



433
2 ej

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

**CULTIVO DE MICROMASAS DE PROCESOS
MANDIBULARES EN RATONES CD-1 A DIFERENTES
CONCENTRACIONES DE ALCOHOL**

T E S I S :
QUE COMO REQUISITO PARA
PRESENTAR EL EXAMEN PROFESIONAL DE

CIRUJANO DENTISTA

P R E S E N T A :

SANDRA ADOLFINA TORRES PASTRANA

Director de Tesis:

DR. JAVIER PORTILLA ROBERTSON

Asesores:

DR. JUAN CARLOS HERNANDEZ GUERRERO

DR. GUSTAVO ADOLFO JIMENEZ GARCIA

DR. GERARDO MAUPOME CARVANTES

DR. ALEJANDRO MIRANDA GOMEZ

ESTE TRABAJO FUE APOYADO POR PAPIIT IN201293

MEXICO, D.F. 1996



FACULTAD DE
ODONTOLOGIA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A MI MADRE:

Porque me dio lo más valioso que se puede tener, por creer en mí y por estar siempre.

A MI PADRE:

Por haberme enseñado parte de sus tan bellos conocimientos, los cuales prevalecen a través del tiempo y la distancia.

A MIS HERMANOS:

Como una muestra de cariño que nos une:

Miguel Angel

Tomás David

Candelaria

Minerva

Víctor Manuel

Margarita

Verónica

AGRADECIMIENTOS

DR. JUAN CARLOS HERNANDEZ:

A quien deseo expresar mi afecto y aprecio más profundos; por haberme brindado su confianza y el trabajar en este proyecto y por la amistad tan confortable que en algún momento me brindó.

DR. GERARDO MAUPOME CARVANTES:

Por su ayuda, comprensión y aliento en los momentos mas difíciles. Por la amistad confortable que me ha brindado.

DR. GUSTAVO JIMENEZ:

Quien me orientó y enseñó amablemente; por brindarme apoyo, ayuda, por estar siempre disponible y lleno de afecto. A quien sin cuya colaboración no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

Alfonso Pineda:

Por su comprensión y ayuda cuando el tiempo fue corto en mi jornada.

Rocio Sánchez:

Por la convivencia diaria, por estar siempre conmigo y permitir que la amistad florezca entre nosotras.

Estela, Luz del Carmen, Dra. Margarita, Luis Gómez, Dr. Juan Francisco Salcido, Lucina, Sulma:

Los quiero y estimo, gracias por brindarme su ayuda y comprensión durante esta etapa.

Muchas Gracias.

AL C. DR. JAVIER PORTILLA ROBERTSON.
Director de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradezco sinceramente la atención y facilidades otorgadas al prestarse amablemente para la Dirección de esta Tesis.

ÍNDICE.

	Pag.
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. JUSTIFICACIÓN.....	8
3. PROBLEMAS	8
4. HIPÓTESIS.....	8
5. OBJETIVO GENERAL	9
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
7. MATERIAL Y MÉTODOS	10
8. RESULTADOS	13
9. DISCUSIÓN	15
10. CONCLUSIONES.....	18
11. BIBLIOGRAFÍA	19

1. INTRODUCCIÓN.

Desde épocas bíblicas, se ha considerado a la ingesta de alcohol como la causa de efectos teratogénicos en el producto. Originalmente, el término "teratogenia" ha sido usado para describir anormalidades físicas, literalmente significaba "formación de monstruos".⁽¹⁾ Recientemente, se ha reportado que esta ingestión de alcohol provoca un conjunto de alteraciones en el producto, a las cuales se les ha denominado: Síndrome del feto alcoholizado (SFA).⁽²⁾ Entre ellas se mencionan anormalidades como pliegues simiescos, párpados mongoloides y un retraso mental, entre otros⁽³⁾. Además, el estudio del desarrollo craneofacial, en estos individuos, ha proporcionado información sobre la compleja organización y constitución de la estructura ósea, e información sobre los mecanismos de control y diferenciación del mesénquima de células embrionarias.

Aunque el potencial teratogénico del alcohol ha sido sospechado durante siglos, es hasta los trabajos de Lemoine en 1968 y Jones y Smith en 1973, en que esta condición dismórfica, asociada con el alcoholismo maternal, es descrita en la literatura. Fue también Lemoine⁽¹⁾ quien en 1968 describió por primera vez, en detalle, las características de niños con malformaciones fetales nacidos de madres alcohólicas; de 127 infantes expuestos a etanol en útero, 25 de ellos presentaron malformaciones faciales, anomalías del corazón,

problemas del desarrollo psicomotor y lenguaje.⁽¹⁾ A su vez Jones, en 1973 describió un patrón similar de anomalías en estos niños, designándolo como SÍNDROME DEL FETO ALCOHOLIZADO (SFA).⁽⁴⁾ Lo anterior condujo a la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos a aplicar medidas de salud pública para prevenir este problema, a través de la colocación de etiquetas de advertencia en botellas de whisky. Sin embargo, la incidencia de SFA se ha mantenido relativamente alta: 1.9 casos por cada 1000 nacidos vivos. Se estima que aproximadamente una de cada 30 embarazadas abusan del alcohol; por lo cual se considera que el 6%, de los hijos de estas personas nacerán con anormalidades relacionados con el SFA. Además, el alcohol reduce el peso natal, aún en ausencia de otros efectos observables. En un estudio prospectivo que involucró más de 800 mujeres, se encontró que por cada onza de alcohol absoluto, (aproximadamente dos bebidas consumidas por día) ingeridas en el período final del embarazo, se reduce el peso natal en 160 gramos.⁽⁵⁾ Los infantes al nacer presentan características de crecimiento deficiente en cuanto a tamaño y peso; se reporta que los pacientes recién nacidos presentan más alteraciones en peso que en tamaño, y que pocos logran adquirir el desarrollo normal después del nacimiento. En general los niños con SFA quedan con más de dos desviaciones por debajo del término medio de peso y talla, con peso severamente limitado.⁽⁶⁾

El decremento de tejido adiposo es casi una constante en niños con SFA. Se ha demostrado que estos pacientes tienen niveles normales de la hormona del crecimiento, por lo que las deficiencias en el desarrollo parecen deberse a una escasa proliferación celular que conduce a la disminución del número de células fetales con la consecuente limitación del tamaño fetal.⁽⁷⁾

Resumiendo, en principio se definen tres características, en el SFA: Deficiencia en el crecimiento prenatal, fisuras palpebrales cortas y microcefalia. Posteriormente, se concluyó que las tres evidencias para el diagnóstico del SFA son: retardo en el crecimiento; ciertas anomalías faciales y disfunciones del SNC.⁽²⁾

Por otro lado, los estudios experimentales en animales íntegros gestantes han confirmado el efecto teratogénico del alcohol, reportándose efectos teratogénicos⁽⁴⁾ como: parte media de la cara pequeña, filtrum indefinido, labio superior delgado, micrognasia, circunferencia de la cabeza pequeña, puente nasal bajo, pliegue epicántico arrugado, fisuras palpebrales pequeñas, nariz pequeña, rotación de la parte posterior de las orejas, microcefalia, anomalías neurológicas, retraso mental, imposibilidad de habilidades cognoscitivas, entre otras.^(2, 8) Otros estudios similares han reportado: exencefalia, hidronefrosis, anomalías cardíacas, crecimiento retardado, malformación craneofacial y daño al desarrollo temprano del ojo.⁽⁹⁾

Cabe destacar que los modelos animales son particularmente importantes porque permiten evaluar factores que rara vez pueden ser controlados en estudios en humanos, incluyendo: el control del tiempo, la dosis de alcohol, el control de los nutrientes, del medio ambiente, así como consideraciones sobre las diferencias genéticas individuales. El ratón, cobayos, sabuesos, y ratas; han sido estudiados entre algunas de las especies como modelos de la teratogenicidad del alcohol.⁽¹⁰⁾

En el ratón las investigaciones demuestran: defectos en los ojos; anomalías cardíacas y neuronales; anomalías digitales, cardiovasculares, urogenitales y malformaciones en cabeza por la administración de grandes dosis de alcohol.⁽¹¹⁾ Las perturbaciones en el crecimiento celular, también han sido asociadas con el consumo de etanol.⁽¹²⁾ El consumo crónico se ha relacionado con la cirrosis alcohólica, la cual se caracteriza por la presencia de un desprendimiento celular, seguido por inflamación y necrosis.⁽¹²⁾

Por otro lado, los mecanismos bioquímicos responsables de este conjunto de daños no han sido bien identificados. Sin embargo, se cree que hay múltiples mecanismos dependientes del estadio de embarazo; y a la fecha se proponen ocho mecanismos:

1. Transporte placentario impedido;
2. Organogénesis muscular anormal;
3. Hipoxia fetal;

4. Cambios en el metabolismo de las prostaglandinas;
5. Metabolismo hormonal alterado;
6. El papel del zinc; este mecanismo propone que debido a una deficiencia del zinc materno, asociado a la ingestión de etanol, se impide el crecimiento fetal, ya que este elemento desempeña un papel muy importante en la síntesis de proteínas y por tanto la teratogénesis se asocia con la actividad de metaloenzimas dependientes del zinc.⁽⁸⁾
7. El papel del acetaldehído; este es un producto metabólico primario del alcohol, y puede contribuir al efecto teratogénico del alcohol, ya que en el hígado fetal hay baja actividad de alcohol-deshidrogenasa comparada con el hígado materno.⁽⁸⁾
8. Etil-ésteres de ácidos grasos;

Dentro de estos ocho mecanismos el que más se apega a nuestra investigación es el octavo mecanismo bioquímico que incluye a los etil-ésteres de ácidos grasos.⁽⁸⁾

Bearer ⁽⁸⁾, demostró que la exposición de los tejidos fetales a altos niveles de etanol se producen acumulación de étil ésteres de ácidos grasos: como el etil-palmitato, etil-esteareato y etil-oleato. Estos etil-ésteres de ácidos grasos han sido identificados después de la ingesta de etanol, en páncreas, hígado, tejido adiposo, médula ósea, leucocitos periféricos, corteza cerebral, músculo esquelético y aorta; pudiendo representar un mecanismo de toxicidad inducida

por el etanol, en órganos que carezcan de alcohol-deshidrogenasa. Por lo tanto, la identificación de estos lípidos pudiera representar un marcador útil para el diagnóstico precoz de SFA, ya que su acumulación puede tener un efecto tóxico sobre el metabolismo celular.⁽⁸⁾

La dosis responsable de la teratogenicidad del alcohol aún no se ha determinado. Esta información es vital para valorar los niveles de seguridad y patrones de la ingesta de alcohol durante el embarazo, y con ello ser capaces de pronosticar e identificar los productos con SFA.

Una vez comprobada la relación causal entre el alcohol y el SFA surgieron nuevas preguntas de investigación, entre ellas se trata de explicar la diferencia de peso y tamaño de los productos de madres alcoholizadas, en relación a productos de madres no alcoholizadas considerándose que tales eventos podrían deberse a una escasa proliferación celular.⁽³⁾

Debido al escaso conocimiento sobre los efectos del alcohol en la cavidad oral, Hernández llevo a cabo un estudio para evaluar el efecto del alcohol sobre el peso y tamaño de la mandíbula de ratones de madres alcoholizadas. Este trabajo, en particular, reporto diferencias significativas entre el peso de la mandíbula entre el grupo control y experimental, lo cual también ha sido reportado en casos severos de SFA tanto en humanos como animales. A si mismo, se planteó que tal diferencia podría ser explicada por la acción teratogénica del alcohol sobre la actividad mitótica del cóndilo. Con el objeto de

dar respuesta a esta hipótesis se llevó a cabo esta investigación, *in vitro*, utilizando en grupos independientes las concentraciones de alcohol utilizadas por Hernández (0.05, 0.1, 0.15 y 0.20) con el objeto de identificar aquellas que provocarán diferencias significativas entre un grupo control y experimental.⁽³⁾

Cabe mencionar, que el cultivo de tejidos es un recurso primario desde el comienzo de este siglo ⁽¹³⁾. Es un método para estudiar el comportamiento de células animales libres de variaciones sistémicas que pueden originarse en el animal, durante la homeostasis normal y/o bajo tensión.

El desarrollo de la tecnología transgénica del ratón ⁽¹⁴⁾, junto con la fuente de estabilización y antecedentes genéticos de este, han sido los factores para considerar al ratón como una especie favorita para diversos trabajos de experimentación.

2. JUSTIFICACION.

Este trabajo pretende continuar con la línea de investigación sobre el efecto del alcohol en las estructuras bucodentales; en particular, se busca dar respuesta a las interrogantes surgidas en los estudios en animales de experimentación, a través de la utilización de cultivos celulares.

3.0 PROBLEMAS.

¿Cual es la concentración de alcohol que pueda explicar una diferencia del al menos el 30% entre los promedios de células cultivadas de cóndilo y mandíbula en relación a un grupo control.?

¿Existirán diferencias significativas entre los promedios de células, de grupos con una misma dosis de alcohol, obtenidas del cóndilo y la mandíbula?

4. HIPOTESIS.

La concentración de 0.10 de alcohol en cultivos celulares del proceso mandibular y condilar embrionarios de ratones CD-1 provocará una disminución del 30% en el número de células en relación a un grupo control.

Utilizando las mismas concentraciones de alcohol, el promedio de células será significativamente mayor en el grupo del cóndilo en relación al grupo de la mandíbula.

5. OBJETIVO GENERAL.

Cuantificar el número de células cultivadas después de un período de cultivo de 15 días, en dos grupos experimentales con cuatro concentraciones de alcohol diferentes y dos grupos controles.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Obtener células de cóndilo, de ratones CD-1 a catorce días de gestación.
- Obtener células de mandíbula, de ratones CD-1 a catorce días de gestación.
- Cultivarlas en un medio, con tripsina y dextrosa PBS.
- Contabilizar el número de células en grupo control y experimental.

7. MATERIALES Y MÉTODOS.

Para el presente estudio se utilizó un grupo de ratones hembras vírgenes de la cepa CD-1, los cuales fueron obtenidos del Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Los ratones con 8 semanas de edad y con un peso entre 21 y 24 gramos. Se colocaron 3 hembras y un macho en una jaula, en el lapso comprendido entre las 20:00 horas y 8:00 horas, para permitir la fecundación. Se determinó la presencia de tapón vaginal al día 0 de la gestación. a partir de ese momento, las hembras fueron separadas del macho y su peso se registró cada tercer día. Se mantuvieron en un ciclo de luz y temperatura controlada y con una dieta comercial dura (purina) y agua *ad libitum* antes y hasta el día 14 de gestación, en el cual se sacrificaron por dislocación cervical; los embriones fueron removidos y colocados en solución estéril, conteniendo un 10% de suero fetal (SIGMA). La disección de las mandíbulas y a su vez de los condolió, se realizó bajo un microscopio de disección estereoscópico (Nikon Co. Japan), utilizando agujas de tungsteno, bajo condiciones asépticas en cada animal. Se realizaron cortes horizontales sobre el proceso medionasal, para poder obtener la separación del cráneo y mandíbula. Las mandíbulas fueron removidas por separado del arco hioides y cortadas lateralmente en el sitio de unión del cuerpo con la cabeza. La lengua fue retenida hasta el final de la disección para hacer más fácil el manejo de la mandíbula; ya habiendo hecho la separación de ésta, la capa de cartílago del

cóndilo mandibular fue excisionada y se dejó libre de cualquier resto de tejido fibroso, periostio y hueso.

Los cultivos de micromasas tanto del cóndilo como del resto del proceso mandibular se colocaron en tubos de ensaye estériles y se incubaron en tripsina (0.25%) y dextrosa en PBS. durante 5 minutos a 37° C; en una atmósfera a 5% de bióxido de carbono, posteriormente se colocó el material en una centrífuga a 1506 rev/min durante 10 minutos con el propósito de homogeneizar los especímenes. Después se observó el precipitado celular y se eliminó el medio de tripsina, se agregó colagenasa (0.15%) para ser resuspendidas en el medio de cultivo durante 15 minutos a 37° C (920 mL) a cada tubo. Al término de este tiempo se agregó medio con suero. Las células disgregadas se resuspendieron en una densidad de 2×10^6 células/mL en medio de cultivo suplementado con suero fetal bovino (10%). Se sembraron las micromasas (condrocitos) en densidades de 1×10^6 cm en cajas de 25 pozos, en las cuales se cuidó de ir colocando las densidades con las pipetas en los extremos pegados a las paredes de los pozos, con el fin de no destruir células y que estas se deslizaran poco a poco hacia el centro del pozo.

La preparación de las concentraciones de alcohol con agua bidestilada se realizaron al 0.05%, 0.10%, 0.15% y 20% las cuales se filtraron y posteriormente se adicionaron a los pozos de cultivo, en una proporción de un mL en cada pozo.

La incubación fue mantenida durante 15 días a 37° C en una atmósfera de 5% de bióxido de carbono. El medio se cambiaba cada tercer día, se realizaron pruebas regulares para asegurar que no existiera contaminación micoplasmal o microbial. Cualquier pozo con signo de contaminación se destruyó inmediatamente y todo el equipo se reesterilizaba.

Toda la metodología antes mencionada se utilizó tanto en los grupos de micromasa condilar y de proceso mandibular en grupos control y los que recibieron alcohol en diferentes concentraciones.

