y organización de las principales estirpes cerebelares al nacimiento y a los 20 días de edad.

MATERIALES Y METODOS

El presente estudio requirió para su realización de 20 ratas adultas del segundo parto, cepa Sprague-Dawley mismas que se alojaron en jaulas individuales y se mantuvieron bajo condiciones de bioterio, alimentadas a libre acceso con agua y Chow-Purina.

Una vez determinada la etapa de estro (por medio de citología exfoliativa vaginal) 3 hembras permanecieron con un macho durante una noche para enseguida determinar el primer día de gestación por la identificación de espermatozoides en un frotis vaginal. El peso individual de las hembras gestantes se registró a partir del primer día de preñez y semanalmente hasta el parto.

El manejo de las hembras gestantes se realizó de la siguiente manera: Tres grupos experimentales (E1, E2 y E3) expuestos al humo de tabaco y un grupo control intacto, con 5 hembras por grupo.

<u>DIAS GESTACIONALES DE EXPOSICION</u>			GRUPO CONTROL
GRUPO E1 1 a 21	GRUPO E2 8 a 21	GRUPO E3 15 a 21	Manejo sin exposición

Los animales se expusieron durante 10 minutos en una atmósfera saturada con humo proveniente de 1.5 gr de tabaco, 2 veces al día con un intervalo de 8 horas. Los cigarrillos utilizados carecieron de filtro y fueron los de más bajo costo debido a que este tipo de tabaco no recibe tratamientos que reduzcan su concentración de compuestos tóxicos.

La exposición se realizó en una cámara hermética de cristal con 40 l de capacidad, la cual posee un orificio circular de ventilación en la parte superior de cada una de ambas paredes laterales de tal manera que permitan la adecuada ventilación de la cámara durante las exposiciones, las cuales comenzaron una vez que el tabaco se quemó totalmente. Durante la incineración los orificios permanecieron cerrados, ya saturado el ambiente se introdujeron dos ratas a la vez.

El manejo de las crías control y experimentales se realizó de la siguiente manera:

- Determinación del número de productos nacidos vivos o muertos, registrandose el peso corporal en una balanza granataria para pequeñas especies, el diámetro cefálico utilizando un vernier y la longitud cráneo-caudal de cada una de las crías al nacimiento y 20 días de edad.
- Ajuste aleatorio de las camadas a 8 crías por madre.
- Perfusión intracardiaca,³² de 2 crías machos y 2 hembras al nacimiento y a los 20 días de edad por cada madre.

Para realizar la perfusión se anestesiaron los animales con eter y una vez fijados a la superficie de trabajo con cinta adhesiva se realizó:

- Toracotomía amplia para exponer el corazón.
- Incisión en la aurícula derecha e introducción en el ventrículo izquierdo de una aguja corta biselada del número 23.

- Permitir el paso de una solución lavadora Ringer-Krebs con procaina al 0.1 % y heparina (1,000 U.I./l) a 37°C, pH 7.3, 0.1 M y 280 mosm/l bajo una presión de 130 cm de agua por espacio de 3 min.
- Permitir el paso de una solución fijadora de glutaraldehído al 2.5 % y formaldehído al 1 % amortiguados en fosfatos 0.1 M, pH 7.3 y 583 mosm/l por espacio de 8 min.

Por craneotomía se extrajo el encéfalo completo para posteriormente separar el cerebelo y registrar su peso y anchura.

Después de la perfusión se postfijaron los tejidos por una noche a 4°C en la misma solución fijadora.

Una vez postfijados los tejidos se lavaron mediante 2 cambios de 15 min. con amortiguador de fosfatos 0.1 M, enseguida se realizó un corte en la parte media del vermis cerebelar para separar los dos hemisferios cerebelosos y procesarlos mediante deshidratación en series crecientes de etanol y mezclas de etanol/xilol para luego incluirse en parafina y obtener cortes de 5 μ m. de espesor en un microtomo manual American Optical SL/20. El material fué teñido con la técnica de Hematoxilina-Eosina.³³

Para realizar el estudio semicuantitativo las laminillas con cortes al nacimiento se observaron en un microscopio de luz Zeiss con el objetivo 40x/0.65 y un ocular 10x/18 adaptado con el micrómetro lineal. Se cuantificó el espesor de la capa germinal externa en los grupos experimentales y control, obteniéndose registros de las zonas lateral, superior y profunda de tres diferentes folias en cada cerebelo (Diagrama 1).

Asimismo, se hicieron proyecciones de las laminillas con cortes de cerebelo de 20 días de edad, amplificadas a 16x para elaborar dibujos de las zonas cerebelares y posteriormente realizar la cuantificación de áreas por medio del planímetro. Se midieron la corteza cerebelar (constituida por: capa molecular, monocapa de células de Purkinje y capa granular interna) e individualmente las capas molecular y granular interna (Diagrama 2).

En el análisis descriptivo se revisó lo siguiente:

- a) identificación de las estirpes celulares cerebelares.
- b) análisis del arreglo y distribución de las distintas poblaciones celulares.
- c) aspecto celular individual, especialmente los indicios de maduración.
- d) identificación de posibles alteraciones de la población celular residente normal o la presencia de tejidos anormales.
- e) definición de la intensidad del daño y su extensión.

Los datos obtenidos se analizaron mediante el método estadístico de análisis de varianza completamente aleatorio con un nivel de significancia de $P < 0.05$.³⁴

MODELO EXPERIMENTAL

20 hembras adultas Sprague-Dawley

Determinación del 1er. día de preñez

5 ratas intactas control (C)	5 ratas expuestas 1 - 21 (E1)	5 ratas expuestas 8 - 21 (E2)	5 ratas expuestas 15 - 21 (E3)
------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	--------------------------------

ETAPA POSTNATAL

Determinación de parámetros somatométricos al nacimiento y 20 días de edad

Perfusión intracardiaca con sol. de glutaraldehído al 2.5 % y formaldehído amortiguado en fosfatos 0.1 M, pH 7.3 . 2 crlas de cada madre al N. y 20 días de edad

Craneotomía y obtención del cerebelo para postfijación por 1 noche a 4°C

Deshidratación, inclusión en parafina y obtención de cortes del vermis cerebelar (5 µm)

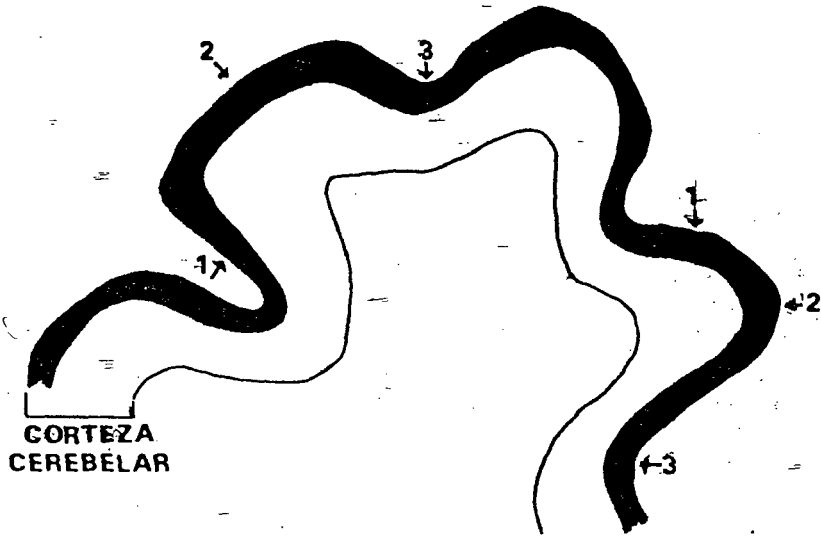
Tinción de cortes histológicos en Hematoxilina-Eosina

