

Universidad de Guadalajara

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia



CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

“Efectos de la Inhalación Pasiva de Humo de Tabaco
Sobre la Progenie de Ratas Expuestas Durante
la Gestación. Estudio Somatométrico.”

Tesis Profesional

Que Para obtener el Título de:

Médico Veterinario Zootecnista

Presenta:

Aurora Celia Farías González

Guadalajara, Jalisco. Agosto de 1990

El presente trabajo se realizó en el Dpto. de Investigación Científica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Facultad de Medicina de la Universidad de Guadalajara y La División de Bioquímica Farmacológica de La Unidad de Investigación Biomédica de Occidente del Instituto Mexicano del Seguro Social.

El presente estudio recibió apoyo financiero del Departamento de Investigación Científica y Superación Académica de la Universidad de Guadalajara.

I N D I C E.

C O N T E N I D O :	Páginas;	INICIAL	FINAL.
Introducción.	2	-----	9
Justificación.	10	-----	10
Planteamiento del Problema.	11	-----	11
Hipótesis.	12	-----	12
Objetivo general y particulares.	13	-----	13
Materiales y métodos.	14	-----	16
Resultados.	17	-----	30
Discusión.	31	-----	33
Conclusiones.	34	-----	34
Resumen.	35	-----	36
Referencias Bibliográficas.	37	-----	40

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 MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TESIS PROFESIONAL PARA OBTENER EL Título de :

Médico Veterinario y Zootécnista.

Presenta:

AURORA CELIA FARIAS GONZALEZ.

"EFECTOS DE LA INHALACIÓN PASIVA DE HUMO DE TABACO
SOBRE LA PROGENIE DE RATAS EXPUESTAS DURANTE LA
GESTACIÓN. ESTUDIO SOMATOMETRICO."

Asesores:

M.V.Z. Victor Barragán Cano

M en C Joaquín García Estrada.

Guadalajara, Jal., Agosto 21, 1990.

INTRODUCCION

El hábito de fumar cigarrillos es causa de numerosas muertes, el 12% de los decesos sucede entre los 35 y los 44 años, el 20% entre los 65 y los 74 años, y el 25% entre los 45 y 64 años. La mayoría de las estadísticas se basan en fumadores de cigarrillos, debido a que ésta es la forma de consumo más generalizada y danina del tabaco.²

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,³ después de tratarse se consumen en forma de cigarrillo, cigarros, puros o pipa.³

El tabaco es una droga que forma hábito y un alto porcentaje de la población mundial lo consume; su principal substancia tóxica es la nicotina que se encuentra en las hojas.⁴ En altas dosis éste 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 ésta se quema al fumar.^{5,7}

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 cercanas, especialmente en habitaciones pequeñas (fumadores pasivos).⁹

Un 10% de la nicotina se elimina intacta por vía renal y el resto se degrada fundamentalmente en el hígado, en la inhalación activa del humo de tabaco se han identificado unas 500 sustancias con importancia toxicológica incluyendo la nicotina, así como; monóxido de carbono, alquitran, arsénico, cromo, gases y vapores irritantes.¹⁴

Uno de los principales factores responsables de toxicidad es el monóxido de carbono (CO) éste 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 hipóxia tisular,¹¹ los efectos resultantes dependen del grado y duración de la saturación de sangre con CO. La exposición a 4,000 ppm durante una hora es fatal, esto equivale al 80% de HbCO en sangre.¹³

La carboxihemoglobina se eleva como consecuencia de la reducción del oxígeno disponible y resulta hipóxia fetal, una madre fumadora alcanza normalmente un 5% de carboxihemoglobina mientras que en un sujeto no fumador su concentración es menos del 1%.¹⁷ La menor concentración de hemoglobina fetal hace que la progenie sea más sensibles a la hipóxia.¹⁷

Dentro de los 40 primeros min. después del contacto con el humo se producen cambios pulmonares que conducen a un aumento en la concentración de carboxihemoglobina en la sangre.²⁹ También resultan numerosas consecuencias adversas en los fumadores pasivos, sin embargo no se han realizado suficientes trabajos que

permitan comprender como se afectan las madres gestantes fumadoras pasivas. Se ha establecido que el isotiocianato es un metabolito resultante del humo de tabaco que se deposita en la progenie.⁹ Este compuesto resulta tóxico en altas dosis y se considera indicador del tiempo de exposición al humo del cigarro en trabajos realizados con ratones.⁹

Mediante el uso de un monitor 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/m³ de aire en lugares donde se fuma, como dentro de carros, cafés, tiendas y cantinas, mientras que la cantidad máxima estimada después de un día de exposición fué de 310 mg., equivalente a fumar activamente 13 cigarros ordinarios.¹⁰

Entre los principales indicadores de la evolución de un fumador se encuentran la nicotina, tiocianato salival y monóxido de carbono en el aire espirado.³³

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.¹⁵

Tanto el CO₂ como la nicotina del cigarro son los principales factores de riesgo cuando el hábito es crónico y desencadenan enfermedades cardíacas coronarias solas o asociadas con otras patologías, como caída de la presión arterial sistólica, aumento del conteo plaquetario venoso y niveles de fibrinógeno plasmático.^{16, 17} Como consecuencia de la isquemia placentaria pueden resultar embolia, muerte cerebral o

hemorragias subaracnoideas.²⁰ Junto con la isquemia placentaria se produce constricción de vasos sanguíneos uterinos con acumulación de hidrocarburos aromáticos, e intoxicación por CO como respuesta placentaria compensatoria.²¹

La exposición aguda a la nicotina o al humo de tabaco produce analgesia en las ratas, sin embargo después de repetir el tratamiento no se produce el mismo efecto por el desarrollo de tolerancia en muy corto tiempo. Por otra parte, el estrés que resulta de la inmovilización también provoca analgesia y tolerancia aunque en menor grado, en ambos fenómenos actúan mecanismos comunes. Como consecuencia del consumo prolongado de numerosos cigarrillos existe una etapa inicial de tolerancia seguida de una de dependencia.²²

