

## Modificaciones en la mucosa olfatoria de ratones adultos jóvenes expuestos al humo de cigarrillo

Delsy Dávila-Vera<sup>1</sup>, Rosa Virginia Mendoza-Briceño<sup>1</sup>, Henry Andrade-Ruiz<sup>2</sup>, Zulma Peña-Contreras<sup>1</sup>, Yzoletth Torres-Vielma<sup>1</sup>, Emilítza Labarca-Villasmil<sup>1</sup>, Leisalba Zavala-Morillo<sup>1</sup>, José Gregorio Peña<sup>1</sup>, Beluardi Sánchez-Gil<sup>1</sup> & Yulianny Vergara-Dávila<sup>3</sup>

1 Centro de Microscopía Electrónica "Dr. Ernesto Palacios-Prü", Vicerrectorado Académico, Universidad de Los Andes, Mérida (5101), Venezuela

2 Dirección General de Planificación y Desarrollo, Universidad de Los Andes. Mérida (5101), Venezuela.

3 Escuela de Nutrición, Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes. Mérida (5101), Venezuela.

### Resumen

Correspondencia

D. Dávila-Vera

E-mail: delmardavila64@gmail.com

**Recibido:** 26 septiembre 2021

**Aceptado:** 10 mayo 2022

**Publicado on-line:** 7 julio 2022

Se analizaron las alteraciones ocasionados por el humo de cigarrillo en la mucosa olfatoria, haciendo énfasis en el epitelio olfatorio, en ratones NMRI adultos jóvenes distribuidos en un grupo control y cuatro grupos experimentales expuestos al humo de cigarrillo a distintas dosis y tiempos. El efecto de los tóxicos presentes en el humo de cigarrillo, durante el tiempo de exposición experimentalmente programado, produjo leves modificaciones de la citoarquitectura epitelial como son la distribución irregular de las células y el desplazamiento de un alto porcentaje de ellas hacia la superficie; así como un incremento de la producción de sustancia mucosa verificada por microscopía óptica y de barrido, lo cual afecta la actividad normal del epitelio olfatorio.

**Palabras clave:** Inhalación tóxica; Olfacción; Cambios citoepiteliales.

### Abstract

*Modifications in the olfactory mucosa of young adult mice exposed to cigarette smoke*

The alterations caused by cigarette smoke in the olfactory mucosa were analyzed, with emphasis on the olfactory epithelium, in young adult NMRI mice distributed in a control group and four experimental groups exposed to cigarette smoke at different doses and times. The effect of the toxins present in cigarette smoke, during the experimentally programmed exposure time, produced slight modifications of the epithelial cytoarchitecture, such as the irregular distribution of the cells and the displacement of a high percentage of them towards the surface; as well as an increase in the production of mucous substance verified by optical and scanning microscopy, which affects the normal activity of the olfactory epithelium.

**Key words:** Toxic inhalation; Olfaction; Cytoepithelial changes.



## Introducción

El cigarrillo tiene importantes repercusiones en la salud del ser humano y en la contaminación del ambiente incrementando las enfermedades respiratorias, cardiovasculares y cancerígenas. Se estima que la mitad de los fumadores muere de una enfermedad relacionada al consumo de cigarrillo y que viven en promedio 10 a 15 años menos que los no fumadores (Hernández-Ramírez 2011).

El cigarrillo es uno de los productos de consumo con más componentes tóxicos y cancerígenos que se conocen hasta ahora. El humo producto de la combustión del cigarrillo es una compleja mezcla que contiene más de 4.000 componentes tóxicos, mutagénicos y carcinogénicos, entre los que se encuentran monóxido de carbono, dióxido de carbono, aldehídos, ácidos, fenoles e hidrocarburos, así como elementos particulados como nicotina, alquitrán y benzopirenos (Fernández-Tapia *et al.* 2006).

La mayoría de los efectos adversos del tabaquismo son dosis-dependientes y se incrementan con el aumento de la cantidad de cigarrillos que se utilizan, no existiendo un nivel de consumo “seguro” para la salud; de allí que los organismos internacionales de salud sostienen que el cigarrillo sigue constituyendo la principal causa prevenible de enfermedades entre los seres humanos. A raíz de ello, campañas educativas, legislaciones y medidas impositivas se han establecido a nivel mundial para disminuir el consumo de cigarrillo y su efecto sobre la salud humana y la economía (Wu *et al.* 2020).

En el hábito de fumar interviene de manera importante el sentido del olfato que forma parte del sistema quimiosensorial, el cual se activa cuando las moléculas liberadas por sustancias presentes en el ambiente estimulan células nerviosas que se localizan en la zona superior del interior de las fosas nasales; los “mensajes químicos” que reciben esas células son transmitidos directamente a áreas del cerebro donde se identifican los olores (Anderson 2002, Ueha *et al.* 2020, Dos Reis Izolan *et al.* 2021). Las células neuronales de la mucosa olfatoria son reemplazadas periódicamente de forma normal, así como también cuando son lesionadas. Se ha referido que el humo del cigarrillo contribuye al deterioro de dichas células, alterando la capacidad de identificar olores (Iskander *et al.* 2017, Esrefoglu *et al.* 2003).

Las enfermedades y las alteraciones del olfato tienen importante impacto sobre nuestras vidas; puesto que este sentido contribuye sustancialmente al desenvolvimiento y relaciones interpersonales, llegando a tener los problemas del olfato graves consecuencias en el comportamiento del ser humano (Fuentes *et al.* 2011, Ropper *et al.* 2007). El objetivo de la presente investigación es analizar las modificaciones que pueda experimentar la mucosa olfatoria por efectos del humo de cigarrillo y tratar de correlacionarlas con el tiempo y las dosis de exposición a dicha inhalación; haciendo previamente un estudio descriptivo de las estructuras presentes en la mucosa no expuesta al humo del cigarrillo. Utilizando microscopía de luz de alta resolución y microscopía electrónica de barrido se tiene como finalidad establecer los cambios que puedan ocurrir en las células sensoriales ciliadas y en la región apical de las células de soporte (Sahin *et al.* 2018); además de precisar la capacidad de estas células en la captación de sustancias presentes en el humo del cigarrillo, lo cual puede contribuir a la pérdida del olfato (Dos Reis Izolan *et al.* 2021).