Estudio histológico descriptivo	Estudio micrométrico al nacimiento	Estudio planimétrico a 20 días de edad
---------------------------------	------------------------------------	--

Análisis estadístico de los datos obtenidos

DIAGRAMA 1

CORTE CEREBELAR AL NACIMIENTO



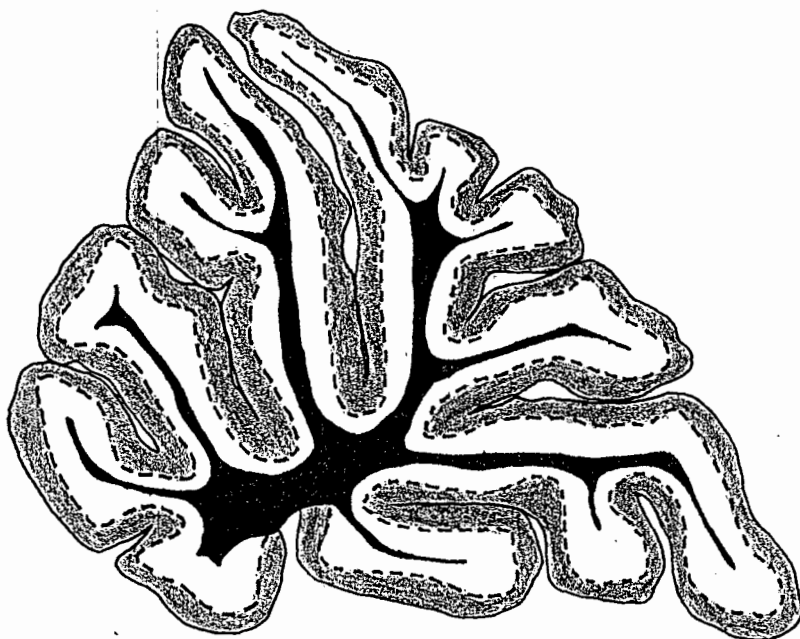
■ CAPA GERMINAL EXTERNA

- 1 ZONA LATERAL
- 2 ZONA SUPERIOR
- 3 ZONA PROFUNDA

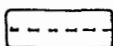
UTILIZANDO EL MICROMETRO LINEAL SE CUANTIFICO EL ESPESOR DE LA CAPA GERMINAL EXTERNA. SE OBTUVIERON REGISTROS DE LAS ZONAS LATERAL, SUPERIOR Y PROFUNDA DE TRES DIFERENTES FOLIAS EN CADA CEREBELO.

DIAGRAMA 2

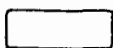
CORTE CEREBELAR A LOS 20 DIAS POSTNATALES



CAPA MOLECULAR



MONOCAPA DE CELULAS DE PURKINJE



CAPA GRANULAR INTERNA



SUSTANCIA BLANCA

SE CUANTIFICO POR MEDIO DEL PLANIMETRO EL AREA CORRESPONDIENTE A :

- CORTEZA CEREBELAR (CONSTITUIDA POR: CAPA MOLECULAR, MONOCAPA DE CELULAS DE PURKINJE Y CAPA GRANULAR INTERNA).
- CAPA MOLECULAR
- CAPA GRANULAR INTERNA

RESULTADOS

Desde el inicio de las exposiciones se observó que los animales se rehusaban a entrar en la cámara, posteriormente se habituaron al manejo, por lo cual no se produjo estrés que haya influido sobre los resultados obtenidos.

Dentro de la cámara saturada las ratas se paraban sobre sus patas traseras para tratar de alcanzar los orificios de ventilación con la nariz, la cual se observó irritada desde los primeros minutos de exposición ya que se la frotaban frecuentemente al igual que los ojos, durante el estudio estas molestias desaparecieron.

El consumo de alimento y agua fué normal, independientemente del tiempo total de exposición alcanzado durante el estudio, por lo que el peso semanal se incrementó normalmente en relación a la etapa de gestación.

El número de productos nacidos por madre fue semejante en las hembras control y experimentales. La mortalidad al nacimiento fué mayor en el grupo expuesto durante el último tercio de gestación (18.86 %) (Cuadro 1).

PARAMETROS SOMATOMETRICOS Y CEREBELARES DE HEMBRAS

Al nacimiento

Solo hubo diferencias significativas de peso corporal, no así en longitud cráneo-caudal y perímetro cefálico. El mayor peso corporal correspondió al grupo expuesto los dos últimos tercios de la gestación que fué diferente del resto de los grupos ($P < 0.05$), (Cuadro 2).

En relación a los parámetros cerebelares, las crías control revelaron el mayor peso y anchura, se identificaron diferencias significativas con los tres grupos experimentales en relación al primer parámetro ($P < 0.05$) y no hubo diferencias en la anchura cerebelar en comparación con los productos expuestos los dos últimos tercios gestacionales ($P > 0.05$), (Cuadro 2).

Veinte días postnatales

Las crías expuestas desde el último tercio de la gestación registraron el mayor peso corporal que fué significativamente diferente del grupo control y los demás experimentales ($P < 0.05$).

Este mismo grupo reveló el mayor perímetro cefálico que fué diferente de los otros grupos experimentales ($P < 0.05$), siendo semejante al control (Cuadro 2).

En esta edad la longitud cráneo-caudal y anchura cerebelar no presentaron diferencias importantes entre las crías control y experimentales ($P > 0.05$), (Cuadro 2).

El grupo control reveló el mayor peso cerebelar que fué significativamente diferente de los demás, a su vez el grupo expuesto los dos últimos tercios de la gestación difirió respecto a los otros experimentales con un peso mayor ($P < 0.05$), (Cuadro 2).

PARAMETROS SOMATOMETRICOS Y CEREBELARES DE MACHOS

Al nacimiento

Las crías expuestas los dos últimos tercios gestacionales revelaron los mayores valores en el peso corporal y perímetro cefálico.

co que significativamente fueron diferentes respecto a los demás grupos en cuanto al primer parámetro y solo con el grupo expuesto toda la gestación al comparar el perímetro cefálico ($P < 0.05$), (Cuadro 3).

No hubo diferencias en longitud cráneo-caudal y anchura cerebelar de crías control y experimentales ($P > 0.05$), (Cuadro 3).

Los productos control revelaron el mayor peso cerebelar, sin embargo este solo fué diferente de los valores correspondientes a las crías expuestas el último tercio de la gestación ($P < 0.05$), (Cuadro 3).

