

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA



**"HISTOLOGÍA DEL PULMÓN EN DESARROLLO, ULTRAESTRUCTURA Y
DETECCIÓN DE PROTEÍNA D ASOCIADA A FACTOR SURFACTANTE
PULMONAR EN EL NEUMOCITO TIPO II DE RATA DE MADRES
DIABETIZADAS"**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

M. en C. MA. GUADALUPE TREVIÑO ALANÍS

DIRECTOR: DR. en C. JAVIER VENTURA JUÁREZ

CO-DIRECTOR: DR. en C. JORGE LUIS HERNÁNDEZ PIÑERO

MIEMBRO DEL COMITÉ TUTORIAL: PhD. LUIS EDGAR RODRÍGUEZ TOVAR

AGUASCALIENTES, AGS., MÉXICO.

SEPTIEMBRE DE 2008

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

VISTO BUENO DEL COMITÉ TUTORIAL



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

Aguascalientes, Ags., a 8 de Agosto de 2008.

Dr en C. Francisco Javier Álvarez Rodríguez,
Decano del Centro de Ciencias Básicas y Presidente del
CONSEJO ACADÉMICO DEL DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS,
Centro de Ciencias Básicas,
Universidad Autónoma de Aguascalientes.

Presente:

Por este conducto, hacemos de su conocimiento que la aspirante a Doctora en Ciencias, estudiante del Doctorado en Ciencias Biológicas **M.enC. Ma. Guadalupe Treviño Alanís**, ha cumplido con los objetivos y metas del proyecto doctoral titulado: "HISTOLOGIA DEL PULMÓN EN DESARROLLO, ULTRAESTRUCTURA Y DETECCIÓN DE PROTEÍNA D ASOCIADA A FACTOR SURFACTANTE PULMONAR EN EL NEUMOCITO TIPO II DE RATA DE MADRES DIABETIZADAS", adicionalmente, los resultados de este proyecto fueron aceptados para ser publicados en la revista Anatomia, Histologia, Embryologia, en Alemania con el artículo: "**Delayed lung maturation of foetus of diabetic mothers rats course with a diminish, but without changes in the proportion of type I and type II pneumocytes and decreased expression of protein D associated surfactant factor**"; con lo que cumple con los requisitos para obtener el grado de Doctora en Ciencias, de igual manera, los abajo firmantes hemos revisado el escrito de la tesis y estamos de acuerdo con el contenido de la misma.

Sin mas por el momento, nos despedimos de usted con un afectuoso saludo.

Atentamente

Dr. en C. Javier Ventura Juárez
Director de tesis

Vo Bo

Dr. en C. Jorge Luis Hernández Piñero
Fac. de Ciencias Biológicas, UANL
Unidad de Microscopía Electrónica.
Co-director de tesis.

PhD. Luis Edgar Rodríguez Tovar
Fac. Medicina Veterinaria Zootecnia
Depto. de Patología
Miembro del comité tutorial.



CARTA DE ACEPTACIÓN DEL EDITOR PARA PUBLICAR EL ARTÍCULO

MsNo: 123 1207

ANATOMIA HISTOLOGIA EMBRYOLOGIA
JOURNAL OF VETERINARY MEDICINE



Prof. Dr. Dr. F. Sinowatz · LMU · Veterinärstr. 13 · 80539 Munich · Germany

Prof. J. Ventura-Juarez
Department of Morphology
Basic Sciences Center
University Autonomous of Aguascalientes
Avenida Universidad 940
Colonia Ciudad Universitaria
Aguascalientes
MECICO
CP: 20100

Editor-in-Chief:

Prof. Dr. Dr. Fred Sinowatz
University Munich
Lehrstuhl für Tieranatomie II
Veterinärstr. 13
80539 Munich
Germany

Phone: + 49 (0) 89 / 21 80 25 - 63
e-mail: f.sinowatz@anat.vetmed.uni-muenchen.de
m.kazior@lmu.de

Munich, 17.07.08

Dear Prof. J. Ventura-Juarez,

your manuscript entitled

Ma. Trevino-Alanis, J. Ventura-Juarez, J. Hernandez-Pinero, A. Nevarez-Garza, A. Quintanar-Stephano and A. Gonzales-Pina
Delayed lung maturation of foetus of diabetic mothers rats course with a diminish, but without changes in the proportion of type I and type II pneumocytes and decreased expression of protein D associated surfactant factor.

was accepted for publication in Anatomia, Histologia, Embryologia.

Before your manuscript can be sent for printing it is obligatory to fill in and sign "Blackwell Publishing Copyright Assignment Form" and if necessary the "Colour Work Agreement Form" which is attached.

Thank you for submitting your manuscript to AHE.

Yours sincerely

M. Kazior, Secretary to
Prof. Dr. Dr. F. Sinowatz



PRIMERA ETAPA DE LA PUBLICACIÓN DEL ARTÍCULO

The screenshot shows a web browser window with the URL <http://www.blackwellpublishing.com/bauthor/history.asp?ArticleID=465660>. The page is titled "Author Services" and features a navigation menu with links for Books, Journals, Subjects, Wiley InterScience, About, Resources, and Home. A search bar is located in the top right corner.