Al constituir el cigarrillo uno de los factores de mortalidad que más ha repercutido en la población, se ha convertido en importante objeto de estudio en el área de la salud (Ho *et al.* 2022, Lugg *et al.* 2021), en este sentido se explica nuestro énfasis en analizar la mucosa olfatoria para determinar los posibles daños que el humo del cigarrillo puede ocasionarle, utilizando para la experimentación ratones de la línea NMRI en condiciones de laboratorio.

## Material y métodos

Se utilizaron 54 ratones machos NMRI (Naval Medical Research Institute), adultos jóvenes, suministrados por el Bioterio Central de la Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. La edad seleccionada para este estudio fue 28 días postnatal, teniendo en consideración que en promedio es cuando comienza la madurez sexual de estos animales, considerándoseles como adultos jóvenes.

Durante diez días, previos al inicio del experimento, los ratones fueron mantenidos en condiciones (*ad libitum*) controladas de laboratorio. Transcurrido este tiempo parte de los ratones fue expuesta a vapores del humo de cigarrillo utilizando una campana de vidrio con ventilación con-

trolada.

Los ratones fueron separados en una categoría control constituida por 6 animales que no fueron expuestos al humo de cigarrillo y una categoría experimental formada por 48 animales, subdividida en cuatro grupos de 12 ratones cada uno (G1, G2, G3, G4).

La exposición al humo de cigarrillo se hizo durante 5 días continuos, variando la dosis y el tiempo de exposición de la siguiente manera:

**G1:** Exposición a un cigarrillo a las 10 am/10 min y otro cigarrillo a las 4 pm/10 min. Total 2 cigarrillos diarios.

**G2:** Exposición a un cigarrillo a las 10 am/20 min y otro cigarrillo a las 4 pm/20 min. Total 2 cigarrillos diarios.

**G3:** Exposición a dos cigarrillos a las 10 am/10 min y dos cigarrillos a las 4 pm/10 min. Total 4 cigarrillos diarios.

**G4:** Exposición a dos cigarrillos a las 10 am/20 min y dos cigarrillos a las 4 pm/20 min. Total 4 cigarrillos diarios.

El grupo control estuvo expuesto al aire del ambiente y no se expuso al humo del cigarrillo.

Una vez concluida la fase experimental los ratones, al igual que los animales control, fueron anestesiados vía intraperitoneal con halotano (250 mg/kg peso) y se procedió a la extracción de las muestras de mucosa olfatoria, las cuales fueron fijadas durante 12h, en mezcla 3:3 (3 % de glutaraldehído y 3 % de formaldehído diluidos en tampón cacodilato de sodio 0,1 M y pH 7,2) (Palacios-Prü & Mendoza-Briceño 1972). La mitad de las muestras de cada grupo fue post-fijada, durante 12 a 16h, con tetraóxido de osmio al 1% preparado en tampón cacodilato 0,1 M, pH 7,2. Posteriormente, se procedió a deshidratar las muestras con alcohol etílico y con óxido de propileno, seguido de infiltración e inclusión en resina epoxídica (Eponate®). Se hicieron cortes de 1 µm de espesor, que fueron coloreados con p-fenil-endiamina y observados en un microscopio de luz de alta resolución Axiophot-Zeiss, realizándose el registro fotográfico con un software Delta Pix (Dpx ViewPro).

La otra mitad de muestras, después de fijadas, fueron deshidratadas con alcohol etílico en concentraciones ascendentes, completando la desecación en un evaporador de vacío Hitachi HUS-5GB, permaneciendo el material en condiciones de vacío durante un tiempo mínimo de 48h.

Transcurrido este tiempo, se llevaron a un Ionizador Ion Coater 1B-2 y se procedió a la metalización de las mismas con vapores de oro, hasta obtener una capa con un espesor promedio de 150 nm. La observación se hizo con un microscopio electrónico de barrido Hitachi S-2500.