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

Entre las patologías que se producen frecuentemente están; bajo peso al nacimiento que se acentúa cuando continúa la exposición durante la lactancia,²² presentación anormal durante el parto y malformaciones,²³ además se potencializan los efectos adversos resultantes por la anestesia materna.²⁴ Cuando las madres consumen más de 11 cigarrillos al día puede ocurrir muerte

neonatal y parto prematuro.²⁵ 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 ADN.³ En altas concentraciones la nicotina produce un efecto embriotóxico, sin embargo los niveles críticos necesarios para provocar éste efecto difícilmente se alcanza aún en madres fumadoras bastante activas.²⁶

Se ha reportado retardo del crecimiento esquelético de neonatos, la distrófia muscular sucede con menos frecuencia,³³ también resulta aumento del latido cardíaco fetal sin modificación de la resistencia periférica.²⁷ Ocasionalmente el consumo de tabaco puede producir malformaciones congénitas como hendiduras orales y músculo-esqueléticas.³¹

De las alteraciones maternas por la nicotina se han identificado anomalías de la placenta,²⁸ isquemia placentaria con acumulación de metabolitos tóxicos, hemorragias durante el parto, placenta previa, desprendimiento retardado de membranas, aborto espontáneo y muerte perinatal.²⁹

Se ha comprobado mediante la utilización de modelos animales que el fumar cigarrillos durante el embarazo induce a la hipoxia fetal mediante descargas adrenérgicas que causan vasoconstricción, disminución de la perfusión sanguínea uterina, taquicardia fetal transitoria y un prolongado incremento en la HbCO con reducción sostenida de la oxigenación fetal.^{29,30}

Los abortos resultan con más de 10 cigarrillos diarios, particularmente cuando se asocia la nicotina con alcohol y otras drogas.³¹

Mediante estudios ultraestructurales se han demostrado anomalías del nervio ciático en productos de madres fumadoras pasivas, sin embargo resulta necesario realizar un mayor número de estudios estructurales.² En trabajos experimentales con ratas fumadoras pasivas se han reportado alteraciones semejantes a las descritas en madres fumadoras activas, sólo que también resulta disminución del número de crías nacidas y reabsorciones embrionarias.²⁰

ORGANOGENESIS DEL EMBRION DE RATA

Al completarse la implantación, (cuarto y quinto día gestacionales) cuando han aparecido la vena primitiva y el mesodermo embrionario asociado, el embrión de la rata entra a un estado de post-implantación, de organogénesis y maduración. La organogénesis empieza con la vena primitiva y termina 8-9 días después. Durante éste período los órganos se empiezan a formar hasta lograr su morfología adulta. Este período es de gran susceptibilidad a la acción de los teratógenos y cada órgano pasa por períodos críticos.¹

A partir del mesodermo se forman el sistema músculo-esquelético, los riñones, el hígado y los pulmones.

SISTEMA MUSCULO-ESQUELETICO.

En los días 9 y 10 gestacionales los somites 1-4 son identificables. El embrión está doblado dorsalmente y aparece el primer arco branquial.

En los días 10-11 aparecen los somites 5-20. En la región cervical aparece el segundo arco branquial y sucede reversión de

la curvatura del cuerpo, la superficie dorsal del embrión se hace convexa, la cola se dobla y se forman los pliegues laterales de la pared del cuerpo.

Días 11-12; los somites 21-33 aparecen en región torácica y lumbar los esbozos anteriores de las piernas aparecen seguido, medio día después por los esbozos de las partes posteriores de las piernas; y aparecen los arcos branquiales tercero y cuarto. En los días 12 y 13 aparecen los somites 34 y 45, se forma la región caudal.

A los días 13-14 aparecen los somites 46-51, los esbozos de las piernas anteriores entran al estado de aleta seguido poco después por las piernas posteriores y las hernias umbilicales normales.

Días 14-15; los somites 52-61 están presentes pero su identificación es difícil, la condensación digital empieza en las extremidades anteriores y posteriores. El cuerpo se desarrolla de su forma de C y el primer esqueleto cartilaginoso aparece en las costillas.

Días 15-16; los somites 61-65 están presentes, aparecen las papilas del pelo del cuerpo y la mayoría de los huesos son identificables.

Días 16-17; los dedos están completamente separados en las garras delanteras.

Días 17-18; la hernia umbilical empieza a retirarse, los dedos están completamente separados en garras posteriores.

Días 18-19; la hernia umbilical se retira.

RINONES

Los días 14 y 15 éstos empiezan su ascenso y el día 18 llegan a su posición final, el glomérulo y los túbulos renales pueden reconocerse y empieza la acumulación de fluidos.

HIGADO

En los días 11 y 12 los cordones hepáticos empiezan a desarrollarse, para los días 14-15 el hígado tiene una configuración semejante a la del órgano adulto.

PULMONES

En los días 12 y 13 aparecen las dobladuras pleuroperitoneales y alcanzan un estado semejante al del adulto los días 14-15.¹

Por todo lo anteriormente expuesto, en el presente trabajo se determinaron las alteraciones somatométricas que resultan en productos nacidos de ratas pasivamente expuestas al humo de tabaco en distintos periodos de la gestación, con el propósito de aumentar la información acerca de los riesgos por la exposición pasiva al humo de tabaco.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existen algunos reportes sobre los distintos efectos que resultan por la exposición pasiva de madres gestantes al humo del tabaco, sin embargo no están completamente comprendidos los mecanismos fisiopatológicos de producción de lesión. La nicotina y el CO causan hipóxia siendo ésta una de los principales factores adversos que afectan a los fetos, aparte están presentes otros compuestos químicos en el humo que pueden ser responsables de reacciones diversas, por lo que el presente estudio se analizarán los efectos sobre el desarrollo corporal de crias prenatalmente expuestas por periodos variables de tiempo, bajo circunstancias controladas.

JUSTIFICACION

Debido al aumento creciente de fumadores activos, entre los que están incluidas madres gestantes y a la falta de obediencia a las regulaciones sanitarias que protegen a los fumadores pasivos de los efectos que resultan por periodos largos de exposición en centros de trabajo, resulta necesario aumentar la información disponible sobre las alteraciones en la progenie de hembras gestantes fumadoras pasivas, ya que existen reportes de numerosas patologías de severidad variable que dependen de diversos factores; edad de la madre, nivel educacional, estrato social y número de abortos prematuros entre los principales.