The main content area is divided into two sections: "Author Services Menu" and "Production History".

Author Services Menu:

- Home
- Journal Authors
 - Journal Authors Home
 - Register
 - My Publications
 - Add New Article
 - Amend My Details
 - My Favorite Journals
 - Author Resources
 - Author Benefits
 - FAQs
- Book Authors
 - Book Authors Home
 - Life of a book
 - Preparing proposals
 - Preparing the text
 - Preparing illustrations
 - Accompanying material
 - Author Checklist
 - Permissions clearance
 - Sales and marketing
 - Links
 - Book Author Contacts
 - Royalties
 - Information about ISBNs

Production History:

The article title is "Anatomia, Histologia, Embryologia". The abstract reads: "Delayed lung maturation of foetus of diabetic mothers rats course with a diminish, but without changes in the proportion of type I and type II pneumocytes and decreased expression of protein D associated surfactant factor".

The production stages are as follows:

Production Stages	Date Reached
1 - Accepted article received	28 Aug 2008

At the bottom of the page, there is a footer with the text: "Copyright © Blackwell Publishing 2008" and "CarbonFree® partner of Carbonfund.org".

VISTO BUENO DE SINODALES



Aguascalientes, Ags. A 5 de septiembre de 2008

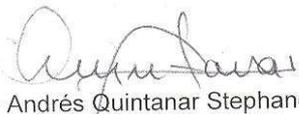
Dr. En C. Francisco Javier Álvarez Rodríguez,
Decano del Centro de Ciencias Básicas
Coordinador general del Doctorado en Ciencias Biológicas

Presente:

Por medio de la presente hago constar que he revisado la tesis de doctorado titulada: **"HISTOLOGÍA DEL PULMÓN EN DESARROLLO, ULTRAESTRUCTURA Y DETECCIÓN DE PROTEÍNA D ASOCIADA A FACTOR SURFACTANTE PULMONAR EN EL NEUMOCITO TIPO II DE RATA DE MADRES DIABETIZADAS"** presentada por la M. en C. Ma Guadalupe Treviño Alanís, después de analizarla considero que cumple con el formato y estoy de acuerdo con el contenido para que pueda obtener el título de Doctora en Ciencias.

Sin otro particular por el momento,

Atentamente,



Dr Andrés Quintanar Stephano

Sinodal externo



VISTO BUENO DE SINODALES



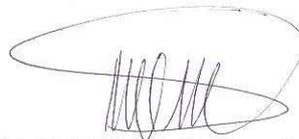
**DR. FRANCISCO ÁLVAREZ RODRÍGUEZ
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E**

Estimado Doctor Álvarez Rodríguez

Después de haber leído el trabajo de tesis titulado ***“Histología del Pulmón en Desarrollo, Ultraestructura y Detección de Proteína D Asociada a Factor Surfactante Pulmonar en el Neumocito Tipo II de Rata de Madres Diabetizadas”***, desarrollado por la estudiante Ma. Guadalupe Treviño Alanis egresada del Doctorado en Ciencias Biológicas en su modalidad Tradicional, le comento que los objetivos del proyecto se cumplieron de forma satisfactoria.

Sin otro particular por el momento, me despido saludándole cordialmente.

Atentamente
“Se Lumen Proferre”
Aguascalientes., Ags. 5 de septiembre de 2008



Dra. Ma. Consolación Martínez Saldaña
Sinodal Externo.



AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios Padre, Hijo y Espíritu Santo por la vida y los dones recibidos...

Agradezco a: la Universidad Autónoma de Aguascalientes, la Universidad de Monterrey y la Universidad Autónoma de Nuevo León, ya que cada una participó de diferente forma para el desarrollo de esta tesis permitiéndome obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas (DCB); Dr. en C. Javier Ventura Juárez y Dr. en C. Jorge Luis Hernández Piñero por la dirección del proyecto de tesis y especialmente por transmitir sus conocimientos y experiencias; PhD. Luis Edgar Rodríguez Tovar por participar con los directores de tesis; M. C. Ana María González Piña por su asesoría en el análisis estadístico; los profesores involucrados en la formación de los alumnos del programa del DCB; miembros del Jurado Dr. en C. Andrés Quintanar Stephano y Dra. en C. Ma. Consolación Martínez Saldaña.

También agradezco a: Sanjuana Limón Herrada, José Luis Moreno Silva[†], Ruth Álvarez Cantú y Rosa Isela Sandoval Lozano por su apoyo en el trabajo con los animales y procesamiento de piezas; colegas de la UDEM y jóvenes que durante este tiempo he sido su formador becario y jóvenes que han sido mis alumnos en este periodo (2005-2008) por su apoyo y motivación; compañeros del programa del doctorado por su cordialidad y confianza.

Especial agradecimiento a mi esposo MVZ Gorgonio Bazaldúa Miranda y a mis hijas Azucena y Jazmín... por su gran amor.