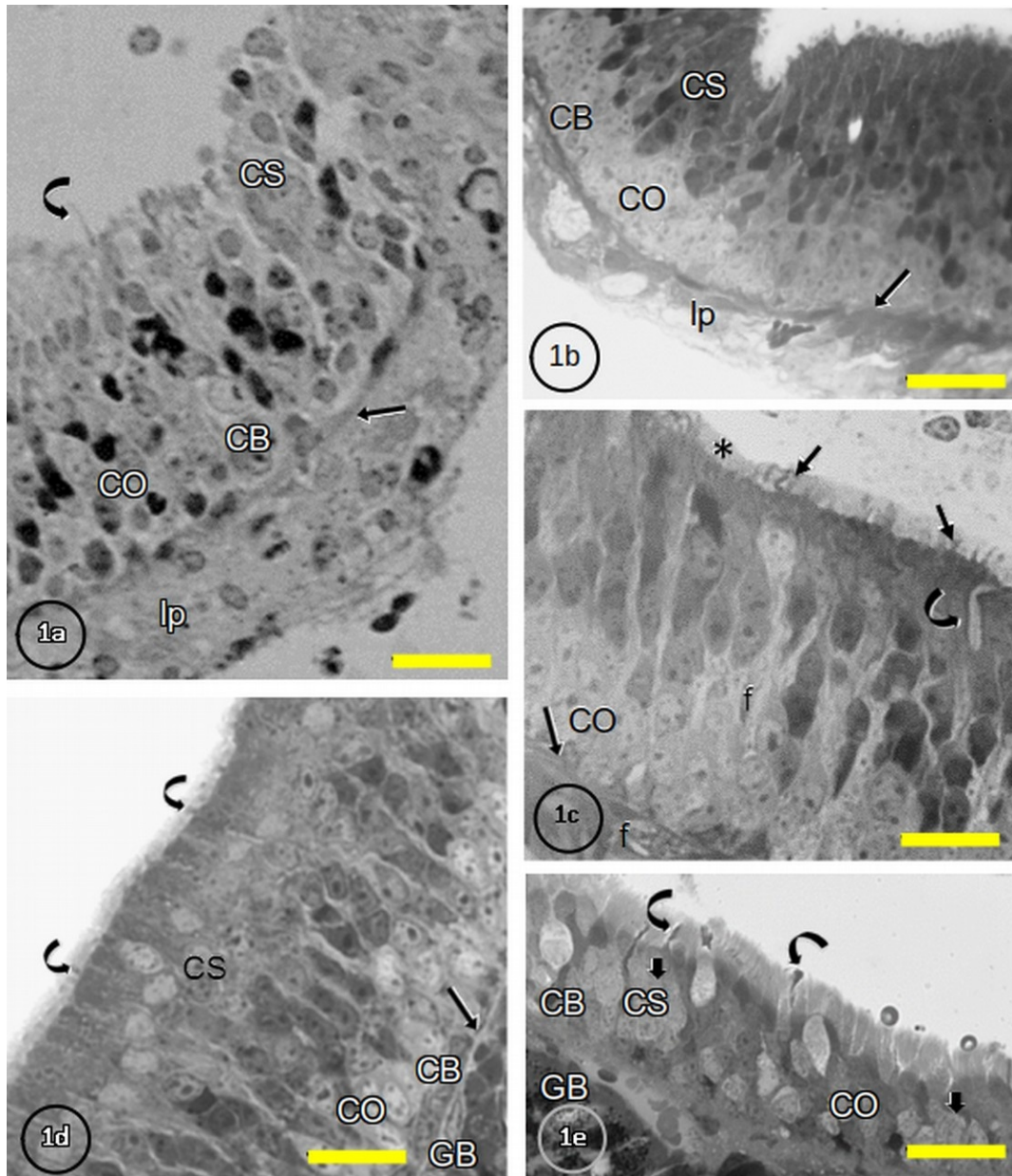
Para el análisis estadístico se correlacionó el peso de los ratones adultos jóvenes con los días de exposición al humo de cigarrillo, desagregando los resultados por grupos, utilizando la correlación de Pearson, la cual se consideró lineal si  $p < 0,05$ . Por otra parte, se realizó análisis de varianza (ANOVA) para comparar la media de las variables longitud de cilios olfatorios y diámetro de glándulas de Bowman. Como prueba a posteriori del ANOVA se utilizó la prueba de Dunnett ya que se tiene un grupo control el cual se comparó con el resto de los grupos de exposición al humo de cigarrillo, la significancia se estableció si  $p < 0,05$  (Andrade 2019, Hernández 2006, Hernández-Sampieri *et al.* 2010).

## Resultados

El presente estudio permitió analizar los cambios histológicos y citoarquitectónicos de la mucosa olfatoria en ratones expuestos al humo de cigarrillo, a diferentes tiempos y dosis, específicamente las alteraciones ocasionadas a nivel del epitelio olfatorio en ratones adultos jóvenes.