Veinte días postnatales

La progenie expuesta el último tercio de la gestación mostró los mayores valores en los tres parámetros somatométricos evaluados. El peso corporal fué significativamente diferente del resto de los grupos ($P < 0.05$), en la longitud cráneo-caudal solo hubo diferencias significativas con el grupo expuesto toda la gestación ($P < 0.05$), mientras que en el perímetro cefálico fue semejante al grupo control ($P > 0.05$), (Cuadro 3).

No hubo diferencias significativas entre los grupos experimentales y control respecto al peso y anchura cerebelares ($P > 0.05$), (Cuadro 3).

Del análisis global de los parámetros somatométricos y cerebelares estudiados no fué evidente ninguna manifestación de alteraciones directamente relacionadas con el tiempo total de exposición prenatal al humo de tabaco.

ESPESOR DE LA CAPA GERMINAL EXTERNA AL NACIMIENTO (μm).

Los datos obtenidos corresponden a las determinaciones realizadas en las zonas lateral, superior y profunda de tres diferentes folias cerebelares seleccionadas al azar (Diagrama 1), integrados para su análisis estadístico en una sola expresión según el grupo al que corresponden.

En las crías machos el grupo expuesto toda la gestación fue significativamente diferente de los grupos experimentales restantes ($P < 0.05$), no habiendo diferencias entre el control y los experimentales ($P > 0.05$), (Cuadro 4).

Las crías hembras no mostraron diferencias entre los grupos experimentales y el control ($P > 0.05$), (Cuadro 4).

DETERMINACION SEMICUANTITATIVA DE AREA A LOS 20 DIAS DE EDAD

Los datos obtenidos corresponden a las mediciones realizadas con el planímetro (mm^2) en capa molecular; desde la región pial-gliál a la monocapa de células de Purkinje; capa granular interna y el área integrada por las regiones anteriores, que constituyen la corteza cerebelar (Diagrama 2).

En las crías machos no se apreciaron diferencias significativas entre los grupos experimentales y el control ($P > 0.05$), (Cuadro 5).

En las crías hembras, las expuestas el último tercio de la gestación mostraron los mayores valores en las tres áreas analizadas. Las capas molecular y granular interna fueron diferentes en relación a los grupos restantes ($P < 0.05$). La corteza cerebelar solo fué diferente del grupo control ($P < 0.05$), a su vez los otros experimentales fueron semejantes al control ($P > 0.05$), (Cuadro 5).

ESTUDIO HISTOLOGICO DESCRIPTIVO AL NACIMIENTO

MACHOS

CAPA GERMINAL EXTERNA

Los grupos experimentales presentaron disminución en la población premigratoria (Figs. 2 y 3). En el grupo expuesto toda la gestación ésta anomalía se presentó en dos de cinco cortes examinados, en el grupo expuesto los dos últimos tercios se observó en cuatro de cinco cortes y en el expuesto el último tercio gestacional la proporción fué en uno de cinco. Las alteraciones se detectaron a lo largo de toda la capa. El grupo control mostró espesor regular y densidad poblacional normal (Fig. 1), (Cuadro 6).

CAPA MOLECULAR

Los grupos experimentales y control revelaron una diferente cantidad de células migratorias dispersas en la capa molecular, sin que pudieran identificarse diferencias entre estas en los cortes examinados, también se observaron núcleos de células gliales y de otras estirpes neuronales residentes en ésta región (Células en canasta y estrelladas). Asimismo, el neuropilio mostró un aspecto compacto sin que se observaran espacios intercelulares vacíos (Fig. 1), (Cuadro 6).

CAPA DE CELULAS DE PURKINJE

El grupo control y el de animales expuestos toda la gestación fueron semejantes, en ambos se observó una densidad poblacional celular regularmente distribuida a través de las folias, también se

observaron indicios de organización incipiente en monocapa y diferenciación primaria de esta estirpe que pudo distinguirse fácilmente de las demás. El grupo expuesto los dos últimos tercios de gestación reveló desorganización en la ubicación de estas células y disminución en la población celular de algunas muestras, en el grupo expuesto el último tercio gestacional solamente en una cría se observó diferenciación incompleta. Las alteraciones anteriormente descritas se manifestaron en la mayor extensión de las folias (Cuadro 6).

CAPA GRANULAR INTERNA

En el grupo expuesto toda la gestación se observaron límites escasamente definidos de esta capa en una de las crías, el grupo expuesto los dos últimos tercios gestacionales mostró reducción en la población celular en algunos productos, evidente por el mayor espacio intercelular. Las alteraciones se observaron regularmente en toda el área (Fig. 2). El grupo control y el expuesto el último tercio gestacional revelaron una mayor definición de esta capa con densidad poblacional normal (Fig. 1), (Cuadro 6).

H E M B R A S

CAPA GERMINAL EXTERNA

En todos los grupos experimentales se observó disminución de la población celular premigratoria (Figs. 2 y 3). El grupo expuesto toda la gestación presentó esta anomalía con mayor severidad que las crías expuestas los dos últimos tercios y el último tercio, la misma manifestación se identificó en las distintas folias examinadas. El grupo control mostró espesor regular a través de

las diferentes folias y una densidad poblacional homogénea en todos los animales estudiados (Fig. 1), (Cuadro 7).

CAPA MOLECULAR

Tanto en el grupo control como en los experimentales se observaron numerosas células migratorias a través de ésta capa, la menor cantidad se identificó en el grupo expuesto el último tercio gestacional (Fig. 1), (Cuadro 7).

CAPA DE CELULAS DE PURKINJE

El grupo expuesto el último tercio gestacional reveló espacios amplios ausentes de estas células, en el grupo expuesto los dos últimos tercios se detectaron células indiferenciadas en todas las folias cerebelares examinadas. Las crías control y las expuestas toda la gestación no mostraron alteraciones (Cuadro 7).

CAPA GRANULAR INTERNA

Tanto el grupo control como los experimentales mostraron un aspecto semejante en todos los cortes estudiados (Cuadro 7).

ESTUDIO HISTOLOGICO DESCRIPTIVO A LOS 20 DIAS DE VIDA POSTNATAL

M A C H O S

CAPA GERMINAL EXTERNA

En el grupo control y de animales expuestos el último tercio gestacional solamente se observaron remanentes de la capa germinal

externa como una monocapa superficial de células granulares (Foto 4). En algunas crías con el mayor tiempo total de exposición y en animales expuestos los dos últimos tercios se observó una mayor cantidad de células remanentes (Fig. 5), (Cuadro 6).

CAPA MOLECULAR

El grupo expuesto el último tercio de la gestación y el control mostraron numerosas células en migración en algunas folias. Las crías expuestas toda la gestación y los dos últimos tercios también revelaron abundantes células migratorias en todo el tejido (Fig. 5), (Cuadro 6).