Má. Guadalupe Treviño Alanís

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

DEDICATORIA

A los hijos de madres diabéticas...



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

RESUMEN

Los recién nacidos de madre diabética tienen un incremento en la morbilidad y mortalidad debido a el riesgo de padecer síndrome de dificultad respiratoria. Nosotros estudiamos la histogénesis del pulmón durante el desarrollo intrauterino en ratas *Sprague-Dawley* de 18, 19 y 21 días de gestación.

Las ratas gestantes fueron separadas en el grupo al cual se le indujo diabetes con Estreptozotocina (EZT), el grupo citrato (vehículo para EZT) y, el grupo control; cuidando que las progenitoras estuvieran representadas, de sus crías de cada grupo se seleccionaron al azar 5 hembras y 5 machos de 18, 19 y 21 días de gestación; de cada cría se obtuvo biopsia del pulmón que fue procesada para cortes histológicos por la técnica histológica de parafina. De las crías de 21 días se obtuvo otra biopsia que se procesó para microscopía electrónica de transmisión (MET) y para MET e inmunocitoquímica, se estudió la morfología del neumocito tipo II y la proteína D asociada al factor surfactante pulmonar respectivamente.

Los resultados mostraron un retraso en el proceso de alveolización del pulmón en los tejidos de las crías del grupo diabetizado de 18, 19 y 21 días, lo cual fue confirmado en los tejidos procesados para MET, también observamos una disminución en la cantidad de la proteína D asociada al factor surfactante pulmonar en el grupo diabetizado estudiado por MET e inmunocitoquímica.

Los fetos del grupo diabetizado presentaron un retraso en la histogénesis del pulmón y en la diferenciación de los neumocitos tipo II así como una disminución en la cantidad de proteína D asociada al factor surfactante pulmonar.

Palabras clave: estreptozotocina, fetos de rata, neumocitos tipo I y neumocitos tipo II, proteína D asociada al factor surfactante pulmonar.

ÍNDICE

Tema	Página
Visto Bueno del Comité Tutorial	ii
Carta de aceptación del editor para publicar el artículo	iii
Primera etapa de la publicación del artículo	iv
Visto Bueno de Sinodales	v
Agradecimientos	vii
Dedicatoria	viii
Resumen	ix
Índice	x
Índice de figuras y gráficas	xiv
CONTENIDO	
CAPÍTULO 1	
Introducción	1
Antecedentes de la Diabetes <i>mellitus</i>	1
Antecedentes embriológicos del pulmón	2
Surfactante pulmonar	7
Antecedentes de la asociación de Diabetes <i>mellitus</i> durante el embarazo	

y el desarrollo del pulmón	8
Antecedentes directos	9
Justificación	12
Planteamiento del problema	13
Preguntas de investigación	14
Hipótesis	15
Objetivos	16
Objetivo general	16
Objetivos específicos	16
Variables	17
Variable dependiente	17
Variable independiente	17
Materiales y métodos	18
Diseño estadístico	18
Animales de experimentación	19
Cuidado de los animales	19
Diseño de los grupos de ratas	19
Revisión del ciclo sexual de los animales de experimentación	20
Inducción y confirmación de la Diabetes <i>mellitus</i> experimental	20
Obtención de las crías	20
Técnica de anestesia con éter etílico anhídrido	21
Técnica de cirugía para la obtención de las crías	21
Obtención de datos de las crías	22
Análisis de los tejidos	22
Microscopía de luz	22
Microscopía electrónica de transmisión	23

Inmunocitoquímica	23
Procedimiento de conteo de la inmunodetección	23

CAPÍTULO 2 24

Resultados	24
Ratas adultas	24
Crías	25
Tejido pulmonar procesado para microscopía de luz	27
Tejido pulmonar procesado para microscopía electrónico de transmisión	31
Tejido pulmonar procesado para inmunocitoquímica y cuantificación de inmunodetección	34

CAPÍTULO 3 39

Discusión, conclusiones y recomendaciones	39
Introducción	39
Progenitoras	40
Crías	41
Análisis histológico de la región periférica del pulmón	42
Factores que influyen en el retraso del desarrollo del pulmón	45
Conclusiones	47
Recomendaciones	47
Perspectivas	47

ANEXOS 48

Anexo A	49
Carta del Comité de Ética, aprobación del proyecto de investigación	49

Anexo B	50
Técnica de aplicación intraperitoneal	50
Técnica para la punción de la vena dorsal de la cola	50
Anexo C	51
Formalina	51
Anexo D	52
Técnica histológica	52
Anexo E	56
Inmunodetección con anticuerpos marcados con oro coloidal para microscopía electrónica de transmisión	56
Técnica para incluir tejidos en LR- White: inmunodetección con anticuerpos	56
Inmunotinción	56
Solución bloqueadora	57
Anexo F	60
Técnica de microscopía electrónica de transmisión	60
BIBLIOGRAFÍA	62
GLOSARIO	74

ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICAS

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Micrografía de pulmón de crías de 18 días de gestación (HyE)	28
2. Micrografía de pulmón de crías de 19 días de gestación (HyE)	29
3. Micrografía de pulmón de crías de 21 días de gestación (HyE)	30
4. Micrografía de pulmón grupo control, neumocito tipo II (MET)	32
5. Micrografia de pulmón grupo diabetes experimental, célula precursora de neumocito (MET)	32
6. Micrografía de pulmón grupo diabetes experimental, célula precursora de neumocito (MET)	33
7. Micrografía de pulmón grupo control, neumocito tipo I y magnificación de cuerpos lamelares (MET)	34
8. Micrografia de pulmón grupo control, neumocito tipo II (MET e Inmunodetección)	35
9. Micrografía de pulmón grupo control, magnificación de la figura 8	35
10. Micrografía de pulmón grupo diabetes experimental, neumocito tipo II (MET e Inmunodetección)	36
11. Micrografía de pulmón grupo diabetes experimental, magnificación de la Figura 9.	37

ÍNDICE DE GRÁFICAS

1. Pesos corporales de las ratas progenitoras	24
2. Glicemias de las ratas progenitoras	25
3. Pesos corporales de las crías	26
4. Longitud cráneo-caudal de las crías	26

5. Peso del pulmón de las crías	27
6. Promedios del inmunomarcaje	38



CAPÍTULO 1

Introducción

Antecedentes de la Diabetes *mellitus*

La Diabetes *mellitus* (DM) es una enfermedad metabólica crónico-degenerativa que incluye múltiples desórdenes y aún con atención médica desarrolla complicaciones devastadoras (Islas-Andrade, *et al.*, 2000). Se caracteriza por trastornos en el metabolismo de los carbohidratos, proteínas y grasas, causado por la insuficiencia completa o parcial de la secreción y/o el efecto de la insulina en las células del individuo (Islas-Andrade, *et al.*, 2000).

La Organización Mundial de la Salud (OMS, 2003) reportó que la DM se ha convertido en un problema mundial de salud pública y que en México ha superado a los problemas infecciosos relacionados con la pobreza. El Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI, 2002) publicó que en México las tres principales causas de mortalidad en mujeres son la DM, enfermedad isquémica del corazón y enfermedad cerebro-vascular; mientras que en los varones están la enfermedad isquémica del corazón, DM, cirrosis y otras patologías hepáticas.

Según la Asociación Americana de Diabetes (sus siglas en inglés ADA) y la OMS, la DM se clasifica en los tipos I, II y gestacional. El diagnóstico para los 2 primeros tipos se realiza mediante una glicemia en ayunas, con una prueba aislada de 126 mg/dl o bien una prueba oral de tolerancia a la glucosa ≥ 200 mg/dl (Resnick, *et al.*, 2000). La DM gestacional (DMG), es aquella que se detecta por primera vez durante el embarazo y se confirma mediante una prueba oral de tolerancia a la glucosa, obteniéndose los resultados a las dos horas, los cuales según la ADA es de 155 mg/dl y según la OMS es de 140 mg/dl (Setji, *et al.*, 2005).

La DM ha sido asociada a serias alteraciones reproductivas en la foliculogénesis, ovulación, fecundación, implantación, placentación, duración del embarazo, trabajo de parto y hasta el desarrollo perinatal (González, 2002). Es conocido que la exposición prenatal a la hiperglicemia aumenta la morbilidad y mortalidad del producto de la concepción por la generación de macrosomía, hipoglicemia neonatal, mortalidad perinatal, malformaciones congénitas, hiperbilirrubinemia, policitemia, hipocalcemia, síndrome de dificultad respiratoria y el desarrollo de problemas endocrinos (Amri, *et al.*, 1985; Nold, *et al.*, 2004; & Setji, *et al.*, 2005).

Desde esta perspectiva, la asociación entre la DM y el embarazo crea un ambiente metabólico perjudicial, el cual representa un factor de riesgo para la salud materna al cursar con un embarazo complicado y por ende para el producto de la concepción. Esto es preocupante, ya que tanto en México como en Estados Unidos de América se reporta que de las mujeres embarazadas por año, hasta el 14% de ellas cursan con DM (Amri, *et al.*, 1985; ADA, 2003; Contreras, 2004; Setji, *et al.*, 2005; & Gutiérrez, *et al.*, 2006). Bolaños, Rivera-Bolaños, y Conway, citados por Mendoza, *et al.*, (2005) publicaron que en México la incidencia de la DMG oscila entre 1.6 y 12%; sin embargo, Mendoza, *et al.*, (2005) publica que en el servicio de Medicina Materno-Fetal del Centro Médico Nacional 20 de noviembre, la DMG es la primera causa de hospitalización y consulta y la segunda causa de enfermedad de referencia, con una frecuencia del 25 al 30%.