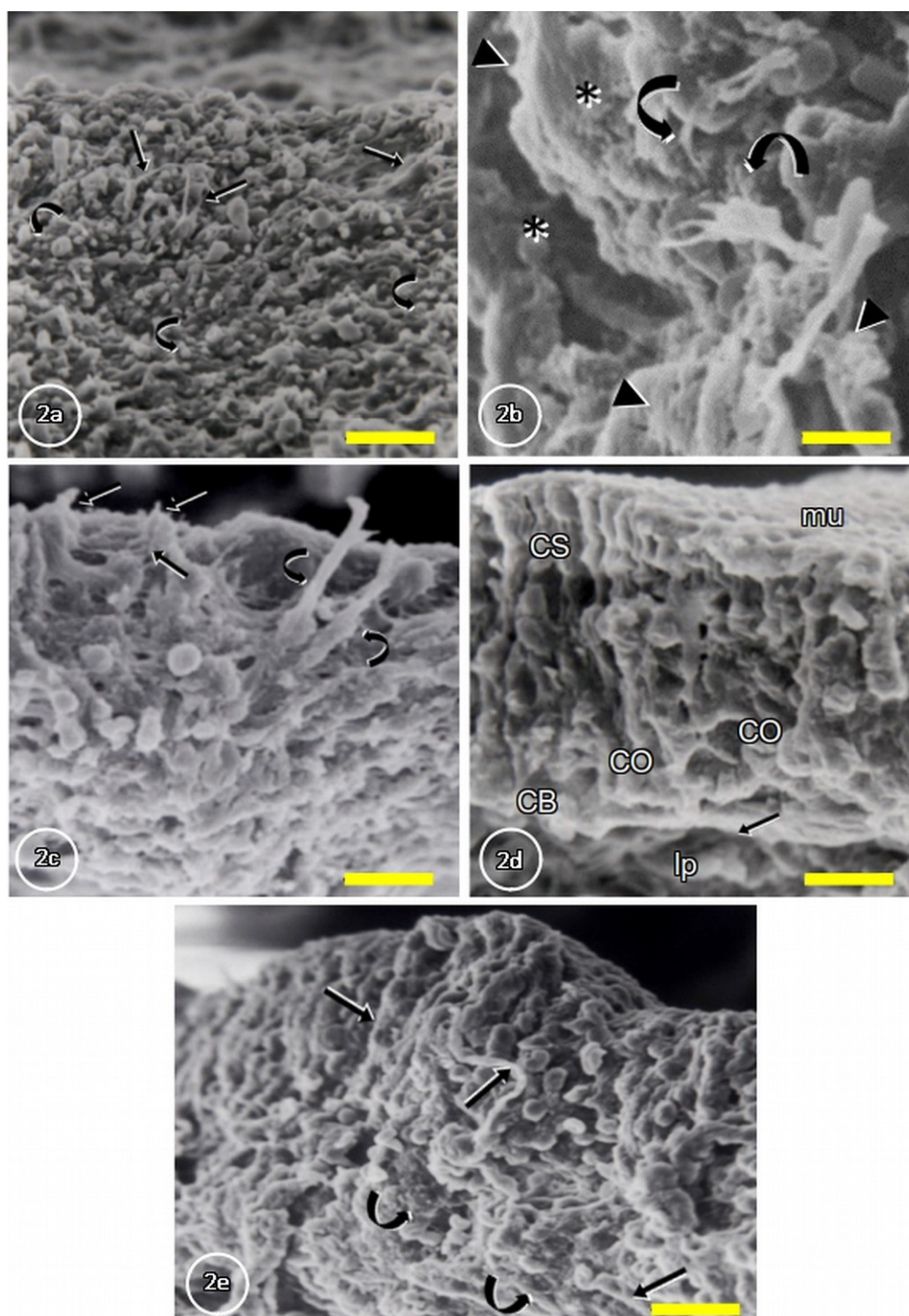
### Control

El neuroepitelio olfatorio, como ha sido descrito por Sacerdote de Lustig & Josiowicz (2001), Gartner & Hiatt (2002), Junqueira *et al.* (2003), es un epitelio cilíndrico pseudoestratificado donde se localizan células de soporte, células basales y células neuronales (Figs. 1a y 2a). Las células de soporte productoras de enzimas que metabolizan las partículas presentes en el aire, poseen inclusiones pigmentarias, semejante a la lipofuscina, que son responsables de la particular coloración que la mucosa tiene en condiciones in vivo, la superficie apical de estas células presenta numerosas microvellosidades que poseen en su extremo distal formaciones vesiculares de tipo secretor. Las células basales, ubicadas en la parte más profunda del epitelio, son consideradas células progenitoras indiferenciadas, a partir de las cuales se originan las células neuronales de la mucosa olfatoria. Por su parte, las neuronas olfatorias bipolares proyec-



**Figura 1.** Secciones de la mucosa olfatoria de ratón, observadas con microscopía óptica, que muestran detalles del epitelio olfatorio. **1a:** Ratón control, se distinguen células basales alineadas sobre la lámina basal (flecha recta), células de soporte y células olfatorias que emiten cilios hacia la superficie (flecha curva). Barra: 2,5  $\mu\text{m}$ . **1b:** Ratón G1, muestra el ensanchamiento de la superficie epitelial y la lámina basal engrosada (flecha recta), la lámina propia, células de soporte, células basales y células olfatorias. Barra: 3  $\mu\text{m}$ . **1c:** Ratón G2, subyacente a la lámina basal (flecha larga) se identifican segmentos de fibras nerviosas olfatorias; hacia la superficie se observan conductos terminales de las glándulas de Bowman (flecha curva); la superficie epitelial está ocupada por una sustancia mucosa (asterisco) entre la cual se ven algunos elementos particulados (flechas cortas). Barra: 4,5  $\mu\text{m}$ . **1d:** Epitelio olfatorio de ratón G3, donde se visualiza una densa mucosidad que contiene partículas densas (flechas curvas); la flecha recta señala la lámina propia. Barra: 4,5  $\mu\text{m}$ . **1e:** Ratón G4, en la cual se observa el incremento de la actividad celular (flechas cortas) de las células de soporte; en la superficie se distinguen partículas de un material denso penetrando en algunos sitios (flechas curvas) al interior del epitelio. Barra: 6  $\mu\text{m}$ . **CB:** células basales; **CO:** células olfatorias; **CS:** células de soporte; **f:** fibras nerviosas olfatorias; **GB:** glándula de Bowman; **lp:** lámina propia.

**Figure 1.** Sections of the mouse olfactory mucosa, observed with light microscopy, showing details of the olfactory epithelium. **1a:** control mouse, basal cells aligned on the basal lamina (straight arrow), supporting cells and olfactory cells that emit cilia towards the surface (curved arrow) are distinguished. Bar: 2.5  $\mu\text{m}$ . **1b:** G1 mouse, shows the widening of the epithelial surface and thickened basal lamina (straight arrow), lamina propria, supporting cells, basal cells, and olfactory cells. Bar: 3  $\mu\text{m}$ . **1c:** G2 mouse, subjacent to the basal lamina (long arrow) segments of olfactory nerve fibers are identified; toward the surface, terminal ducts of Bowman's glands are observed (curved arrow); the epithelial surface is occupied by a mucous substance (asterisk) among which some particulate elements can be seen (short arrows). Bar: 4.5  $\mu\text{m}$ . **1d:** G3 mouse olfactory epithelium where a dense mucus containing dense particles is visualized (curved arrows); the straight arrow points to the lamina propria. Bar: 4.5  $\mu\text{m}$ . **1e:** G4 mouse, in which the increase in cellular activity (short arrows) of the support cells is observed; on the surface, particles of a dense material can be distinguished penetrating in some places (curved arrows) into the interior of the epithelium. Bar: 6  $\mu\text{m}$ . **CB:** basal cells; **CO:** olfactory cells; **CS:** supporting cells; **f:** olfactory nerve fibers; **GB:** Bowman's gland; **lp:** lamina propria.



**Figura 2.** Detalles de la parte superficial de la mucosa olfatoria observados con microscopía electrónica de barrido. **2a:** Ratón control, formaciones ciliares (flechas rectas) y microvellosidades (flechas curvas). Barra: 15  $\mu\text{m}$ . **2b:** Ratón G1, superficie epitelial con sustancia mucosa (cabezas de flecha); micro-vellosidades (\*) y cilios (flechas curvas). Barra: 35  $\mu\text{m}$ . **2c:** Ratón G2, cilios (flechas curvas) y microvellosidades (flechas rectas) recubiertos por sustancia mucosa. Barra: 30  $\mu\text{m}$ . **2d:** Sección de epitelio olfatorio de ratón G3 con recubrimiento de sustancia mucosa; lámina basal (flecha recta). Barra: 30  $\mu\text{m}$ . **2e:** Ratón G4, prolongaciones ciliares (flechas rectas) y estructuras irregulares (flechas curvas) que pueden corresponder a compuestos provenientes del humo de cigarrillo. Barra: 25  $\mu\text{m}$ . **CB:** células basales; **CO:** células olfatorias; **CS:** células de soporte; **f:** fibras nerviosas olfatorias; **GB:** glándula de Bowman; **lp:** lámina propia; **mu:** sustancia mucosa.