HIPOTESIS

LA HIFÓXIA Y ACUMULACIÓN DE SUSTANCIAS TÓXICAS QUE SE PRODUCEN POR LA EXPOSICIÓN E INHALACIÓN PASIVA DEL HUMO DE TABACO PUEDE AFECTAR EL DESARROLLO DE LA PROGENIE EN MADRES GESTANTES.

OBJETIVO GENERAL

Determinar los trastornos morfométricos en la progenie de ratas gestantes, expuestas a la inhalación pasiva de humo de tabaco.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar los efectos por la inhalación pasiva de humo de tabaco en el número de nacimientos, porcentaje de vivos y porcentaje de muertos.

2. Determinar los efectos por la inhalación pasiva de humo de tabaco sobre parámetros morfométricos en productos de ratas expuestas en distintas etapas de la gestación.

3. Determinar el peso húmedo y seco de: Riñones, hígado, pulmones y carcas de productos normales y sometidos a los efectos del humo de tabaco al nacimiento, veinte y sesenta días de edad.

MATERIALES Y METODOS

Para el presente trabajo se utilizaron 20 ratas adulta de raza SPRAGUE-DAWLEY de segundo parto alojadas en jaulas individuales y mantenidas bajo condiciones de bioterio con temperatura y humedad controladas y ciclos de 12 horas luz-12 horas oscuridad, alimentadas a libre acceso con agua y alimento balanceado para roedores. Mediante citología exfoliativa vaginal se determinó la etapa de estro, para luego dejar 3 ratas con un macho durante cinco días. Con las madres gestantes se formaron cuatro grupos de 5 ratas cada uno. Los animales del primer grupo experimental fueron expuestos al humo del cigarro durante toda la gestación 2 veces al día durante 10 min. cada vez, después de un intervalo de 8 horas. El segundo grupo consistió en ratas que fueron expuestas del día 8 al 21 gestacionales (segundo y tercer tercio de la gestación), bajo las mismas condiciones descritas. El tercer grupo de 5 animales fueron expuestos al humo de cigarro a partir del último tercio de la gestación (15 a 21 días). Los animales restantes fueron los control que solamente se manipularon sin exponerse al humo. Para la exposición se utilizó una cámara hermética de vidrio con 20 cm de alto, 20 cm de ancho y 35 cm de altura y un sistema de aereación mediante dos orificios circulares laterales. Antes de iniciar la exposición se exhalaban en la cámara el equivalente a 2 cigarros con la participación de fumadores voluntarios. Una vez que se generó la atmósfera experimental deseada se introdujo separadamente cada rata. Al momento del parto se determinó el número de productos por madre vivos y

muestras y se registró el peso individual de las crías para luego, en forma aleatoria ajustar las camadas a 8 por madre, a los 21 días de edad se separaron las crías de sus madres y se mantuvieron en grupos separados el resto del estudio. De la prole recién nacida, una rata macho y una hembra fueron sometidas a perfusión intracardiaca para luego separar carcas, hígado, riñones y pulmones. El carcas consistió de la masa musculoesquelética sin piel, vísceras, manos, pies ni cabeza. Para realizar la perfusión se anestesiaron los animales mediante inhalación de éter anhidro y una vez sujetos con cinta adhesiva se hizo toracotomía amplia para exponer el corazón e introducir en el ventrículo izquierdo una aguja biselada No. 23 inmediatamente después se hizo pasar una solución lavadora Ringer-Krebs con procaina al 0.1%, heparina 1,000 U.I. a 37°C, pH 7.3, 0.1 M y 2:3 mosm/l bajo presión de 130 cm de agua por 3 min, seguida 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 8 min. Los tejidos obtenidos al final de la perfusión se posfijaron por una noche a 4°C en la misma solución fijadora. Este procedimiento se repitió con animales control y experimentales de ambos sexos a los 20 y 60 días de edad. Los órganos seleccionados se pesaron en una balanza analítica (Kolch) juntos y el carcas por separado después de eliminar el exceso de humedad mediante papel absorbente. Luego los tejidos se deshidrataron en una estufa bacteriológica a 37°C durante 48 h para registrar nuevamente su peso seco. Los resultados obtenidos fueron analizados

mediante el método estadístico "t" de Student a un nivel de significancia de $P < 0.05$.

RESULTADOS

En general, no resultaron alteraciones en el número de productos nacidos de las madres control y experimentales, tampoco se produjo una elevada mortalidad. En los grupos control y de madres expuestas del día 8 a 21 de la gestación se presentó un 4% de mortalidad sin relación con el tratamiento experimental, la progénie expuesta toda la gestación no reveló mortalidad, en el grupo expuesto del día 15 a 21 se encontró el mayor porcentaje (8%), en éste mismo grupo una cria mostró formación incompleta de la columna vertebral (Cuadro 1).

En todas las crias experimentales muertas se observó bajo peso corporal y al practicarse necropsia se diagnosticó cianosis y ligero edema subcutáneo, también se demostró que los productos murieron al nacimiento sin haber respirado.

Cuadro 1

Efectos de la exposición pasiva al humo de tabaco en el número de productos y mortalidad neonatal.

Grupos	No. ratas	Total de productos nacidos. (vivos ó muertos).	Promedio de crias por rata.	% Mortalidad
Control	5	46	9.2	4
Experimentales				
1 a 21 días	5	61	12.2	0
8 a 21 días	5	38	7.6	4
15 a 21 días	5	50	10.0	8

Los días indicados corresponden al periodo gestacional de la rata que comprende 21 días.

MORFOMETRIA.

M a c h o s.

Al nacimiento no hubo diferencias en el peso corporal y longitud craneo-caudal de los productos control y experimentales, el mayor diámetro cefálico correspondió a la progénie control que solo difirió significativamente de los productos expuestos a partir del segundo y último tercio de la gestación, sin diferencias significativas entre los tres grupos experimentales ($P>0.05$), (Cuadro 2).