CAPA DE CELULAS DE PURKINJE

En el grupo control la mayoría de las muestras examinadas mostraron alineación de estas células (Fig. 4). Alrededor de la mitad de las crías de madres expuestas toda la gestación y los dos últimos tercios revelaron inmadurez celular, espacios amplios desprovistos de células y una menor población. En el grupo expuesto el menor período de tiempo, solo en algunas folias de un cerebelo se observó distribución irregular de células de Purkinje (Fig. 6), (Cuadro 6).

CAPA GRANULAR INTERNA

Solo un animal del grupo expuesto los dos últimos tercios de gestación reveló una menor población de células granulares, los demás grupos se observaron normales (Cuadro 6).

HEMBRAS

CAPA GERMINAL EXTERNA

En las crías sometidas al mayor tiempo de exposición se observaron remanentes de células en la capa granular externa solamente en algunas folias del total de cortes examinados, en los grupos expuestos los dos últimos tercios o el último tercio también se observaron remanentes en un menor número de animales, pero en todas las folias cerebelares (Fig. 5). Las crías control mostraron desaparición casi completa de las células premigratorias (Fig. 4), (Cuadro 7).

CAPA MOLECULAR

Solamente en una de las crías control persistieron numerosas células migratorias en algunas zonas, este mismo hallazgo se observó en la mayoría de animales del grupo prenatalmente expuesto toda la gestación. La mayoría de los animales del grupo con el período intermedio de exposición revelaron una gran cantidad de células migratorias irregularmente distribuidas en el espesor de la capa molecular, esto mismo sucedió con todas las crías del grupo con el menor tiempo total de exposición (Fig. 5), (Cuadro 7).

CAPA DE CELULAS DE PURKINJE

En algunas folias de una cría control se observó una menor población celular. El grupo expuesto los dos últimos tercios presentó inmadurez y desalineación mientras que en el grupo expuesto toda la gestación, además de lo anterior también se observó disminución de la población celular normal manifestada por ausencia de células en amplias zonas de la mayoría de los cortes examinados.

El grupo expuesto el último tercio reveló una completa desalineación de ésta estirpe en una de las muestras (Fig. 6), (Cuadro 7).

CAPA GRANULAR INTERNA

En algunas folias de una cría control se observó menor población celular, en dos de los productos expuestos los dos últimos tercios gestacionales también se observó disminución poblacional. Los grupos expuestos toda la gestación o el último tercio mostraron aspecto semejante a los animales control (Fig. 4), (Cuadro 7).

Cuadro 1

ORIGEN Y PORCENTAJE DE MORTALIDAD AL NACIMIENTO

GRUPO	NUMERO DE CRIAS			% DE MORTALIDAD
	TOTAL	VIVAS	MUERTAS	
C	48	45	3	6.25
E 1	51	45	6	11.76
E 2	54	53	1	1.85
E 3	53	43	10	18.86

GRUPOS :

- C= Control
- E1= Expuestos toda la gestación
- E2= Expuestos los dos últimos tercios de gestación
- E3= Expuestos el último tercio de gestación

Cuadro 2

PARAMETROS SOMATOMETRICOS Y CEREBELARES DE CRIAS HEMBRAS

	Gpo	n	RECIEN NACIDAS			20 DIAS			
			X	D.E	C.V %	n	X	D.E	C.V %
PESO	C	18	5.189	b ± 0.681	13.13	9	28.277	b ± 2.818	9.96
CORPORAL gr	E 1	21	4.952	b ± 0.753	15.21	11	28.700	b ± 9.120	31.77
	E 2	21	6.047	a ± 0.586	9.69	11	20.000	b ± 5.864	20.94
	E 3	24	5.400	b ± 0.778	14.41	11	44.409	a ± 10.234	23.04
LONGITUD	C	18	6.116	a ± 0.616	10.11	9	14.600	a ± 1.086	7.43
CRANEAL - CAUDAL cm	E 1	21	5.990	a ± 0.420	7.02	11	15.318	a ± 1.636	10.68
	E 2	21	6.128	a ± 0.363	5.93	11	15.009	a ± 1.227	8.17
	E 3	24	6.283	a ± 0.353	5.62	11	16.654	a ± 1.859	11.16
PERIMETRO	C	18	8.388	a ± 0.595	7.10	9	15.238	ab ± 0.623	4.09
CEREBELO mm	E 1	21	8.342	a ± 0.608	7.29	11	14.113	b ± 1.418	10.05
	E 2	21	8.802	a ± 0.563	6.40	11	14.409	b ± 1.356	9.41
	E 3	24	8.560	a ± 0.687	8.05	11	16.531	a ± 1.481	8.95
PESO	C	5	0.060	a ± 0.008	10.73	5	0.349	a ± 0.027	7.73
CEREBELAR gr	E 1	5	0.050	b ± 0.005	11.55	5	0.233	b ± 0.055	23.79
	E 2	5	0.041	b ± 0.011	28.33	5	0.272	c ± 0.082	30.18
	E 3	5	0.041	b ± 0.014	34.06	5	0.218	b ± 0.064	29.59
ANCHURA	C	5	5.670	a ± 0.491	8.67	5	11.140	a ± 0.277	2.48
CEREBELAR mm	E 1	5	4.750	b ± 0.379	7.98	5	10.160	a ± 0.341	3.36
	E 2	5	4.960	ab ± 0.611	12.33	5	10.590	a ± 0.230	2.17
	E 3	5	4.660	b ± 0.290	6.22	5	10.134	a ± 1.067	10.53

GRUPOS :

C= Control

E1= Expuestas durante toda la gestación

E2= Expuestas durante los dos últimos tercios de gestación

E3= Expuestas durante el último tercio de gestación

Comparación con la prueba de Duncan para determinar diferencias estadísticas entre grupos control y experimentales a partir del análisis de varianza completamente aleatorio.

Literales diferentes indican diferencias a un nivel de significancia P<0.05.

Cuadro 3

PARAMETROS SOMATOMETRICOS Y CEREBELARES DE CRIAS MACHOS

	Gpo	RECIENTE NACIDOS				20 DIAS			
		n	X	D.E	C.V %	n	X	D.E	C.V %
PESO CORPORAL	C	28	5.725	b ± 0.855	15.11	11	37.172	b ± 7.173	19.29
	E 1	30	5.443	b ± 0.608	11.18	14	29.378	b ± 7.059	24.03
gr	E 2	32	6.287	a ± 0.734	11.68	17	29.817	b ± 5.760	19.31
	E 3	28	5.703	b ± 0.852	14.94	10	49.310	a ± 8.135	16.49
LONGITUD CRANEO - CAUDAL	C	28	6.371	a ± 0.409	6.43	11	15.900	ab ± 1.592	10.01
	E 1	30	6.070	a ± 0.371	6.12	14	14.928	b ± 1.485	9.95
cm	E 2	32	6.187	a ± 0.436	7.04	17	15.658	ab ± 1.512	9.65
	E 3	28	6.353	a ± 0.439	6.91	10	17.380	a ± 1.812	10.43
PERIMETRO CEFALICO	C	28	8.685	ab ± 0.659	7.59	11	15.731	ac ± 0.525	3.33
	E 1	30	8.555	b ± 0.452	5.29	14	13.896	b ± 0.720	5.18
mm	E 2	32	9.045	a ± 0.764	8.43	17	14.402	bc ± 1.872	13.00
	E 3	28	8.648	ab ± 0.643	7.43	10	17.245	a ± 1.209	7.01
PESO CEREBELAR	C	5	0.063	a ± 0.003	5.47	5	0.325	a ± 0.020	6.34
	E 1	5	0.048	ab ± 0.005	10.47	5	0.270	a ± 0.105	39.01
gr	E 2	5	0.048	ab ± 0.022	45.84	5	0.296	a ± 0.070	23.64
	E 3	5	0.036	b ± 0.001	3.00	5	0.265	a ± 0.130	49.37
ANCHURA CEREBELAR	C	5	5.332	a ± 0.237	4.46	5	10.920	a ± 0.256	2.34
	E 1	5	4.840	a ± 0.389	8.04	5	10.470	a ± 0.376	3.59
mm	E 2	5	5.200	a ± 0.588	11.31	5	10.740	a ± 0.696	6.48
	E 3	5	4.698	a ± 0.476	10.13	5	10.256	a ± 0.585	5.71