**Figure 2.** Details of the superficial part of the olfactory mucosa observed with scanning electron microscopy. **2a:** Control mouse, ciliary formations (straight arrows) and microvilli (curved arrows). Bar: 15  $\mu\text{m}$ . **2b:** G1 mouse, epithelial surface covered by a mucous-like substance (arrowheads); microvilli (\*) and cilia (curved arrows). Bar: 35  $\mu\text{m}$ . **2c:** G2 mouse, cilia (curved arrows) and microvilli (straight arrows) covered by a mucous substance. Bar: 30  $\mu\text{m}$ . **2d:** Section of the olfactory epithelium of G3 mouse, lining of the epithelium with a mucous substance; basal lamina (straight arrow). Bar: 30  $\mu\text{m}$ . **2e:** G4 mouse, ciliary extensions (straight arrows), irregular structures (curved arrows) that may correspond to compounds in cigarette smoke. Bar: 25  $\mu\text{m}$ . **CB:** basal cells; **CO:** olfactory cells; **CS:** supporting cells; **f:** olfactory nerve fibers; **GB:** Bowman's gland; **lp:** lamina propria; **mu:** mucous substance.

tan su prolongación dendrítica hacia la cavidad nasal, que en proximidad a la superficie se ensancha y de ella emerge un número variable de cilios olfatorios, que se extienden hacia la superficie libre del epitelio aumentando considerablemente el área receptora de la mucosa olfatoria; el axón de estas neuronas es amielínico que en conjunto forman el nervio olfatorio que atraviesa la lámina cribosa del hueso etmoides, hasta llegar al bulbo olfatorio (Ham 1968, Doty & Bromley 2003, Hadley *et al.* 2004).

Inmediatamente por debajo del epitelio olfatorio se localiza la submucosa o lámina propia, constituida por una delgada capa de tejido conjuntivo, con predominio de fibras de colágeno, vascularizado por un amplio plexo de capilares sanguíneos entremezclados con macrófagos, células plasmáticas, células pigmentarias y linfocitos B, que contiene además, los haces de axones olfatorios, plexos linfáticos y las glándulas de Bowman. Estas últimas poseen alargados y estrechos conductos secretores, que atraviesan el epitelio olfatorio, llegando hasta la superficie, transportando la secreción glandular de mucus que humedece la superficie de la mucosa, recubre cilios y microvellosidades y facilita la solubilización de las sustancias odoríferas (Hernández-Ramírez 2011, Iwai *et al.* 2008).

### **G1. Exposición a baja dosis de humo de cigarrillo, durante 20 minutos diarios**

La mucosa olfatoria de ratones expuestos al humo de un cigarrillo durante 10 minutos dos veces al día mostraron las características histológicas propias de la misma. La capa de células de soporte tiene una alta celularidad. Tal como es referido por Sacerdote de Lustig & Josiowicz (2001), Carbajal-Zegarra *et al.* (2003), Claudio Galeana *et al.* (2016), una vez expuesta la mucosa olfatoria durante corto tiempo y a dosis baja de humo de cigarrillo, se aprecia toda la superficie del epitelio recubierta por una sustancia mucosa. Este revestimiento mucoso incluye las formaciones ciliares de las células neuronales, las microvellosidades de las células de soporte y en profundidad el cuerpo de las diferentes células del epitelio. Las glándulas de Bowman se visualizan ligeramente aumentadas de volumen, posiblemente debido a la mayor producción de mucus que debe ser transportado hasta la superficie de la mucosa (Figs. 1b y 2b).

### **G2. Exposición a baja dosis de humo de cigarrillo, durante 40 minutos diarios**

En ratones expuestos al humo de un cigarrillo, durante 20 minutos dos veces al día, la mucosa olfatoria muestra los elementos celulares propios (Fig. 1c), con la particularidad que se observan manifestaciones de reactivación celular como son el ensanchamiento de los conductos secretores de las glándulas de Bowman y un leve aumento en el diámetro de los cilios y de las microvellosidades que en conjunto forman el denominado borde en cepillo, el cual se observa irregularmente distribuido a consecuencia del desplazamiento sufrido por la presencia aumentada de sustancia mucosa que las recubre; inmersas entre esta sustancia fue posible detectar pequeñas cantidades de partículas electrón densas posiblemente provenientes del humo del cigarrillo (Fig. 2c) (Iwai *et al.* 2008, Hernández-Ramírez 2011, Claudio Galeana *et al.* 2016).

### **G3. Exposición a alta dosis de humo de cigarrillo, durante 20 minutos diarios**

Cuando los ratones fueron expuestos al humo de dos cigarrillos, durante 10 minutos dos veces al día, la mucosa olfatoria mantiene la citoarquitectura propia del tejido (Fig. 1d). Las células de soporte se observan a diferentes niveles del epitelio y en proximidad a las neuronas sensoriales olfatorias y las células basales, localizadas en el tercio inferior del epitelio, se observan con dimensiones ligeramente disminuidas al compararlas con el grupo control. Es de destacar que ninguna de estas células muestra afectación por efecto del humo de cigarrillo. Las glándulas submucosas de Bowman, principal fuente de sustancia mucosa de la región olfatoria, se ven ligeramente aumentadas de tamaño (Fig. 2d). Llama la atención la condensación de material mucoso sobre la totalidad del epitelio olfatorio, formando una gruesa capa de mucus que contiene a su vez, formaciones particuladas. Estas partículas, de diferentes tamaños, formas y densidad electrónica fueron observadas tanto en proximidad a la superficie de los cilios y de las microvellosidades, como distantes de estas dos citoestructuras (Fuentes *et al.* 2011).

### **G4. Exposición a alta dosis de humo de cigarrillo, durante 40 minutos diarios**

Al aumentar el tiempo y el volumen de exposición al humo de dos cigarrillos, 20 minutos dos veces

al día, se observa alterada la estructura de la mucosa olfatoria, siendo importante la pérdida de continuidad entre el epitelio olfatorio, la lámina basal y la lámina propia. Se detectó el desplazamiento de un alto porcentaje de los cuerpos de células de soporte hacia el borde del epitelio donde se acumulan y se alinean por debajo de la superficie (Fig. 1e); mientras que los cuerpos de las neuronas olfatorias se ubicaron de manera irregular. Los cuerpos de las neuronas olfatorias se vieron distribuidos de manera irregular.

Por otra parte, se observaron cilios de menor longitud que los de los grupos experimentales con menor exposición del humo de cigarrillo, así como segmentos donde las microvellosidades fueron sustituidas por gruesas evaginaciones a manera de extensiones de la superficie celular (Fig. 2e).