A los veinte días de edad no hubo diferencias en el peso corporal de la progénie control y los expuestos toda la gestación, el mayor peso de 49.31 gr., diferente al resto de los animales ($P<0.05$), correspondió a los expuestos a partir del primer tercio de la gestación seguidos por los correspondientes al último tercio de la gestación (37.172 gr.), que también difirieron de todos los demás ($P<0.05$).

El mayor tamaño se encontró en la progénie expuesta del día 8-21 (17.58 cm.), ésta difirió de los demás productos, no hubo diferencias significativas entre los otros dos grupos experimentales ($P>0.05$), ambos difirieron del control, éstos mostraron el menor tamaño (14.98 cm.). El diámetro cefálico de las crías control y expuestas toda la gestación fué semejante ($P>0.05$), el mayor valor correspondió al grupo de animales expuestos del día 8-21 gestacional (17.24 cm.) y diferente al resto ($P<0.05$). La progénie expuesta el último tercio mostró un valor menor que el grupo anterior y también fué diferente a los demás animales ($P<0.05$), (Cuadro 2).

A los sesenta días de edad la progénie control alcanzó el mayor peso corporal (178.5 gr.) que difirió de los grupos experimentales expuestos toda la gestación y el último tercio, que también difirieron entre sí ($P < 0.05$). El mayor tamaño se encontró en la progénie del grupo expuesto del día 15-21 gestacional, éste difirió de todos los demás ($P < 0.05$), que a su vez fueron semejantes entre sí ($P > 0.05$).

No hubo diferencias en el diámetro cefálico de las progénies control y experimentales, (Cuadro 2).

Cuadro 2

Parámetros Somatométricos (Machos)

E D A D (Días).

	Epo	n	1			20			60				
			X	D E	CVI	n	X	D E	CVI	n	X	D E	CVI
Peso Corporal gr	C	24	6.11 a	0.62	0.37	14	29.45 a	46.28	7.05	3	1178.50 a	8.84	52.16
	E1	29	5.76 a	0.66	0.42	17	29.81 a	31.22	5.76	9	149.13 b	26.85	41.28
	E2	18	6.30 a	0.74	0.52	10	49.31 c	59.56	8.13	3	145.40abc	42.89	29.49
	E3	24	6.36 a	0.51	0.25	11	37.17 b	46.78	7.17	10	134.21 c	10.12	92.35
Longitud craneo-caudal ca	C	24	6.73 a	3.68	13.06	14	14.98 a	2.47	1.63	3	32.16 a	1.60	4.90
	E1	29	5.44 a	0.48	0.22	17	15.86 b	2.44	1.61	9	30.10 a	2.01	0.64
	E2	18	5.91 a	0.44	0.18	10	17.58 c	2.84	1.79	3	29.56 a	4.05	13.70
	E3	24	5.59 a	0.53	0.29	11	15.90 b	2.30	1.59	10	36.20 b	1.71	2.66
Diámetro cefálico na	C	24	8.65 a	0.63	0.39	14	12.87 a	0.07	0.48	3	20.80 a	0.75	0.38
	E1	29	8.25abc	0.40	0.16	17	14.38 a	3.28	1.86	8	21.97 a	0.44	31.11
	E2	18	8.28 b	0.34	0.60	10	17.24 c	1.31	1.20	3	22.13 a	0.21	22.69
	E3	24	8.31 c	0.46	0.20	11	15.68 b	0.25	0.52	10	19.95 a	1.50	2.03

C= control. E1= exposición de 1 a 21 días. E2= exposición del día 8 a 21. E3= exposición el último tercio.

Valores con literales diferentes indican significancia estadística (P<0.05).

H e m b r a s

Al nacimiento el mayor peso corporal se encontró en el grupo prenatalmente expuesto el último tercio de la gestación (5.96 gr.) significativamente diferente a los demás ($P < 0.05$), no hubo diferencias entre las crías control y las expuestas toda la gestación ($P > 0.05$). El mayor tamaño a esta edad correspondió a las crías control (5.83 gr.) que difirieron de todos los animales experimentales ($P < 0.05$), entre estos no se apreciaron diferencias ($P > 0.05$). No hubo diferencias en el perímetro cefálico de las crías control y experimentales ($P > 0.05$), (Cuadro 3).

A los veinte días de edad el mayor peso corporal correspondió a las hembras expuestas a partir del segundo tercio de la gestación y difirieron significativamente de todos los demás grupos ($P < 0.05$) que fueron semejantes entre sí ($P > 0.05$).

El tamaño de las crías control y experimentales fué semejante a los veinte días de edad ($P > 0.05$).

El mayor perímetro cefálico se encontró en los animales expuestos del día 8-21 gestacional (16.51 mm.) seguido del grupo expuesto el último tercio de la gestación (15.18 mm.) que también difirió del resto de grupos ($P < 0.05$), no hubo diferencias entre las crías control y las expuestas toda la gestación ($P > 0.05$), (Cuadro 3).

A los sesenta días de edad el mayor peso corporal correspondió a las hembras control (144.83 gr.) que difirieron de la progénie expuesta toda la gestación y el último tercio ($P < 0.05$) y éstos grupos mostraron valores semejantes entre sí ($P > 0.05$).

Las crias expuestas los dias 8-21 de la gestación fueron semejantes a las control pero difirieron de las demás.

En ésta edad, el mayor tamaño (34.55 cm.) se encontró en la progénie expuesta el último tercio de la gestación, que difirió de todos los demás grupos ($P < 0.05$), y de éstos, las hembras control difirieron de las expuestas toda la gestación ($P < 0.05$).

No hubo diferencias en el perimetro cefálico de la progénie control y las expuestas toda la gestación y a partir del primer tercio ($P > 0.05$), las crias de madres tratadas en el último tercio gestacional tuvieron valores semejantes a las expuestas toda la gestación ($P > 0.05$), (Cuadro 3).