GRUPOS :

C= Control

E1= Expuestos durante toda la gestación

E2= Expuestos durante los dos últimos tercios de gestación

E3= Expuestos durante el último tercio de gestación

Comparación con la prueba de Duncan para determinar diferencias estadísticas entre grupos control y experimentales a partir del análisis de varianza completamente aleatorio.

Letrales diferentes indican diferencias a un nivel de significancia $P < 0.05$.

Cuadro 4

ESPESOR DE LA CAPA GERMINAL EXTERNA AL NACIMIENTO (μm)

GRUPO	MACHOS			HEMBRAS		
	X	D.E	C.V %	X	D.E	C.V %
C	30.555 ab _±	57.469	188.08	32.277 a _±	84.117	260.60
E 1	33.833 a _±	101.833	300.98	35.000 a _±	145.833	416.16
E 2	27.222 b _±	51.172	187.98	31.555 a _±	187.850	595.30
E 3	28.555 b _±	39.580	138.60	33.888 a _±	114.876	338.98

n= 15

GRUPOS :

C= Control

E1= Expuestos durante toda la gestación

E2= Expuestos durante los dos últimos tercios de gestación

E3= Expuestos durante el último tercio de gestación

Comparación con la prueba de Duncan para determinar diferencias estadísticas entre grupos control y experimentales a partir del análisis de varianza completamente aleatorio.

Literales diferentes indican diferencias a un nivel de significancia $P < 0.05$.

Cuadro 5

DETERMINACION SEMICUANTITATIVA DE AREA A LOS 20 DIAS DE EDAD (mm²)

ZONA	Gpo	MACHOS			HEMBRAS		
		X	D.E	C.V %	X	D.E	C.V %
CORTEZA	C	35,675 a ±	119,411	334,71	25,374 b ±	8,453	33,31
	E 1	41,334 a ±	155,940	379,68	33,673 ab ±	55,159	163,60
	E 2	35,941 a ±	122,264	340,17	33,998 ab ±	32,624	95,95
CEREBELAR	E 3	44,243 a ±	48,148	108,82	44,604 a ±	85,296	191,22
	C	17,301 a ±	27,719	160,21	12,958 b ±	3,573	27,55
	E 1	21,146 a ±	45,690	216,06	16,750 b ±	17,282	103,17
MOLECULAR	E 2	17,665 a ±	44,227	250,36	16,767 b ±	7,358	43,89
	E 3	22,712 a ±	9,449	41,60	22,650 a ±	18,471	81,54
	C	18,373 a ±	33,053	179,89	12,405 b ±	1,098	8,85
CAPA GRANULAR	E 1	20,187 a ±	33,895	182,78	16,922 c ±	10,967	64,80
	E 2	18,274 a ±	20,279	113,81	17,231 c ±	9,731	56,47
CAPA INTERNA	E 3	21,531 a ±	18,394	65,43	21,953 a ±	27,361	124,63

n= 20

GRUPOS :

C= Control

E1= Expuestos durante toda la gestación

E2= Expuestos durante los dos últimos tercios de gestación

E3= Expuestos durante el último tercio de gestación

Comparación con la prueba de Duncan para determinar diferencias estadísticas entre grupos control y experimentales a partir del análisis de varianza completamente aleatorio.

Literalas diferentes indican diferencias a un nivel de significancia $P < 0,05$.

Cuadro 6

ESTUDIO HISTOLOGICO DESCRIPTIVO EN CRIAS MACHOS

AL NACIMIENTO

GRUPO	CAPA GERMINAL EXTERNA	CAPA MOLECULAR	CELULAS DE PURKINJE	CAPA GRANULAR INTERNA	MAGNITUD DEL DAÑO
C	Normal (5/5)	Normal (5/5)	Normal (5/5)	Normal (5/5)	Celularidad disminuida (1/5)
E 1	Población preinigratoria disminuida (2/5)	Normal (5/5)	Normal (5/5)	Indefinida (1/5)	General
E 2	Población preinigratoria disminuida (4/5)	Normal (5/5)	Desalineación (2/5) Menor población (2/5)	Población disminuida (2/5)	General
E 3	Población preinigratoria disminuida (1/5)	Normal (5/5)	Diferenciación incompleta (1/5)	Normal (5/5)	General

A LOS 20 DIAS DE VIDA POSTNATAL

C	Remanentes en algunas folias (1/4)	En algunas folias mayor cantidad de cél.migratorias (1/4)	Menor cantidad (1/4) Desalineación (1/4)	Población celular densa (1/4)	En zonas
E 1	Remanentes (3/5)	Mayor cantidad de células migr. (4/5)	Inmadurez (2/5) Nulas en zonas (2/5) Menor cantidad (1/5)	Normal (5/5)	General
E 2	Remanentes (4/5)	Mayor cantidad de células migr. (3/5)	Nulas en zonas (2/5) Menor cantidad (2/5) Inmadurez (2/5) Desalineación (1/5)	Población celular disminuida (1/5)	General
E 3	Normal (5/5)	En algunas folias mayor cantidad de cél.migratorias (1/5)	Distribución irregular (1/5)	Normal (5/5)	En zonas

GRUPOS:

C= Control

E1= Expuestos durante toda la gestación

E2= Expuestos durante los dos últimos tercios de gestación

E3= Expuestos durante el último tercio de gestación

ESTUDIO HISTOLOGICO DESCRIPTIVO EN CRIAS FEMBRAS

AL NACIMIENTO

GRUPO	CAPA GERMINAL EXTERNA	CAPA MOLECULAR	CELULAS DE PURKINJE	CAPA GRANULAR INTERNA	MAGNITUD DEL DAÑO
C	Normal (5/5)	Normal (5/5)	Normal (5/5)	Normal (5/5)	
E 1	Población premigratoria disminuida (3/6)	Normal (6/6)	Normal (6/6)	Normal (6/6)	General
E 2	Población premigratoria disminuida (2/3)	Normal (3/3)	Indiferenciadas (2/3)	Normal (3/3)	General Desarreglo tisular (2/3)
E 3	Población premigratoria disminuida (2/4)	Baja población migratoria (2/4)	Ausentes en amplias zonas (1/4)	Normal (4/4)	General Desarreglo tisular (1/4)