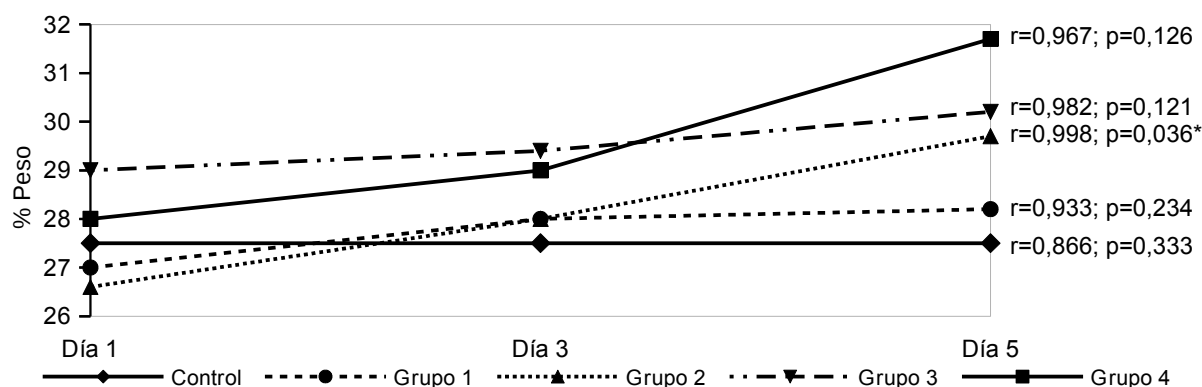
El análisis estadístico permitió dilucidar si el consumo de cigarrillos puede tener alguna relación con la variación del peso corporal, el cual cuantificado cada dos días durante los cinco días de exposición, mostrando una correlación lineal significativa con  $p=0,036$  entre el peso y los días de exposición al humo de cigarrillo del G2 (40 minutos con dos (2) cigarrillos), donde el coeficiente de correlación fue de 0,998, lo que indica que a medida que pasaron los días de exposición al cigarrillo, el peso de los ratones se incrementó; es decir, el G2 expuesto a menor cantidad de cigarrillos pero durante mayor tiempo se relacionó con el incremento del peso de los ratones. Para el resto de los grupos no se observó correlación, el

control mostró un comportamiento casi constante, mientras que los G1 (20 minutos y 2 cigarrillos), G3 (20 minutos y 4 cigarrillos) y G4 (40 minutos y 4 cigarrillos) presentaron coeficientes de correlación altos lo que indica que el peso de los ratones se incrementó al pasar los días, no obstante, no hay una relación lineal (Fig. 3).

En cuanto al comportamiento de algunas estructuras celulares en el control y en las distintas formas de exposición al humo de cigarrillo, fue posible establecer la comparación de las medias del área de glándulas de Bowman, la longitud de cilios olfatorios y el diámetro de estos, observándose diferencias significativas con  $p=0,000$  para las dos primeras. Las medias para el área de glándulas de Bowman fueron:  $288,60 \mu^2$  del control,  $480,23 \mu^2$  del G1 (20 minutos y 2 cigarrillos),  $513,12 \mu^2$  del G2 (40 minutos con 2 cigarrillos),  $702,48 \mu^2$  del G3 (20 minutos y 4 cigarrillos) y  $1199,81 \mu^2$  del G4 (40 minutos y 4 cigarrillos); para la longitud de cilios olfatorios los promedios fueron  $3,36 \mu$  del control,  $4,98 \mu$  del G1 (20 minutos y 2 cigarrillos),  $5,88 \mu$  del G2 (40 minutos con 2 cigarrillos),  $5,38 \mu$  del G3 (20 minutos y 4 cigarrillos) y  $8,27 \mu$  del G4 (40 minutos y 4 cigarrillos). El diámetro de cilios olfatorios no presentó diferencias (Tabla 1).

## Discusión

El humo de cigarrillo en diferentes concentraciones produjo cambios en la mucosa olfatoria en todos los grupos experimentales, que variaron desde



**Figura 3.** Correlación lineal entre el peso de los ratones y días de exposición al humo de cigarrillos por grupo. G1= 20 minutos y 2 cigarrillos, G2= 40 minutos y 2 cigarrillos, G3= 20 minutos y 4 cigarrillos, G4= 40 minutos y 4 cigarrillos; \*correlación lineal significativa ( $p<0,05$ ). Los datos corresponden a la media,  $n=54$  ratones machos; distribuidos en 6 controles, y 12 por cada grupo experimental. Debido al corto tiempo de experimentación, se obtuvo el peso de los ratones cada dos días.

**Figure 3.** Linear correlation by group between the weight of the mice and the days of exposure to cigarette smoke. G1= 20 minutes and 2 cigarettes, G2= 40 minutes and 2 cigarettes, G3= 20 minutes and 4 cigarettes, G4= 40 minutes and 4 cigarettes; \*significant linear correlation ( $p<0,05$ ). The data correspond to the mean,  $n=54$  male mice; distributed in 6 controls, and 12 for each experimental group. Due to the short time of experimentation, the weight of the mice was performed every two days.

Variables	Grupos					p
	Control	G1	G2	G3	G4	
Área de glándulas de Bowman	288,60 (61,68) <sup>a</sup>	480,23 (113,61) <sup>a,b</sup>	513,12 (189,95) <sup>a,b</sup>	702,48 (140,51) <sup>a,b</sup>	1199,81 (537,91) <sup>b</sup>	0,000*
Longitud de cilios olfatorios	3,36 (0,97) <sup>a</sup>	4,98 (1,25) <sup>b</sup>	5,88 (1,05) <sup>b</sup>	5,38 (1,06) <sup>b</sup>	8,27 (1,26) <sup>b</sup>	0,000*
Diámetro cilios olfatorios	2,48 (2,02) <sup>a</sup>	2,72 (0,97) <sup>a</sup>	1,80 (0,46) <sup>a</sup>	3,20 (0,99) <sup>a</sup>	3,15 (1,09) <sup>a</sup>	0,085

**Tabla 1.** Comparación del área de glándulas de Bowman ( $\mu^2$ ), longitud de cilios olfatorios ( $\mu$ ) y diámetro de cilios olfatorios ( $\mu$ ) de ratones adultos jóvenes por grupo de exposición o no al humo de cigarrillo. Media (desviación estándar); G1= 20 minutos y 2 cigarrillos, G2= 40 minutos y 2 cigarrillos, G3= 20 minutos y 4 cigarrillos, G4= 40 minutos y 4 cigarrillos; \* diferencias significativas en las medias ( $p<0,05$ ), superíndice distintos indican la diferencia entre los grupos. Los datos corresponden a la media,  $n=54$  ratones machos; distribuidos en 6 controles, y 12 por cada grupo experimental.