Cuadro 3

Parámetros Somatométricos (Hembras)

E D A D (DIAS)

	Epo	n	10			20			60				
			\bar{X}	D E	CVZ	n	\bar{X}	D E	CVZ	n	\bar{X}	D E	CVZ
Peso Corporal gr	C	47	5.58 a	0.57	0.32	11	28.70 a	9.12	75.62	3	144.83 a	9.26	57.16
	E1	61	5.31 a	0.59	0.34	11	28.00 a	5.86	31.27	8	97.52 b	26.11	26.77
	E2	39	5.88 b	0.49	0.23	11	44.40 b	10.23	95.22	3	140.30 ca	16.42	11.70
	E3	50	5.96 c	0.90	0.78	9	28.38 a	2.80	6.98	10	126.65 b	3.72	12.36
Longitud cráneo-caudal cm	C	47	5.63 a	0.91	0.79	11	15.31 a	1.65	2.43	3	31.66 a	1.04	3.20
	E1	61	5.51 b	0.48	0.22	11	15.00 a	1.22	1.36	8	29.75 b	0.53	4.80
	E2	39	5.70 b	0.43	0.18	11	15.03 a	1.85	3.14	3	30.36ab	1.20	3.90
	E3	50	5.51 b	0.47	0.21	9	14.60 a	1.08	1.04	10	34.55 c	1.53	2.12
Diámetro cefálico mm	C	47	8.40 a	0.66	0.42	11	14.09 a	1.41	1.81	3	19.16 a	0.37	0.89
	E1	61	8.29 a	0.34	0.01	11	14.40 a	1.41	1.82	8	21.65ab	0.80	25.31
	E2	39	8.36 a	0.47	0.21	11	16.51 c	1.48	1.99	3	21.13 a	4.68	18.30
	E3	50	8.49 a	0.64	0.40	9	15.18 b	0.62	0.34	10	17.93 b	1.51	2.01

valores con literales diferentes indican significancia estadística (P<0.05).

n = Número de hembras.

 \bar{X} = Media.

D.E. = Desviación estándar.

C.V.Z = Coeficiente de variación.

ANÁLISIS DEL CARCAS Y VISCERAS DE MACHOS Y HEMBRAS EN LAS DIFERENTES EDADES.

Peso húmedo y seco de machos.

Al nacimiento el peso húmedo del carcas control fué significativamente menor al registrado en la progénie correspondiente a los grupos expuestos toda la gestación y durante el último tercio ($P < 0.05$), no hubo diferencias entre todos los grupos estudiados cuando se analizó el peso húmedo y seco de las vísceras. Una vez deshidratados los tejidos el mayor peso del carcas se encontró en los productos expuestos toda la gestación que difirieron del control y fueron semejantes a los otros dos grupos experimentales ($P < 0.05$), (Cuadro 4).

A los veinte días de edad el peso húmedo del carcas de machos control y experimentales fué similar ($P > 0.05$), cuando se compararon las vísceras los mayores valores se encontraron en las crías control y las expuestas toda la gestación, ambas difirieron de los demás grupos experimentales ($P < 0.05$) que fueron semejantes entre sí ($P > 0.05$).

Al compararse el peso seco del carcas, solamente el grupo expuesto a partir del segundo tercio de la gestación presentó los mayores valores que difirieron significativamente de dos grupos ($P < 0.05$) y fueron semejantes a los de productos de madres expuestas el último tercio de la gestación ($P > 0.05$). No hubo diferencias en el peso seco de las vísceras entre los tres grupos experimentales ($P > 0.05$), la progénie control mostró el menor valor promedio que difirió de la progénie expuesta toda la gestación y a partir del segundo tercio ($P < 0.05$), (Cuadro 4).

A los sesenta días de edad el peso húmedo y seco del carcas de machos control resultó mayor que el resto de los grupos experimentales ($P < 0.05$), en el peso húmedo de las vísceras no hubo diferencias entre los distintos animales ($P > 0.05$), una vez deshidratadas se encontraron valores semejantes entre animales control y experimentales, sólo la progénie expuesta el último tercio de la gestación difirió de la progénie control ($P < 0.05$), (Cuadro 4).

Cuadro 4

Peso húmedo y seco del carcas y vísceras de machos control y experimentales al nacimiento, veinte y sesenta días de edad.

RECIBEN NACIDOS	M A C H O S															
	P E S O H U M E D O						P E S O S E C O									
	C A R C A S			V I S C E R A S			C A R C A S			V I S C E R A S						
	\bar{X}	DE	CVI	\bar{X}	DE	CVI	\bar{X}	DE	CVI	\bar{X}	DE	CVI				
C	2.085	a	0.18	8.63	0.744	a	0.16	21.50	0.373	a	0.17	45.57	0.138	a	0.12	86.95
E1	2.835	b	0.50	17.63	0.621	a	0.33	53.14	0.572	b	0.12	20.97	0.229	a	0.15	50.21
E2	2.384	ab	2.13	89.34	0.635	a	0.39	61.40	0.475	ab	0.22	48.42	0.280	a	0.22	78.57
E3	2.784	b	0.71	25.50	0.717	a	0.62	86.47	0.523	ab	0.19	36.32	0.196	a	0.15	76.53
20 días																
C	10.618	a	3.82	35.97	2.638	a	0.57	21.60	2.679	a	0.78	29.11	0.511	a	0.04	7.80
E1	10.743	a	2.55	23.73	2.236	a	0.43	19.23	3.373	a	0.86	25.49	0.604	b	0.06	9.90
E2	11.623	a	2.84	24.43	2.169	bc	0.85	39.18	3.555	b	0.72	29.25	0.629	b	1.08	8.90
E3	10.577	a	3.69	34.88	2.368	bc	0.86	36.63	3.483	ab	1.07	30.72	0.603	ab	0.14	23.21
60 días																
C	170.122	a	5.46	10.93	9.791	a	2.29	23.38	23.816	a	4.27	17.92	1.945	a	0.36	18.50
E1	161.451	b	5.46	8.80	10.157	a	2.68	26.38	19.061	b	4.23	22.19	2.194	ab	0.74	33.72
E2	156.740	b	5.34	27.00	10.753	a	2.74	25.48	18.436	b	5.05	27.39	2.354	ab	1.26	53.52
E3	157.962	b	4.63	7.90	9.002	a	1.50	16.66	18.323	b	4.21	22.97	2.557	b	0.71	27.76

Literales iguales indican que no existe diferencia significativa (P<0.05).