Antecedentes embriológicos del pulmón

Los pulmones son los órganos esenciales de la respiración y en ellos se verifica la hematosis. Dicho órgano, en la rata, inicia su desarrollo aproximadamente a los 9.5 días después de la concepción (Ten Have-opbroek *et al.*, 1981), con dos brotes pulmonares originados del intestino anterior, que posteriormente son rodeados por

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

mesénquima. El epitelio de revestimiento interno proviene de la hoja germinativa endodérmica, mientras que el resto del componente pulmonar es de origen mesodérmico (Sorokin, 1970).

El desarrollo de la histología del pulmón se clasifica en varios períodos, los cuales son comunes para todos los mamíferos y son los siguientes: seudoglandular, canalicular, sacular y alveolar (Strang, 1977; & Ten Have-opbroek, *et al.*, 1981).

El período seudoglandular (18 días de gestación en la rata y de 8 a 16 semanas en el humano, 12 a 13 divisiones de vías aéreas) se caracteriza por la presencia de túbulos cubiertos internamente por epitelio columnar de origen endodérmico, que al corte transversal le da la apariencia de glándulas. Asimismo, dichos túbulos están rodeados por tejido mesenquimático que al final de este período da inicio a la formación de vasos sanguíneos que corren paralelos a los conductos (Strang, 1977; Ten Have-opbroek, *et al.*, 1981; Burri, 1997; & Carlson, 2000).

Durante el período canalicular (19-20 días de gestación en la rata y de 17 a 27 semanas en el humano), las estructuras tubulares se encuentran cubiertas por células cúbicas, las precursoras de los neumocitos. Dichas estructuras tubulares hacen contacto con el sistema capilar que tiene en este período un desarrollo notable (Strang, 1977; Ten Have-opbroek, *et al.*, 1981; Burri, 1997; & Carlson, 2000). Este período comprende la aparición de acinos, el desarrollo de la barrera alveolo capilar y al final de la etapa se inicia el desarrollo del factor surfactante pulmonar; corresponde al paso de un pulmón incompatible con la vida a otro potencialmente viable (en el humano entre las semanas 20 a 22 se reconocen las células precursoras de los neumocitos) (Burri, 1997).

Al día 21 de la gestación en la rata y de la semana 28 al término de la gestación en el humano, se identifica la etapa sacular caracterizada porque los túbulos, ahora convertidos en sacos, están revestidos por células planas y cúbicas diferenciadas a

partir de las células columnares, los neumocitos tipo I y los neumocitos tipo II. En primer lugar se diferencian los neumocitos tipo II, los cuales a su vez se diferenciarán en neumocitos tipo I, en este período sacular también aparecen los tabiques entre los sacos y se adelgaza el epitelio, igualmente aumentan los cuerpos lamelares en tamaño y número (Strang, 1977; Ten Have-opbroek, *et al.*, 1981; Burri, 1997; & Carlson, 2000).

Finalmente, el periodo alveolar (postnatal) se caracteriza por la formación de las bolsas alveolares, las cuales constan de paredes lisas revestidas por los neumocitos tipo I y los neumocitos tipo II (Strang, 1977; & Ten Have-opbroek, *et al.*, 1981).

Una vez que han terminado su desarrollo, los pulmones están compuestos por los lobulillos pulmonares, los cuales son considerados como la unidad estructural básica del pulmón. Los lobulillos pulmonares están formados por el bronquiolo respiratorio, el conducto alveolar y el saco alveolar (Krahl, 1955). La diferenciación ocurre en forma centrífuga, es decir, del hilio hacia la periferia. Los bronquiolos terminales se dividen en bronquiolos respiratorios, los cuales están formados por células cúbicas ciliadas alternando con células no ciliadas, llamadas de Clara o epiteliales secretoras bronquiales. En la pared bronquial también se encuentra músculo liso, fibras elásticas, colágenas y reticulares. El conducto alveolar tiene una pared delicada formada por epitelio plano, escaso músculo liso y fibras reticulares, elásticas y de colágena. Estos conductos terminan en un número variable de sacos alveolares, las cuales son estructuras que tienen una pared delgada cubierta por un epitelio plano soportado por fibras elásticas y reticulares (Ross, *et al.*, 2005).

El alvéolo es el fondo de saco terminal de las ramificaciones bronquiales, constituye la unidad funcional del acino pulmonar y está formado por una pared fina tapizada por el epitelio alveolar, que consiste en dos tipos de células: los neumocitos tipos I y los

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

neumocitos tipo II (40 y 60% respectivamente, de la población de células epiteliales) (Krahl, 1955; Meyrick, *et al.*, 1970; Kuhn, 1976; & Kierszenbaum, 2007).

El neumocito tipo I es una célula plana con un núcleo central y citoplasma escaso, pero con prolongaciones citoplasmáticas. Ésta célula contribuye a la mayor parte de la superficie alveolar (93-95%) participando en la estructura de la barrera de intercambio gaseoso (Kuhn, 1976; Meyrick, *et al.*, 1977; Mallampalli *et al.*, 1997; Feng, *et al.*, 2005, Ross, 2005; Mason, 2006; & Kierszenbaum, 2007); el neumocito tipo I corresponde al 40% de las células alveolares (Kierszenbaum, 2007); tiene menos ribosomas y mitocondrias que el neumocito tipo II y no produce surfactante pulmonar (Mamchaoui, *et al.*, 2002); su diámetro es de aproximadamente 50 μm , alcanzando en algunas áreas 0.2 μm de grosor (Meyrick, *et al.*, 1977).