**Table 1.** Comparison of Bowman's gland area, olfactory cilia length, and olfactory cilia diameter of young adult mice by group with or without exposure to cigarette smoke. SD=standard deviation; G1= 20 minutes and 2 cigarettes, G2= 40 minutes and 2 cigarettes, G3= 20 minutes and 4 cigarettes, G4= 40 minutes and 4 cigarettes; \* significant differences in means ( $p<0,05$ ), different superscripts indicate the difference between the groups. Data is mean,  $n=54$  male mice; distributed in 6 controls, and 12 for each experimental group.

modificaciones leves en cuanto a la cantidad de sustancia mucosa de recubrimiento y la presencia poco cuantificable de partículas provenientes del humo de cigarrillo hasta la presencia de agrupaciones significativas de estas partículas acompañada de la densificación de la sustancia mucosa llegando a adquirir una consistencia compacta (Iskander *et al.* 2017). Evidentemente los mayores cambios se presentaron en G3 y G4, en los cuales hubo incremento en la presencia de partículas contaminantes probablemente provenientes de los componentes del humo del cigarrillo, así como mayor producción de mucus hasta llegar a formar una especie de taponamiento, como consecuencia de la alta activación de la secreción de las glándulas de Bowman, lo cual puede llegar a dificultar la actividad de las microvellosidades al verse impedidas de accionar por la presencia excesiva de mucus. El comportamiento epitelial en G3 y G4 fue variado, en algunos segmentos fue escasa la presencia de dicha sustancia, contrastando con zonas provistas de una gruesa capa de mucus de aspecto compacto y formando una especie de taponamiento sobre el epitelio a manera de un sellamiento sobre la superficie.

La irregular distribución de las neuronas olfatorias puede interpretarse como resultado del proceso de apoptosis acelerado por las condiciones de neurotoxicidad ocasionado por acción del humo de cigarrillo; la muerte celular programada es un evento presente en el linaje neuronal del epitelio olfatorio como ha sido demostrado, con estudios quirúrgicos in vivo, por Calof *et al.* (1966).

Los resultados de este estudio proveen valiosa información sobre el efecto que causa el humo de cigarrillo sobre la mucosa olfatoria. Es de resaltar que en el presente estudio la exposición al humo

de cigarrillo fue sólo por 5 días, período relativamente corto si se compara con la exposición crónica a la cual se somete el ser humano; sin embargo, en el breve tiempo utilizado con los animales de experimentación, se pudo demostrar que el humo del cigarrillo causa efecto sobre la mucosa olfatoria aun en períodos cortos de tiempo.

El efecto de este tóxico aparentemente no modifica la citología epitelial, pero sí altera el funcionalismo de este tejido como lo demuestra el aumento de volumen y la hiperactividad de las glándulas de Bowman, las variaciones observadas en los cilios y el incremento en el depósito de sustancia mucosa entre los cilios y las microvellosidades dificultando el normal intercambio que debe existir entre la superficie celular y el ambiente de la cavidad nasal. La presencia y condensación de sustancia mucosa en la superficie epitelial puede traer como consecuencia la disminución funcional del epitelio, expresado por disminución de la olfacción (hiposmia) e incluso la pérdida de la misma (anosmia), que según lo expresan Kern *et al.* (2004) pueden ser causadas por una disminución en el número de neuronas sensoriales olfatorias maduras en funcionamiento, información que es reforzada por las investigaciones tanto de Ueha *et al.* (2016a, 2016b), quienes han demostrado que fumar cigarrillos es una causa importante de disfunción olfativa, ambos grupos de investigadores afirman que los mecanismos que producen tal disfunción siguen sin estar claros; sin embargo, los hallazgos publicados por Iskander *et al.* (2017) demuestran la existencia de cambios ultraestructurales del neuroepitelio olfatorio de conejo por efecto del humo de cigarrillo.

De acuerdo a lo referido por diversos autores,



la mayoría de los efectos del cigarrillo son dosis dependientes, incrementándose con el aumento de la cantidad de cigarrillos que se utilizan, hecho este que pudo comprobar durante el desarrollo del presente experimento; no obstante también se demostró la existencia de algunos cambios del epitelio olfatorio con las dosis bajas y tiempos breves de estimulación (Ropper *et al.* 2007), lo cual puede interpretarse como la razón por la cual el humo de cigarrillo contenido en el ambiente llega también a producir enfermedades similares a las que se producen en el fumador.

## Agradecimientos

Al Personal del Bioterio Central de la Universidad de Los Andes por su invaluable colaboración en el suministro y acertada manipulación de los animales de experimentación y al Personal Técnico del Centro de Microscopía Electrónica “Dr. Ernesto Palacios Prú quienes con su asistencia y conocimientos fueron parte importante en la realización de la presente investigación.