En el día quince de incubación se les retiró el medio de cultivo a todos los "cultivos", posteriormente fueron fijados con medio Karnowsky de alta densidad durante 1 hora, se eliminó el fijador y se agregó azul de alciano al 1% (en ácido acético 6 ml al 6% y ácido clorhídrico 2 ml al 2% durante 24 horas.

Posteriormente, se eliminó el azul de alciano y se lavó el exceso con ácido acético al 3% y ácido clorhídrico al 1%. Para cuantificar la incorporación de azul de alciano en la matriz extracelular, las células se trataron con 4M guanidina HC 4M/L durante 24 hrs, al final de la extracción el sobrenadante fue leído a 595 nm de absorción en un microscopio estereoscópico.

8. RESULTADOS.

Los resultados descriptivos del grupo condilar y mandibular son presentados en la Tabla 1, la cual muestra el promedio, desviación estándar (ds) y sesgo del número de células de ambos grupos. Ya que el promedio y ds de los grupos controles fueron similares se decidió utilizar solo el Control #1 para los análisis comparativos. Las Tablas 2 y 3 muestran los resultados del grupo mandibular y maxilar respectivamente, se aprecia que solo en un grupo la distribución fue asimétrica (concentración 0.20 del grupo mandibular) por lo que los análisis bivariados se llevaron a cabo con la prueba paramétrica "t pareada". La hipótesis nula destacaba que no existían diferencias entre el promedio de células del grupo control en relación a cada una de las concentraciones de alcohol. Mientras que la hipótesis alterna era que el promedio de células sería mayor en cada uno de los grupos experimentales que en el grupo control. Los resultados de las pruebas bivariadas se muestran en las Tablas 4 y 5, en las cuales se destaca que todas las comparaciones, entre el grupo control y cada uno de los grupos experimentales, fueron significativas ($p < 0.05$). Esto es, en todos los grupos el promedio de células fue mayor en el grupo control que en el experimental. Se aprecia una relación dosis respuesta entre la concentración de alcohol y el número de células: a mayor concentración de alcohol mayor diferencias de promedios. Con el objeto de saber si existían diferencias significativas entre los promedios de células del grupo condilar versus

mandibular, para una misma concentración de alcohol, se llevó a cabo un análisis de varianza de una vía. En este caso la hipótesis nula era que no existirían diferencias entre los promedios de células del grupo condilar contra el promedio de células del grupo mandibular, para una misma concentración de alcohol. La hipótesis alterna mencionaba que el promedio de células sería mayor en el grupo condilar que en el grupo mandibular. Los resultados mostraron que existieron diferencias significativas entre al menos uno de los grupos comparados (ANOVA $F=110.30$ $p=0.0000$). Sin embargo, el análisis *post-hoc* no mostró diferencias significativas específicamente entre los grupos que deseábamos comparar, como la muestra la Tabla 6, para el análisis *post hoc* se utilizó la prueba de Tukey.

9. DISCUSIÓN.

Estudios epidemiológicos permitieron identificar al consumo de alcohol en mujeres embarazadas como la causa de un síndrome denominado Síndrome del Feto Alcohólico (SFA). Estudios en animales corroboraron al alcohol como el responsable de aquel conjunto de malformaciones. Posteriormente, se estudio el efecto que pudiera tener el alcohol sobre las estructuras bucodentales. Al comprobar que el tamaño y peso del maxilar y la mandíbula eran significativamente menores que la de los animales control, surgió la hipótesis de que estas diferencias se podrían deber al efecto teratogénico del alcohol sobre la actividad mitótica de células del cóndilo. Con el objeto de probar tal hipótesis se llevo a cabo este trabajo de investigación. Además, se esperaba que hubiera una diferencia significativa entre la actividad mitótica de células obtenidas del cóndilo y de la mandíbula. medida a través de comparar los promedios de células después de cultivarlas con diferentes concentraciones de alcohol. Los resultados mostraron que existía una relación dosis respuesta entre la concentración de alcohol y el promedio de células cultivadas: a mayor concentración de alcohol ocurrió un menor número de mitosis, en todos los grupos estudiados.

Se destaca que Hernández⁽¹⁾, reportó que la máxima diferencia entre el peso de la mandíbula de progenies de ratones alcoholizadas se encontró en el día postnatal 21.5, esta diferencia correspondió a un 30.8%. En tal estudio se le

administró concentraciones cada vez más altas de alcohol del 1 al 20% al mismo animal. Nosotros utilizamos concentraciones del 5 al 20% ya que pretendíamos conocer aquella concentración de alcohol que provocara también una diferencia porcentual del 30%. Tal diferencia se encontró entre los grupos de concentración de alcohol más baja (0.05%). Dicho de otro manera, Hernández encontró una diferencia del 30.8% entre los pesos mandibulares, al utilizar diferentes dosis en un mismo animal no fue posible conocer que concentración era la responsable de tal diferencia. Nosotros, al utilizar concentraciones de alcohol únicas para cada grupo permitió establecer que la misma diferencia se encontró en el grupo del 5%. De manera que suponemos que una reducción en la actividad mitótica del 30% se traducirá en una disminución del peso mandibular también en un 30%. Cabe destacar, que esta diferencia se encontró tanto en el grupo de la mandíbula como del cóndilo. Al provenir de un centro de crecimiento, suponíamos que el potencial mitótico era más alto para las células del cóndilo. Sin embargo, al comparar los grupos de cóndilo y mandíbula con las mismas concentraciones no se encontraron diferencias significativas en ningún grupo. Al saber que la dosis teratogénica no es bien conocida, hubiera sido prudente utilizar también la concentración del 1% y posiblemente concentraciones más bajas. Las diferencias significativas entre los grupos experimental y control nos permitió descartar la variabilidad natural como una posible explicación de la asociación entre la concentración de alcohol

y el promedio de células para los grupos control y experimental. Aunque es importante señalar que tal variabilidad está reducida simplemente por el hecho de utilizar cultivos de células de una misma cepa. Se descarta que los resultados encontrados se pudieran deber a el efecto de otras variables ya que el diseño experimental por si mismo las controla. Finalmente, cabe mencionar que no se llevaron a cabo pruebas de confiabilidad en los sujetos que llevaron a cabo el conteo de células. Sin embargo, debido al hecho de que fueron dos sujetos diferentes los que llevaron a cabo los conteos celulares ((uno para el grupo mandibular y otro para el grupo condilar) y no existiendo diferencias notables suponemos que las lecturas tuvieron un adecuado nivel de confiabilidad. Otro aspecto importante era que se evitó el sesgo del observador al asegurarse que los sujetos, que llevaron a cabo el conteo celular, desconocían la hipótesis del trabajo de investigación.

10. CONCLUSIONES.

La investigación realizada *in vitro*, concluye que la administración de alcohol resulta en inhibición celular., comprobando la hipótesis propuesta por Hernández, en cultivos de células del cóndilo y la mandíbula.

La inhibición en un 30%, en relación con el grupo control, se logró con la concentración más baja de alcohol (0.05)

El alcohol reduce la actividad mitótica de células obtenidas del proceso condilar y del proceso mandibular de ratón, en una relación dosis respuesta, obteniéndose una mayor disminución conforme se incrementa la concentración de alcohol.

No existieron diferencias significativas entre los promedios de células del cóndilo y mandíbula para cada una de las concentraciones de alcohol.

Se sugieren los siguientes proyectos de investigación:

- Desarrollo y alteración en la síntesis de proteínas y colágena tipo II.
- Estudiar el papel de los glicosaminoglicanos en el desarrollo de la condrogénesis.
- Estudiar alteraciones en el ligamento periodontal en ratones CD-1 a diferentes
- concentraciones de alcohol *in vitro*.