\bar{X} = media

D.E. = Desviación estandar

C.V.I = Coeficiente de variación

Las hembras recién nacidas mostraron los mayores valores del carcas húmedo en los grupos prenatalmente expuestos toda la gestación y durante el último tercio, ambos difirieron de los productos control ($P < 0.05$) que mostró el menor peso del carcas. No hubo diferencias en el peso húmedo de las vísceras de todas las crías estudiadas ($P > 0.05$), en el peso seco del carcas tampoco se identificaron diferencias entre todos los grupos. El peso seco de las vísceras control fué significativamente menor al registrado en los grupos expuestos toda la gestación y durante el último tercio, éstos últimos tuvieron el mayor peso ($P < 0.05$), (Cuadro 5).

En ésta edad no hubo diferencias significativas entre los diferentes parámetros estudiados en machos y hembras.

A los veinte días de edad el peso húmedo de carcas experimentales fueron semejantes entre sí, pero diferentes al control que mostró el mayor valor ($P < 0.05$) semejante al de la progenie expuesta toda la gestación ($P > 0.05$). Las vísceras en húmedo tampoco difirieron entre los tres grupos experimentales, todas mostraron pesos significativamente menores que los de la progenie control ($P < 0.05$). No hubo diferencias en el peso seco de carcas y vísceras control y experimentales ($P > 0.05$), (Cuadro 5).

Al igual que en la etapa anterior, tampoco hubo diferencias significativas entre machos y hembras.

A los sesenta días de edad el mayor peso húmedo del carcas se encontró en la progenie control, que difirió significativamente del resto ($P < 0.05$). De los animales experimentales analizados, las crías expuestas toda la gestación

mostraron el menor valor significativamente diferente a los grupos control y de animales expuestos de 8 a 21 días ($P < 0.05$).

El peso húmedo de las vísceras fué semejante entre la progénie control y las expuestas toda la gestación y desde el segundo tercio ($P < 0.05$). El menor valor correspondió a las crias expuestas el último tercio de la gestación que sin embargo sólo difirieron significativamente del control ($P < 0.05$).

El carcas deshidratado del control sobrepasó a los pesos resultantes de todos los grupos experimentales ($P < 0.05$), seguido de los animales expuestos el último tercio de la gestación y desde el segundo tercio que no difirieron entre sí ($P > 0.05$), pero sí del grupo expuesto el último tercio del desarrollo prenatal ($P < 0.05$). No se observaron diferencias en el peso de las vísceras deshidratadas control y experimentales ($P > 0.05$), (Cuadro 5).

A los 60 días de edad no hubo diferencias entre machos y hembras respecto al peso húmedo y seco de carcas, hígado, pulmones y riñones.

Peso húmedo y seco del carcas y vísceras de hembras control y experimentales al nacimiento, veinte y sesenta días de edad.

RECIBEN NACIDAS	HEMBRAS											
	PESO HUMEDO						PESO SECO					
	CARCAS			VISCERAS			CARCAS			VISCERAS		
	\bar{X}	DE	CVZ	\bar{X}	DE	CVZ	\bar{X}	DE	CVZ	\bar{X}	DE	CVZ
C	1.864 a	0.33	17.70	0.658 a	0.20	29.41	0.744 a	0.13	17.47	0.161 a	0.03	18.63
E1	2.749 b	0.82	29.82	0.690 a	0.21	44.92	0.621 a	0.17	12.57	0.330 b	0.20	60.60
E2	2.408 ab	1.17	48.58	0.504 a	0.21	41.66	0.431 a	0.10	44.08	0.110 c	0.05	45.45
E3	2.752 b	0.62	22.52	0.574 a	0.37	64.46	0.489 a	0.15	30.67	0.407 abc	1.15	29.30
20 días												
C	13.256 a	2.47	18.63	3.569 a	0.40	11.20	3.084 a	0.40	12.97	0.592 a	0.33	55.74
E1	11.259 ab	2.23	19.80	2.638 b	0.83	31.46	3.471 a	1.09	31.40	0.593 a	0.12	20.23
E2	10.563 b	2.23	21.11	2.229 b	0.41	18.39	2.957 a	0.48	16.23	0.587 a	0.06	10.22
E3	10.521 b	2.75	26.13	2.615 b	0.48	18.35	3.017 a	0.70	23.20	0.599 a	0.06	10.01
60 días												
C	68.333 a	2.47	7.02	9.203 a	0.84	9.12	24.376 a	3.16	12.96	1.822 a	0.92	50.49
E1	54.495 b	6.56	12.03	8.471 ab	1.52	17.94	15.226 b	1.52	9.98	1.958 a	0.19	9.70
E2	54.872 c	11.58	21.33	9.179 ab	2.63	28.65	15.620 b	0.83	5.31	2.120 a	0.41	19.33
E3	57.801 bc	12.33	21.10	7.442 cb	1.74	23.38	19.365 c	2.23	11.51	2.234 a	0.58	25.96

literales iguales indican que no existe diferencia significativa (P<0.05).

\bar{X} = Media.

D.E. = Desviación estándar.

C.V.Z = Coeficiente de variación.

DISCUSION.

Durante el estudio las hembras gestantes mantuvieron su consumo normal de alimento y solo presentaron un ligero estres al inicio de los experimentos, cuando se encontraban dentro de la cámara se acicalaban la nariz que se les irritó bastante en los primeros periodos de exposición, esta irritación desapareció posteriormente. Después de exposiciones repetidas las ratas se resistian a ingresar en la cámara.

Existen diferentes reportes que describen los efectos adversos que resultan en los productos nacidos de madres expuestas a la inhalación activa o pasiva de humo de tabaco durante la gestación, éstos refieren que los machos se afectan con mayor severidad que las hembras.²¹

En los resultados obtenidos del presente estudio no se identificaron diferencias en los parámetros morfométricos analizados atribuibles al sexo, tampoco se produjeron trastornos de severidad variable por el tiempo total de exposición que dependió del momento gestacional en que se inició la exposición (Cuadros 2-5).