A LOS 20 DIAS DE VIDA POSTNATAL

C	Normal (4/4)	Presencia de mayor cantidad de células migratorias (1/4)	Menor población celular irregularmente distribuida (1/4)	Menor población celular (1/4)	En zonas
E 1	Remanentes (5/5)	Presencia de mayor cantidad de células migratorias (3/5)	Inmadurez (3/5) Desalineación (2/5) Disminución y ausencia de células (2/5)	Normal (5/5)	En zonas
E 2	Remanentes (5/5)	Presencia de mayor cantidad de células migratorias (4/5)	Inmadurez (2/5) Desalineación (1/5)	Menor población celular (2/5)	General
E 3	Remanentes (1/5)	Presencia de mayor cantidad de células migratorias (5/5)	Desalineación (1/5)	Normal (5/5)	General

GRUPOS :

C= Control

E1= Expuestos durante toda la gestación

E2= Expuestos durante los dos últimos tercios de gestación

E3= Expuestos durante el último tercio de gestación

FOTOMICROGRAFIAS

FIGURA 1



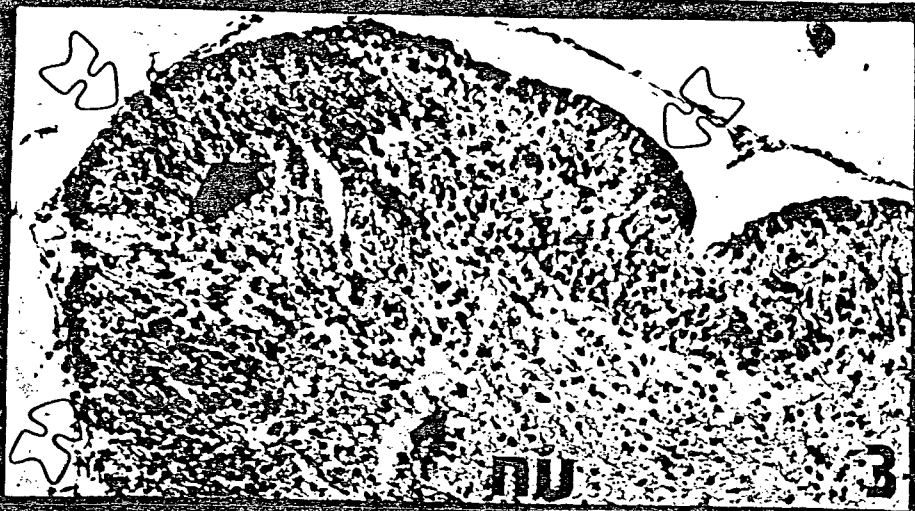
Corte cerebelar al nacimiento de una cría control que muestra el arreglo histológico normal de las diferentes estirpes celulares. Se aprecia el arreglo tisular organizado, el espesor constante de la capa germinal externa (contorno de flecha) y el límite de la capa granular interna (). Núcleos profundos (nu).

FIGURA 2

Animales recién nacidos expuestos el último tercio de la gestación. Es apreciable la celularidad disminuida y el espesor irregular de la capa germinal externa (contorno de flecha). Núcleos profundos (nu). Cuarto ventrículo (iv-V).

FIGURA 3

Crias recién nacidas expuestas el último tercio de gestación. Se aprecia la desorganización del tejido () y el espesor irregular de la capa germinal externa (contorno de flecha). Núcleos profundos (nu).



FOTOMICROGRAFIAS

FIGURA 4

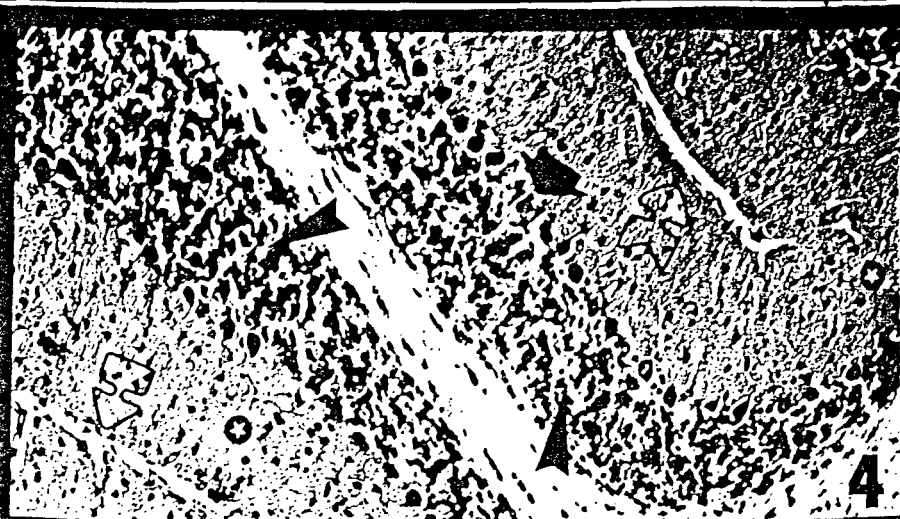
Corte cerebelar de una cría control que muestra el arreglo celular normal a los 20 días postnatales. Se observa ausencia de la capa germinal externa (contorno de flecha), pocas células en migración (⊗), arreglo en monocapa de las células de Purkinje (▶) y densidad poblacional constante en la capa granular interna (▶▶).

FIGURA 5

Crias de 20 días postnatales expuestas toda la gestación. Se observa la persistencia de la capa germinal externa (contorno de flecha) y numerosas células en migración a través de la capa molecular (⊗).

FIGURA 6

Animales a los veinte días postnatales expuestos toda la gestación. Se aprecian remanentes de la capa germinal externa (contorno de flecha), así como la ausencia en zonas (▶) y desalineación de las células de Purkinje (▶▶).



DISCUSION

En general, se manifestaron trastornos en los parámetros somatométricos evaluados en los productos experimentales y en su maduración cerebelar, aunque ninguna de estas alteraciones pueden considerarse como severas al no haberse establecido relación directa (causa-efecto) entre el tiempo total de exposición y la severidad en las alteraciones observadas a través del estudio.

El modelo experimental utilizado en el presente estudio es semejante a las condiciones en las que mujeres gestantes consumen diariamente menos de 6 cigarrillos, situación que no llega a provocar intoxicación aguda.

Las ratas expuestas no desarrollaron adicción al humo de tabaco, ya que invariablemente los animales se resistían a entrar en la cámara, la cual por el dispositivo de ventilación utilizado impidió que se alcanzaran niveles críticos de intoxicación e hipoxia.