El neumocito tipo II es una célula secretora de forma cúbica, con un núcleo esférico y en su citoplasma contiene más organelos que el neumocito tipo I; cubre 5-7% de la superficie alveolar (Mallampalli, *et al.*, 1997; Mason, 2006; & Kierszenbaum, 2007) y corresponde al 60% de las células alveolares (Kierszenbaum, 2007), su diámetro es de 9 μm , es metabólicamente activo, está localizado en un nicho en el tabique interalveolar y se encuentra parcialmente cubierto por las extensiones citoplasmáticas del neumocito tipo I. Entre los organelos citoplasmáticos importantes que tiene el neumocito tipo II, están los cuerpos lamelares (estructuras electrodensas) y presenta también abundantes mitocondrias; los cuerpos lamelares miden aproximadamente de 250 a 2000 nm de diámetro, están dispuestos en pilas de 3 a 3.5 nm de grosor, y son los responsables de la producción del surfactante pulmonar. Estos organelos están localizados en la porción apical del neumocito tipo II, y con microscopía de luz (ML) se observan como gránulos. Sin embargo, cuando son vistos mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) se observan como rimero de laminillas membranosas paralelas, constituidas por fosfolípidos, lípidos neutros y proteínas. Los cuerpos

lamelares son secretados a la luz del alvéolo por exocitosis para formar el surfactante pulmonar (Meyrick, *et al.*, 1970; Kuhn, 1976; Meyrick, *et al.*, 1977; Rhoades, *et al.*, 1997; Feng, *et al.*, 2005; Ross *et al.*, 2005; & Mason, 2006).

El neumocito tipo II es la célula progenitora del neumocito tipo I (Meyrick, *et al.*, 1970; Kuhn, 1976; Meyrick, *et al.*, 1977; Rhoades, *et al.*, 1997; Mallampalli *et al.*, 1997; Mamchaoui, *et al.*, 2002; Bishop, 2004; Feng *et al.*, 2005; & Ross *et al.*, 2005), incluso se ha publicado que existen dos subpoblaciones de neumocitos tipo II: los neumocitos tipo II propiamente y las células madre (Bishop, 2004).

La aparición del surfactante pulmonar varía según la especie: en la rata ocurre al día 21 (Meyrick, *et al.*, 1970), mientras que en el ser humano la síntesis del surfactante pulmonar inicia entre la 24-28ª semanas de desarrollo y para la 35ª semana de la gestación ya hay suficiente surfactante pulmonar, el cual se distribuye sobre la superficie de los alvéolos para reducir la tensión superficial y facilitar la expansión alveolar favoreciendo el intercambio gaseoso (Carlson, 2000). En la modulación del surfactante pulmonar participan de manera importante las hormonas cortisol, insulina, prolactina y tiroxina entre otras (Odom, *et al.*, 1977; & Rooney, 1984).

El desarrollo del pulmón termina después del nacimiento; sin embargo, inicialmente su morfogénesis depende de interacciones epitelio-mesénquima para lo cual se expresan los genes Hox siguientes: Hoxa-3 a Hoxa-5 y Hoxb-3 a Hoxb-6 (Carlson, 2000; & Mendelson, 2000). También contribuyen factores reguladores como el factor de crecimiento de los fibroblastos 10, sonic hedgehog, la proteína 4 morfogenética ósea, el proto-oncogén N-myc, el sindecán, la tenascina y la epimorfina (Carlson, 2000; & Mendelson, 2000). Asimismo, intervienen factores de transcripción como las hormonas adrenales, el factor de transcripción tiroideo, los de la familia de forkhead y la familia de los dedos de zinc (Gilbert, *et al.*, 1997; Mendelson, 2000; & Whitsett, 2002). En la alveologénesis y la diferenciación de los neumocitos tipo I y los neumocitos tipo II se

involucran mayormente el factor de crecimiento de los fibroblastos y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (Mino, 2000).

Surfactante pulmonar

Síntesis. En el neumocito tipo II ocurre la síntesis y almacenamiento del surfactante pulmonar, teniendo como sustratos glucosa, glicerol, palmitato, fosfatos, colina y fosfatidilcolina (Rooney, 1984). Los lípidos del surfactante se sintetizan en el retículo endoplásmico y se transfieren por la vía del sistema del aparato de Golgi a los cuerpos lamelares a través de proteínas transportadoras del surfactante. Finalmente, de los cuerpos lamelares, el surfactante es liberado por exocitosis hacia la luz alveolar (Rooney, 1984; Rooney, 2001; & Feng, *et al.*, 2005).