11. BIBLIOGRAFIA.

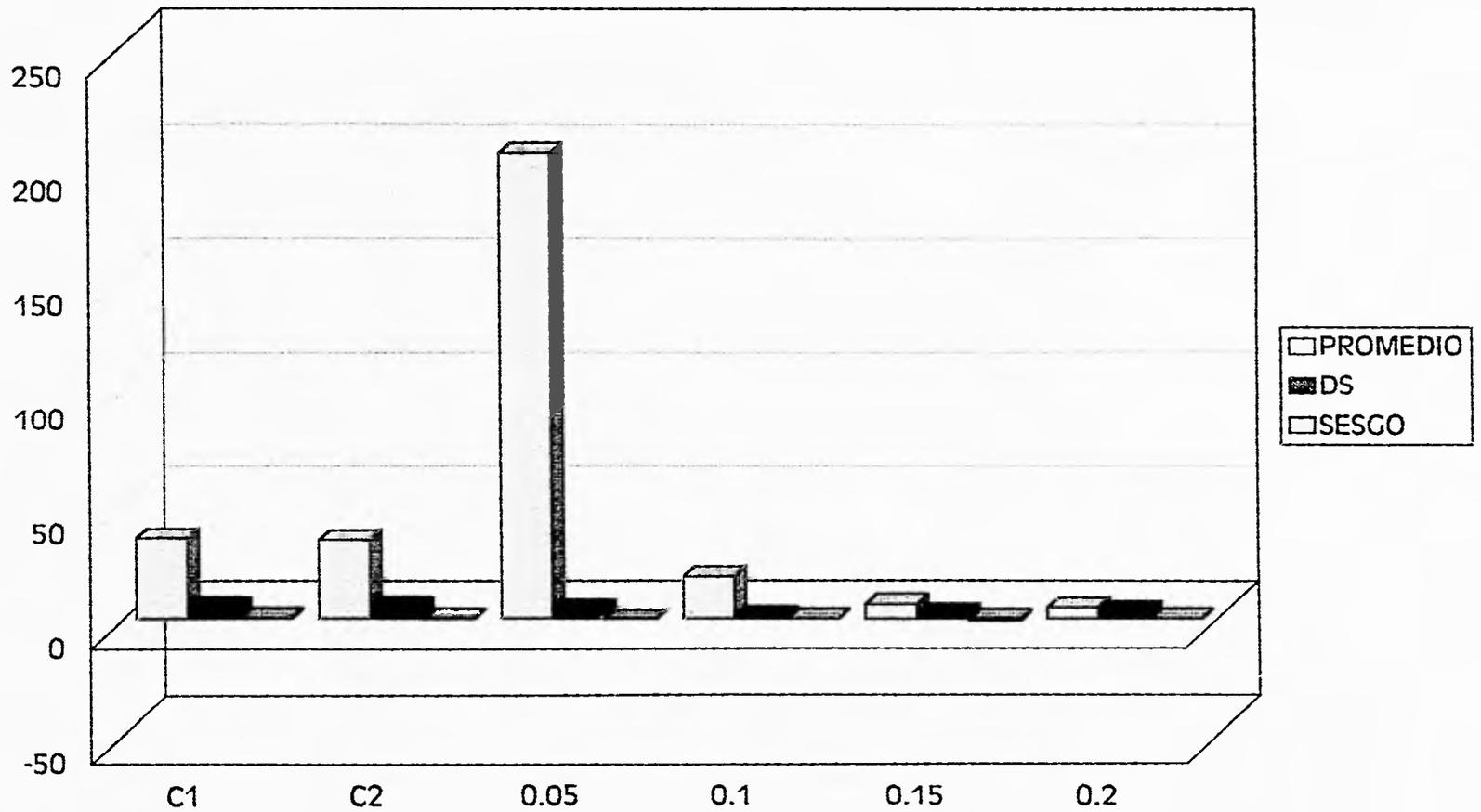
1. **LEMOINE P, HARROSEAU H., BORTEYRU JP., MENUET JC.** Les enfants de parents alcooliques: anomalies observees. *Quest Med.* 21:476-82. 1978.
2. **HERNANDEZ JC.** Morphologic effects of maternal alcohol intake on skull, mandible and tooth of the offspring in mice. *Jap J Oral Biol* 32 1990; (4): 460-469.
3. **GIANOULAKIS C.** Effect of prenatal exposure to ethanol on body growth and the pituitary B-endorphin. *Alcoholism Clin Exp Res* 1987; 11:567-563.
4. **ABEL EL.** Consumption of alcohol during pregnancy: A review of effects on growth and development of offspring. *Hum Biol* 1982; 54 421-453.
5. **GAITAN LA, LABRADA LS, MENDEZ JD.** Síndrome del feto alcoholizado. Aspectos generales y mecanismos teratogénicos del etanol. Una revisión. *Práctica odontológica.* 1994; 15 (2).
6. **BARNETT R, SHUSTERMAN S.** Fetal alcohol syndrome: review of literature and report of cases. *JADA.* 1985; 111:591-593.
7. **WEISS P.** Perspectives in the field of morphogenesis. *Rev Biol.* 25:177-198. 1950.
8. **BEARER CF, GOULD S, EMERSON R, KINNUNEN P, COOK CS.** Fetal alcohol syndrome and fatty acid ethyl esters. *Pediatr Res.* 1992; 31 (5).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

9. **RANDALL CL.** Alcohol as a teratogen: a decade of research in review. *Alcohol. suppl* 1987; 1(3):125-132.
10. **SMITH GN, PATRICK J, SINERVO HR, BRIEN JF.** Effects of ethanol exposure on the embryo-fetus: experimental considerations, mechanism and the role of prostaglandins. *Can J Physiol Pharmacol.* 69:550-569. 1991.
11. **STREISSGUTH AP, LANDESMAN-DWYER S, MARTIN JC AND SMITH DW.** Teratogenic effects of alcohol in human and laboratory animals. *Science.* 1980; vol.209.
12. **SMITH GN, PATRICK J, SINERVO HR, BRIEN JF.** Effects of ethanol exposure on the embryo-fetus: experimental considerations, mechanism and the role of prostaglandins. *Can J. Physiol Pharmacol.* 1991;69:550-569.
13. **MOSS ML.** Functional analysis of human mandibular growth. *J. Prosthet Dent* 1960; 10:1149-1159.
14. **COTRILL CP, ARCHER CW & WOLPERT L.** Cell sorting and chondrogenic aggregate formation in micromass culture. *Dev Biol.* 1987; 122:503-515.