Al parecer, la mortalidad de las crías experimentales al nacimiento se debió a que el humo de tabaco afectó severamente a los productos con menor desarrollo intrauterino, mismos que presentaron bajo peso al nacimiento (Cuadro 1). Estos efectos se deben a la hipoxia crónica causada por una reducción en el flujo sanguíneo placentario por los efectos vasoconstrictores de la nicotina, así como a la disminución del oxígeno consecuente al incremento en la concentración de carboxihemoglobina materna y fetal. 20.21.25

El intercambio hemato-placentario entre madre y fetos varía en cantidad de nutrientes según la edad embrionaria y localización intrauterina de los productos, lo que da como resultado el desarrollo desigual de cada uno de estos,^{36,37} lo anterior que sucede normalmente, se hizo más evidente por las diferencias en longitud cráneo-caudal, peso corporal y perímetro cefálico de las crías al nacimiento (Cuadros 2 y 3).

El hecho de que no se manifestaran alteraciones más severas con el mayor tiempo de exposición sugiere que las ratas gestantes fueron capaces de desarrollar cierto grado de adaptación a los bajos niveles de oxígeno y tolerancia a la presencia de tóxicos en el aire inspirado, ya que la mayoría de las crías mantuvieron un desarrollo corporal prenatal normal. Estos mecanismos de protección materno-fetales pueden deberse a un estímulo en los receptores carotídeos junto con la modificación de presión parcial de gases en alveolos. También resulta de fundamental importancia la inducción de una mayor cantidad de enzimas microsomales hepáticas que aceleran la velocidad de depuración de las sustancias tóxicas presentes en el humo de tabaco y que entran en contacto con los tejidos.³

Por otra parte, por la naturaleza de las alteraciones observadas en los productos correspondientes a los diferentes grupos experimentales es posible inferir que suceda una recuperación completa postnatal, como ha sido reportado en otros trabajos en los que crías prenatalmente afectadas posteriormente alcanzaron parámetros normales de desarrollo al suprimir el estímulo nocivo y recibir alimentación normal,³¹ lo anterior

explica la recuperación en peso y anchura cerebelares a los 20 días de edad (Cuadros 2 y 3).

En el presente estudio resultó evidente que la exposición prenatal al humo de tabaco afectó el desarrollo normal del cerebelo,³⁶ las alteraciones resultantes parecen ser permanentes debido a que se redujo la población celular normal, después de haberse completado la etapa de mitosis en las células migratorias que formarán la capa granular interna y eventualmente en células de Purkinje. No obstante lo anterior, el cerebelo conserva su funcionalidad normal debido a la gran plasticidad del tejido nervioso durante el desarrollo, que permite aumentar el número de sinapsis mediante reinervación compensatoria por un aumento en la cantidad de contactos interneuronales cuando el estímulo nocivo no aumenta el índice normal de necrobiosis neuronal que sucede en la etapa de maduración postnatal, sino solamente interfiere transitoriamente con el metabolismo del tejido nervioso como al parecer ocurrió en el presente estudio.

En las crías recién nacidas, al cuantificar el espesor de la capa germinal externa cerebelar (Cuadro 4), los machos y hembras control fueron semejantes estadísticamente a las crías experimentales, por lo que aparentemente estos últimos no sufrieron daños, sin embargo las alteraciones se evidenciaron al analizar sus amplios coeficientes de variación (C.V.) que reflejan una notable irregularidad en el espesor, así como en la distribución de la población celular; lo anterior se manifestó principalmente en el grupo de machos prenatalmente expuestos toda la gestación cuyo C.V. fué de 300.98 %, con un valor mínimo de 15 μ m y máximo de 50 μ m en

el espesor de la capa germinal. En el grupo de hembras prenatalmente expuestas los dos últimos tercios de gestación el C.V. fué de 595.30 %, con un valor mínimo de 7.5 μm y máximo de 62.5 μm en el espesor de la capa (Figs. 2 y 3).

El estudio planimétrico en el cerebelo de crias machos de 20 días de edad mostró semejanza estadística entre los grupos experimentales y el control, sin embargo al analizar los C.V. se evidenciaron anomalías de los grupos experimentales en el espesor de la corteza cerebelar completa, capa molecular y capa granular interna (Cuadro 5).

Los mayores coeficientes de variación en la corteza cerebelar se encontraron en el grupo expuesto toda la gestación (379.68 %). Estos animales también mostraron una notable irregularidad en el espesor de la capa granular interna (C.V. 182.78 %) que indica un patrón anormal de migración celular postnatal.

Las alteraciones cerebelares identificadas se han descrito en otros estudios en los que se han expuesto los productos a diferentes agentes tóxicos.^{38,39} El análisis histológico descriptivo de las principales estirpes celulares cerebelares mostró las mismas alteraciones al nacimiento y veinte días postnatales tanto en machos como en hembras (Cuadros 6 y 7).

Posiblemente el cerebelo resultó afectado por la hipoxia intermitente provocada por la exposición al humo de tabaco, como consecuencia de esto se alteró la actividad de algunas enzimas oxidativas y de la vía glucolítica así como la neurogénesis normal,^{22,23} como lo sugiere el espesor irregular y disminución en la población premigratoria de la capa germinal externa (Figs. 2 y 3)

además del retraso en el tiempo normal de migración hacia la capa granular interna (Fig 5). Por otra parte, las células de Purkinje además de afectarse por el CO, también son sensibles a la nicotina que actúa específicamente de manera inhibitoria sobre ellas.^{27,28} La vulnerabilidad de ésta estirpe se manifestó por reducción numérica en la mayor parte del tejido examinado, zonas amplias ausentes de células o por la alineación irregular de esta monocapa (Fig.6).

El cerebelo fué un buen modelo para demostrar los efectos de bajos niveles de exposición prenatal al humo de tabaco sobre el desarrollo del sistema nervioso, así como para revelar la vulnerabilidad de los productos en distintos estadios de su desarrollo y la evolución postnatal de las alteraciones producidas, desde el nacimiento hasta la maduración del cerebelo. Para entender integralmente los eventos sucedidos es necesario realizar estudios bioquímicos y electrofisiológicos complementarios que permitan identificar los mecanismos metabólicos materno-fetales de adaptación a la presencia sistémica de los compuestos del humo de tabaco.

CONCLUSIONES

1.- No se evidenció ninguna manifestación de alteraciones severas directamente relacionadas con el tiempo total de exposición prenatal al humo de tabaco.

2.- Las alteraciones en la maduración cerebelar fueron: espesor irregular y población celular disminuida en la capa germinal externa; retraso en el período normal de migración de las células granulares; desalineación y ausencia ocasional de células de Purkinje.

3.- Las madres gestantes desarrollaron tolerancia a la presencia sistémica de los compuestos tóxicos del humo de tabaco.