## Referencias

- Anderson JE. 2002. Treating tobacco use and dependence: an evidence-based clinical practice guideline for tobacco cessation. *Chest* 121 (3): 932-941. <https://doi.org/10.1378/chest.121.3.932>
- Andrade H. 2019. Bioestadística aplicada en ciencias de la salud: Guía Complementaria. Fundación Gustavo Palma Calderón.
- Calof AL, Hagiwara N, Holcomb JD, Mumm JS & Shou J. 1996. Neurogenesis and cell death in olfactory epithelium. *The Journal of Neurobiology* 30 (1): 67-81. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4695\(199605\)30:1%3C67::aid-neu7%3E3.0.co;2-e](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4695(199605)30:1%3C67::aid-neu7%3E3.0.co;2-e)
- Carbajal-Zegarra V, Lloja-Lozano L & Yatto E. 2003. Alteraciones en el sistema respiratorio producidas por intoxicación crónica con humo de tabaco en *Rattus norvegicus* variedad Sprague Dawley a diferentes altitudes. Tacna, Perú: Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tesis de grado
- Claudio-Galeana GS, Meraz-Ríos MA & Gómez-Virgilio L. 2016. Caracterización de las células progenitoras neuronales del epitelio olfatorio humano. *Tlamati Sabiduría* 7 (esp. 2): 1-16.
- Dos Reis Izolan L, Bandiera S, Pulcinelli RR, Nin MS, Almeida FB, Marques D, . . . Gomez R. 2021. Low-cost apparatus for cigarette smoke exposure in rats. November 2021 *Journal of Neuroscience Methods* 366 (39): 109412. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2021.10.9412>
- Doty L & Bromley SM. 2003. Olfaction and Gustation. En: Snow J, Ballenger J. *Ballenger's Otorhinolaryngology: Head and Neck Surgery*. Hamilton, Ontario, Canadá: Editorial BC Decker, pp. 561-591.
- Esrefoglu M, Selimoglu E, Eşrefoğlu M & Vuraler O. 2003. The Influence of Cigarette Smoke on the Epithelium of the Vestibule: an Electron Microscopic Study. *Yonsei Medical Journal* 44(4): 703-709. <https://doi.org/10.3349/ymj.2003.44.4.703>
- Fernández-Tapia AM, Rodríguez-Tovar J, Hernández-Araya E & ramírez P. 2006. Conductas agresivas, consumo de drogas e intentos de suicidio en jóvenes universitarios: *Terapia psicológica* 24(1): 63-69.
- Fuentes A, Fresno MJ, Santander H, Valenzuela S & Gutiérrez MF. 2011. Sensopercepción olfatoria: una revisión. *Revista médica de Chile* 139: 362-367.
- Gartner L, Hiatt J. 2002. *Histología. Texto y Atlas*. México: Editorial Mc Graw-Hill Interamericana.
- Hadley K, Orlandi RR & Fong KJ. 2004. Basic anatomy and physiology of olfaction and taste. *Otolaryngologic Clinics of North America* 37: 1115-1126. <https://doi.org/10.1016/j.otc.2004.06.009>
- Ham AW. 1968. *Tratado de Histología*. La Habana: Instituto del Libro.
- Hernández R. 2006. *Metodología de la Investigación*. México: McGraw-Hill Interamericana.
- Hernández-Ramírez P. 2011. Medicina regenerativa y células madre. Mecanismos de acción de las células madre adultas. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia* 25(1):[15] Disponible en <http://scielo.sld.cu/pdf/hih/v25n1/hih02109.pdf> (accedido el 25-VIII-2021).
- Hernández-Sampieri R, Fernández-Collado C & Baptista-Lucio MP. 2010. *Metodología de la Investigación*. México: McGraw-Hill/Interamericana editores S.A.
- Ho J, Koshibu K, Xia W, Luetlich K, Kondylis A, García L, Phillips B, Peitsch M & Hoeng J. 2022. Effects of cigarette smoke exposure on a mouse model of multiple sclerosis. *Toxicology Reports* 9(3). <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2022.03.032>
- Iskander NM, El-Hennawi DM, Yousef TF, El-Tabbakh MT & Elnahriry TA. 2017. Evaluation of the effect of cigarette smoking on the olfactory neuroepithelium of New Zealand white rabbit, using scanning electron microscope. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology* 274 (6): 2461-2468. doi: 10.1007/s00405-017-4475-1.
- Iwai N, Zhou Z, Roop DR & Behringer RR. 2008. Horizontal basal cells are multipotent progenitors in normal and injured adult olfactory epithelium. *Stem Cells* 26: 1298-1306.
- Junqueira LC, Carneiro J. 2003. *Basic Histology. Text & New York: Atlas*. McGraw-Hill/Appleton & Lange.
- Kern RC, Conley DB, Haines GK & Robinson AM. 2004. Pathology of the olfactory mucosa: implications for the treatment of olfactory dysfunction. *Laryngoscope* 114 (2): 279-85. <https://doi.org/10.1097/00005537-200402000-00018>
- Palacios-Prú EL, Mendoza-Briceño RV. 1972. An unusual relationship between glial cells and neuronal dendrites in olfactory bulbs of *Desmodus rotundus*. *Brain Research* 36: 404-408. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(72\)90744-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(72)90744-5)
- Ropper AH, Brown RH. 2007. *Trastornos del Olfato y el*

- Gusto. En: Ropper AH, Brown RH (Eds). *Principios de Neurología*, México: McGraw-Hill Interamericana, pp. 195-202.
- Sacerdote de Lustig E, Josiowicz AD. 2001. La mucosa olfatoria: una fuente permanente de neuronas. *Medicina* 61: 621-624.
- Sahin E, Ortug G & Ortug A. 2018. Does cigarette smoke exposure lead to histopathological alterations in the olfactory epithelium? An electron microscopic study on a rat model, *Ultrastructural Pathology*. <https://doi.org/10.1080/01913123.2018.1499685>
- Ueha R, Ueha S, Kondo K, Nishijima H & Yamasoba T. 2020. Effects of Cigarette Smoke on the Nasal Respiratory and Olfactory Mucosa in Allergic Rhinitis Mice. *Frontiers in Neuroscience* 18: 126. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00126>
- Ueha R, Ueha S, Kondo K, Sakamoto T, Kikuta S, Kanaya K, . . . Yamasoba T. 2016a. Damage to olfactory progenitor cells is involved in cigarette smoke-induced olfactory dysfunction in mice. *The American Journal of Pathology* 186 (3): 579-86. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.11.009>
- Ueha R, Ueha S, Sakamoto T, Kanaya K, Suzukawa K, Nishijima H, . . . Yamasoba T. 2016b. Cigarette smoke delays regeneration of the olfactory epithelium in mice. *Neurotoxicity Research* 30 (2): 213-24. <https://doi.org/10.1007/s12640-016-9617-5>
- Wu P, Li W, Cai X, Yan H & Chen M. 2020. Associations of cigarette smoking with memory decline and neurodegeneration among cognitively normal older individuals. *Neuroscience Letters* 714: 134563. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.134563>