PROMEDIO, DS Y SESGO DEL NUMERO DE CELULAS POR CADA GRUPO CONTROL Y CONCENTRACIONES DE ALCOHOL

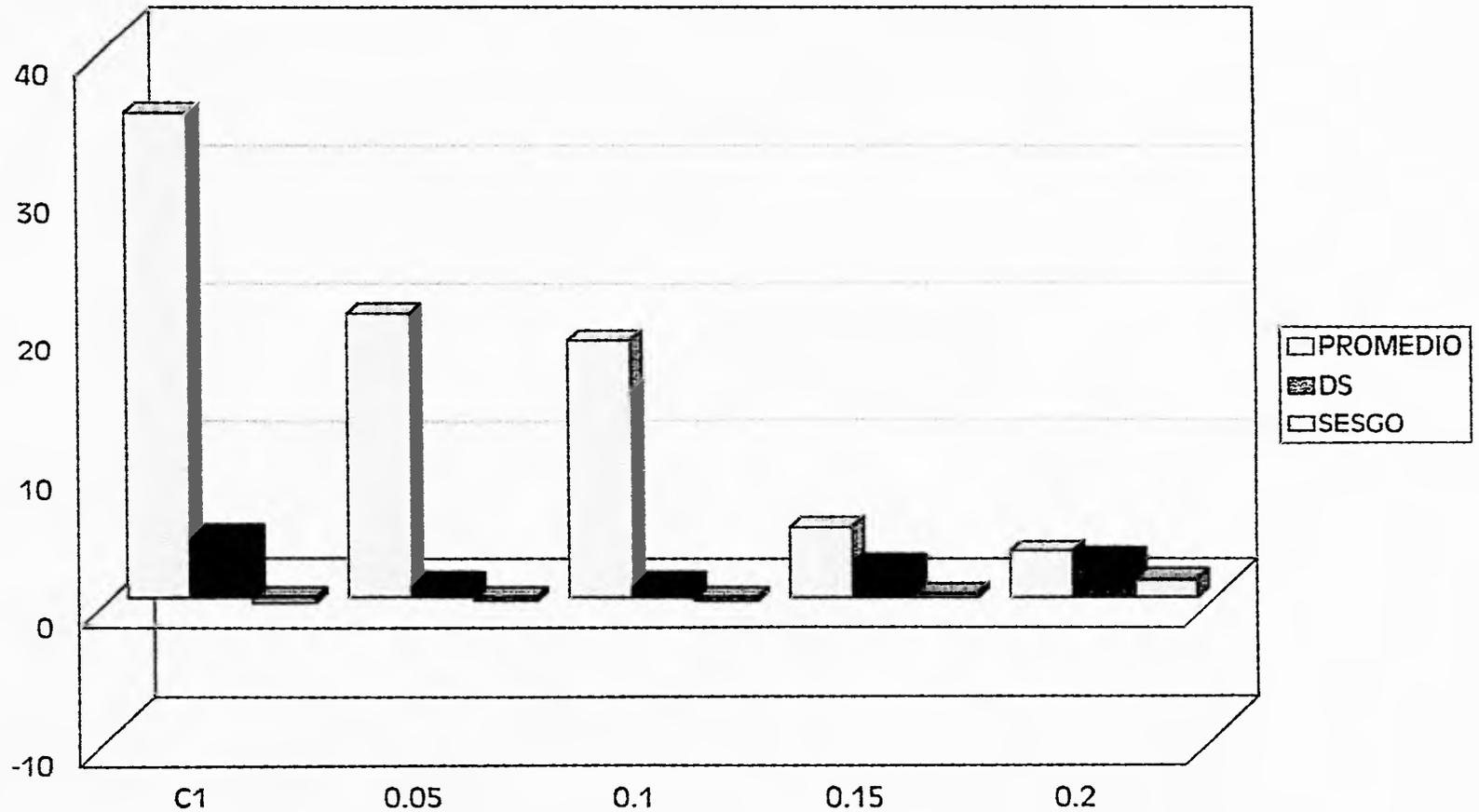
AMBOS GRUPOS: CONDILO Y MANDIBULA



GRAFICA 1

PROMEDIO, DS Y SESGO DEL NUMERO DE CELULAS POR GRUPO CONTROL 1 Y 4 CONCENTRACIONES DE ALCOHOL

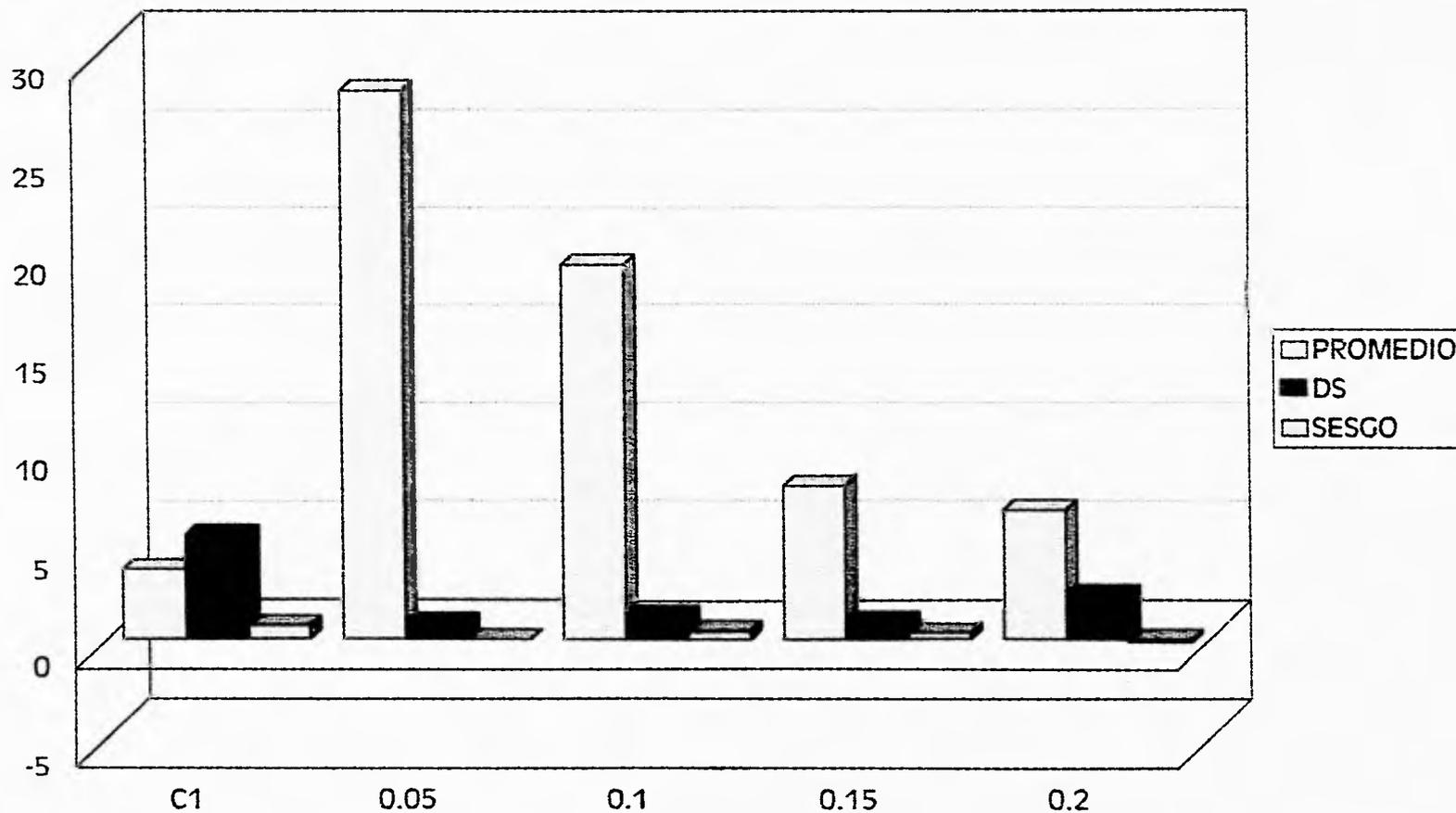
GRUPO: CONDILO



GRAFICA 2

PROMEDIO, DS Y SESGO DEL NUMERO DE CELULAS POR GRUPOS 1 Y 4 CONCENTRACIONES DE ALCOHOL

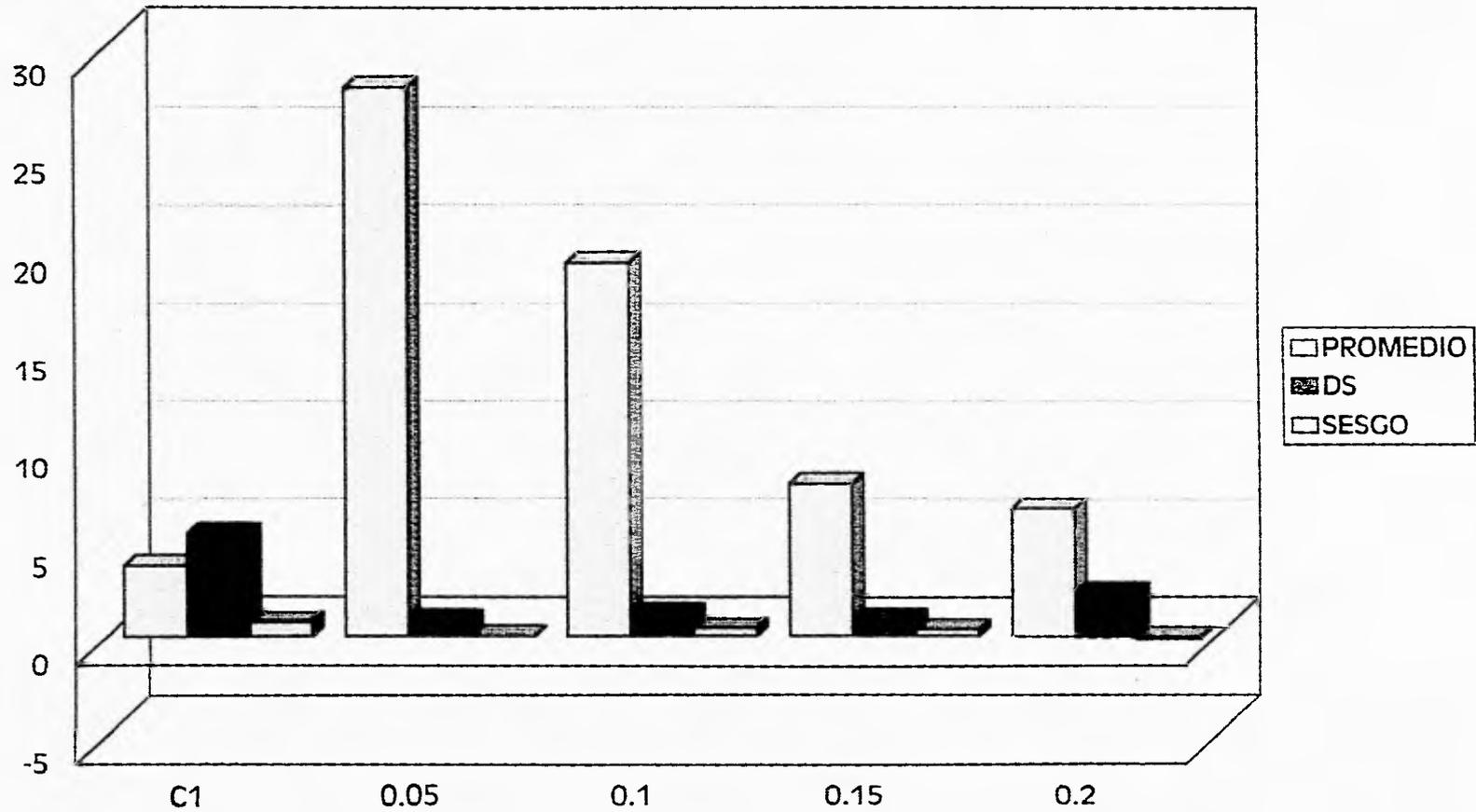
GRUPO: MANDIBULA



GRAFICA 3

PROMEDIO, DS Y SESGO DEL NUMERO DE CELULAS POR GRUPOS 1 Y 4 CONCENTRACIONES DE ALCOHOL

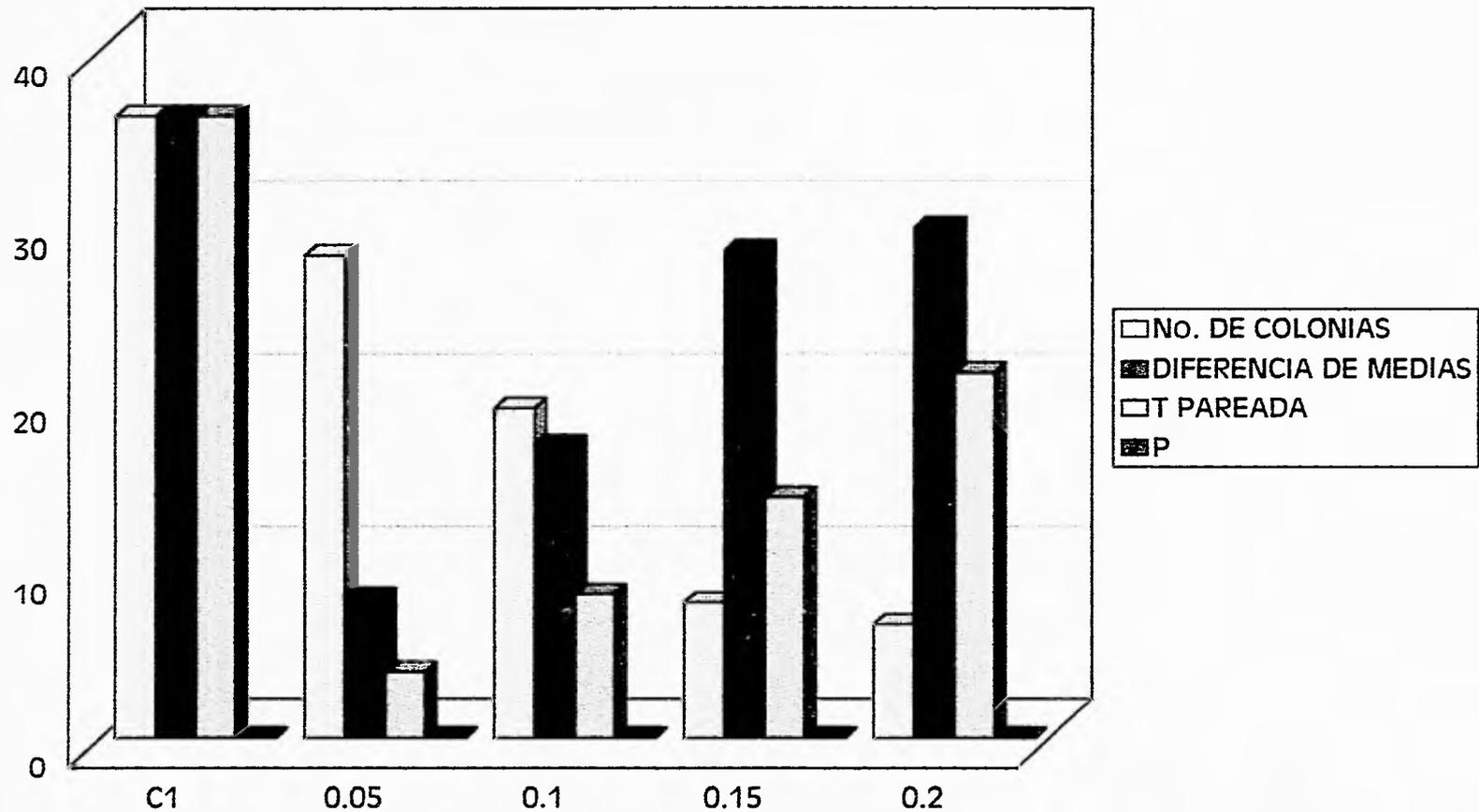
GRUPO: MANDIBULA



GRAFICA 3

DIFERENCIAS DE PROMEDIO ENTRE EL GRUPO CONTROL 1 Y CADA UNA DE LAS CONCENTRACIONES DE ALCOHOL

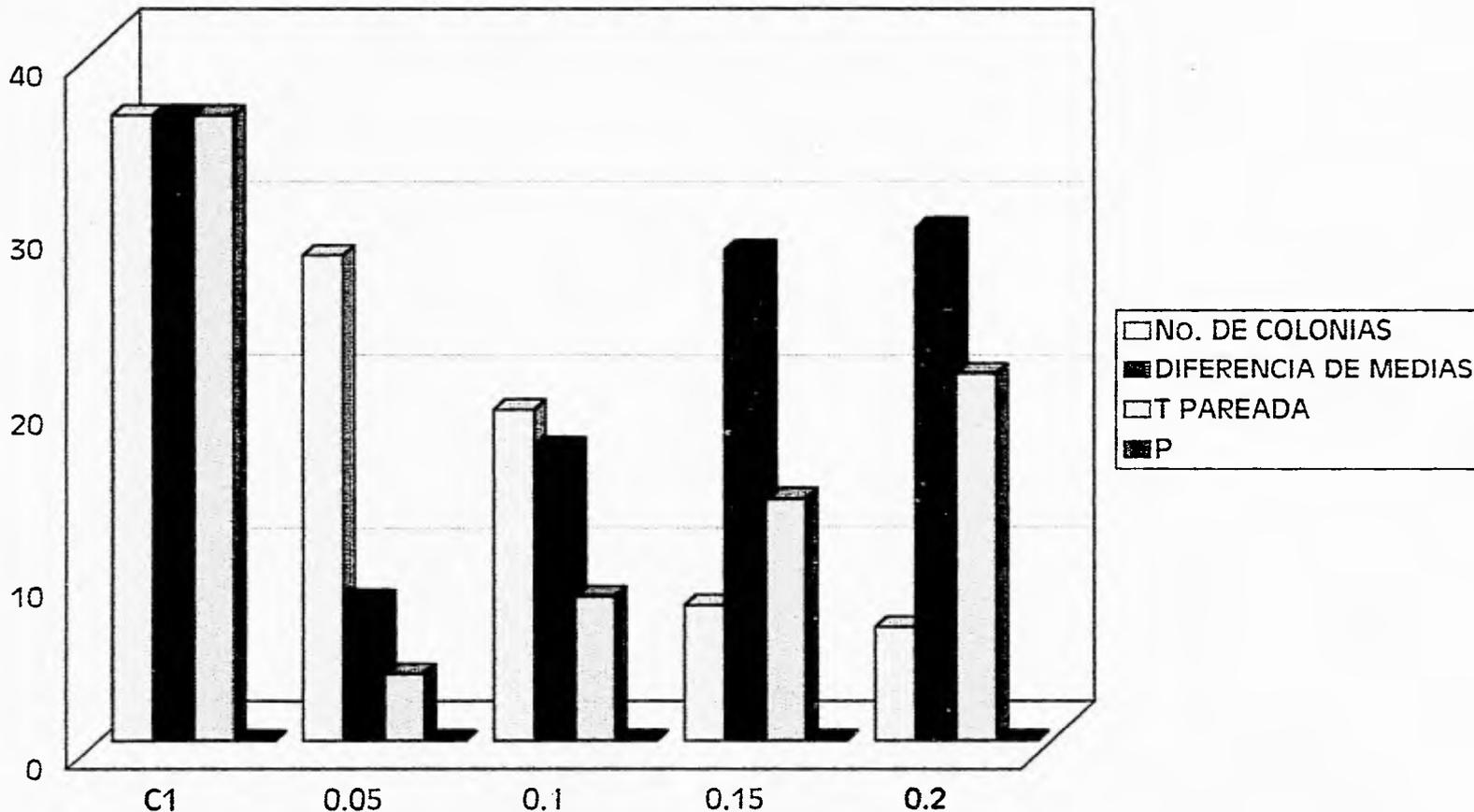
CONDILO



GRAFICA 4

DIFERENCIAS DE PROMEDIOS ENTRE EL GRUPO CONTROL 1 Y CADA UNA DE LAS CONCENTRACIONES DE ALCOHOL

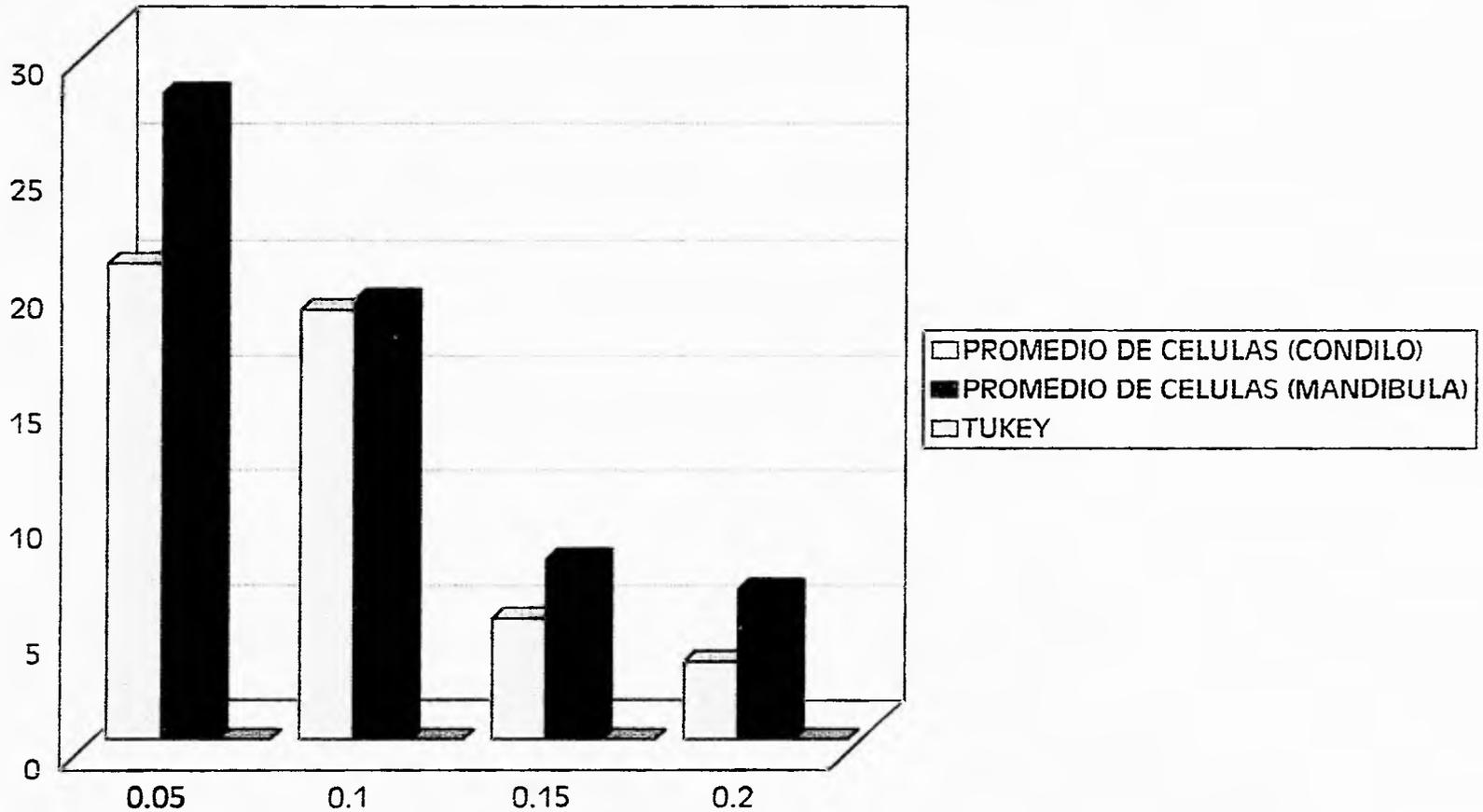