4.- El humo de tabaco afectó con mayor severidad a los productos con menor desarrollo intrauterino, provocando su muerte al nacimiento.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Freixa i Santfeliu, F. (1983). El fenómeno droga, colección Salvat temas clave. Edit. Aula Abierta Salvat. p. 32.
- 2.- Baker, H.G. (1968). Las plantas y la civilización. Centro regional de ayuda técnica. p.p. 163-166.
- 3.- Bowuau, W.C. y Raud, M.J. (1984). Farmacología, bases bioquímicas y fisiológicas. Nueva Editorial Interamericana S.A. de C.V. Capítulo 42.
- 4.- Kuschinsky, G. y Lullmann, H. (1968). Manual de farmacología. p.p. 310,326-328.
- √5.- Gaddum, J.H. (1955). Farmacología. Edit. Reverté S.A.
- 6.- Delmas, A. (1973). Vías y Centros nerviosos. Edit. Toray-Masson S.A. p.p. 1,18.
- 7.- Barr, M. (1975). El Sistema Nervioso Humano, un punto de vista anatómico. Edit. Harla S.A. de C.V. Capítulo 10.
- 8.- Eccles, J. (1975). El cerebro, morfología y dinámica. Edit. Interamericana. p.p. 123,148-149.
- 9.- Altman, J. y Bayer, A. (1978). Prenatal development on the cerebellar cortex in the rat. Citogénesis and histogénesis of the deep nuclei and cortex of the cerebellum. J Comp Neur. 179; 23-48.
- 10.- Altman, J. (1972). Postnatal development on the cerebellar cortex in the rat. I,II,III. J Comp Neur. 353-514.
- 11.- Lopez, A. (1983). Anatomía funcional del sistema nervioso. Edit. Limusa. p.p. 437-461.
- 12.- Dreisbach, R.H. (1981). Manual de envenenamientos. Edit. El manual moderno S.A. p.p. 225-226.
- 13.- Deichmann, W.B. y Gerard, H.W. (1969). Toxicology of drugs and chemicals. Academic Press, Inc. p.p. 154-654.
- 14.- Drill. (1969). Farmacología. Edit. Fournier S.A. p. 577.
- 15.- Van Der Veen y Fox, H. (1982). Effects of cigarette smoking on the human placentas: A light microscopic and electron microscopic study. Placenta. 3; 243-256.
- 16.- Urlich, M. (1982). Fetal growth patterns in premature and low-weight mature newborn infants in relation to maternal smoking placentas abnormalities and other complications of pregnancy. Acta paediatr. 292; 27-40.

- 17.- Rusticali, B. y Mocci, C. (1982). Smoking and pregnancy; clinical and social considerations. *Roma Difsoc.* 61; 116-120.
- 18.- De Scrill, A., Boracchi, P., Pardi, G., Bevilacqua, G., Pezzani, F.M., Marconi, A., Davanzo, R., Paludetto, R., Selvaggi, L. y Zuppa, A.A. (1986). Cigarette smoking in pregnancy: Relationship to perinatal outcomes in six Italian centres. *Genus.* 42; 37-52.
- 19.- Hemminki, K., Mutanen, P. y Saloniemä, I. (1983). Smoking and the occurrence of congenital malformations and spontaneous abortions; multivariate analysis. *Am J Obstet Gynecol.* 145; 61-66.
- 20.- Quigley, M.E., Sheehan, K.L., Wilkes, M.M. y Yen, S.S.C. (1977). Effects of maternal smoking on circulating catecholamine levels and fetal heart rates. *Am J Obstet Gynecol.* 133; 685-690.
- 21.- Sindberg, P. y Marsal, K. (1987). Circulatory changes in the fetal aorta after maternal smoking. *Br J Obstet Gynaecol.* 94; 301-305.
- 22.- Fechter, L.D., Karpa, M.D., Proctor, B., Gail, A. y Storm, J.E. (1987). Disruption of neocortical development in rats following perinatal exposure to mild but chronic carbon monoxide. *Neurotoxicol Teratol.* 9; 277-282.
- 23.- Dagani, F., Marzatico, F., Curti, O., Zanada, F. y Benzi, G. (1984). Effect of prolonged and intermittent hypoxia on some cerebral enzymatic activities related to energy transduction. *J Cereb Blood Flow Metab.* 4; 615-624.
- 24.- Balling, R. y Beier, H.M. (1985). Direct effects of nicotine on rabbit preimplantation embryos. *Toxicology.* 34; 309-314.
- 25.- Carr, L.A., Walters, D.E. y Meyer, D.C. (1985). Postnatal development in the rat following prenatal or postnatal exposure to nicotine. *Res Commun Subst Abuse.* 6; 151-164.
- 26.- Maiti, A., Shahid, K., Grassi, S. y Abood, L.G. (1986). Barrel rotation and prostration by vasopressin and nicotine in the vestibular cerebellum. *Pharmacol Biochem Behav.* 25; 583-588.
- 27.- De la Garza, R., Freedman, R. y Hoffer, J. (1989). Nicotine induced inhibition of cerebellar Purkinje neurons: Specific actions of nicotine and selective blockade by mecamylamine. *Neuropharmacology.* 28; 495-502.
- 28.- De la Garza, R., Bickford, P.C., Hoffer, B.J. y Freedman, R. (1987). Heterogeneity of nicotine actions in the rat cerebellum: An in vivo electrophysiologic study. *J Pharmacol Exp Ther.* 24; 689-695.

- 29.- Vazques, N., Gerardo, H., Zimitria, D., Echeverria, M. y Bermudez, D. (1980). Early neuronal alteration caused by experimental thinner inhalation in young rats. *Neurobehav Toxicol.* 2; 25-30.
- 30.- Seil, F.J., Blank, N.K. y Leiman, A.L. (1979). Toxic effects of kainic acid on mouse cerebellum in tissue culture. *Brain Research.* 161; 253-265.
- 31.- Mendoza Magaña M.L., Garcia Estrada, J. y Garzón de la Mora, P. (1987). Alteraciones estructurales del encéfalo de ratas con retardo en el crecimiento intrauterino y restricción o rehabilitación nutricional postnatal. *Tiempos de ciencia U de G.* p. 22.
- 32.- Feria Velasco, A. y Karnovski, M.J. (1970). Preservación óptima del sistema nervioso central por perfusión con glutaraldehído para estudio estructural. *Arch Invest Med Mex.* 1; 201-217.
- 33.- Disbrey, B.D. y Rack, J.H. (1970). Hematoxiline and Eosine, Harris hematoxiline an eosine histological laboratory methods. *E.S.Livinstone Engl.* p. 99.
- 34.- Little, J.M. (1954). An introduction to the experimental method. Burgess Publishing Co.
- 35.- Hoff, C., Wertelecki, W., Blackburn, W. R., Mendenhall, H., Wiseman, H. y Stumpe, A. (1986). Trend associations of smoking with maternal, fetal and neonatal morbidity. *Obstet Gynecol.* 68; 317-320.
- 36.- Butler, N.R. y Goldstein, H. (1973). Smoking in pregnancy and subsequent child development. *Br Med J.* 4; 573-575.
- 37.- Cnattingius, S., Axelsson, O., Eklund, G. y Lindmarck, G. (1985). Smoking, maternal age y fetal growth. *Obstet Gynecol.* 66; 449-451.
- 38.- Hillman, D.E. y Chen, S. (1981). Vulnerability of cerebellar development in malnutrition. II Intrinsic determination of total synaptic area on Purkinje cell spines. *Neuroscience.* 6; 1263.
- 39.- Griffin, S.T., Wooddeard, D.J. y Chanada, D. (1979). Malnutrition and brain development. *J Neurochemistry.* 28;1269.