Composición. El surfactante pulmonar está formado en un 90% por lípidos, de los cuales, un 80-90% corresponden a fosfolípidos, 10% a glicolípidos y 5% a lípidos neutros; y proteínas (10%) (Rooney, 1984; & Fehrenbach, 2001). El más abundante de los fosfolípidos es la fosfatidilcolina (86%), de la cual más del 60% corresponde a dipalmitoilfosfatidilcolina (está en forma disaturada, y es el principal componente tensoactivo), el resto son fosfatidilglicerol y esfingomielina (Rooney, 1984).

Las proteínas del surfactante son nombradas A, B, C y D, de las cuales las proteínas A y D son glicoproteínas hidrofílicas y las proteínas B y C son hidrofóbicas.

La proteína A es la más abundante, monomérica de 28-36 kDa, codificada por un gen del cromosoma 10; es responsable de regular la síntesis y secreción del surfactante, de organizar la mielina tubular y tiene función inmune pulmonar regulando al macrófago alveolar y participando en la opsonización (Odom, *et al.*, 1977; Van Golde, *et al.*, 1994; Rooney, 2001; & Ross, *et al.*, 2005).

La proteína B es un péptido de 42 kDa que se encuentra localizada en los cuerpos lamelares, y está codificada por un gen del cromosoma 2. Esta proteína es importante para la transformación de cuerpo lamelar en una película superficial (capa de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

surfactante) estabilizando la monocapa lipídica y forma parte esencial del surfactante pulmonar (Odom, 1977; Van Golde, *et al.*, 1994; Rooney, 2001; & Ross, *et al.*, 2005).

La proteína C, está identificada en los cuerpos lamelares; es codificada por el gen del cromosoma 8 y junto con la B, orienta a la palmitoilfosfatidilcolina dentro del surfactante y mantiene la capa de surfactante en los alvéolos (Odom, 1977; & Van Golde, *et al.*, 1994).

La proteína D es una glucoproteíncolagenasa de 43 kDa ausente en los cuerpos lamelares. Esta proteína es sintetizada por el neumocito tipo II, las células de Clara, células caliciformes y los macrófagos, así como en los fluidos pulmonares (Kasper, *et al.*, 2002; & Cao, *et al.*, 2004), regula el metabolismo del surfactante y participa en los mecanismos de defensa inmunológicos regulando al macrófago alveolar. Las proteínas A y D son llamadas lectinas tipo C por lo que se agrupan en las colectinas (Odom, 1977; Rooney, 2001; Kasper *et al.*, 2002; & Ross, *et al.*, 2005).

Funciones. Las funciones del surfactante pulmonar son disminuir la tensión superficial de los alvéolos, contribuir a la estabilidad alveolar, prevenir el edema pulmonar, disminuir la presión intersticial, disminuir la fuerza superficial, defensa del huésped (antimicrobial y antiinflamatorio) y en el adulto mantener los pulmones secos (Rhoades, *et al.*, 1995; Fehrenbach, 2001; & Mason, 2006).

Antecedentes de la asociación de Diabetes *mellitus* durante el embarazo y el desarrollo del pulmón

Los factores de riesgo perinatal que afectan el desarrollo del pulmón son DM, prematuridad y factores genéticos. El hijo de la madre diabética tiene un incremento en el riesgo de morbilidad y mortalidad debido a la presentación de macrosomía, hipoglicemia neonatal, mortalidad perinatal, malformaciones congénitas, hiperbilirrubinemia, policitemia, hipocalcemia, síndrome de dificultad respiratoria y

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

favorece el desarrollo de problemas endocrinos (Amri, *et al.*, 1985; Nold, *et al.*, 2004; & Setji, *et al.*, 2005). De igual manera, durante el embarazo, la DM retrasa la diferenciación del neumocito tipo II independientemente de la severidad de la DM (Bourbon, *et al.*, 1985). Experimentalmente y en animales de laboratorio se ha reportado que entre las alteraciones en la maduración pulmonar de las crías están la disminución del espacio aéreo, incremento en el número de alvéolos, retraso en la maduración del pulmón y, por ende, una disminución o ausencia del surfactante pulmonar (Oliveros, *et al.*, 1999); así como un incremento en la permeabilidad de la microvasculatura pulmonar (Wright, *et al.*, 1999).

Antecedentes directos

La utilización de animales de granja y de laboratorio en investigación científica, enseñanza y pruebas de laboratorio se separa en usos biomédicos y agrícolas, cada uno con diferentes criterios de evaluación de protocolos, estándares de alojamiento y cuidado de los animales de una misma especie basados en los objetivos de investigación. El uso de los animales en la actividad científica deberá estar sujeto a consideraciones éticas con el fin de promover el cuidado humanitario de los animales procurando su bienestar con lo que se garantiza la calidad en la investigación.

Existe una guía de regulación que promueve los siguientes principios:

- 1.- Diseño y realización de los procedimientos con base en su relevancia para la salud humana y animal, el avance del conocimiento y el bienestar de la sociedad.
- 2.- Evitar o reducir la incomodidad, estrés y dolor siempre y cuando sea compatible con una buena ciencia.
- 3.- Uso apropiado de sedación, analgesia y anestesia.
- 4.- Establecer el punto final en los experimentos.