MANDIBULA



GRAFICA 5

ANALISIS DE VARIANZA ENTRE PARES DE GRUPOS DE LA MISMA DOSIS DE ALCOHOL

CONDILO VERSUS MANDIBULA



GRAFICA 6

TABLAS DE RESULTADOS

Análisis univariados

Tabla I

Promedio, DS y sesgo del número de células por cada grupo control y concentraciones de alcohol *.

AMBOS GRUPOS: CONDILO Y MANDIBULA.

*	PROMEDIO	DS	SESGO
C1	35.85	4.81	.266
.05	204.35	3.89	-.059
.15	6.57	2.24	-.801

TABLA II

Promedio, DS y sesgo del número de células por grupo control 1 y 4 concentraciones de alcohol *.

GRUPO: CONDILO.

*	PROMEDIO	DS	SESGO
C1	35.2	4.6	-.37
.10	18.7	1.11	-.24
.20	3.4	2.9	1.35

TABLAS DE RESULTADOS

Análisis univariados

Tabla I

Promedio, DS y sesgo del número de células por cada grupo control y concentraciones de alcohol *.

AMBOS GRUPOS: CONDILO Y MANDIBULA.

*	PROMEDIO	DS	SESGO
CI	35.85	4.81	.266
.05	204.35	3.89	-.059
.15	6.57	2.24	-.801

TABLA II

Promedio, DS y sesgo del número de células por grupo control I y 4 concentraciones de alcohol *.