Lo anterior sugiere que la concentración de elementos tóxicos en la atmósfera saturada de la cámara experimental fué insuficiente para alterar el desarrollo corporal normal prenatal, por lo que no se observó un efecto dosis dependiente como ha sido reportado anteriormente.²² La única alteración del desarrollo se encontró en una cria del grupo expuesto el último tercio de la gestación y consistió en una falta de desarrollo de la columna vertebral que por el periodo gestacional en que se aplicó el

tratamiento, no tiene relación con la exposición, ya que en ésta se encuentra avanzado el proceso de formación del sistema músculo-esquelético.⁴

Por otra parte, posiblemente las hembras gestantes experimentales desarrollaron un mecanismo de tolerancia a los niveles elevados de carboxihemoglobina circulante en sangre por estimulación de los cuerpos carotídeos y modificación de la presión parcial de gases en alvéolos, mientras que la velocidad de depuración de compuestos tóxicos en sangre se aceleró por inducción de los sistemas microsomales hepáticos, entre otros.

Asimismo resultó evidente una amplia variación en la respuesta individual materno-fetal debido a la diversidad de los resultados en productos control y experimentales. Por éstas razones, los productos no se afectaron en relación directa con la concentración total acumulada de los tóxicos activos presentes en el humo del tabaco que fueron inhalados por las madres.

Estos resultados solo pueden extrapolarse a lo que sucedería en progenies de mujeres gestantes expuestas a períodos intermitentes de corta duración en atmósferas con concentraciones moderadas de humo de tabaco. Para poder establecer los efectos que resultan por períodos prolongados de exposición en ambientes laborales deberán establecerse otros modelos experimentales. De cualquier manera, resultaría indispensable obtener una muestra de la atmósfera saturada para medir la concentración de elementos presentes mediante cromatografía de gases, lo cual resultaría difícil por la diversidad de compuestos tóxicos además de la nicotina, sin

embargo la concentración de ésta serviría como un indicador del nivel de saturación.

Con los resultados obtenidos es evidente que la exposición pasiva con mediana saturación de humo de tabaco y periodos cortos de exposición no causó alteraciones en el desarrollo de los productos, independientemente de la etapa gestacional, (Cuadros 4,5). Sin embargo utilizando el mismo modelo, pero en exposición activa si se han descrito alteraciones del desarrollo prenatal.³⁰

Lo anterior indica que cuando el humo es exhalado contiene una menor concentración de tóxicos debido a que éstos fueron parcialmente retenidos por el fumador activo.⁴

El peso húmedo y seco de carcas de animales control y experimentales en la etapa neonatal y posnatal indica que no hubo alteraciones del desarrollo músculo-esquelético ni visceral por acumulación de compuestos tóxicos en los tejidos corporales de las madres y los productos (Cuadros 4,5). Sin embargo, con las mismas dosis y periodos más prolongados de exposición resultarían alteraciones de severidad variable correspondientes a la etapa de organogénesis.

Al parecer las ratas gestantes fueron capaces de adaptarse a la disminución de los niveles normales de O_2 y a la presencia de tóxicos en el aire, ya que se mantuvo el desarrollo normal de sus crías. Esto no significa que no se afecten otros órganos más sensibles a la hipoxia, como el sistema nervioso central.¹²

Para entender éste fenómeno más integralmente es necesario realizar estudios bioquímicos complementarios que permitan identificar los efectos metabólicos en las madres y sus

productos, ya que hasta el presente se han realizado muy pocos estudios acerca de éstos utilizando el humo directamente exhalado por un fumador activo.

CONCLUSIONES

1.- No hubo diferencias significativas entre el número de nacimientos y porcentaje de vivos y muertos entre el grupo control y los experimentales.

2.- En el modelo experimental utilizado no se observaron alteraciones somatométricas significativas sobre la progénie de ratas expuestas a la inhalación pasiva de humo de tabaco.

3.-No hubo diferencias significativas entre los pesos secos y húmedos de carcas y vísceras de los diferentes grupos experimentales y el grupo control.

RESUMEN.

La inhalación activa del humo de tabaco retrasa el crecimiento intrauterino al inhibir parcialmente la síntesis de ADN. El humo inhalado involuntariamente es nocivo para los no fumadores por sus compuestos tóxicos, sin embargo no se obedecen las regulaciones sanitarias establecidas al respecto. Se realizó éste estudio para determinar los riesgos en progenie por la exposición pasiva materna durante la gestación al analizar: susceptibilidad fetal en distintos estadios prenatales, manifiesta por los efectos sobre el desarrollo corporal intrauterino y postnatal. Veinte ratas gestantes Sprague-Dawley se dividieron en 4 grupos de 5 cada uno, un control y 3 experimentales expuestos 2 veces al día por 10 min en una cámara de 40 lt saturada con humo exhalado de 1.5 gr de tabaco, a partir del día 1 a 21 (1E), 8 a 21 (2E) ó 15 a 21 (3E) de la gestación. Al día 1, 20 y 60 de edad se registró el peso corporal, diámetro cefálico y longitud craneo-caudal de la progenie, así como el peso húmedo y seco de carcas, hígado, pulmones y riñones. Dos crias por camada en cada edad se fijaron por perfusión intracardiaca y se deshidrataron para obtener carcas y vísceras. En las tres edades estudiadas las diferencias somatométricas entre los grupos control y experimentales no permitieron establecer una relación directa entre el periodo gestacional y el tiempo total de exposición con las alteraciones observadas. Del análisis de pesos húmedo y seco de carcas y vísceras en las mismas edades tampoco se evidenciaron