GRUPO: CONDILO.

†	PROMEDIO	DS	SESGO
CI	35.2	4.6	-.37
.10	18.7	1.11	-.24
.20	3.4	2.9	1.35

TABLA III

**Promedio, DS y sesgo del número de células por grupo 1 y 4
concentraciones de alcohol*.**

GRUPO: MANDIBULA

*	PROMEDIO	DS	SESGO
C1	3.61	5.3	.72
.10	19.1	1.2	.41
.20	6.5	2.2	.13

ANALISIS BIVARIADO

Tabla IV

**Diferencias de promedios entre el grupo control 1 y cada una
de las concentraciones de alcohol**

(Córdilo)

CONCENTRACION	No. DE COLONIAS	DIFERENCIA DE MEDIAS	T PAREADA	P
C1	36.14	36.14	36.14	0
.10	19.14	17.00	8.35	.000
.20	6.57	29.57	21.20	.000

TABLA V

Diferencias de promedios entre el grupo control 1 y cada una de las concentraciones de alcohol

MANDIBULA

CONCENTRACION	No. DE COLONIAS	DIFERENCIA DE MEDIAS	T PAREADA	P
C1	36,14	36,14	36,14	0
.10	19,14	17,00	8,35	.000
.20	6,57	29,57	21,20	.000

TABLA VI

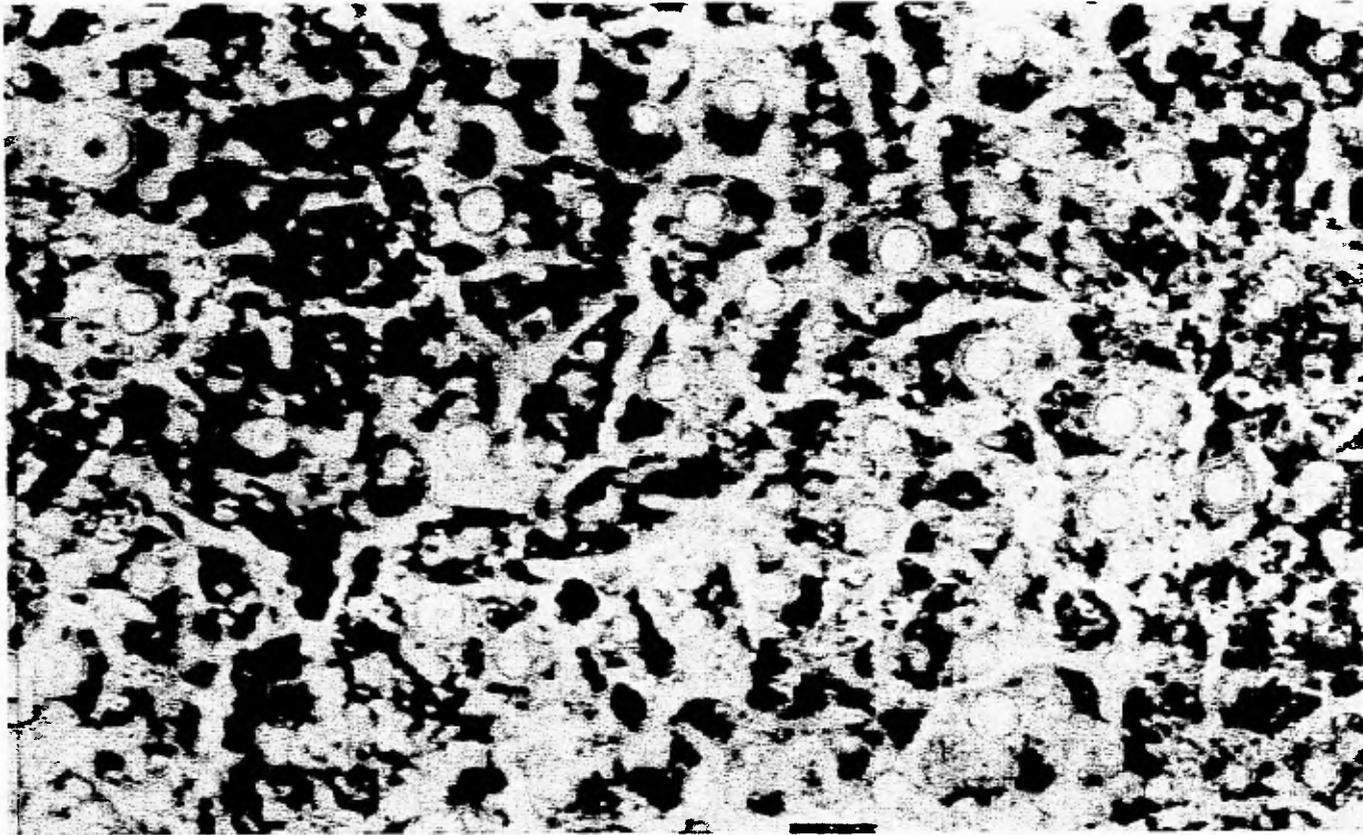
Análisis de varianza entre pares de grupos de la misma dosis de alcohol:

cóndilo versus mandíbula

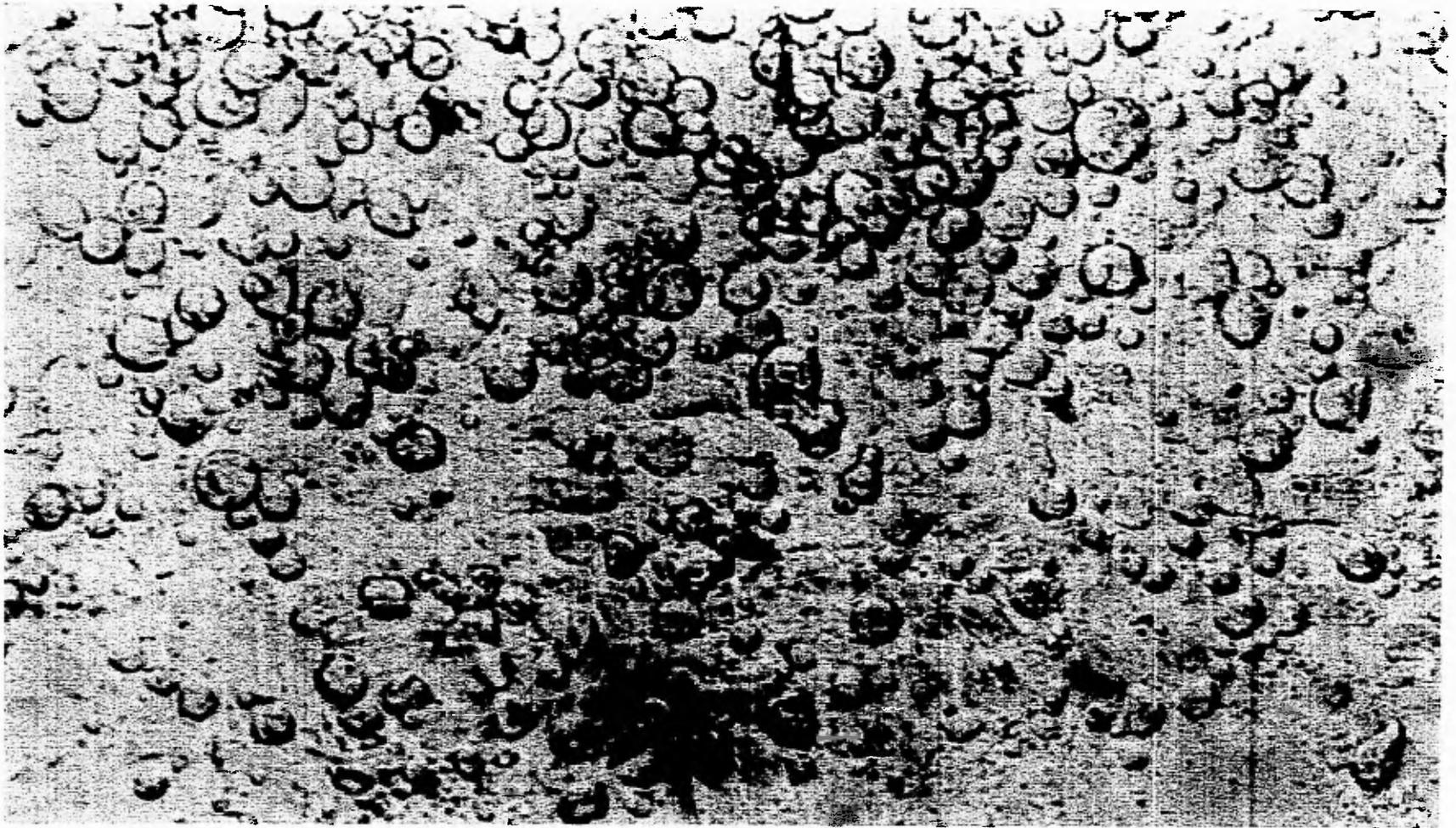
* DOSIS	CONDILO	MANDIBULA	TUKEY
	PROMEDIO DE CELULAS	PROMEDIO DE CELULAS	
.10	18,71	19,14	N.S.
.20	3,42	6,57	N.S.

ANOVA: F=110,3

P=0.0000



Esta microfagia muestra la morfología poligonal característica de los condrocitos



Esta micrografía muestra los condrocitos a las 2 horas de haber sido sembrados en cultivo.

CULTIVOS DE MICROMASAS DE RATONES CD-1 A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ALCOHOL.

Torres P. Sandra, Portilla R. Javier, Hernández G. Juan Carlos Cuauhtemoc*, Jiménez G. G; Miranda G. A; Maupome C. G.

Los primeros estudios realizados en humanos fueron descritos por Jones quien describió un patrón similar en estos niños designandolo como SÍNDROME DEL FETO ALCOHOLIZADO (SFA).

El SFA ha sido estudiado en detalle confirmándose efectos teratogenicos en estudios realizados *in vivo* en animales alcoholizados gestantes.

Seguido de estos estudios se inicio el amplio estudio del efecto que pudiera tener el alcohol sobre las estructuras bucodentales.

La dosis responsable de la teratogenicidad del alcohol aun no se ha determinado. Una vez comprobada la relación causal entre el alcohol y el SFA se llevo a cabo esta investigación estudiando la teratogenicidad de células mandibulares *in vitro*. En investigaciones anteriores se planteo que tal diferencia podría ser explicada por la acción teratogenica del alcohol sobre la actividad mitotica del cóndilo. Este estudio trata de dar respuesta a esta hipótesis. Las concentraciones de alcohol utilizadas fueron 0.05%, 0.10%, 0.15% y 0.20%.

Los resultados mostraron que existía una relación dosis-respuesta entre la concentración de alcohol y el promedio de células cultivadas: a mayor concentración ocurrió un numero menor de mitosis en todos los grupos estudiados.

La inhibición en un 30% en relación con el grupo control se logro con la concentración mas baja de alcohol (0.05%).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los promedios de células de cóndilo y mandíbula para cada una de las concentraciones de alcohol, tanto en el análisis univariado (Promedio, DS, sesgo), como en el análisis bivariado (No. de colonias, diferencia de medias, T pareada, P, Anova, Tukey).

MICE MICROMASS CO-1 CULTURES AT DIFFERENT ALCOHOL CONCENTRATIONS

Torres P. Sandra, Portiila R. Javier, Hernández G. Juan Carlos Cuauhtemoc, Jiménez G. G., Miranda G. A., Maupomé C. G.

Human studies were made by Jones, who describes a similar pattern in children, designing it as the Fetus Alcoholized Syndrome (FAS).

The FAS was studied in detail confirming the teratogenic effects, being made *In Vivo* in pregnant alcoholized animals.

Posterior to these studies, investigations about the effect that alcohol could have on bucodental structures have been carried out.

The dose responsible for the teratogenicity of alcohol has not yet been determined. Once proved the causal relationship between alcohol and FAS, this investigation was made, studying the teratogenicity of mandibular cells *In Vitro*. In anterior investigations it has been proposed that such difference could be explained by the teratogenic action of alcohol over the mitotic activity of condile. This study tries to give an answer to this hypothesis. The concentrations of alcohol used were of 0.05%, 0.10%, 0.15% and 0.20%.

The results showed that there existed a relationship of dose-response between the alcohol concentration and the average of cultivated cells; at mayor concentration we had a minor number of mitoses in all the studied groups.

There was an inhibition of a 30% in relation with the control group at the lowest alcohol concentration (0.05%).

There were statistically significative differences between the average of condile and mandible cells for each one of the alcohol concentrations, as well in the univariate analysis (average, DS) as in the bivariate analysis (No. of colonies, media differences, paired T, P, Anova, Tukey).