efectos por el tratamiento experimental. Del análisis global de los resultados se puede concluir que las ratas expuestas en diferentes periodos de la gestación toleraron la disminución de la concentración normal de oxígeno y la presencia tisular de compuestos tóxicos. El modelo estudiado resultó de baja toxicidad para los parámetros estudiados aún en el más largo periodo de exposición.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Allan, R.D. 1989 Embriology and teratology. The laboratory rat vol. II. Chapter fourth.
- 2.- Amankwah, K.S., Kaufman, N.C., Webberg, A.D. 1985 Ultraestructural changes in neonatal Sciatic Nerve Tissue; effects of passive maternal smoking. Gynecol Obstet Invest., 20; 180-193.
- 3.- Balling, R., Beir, H.M. 1985 Direct effects of nicotine on rabbit preimplantation embryos. Toxicology, 34; 309-314.
- 4.- Banuelos, F, J., Caratachea, G, B, M., Garcia, L, P, M., Farias, G. A. C. 1990 Efectos de la inhalación activa de humo de tabaco sobre el desarrollo corporal en productos de ratas expuestas en distintos periodos de la gestación. Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Agosto 5 al 8, Guadalajara Jal. México.
- 5.- Bell, B. A., Ambrose, J. 1982 Smoking and the risk of stroke. Acta Neurochir., 64; 1-8.
- 6.- Bergstrom, J., Eliasson, S. 1987 Cigarette smoking and alveolar bone weight in subjectes with a high standard of oral hygiene. J Clin Periodontol., 14; 466-469.
- 7.- Boracchi, P. I., Cortinovis, De Scrilli, A. 1986 Smoking habit in pregnancy and sociodemographic backgroup in six Italian Centres. Genus, 42; 53-70.
- 8.- Bottoms, S., F., Kuhnert, B, R. 1982 Maternal passive smoking and fetal serum thiocyanate levels. Am J Obstet Gynecol., 144; 787-791.

- 9.- Brudin, L. M., Rhodes, C.G., Valind, S.O. 1987 Regional lung and blood volume in nonsmoking and smoking subjects measured by PET. *J Appl Physiol.*, 63; 1324-1334.
- 10.- Bounannd, G., Lenzato, G., Maisto, F.. 1984 Smoking in pregnancy; Smoke-addicted pregnant women give birth lean body mass alewborns. *Osp Ital Pediatr.*, (Spec-Chir) 19; 16-22.
- 11.- Busacca, M. F., Breviario. 1986 Effect of cigarette smoking on plasmatic regulation of vascular prostacyclin in pregnancy and puerperium. *Obstet Gynecol.*, 68; 816-819.
- 12.- Campos, B. C. A. 1990 Alteraciones cerebelares en productos de ratas expuestas durante la gestación a la inhalación de humo de tabaco. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias (Biología), Universidad de Guadalajara.
- 13.- Cerderqvist, L., Spigelman, S., Litwin, S., D. 1982 The fetal serum alpha-fetoprotein and its relationship to immunoglobulins and birth weigh at term. *Obstet Gynecol.*, 61; 233-237.
- 14.- Chaplin, J., Spurr, W. Jr. 1982 Altering condensate levels in Tobacco smoke by genetic techniques. *Beitr Tabakforsch Int.*, 11; 151-160.
- 15.- Di Blasi., Ferotti, G.N., Belvedere, M. 1983 Interrelation of cigarette smoking and other risk factors in coronary heart disease. *Cardiologia*, 28; 1037-1051.
- 16.- Dotevall, A., Cutti, J., Teger-Nilson, A. C. 1987 Platelet reactivity fibrogen and smoking. *Eur J Haematol.*, 38; 55-59.

- 17.- Eldon, M., Luecker, A. F. W., Macgee, J. 1987 Lack of effect of withdrawal from cigarette smoking on theophylline pharmacokinetics. *J Clin Pharmacol.*, 27; 221-225.
- 18.- Eldon, M., Luecker, A. F. W. 1987 The effect of acute withdrawal from cigarette smoking on indocyanine green and antypirine clearance. *J Clin Pharmacol.*, 27; 226-232.
- 19.- Eriksen, P. 1987 Circulatory changes in the fetal aorta after maternal smoking. *Br J Obstet Gynecol.*, 94; 301-305.
- 20.- Estel, C., Boettcher, A., Semman, K.. 1982 Smoking habits of mothers and fathers; Bearings on birth weight and malformations of newborn. *Ntrabl Gynaekol.*, 104; 563-567.
- 21.- Feccher, L., D., Karpa, M., D., Proctor, B. 1987 Distrupction of neostrial development in rats following perinatal exposure to mild but chronic carbono monoxide. *Neurotoxicol Teratol.*, 9; 277-282.
- 22.- Federici, F., C., Pasqualis, A., Moretti, P. 1986 Weight increase and chronic experimental intoxication from Tobacco smoke in the albino rat; Effect of protection with mineral water. *Acta Bio-Med Ateneo Parmense*, 55; 235-254.
- 23.- Hjalmarson., Agneta, J.M. 1984 Effect of nicotine chewing gum in smoking cessation; A randomized, placebo controlled, double blind study. *Jama*, 522; 2835-2838.
- 24.- Kololowski, L., Page, A. 1987 A second look at the effects of supportive follow-up and smoking cessation. *Can Med Assoc J.*, 137; 605-607.

- 25.- Loscalzo, B., Agrusta, A., M., Agrusta, A., Crisci, L. 1987 Passive Tobacco smoking and stress in pregnancy. Riv Tossicol Sper Clin., 15; 119-128.
- 26.- Massey, K., Vincent, P., Russel, L. 1984 Dose-dependent kinetics of theophylline in adults with pulmonary diseases. Ther Drug Monit., 6; 284-289.
- 27.- Mc Bride, Melanie, J., Guyatt, Andrew, R., Kirkham, Andrew, J. T. 1984 Assessment of smoking behavior and ventilation with cigarettes of differing nicotine yields. Clin Sci., 67; 619-632.
- 28.- Pinto, R., Abrams, D., B., Monti, P., M. 1987 Nicotine dependence and likelihood of quitting smoking. Addic Behav., 12; 371-374.
- 29.- Ress, P.J. 1982 Immediate response to cigarette smoke. Thorax., 37; 417-422.
- 30.- Rowell, P., P., Carr, L., A., Garner, A., C. 1987 Stimulation of Tritiated dopamine release by nicotine in rat nucleus accumbens. J Neurochem., 49; 1449-1454.
- 31.- Simoes, M., Silva, J. 1985 Study of the frequency of mother's smoking habits during pregnancy in Ribeirao Preto, Sao Paulo. Rev Cienc Biomed., 6; 61-70.
- 32.- Stanley, O. H., Fleming, P. J., Morgna, M. H. 1987 Development wave form analysis of the neonatal flash evoked potential. Electroencephalogr Clin Neurophysiol., 68; 149-152.
- 33.- Stookey, G. K., Alson, B. L., Drook, C. A. 1987 Evaluation of biochemical validation measures in determination of smoking status. J Dent Res., 66; 1597-1601.