5.- Brindar un manejo apropiado a los animales, dirigido y realizado por personas calificadas.

6.- La conducción de experimentos en animales vivos solo se llevará a cabo por, o bajo la estricta supervisión de personas calificadas y con experiencia (Lomelli, 1996).

Los animales de experimentación son una valiosa ayuda para realizar modelos de diabetes experimental, con el objetivo de estudiar cómo ésta patología afecta los diferentes órganos y sistemas tanto en su desarrollo como en la madurez. Con los modelos experimentales es posible establecer diversas líneas de investigación, como por ejemplo Morfológica, Bioquímica, Hormonal y otras.

Los modelos para inducir DM utilizan diferentes especies animales, sin embargo, en este trabajo de investigación se utilizó a la rata *Sprague-Dawley*. De igual forma, entre los tóxicos para el páncreas más usados están la Aloxán y la Estreptozotocina (EZT), siendo esta última la que se utilizó para éste proyecto (Islas-Andrade, *et al.*, 2000; & López-Soldado, *et al.*, 2003).

La EZT es producida por el *Streptomyces achromogenes*. Esta sustancia es un antibiótico natural de amplio espectro, potente agente antibacterial y antitumoral, clínicamente utilizado para el tratamiento de pacientes con metástasis de células β de los islotes endocrinos pancreáticos de Langerhans y tumores carcinoides malignos del páncreas (Second Annual Report on Carcinogens, 1981). Por su alta afinidad por las células β de los islotes endocrinos del páncreas, la EZT se ha utilizado como inductor de la DM (Palomino, *et al.*, 1998, Islas-Andrade, *et al.*, 2000; & López-Soldado, *et al.*, 2003); este compuesto es un agente citotóxico (Hugues, *et al.*, 2001) que actúa inhibiendo la síntesis del ácido desoxirribonucleico (Mosby's Drug Consult, 2005). Al-Achi, *et al.* (2001) refieren que la EZT es tóxica para los islotes endocrinos de Langerhans porque se incrementa la producción de óxido nítrico y prostaglandinas.

Para el primero se han descrito dos roles: una comunicación célula a célula mediada

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

por estimulación de la síntesis de guanosina 3'5'-monofosfato y citotoxicidad por interacción directa o indirecta de los radicales libres (Yang, *et al.*, 1998). El efecto tóxico de la EZT en los islotes endocrinos pancreáticos se manifiesta por la elevación de la glicemia (Al-Achi, *et al.*, 2001).



Justificación

El presente trabajo contribuye con información sobre el desarrollo del pulmón y la inmadurez del órgano en el recién nacido, ocasionada por la Diabetes *mellitus* incontrolada durante la gestación.

Aporta datos que serán de gran utilidad en el área de la biomedicina a todos los niveles como son los pacientes, los profesionales en las ciencias de la salud así como instituciones de la salud.



Planteamiento del problema

La Diabetes *mellitus* es una enfermedad metabólica crónico-degenerativa que incluye múltiples desórdenes y aún con atención médica desarrolla complicaciones devastadoras. Actualmente es un problema mundial de Salud Pública y en México ha superado a las infecciones convirtiéndose en las primeras causas de muerte (INEGI, 2002). Los hijos de madres diabéticas incontroladas sufren de inmadurez pulmonar, produciéndoles problemas respiratorios, mismos que desembocan en asfixia perinatal en el 25-28% de los casos y en síndrome de dificultad respiratoria en 15% de los casos (García, *et al.*, 2002). En la mayoría de estos, los recién nacidos son tratados procurando la ventilación y olvidando que el órgano blanco, en este caso el pulmón, necesita terminar su desarrollo. Cordero, *et al.* (1998) publicó que de 530 recién nacidos de madres diabéticas 182 (34%) tuvieron síndrome de dificultad respiratoria, de los cuales 65 (36%) necesitaron ventilación mecánica y 34 (6%) tuvieron la enfermedad de la membrana hialina, necesitando todos ellos surfactante pulmonar exógeno para su manejo.

Debido a que el retraso en el desarrollo histológico del pulmón causa síndrome de dificultad respiratoria es importante revisar la ultraestructura de los neumocitos tipo II y tratar de detectar si hay alteración en los cuerpos lamelares como precursores del factor surfactante, ya que tanto el manejo con surfactante como con ventilación mecánica es costoso.

Preguntas de investigación

¿Qué cambios en el peso corporal y la longitud cráneo-caudal presentan las crías de 21 días de gestación de madres a las que se les indujo diabetes experimental con Estreptozotocina, con respecto a los de madres control y citrato?

¿Qué cambios en el peso del pulmón presentan las crías de 21 días de gestación de madres a las que se les indujo diabetes experimental con Estreptozotocina, con respecto a los de madres control y citrato?

¿Qué alteraciones en el desarrollo de la histología pulmonar presentan las crías de 18, 19 y 21 días de gestación de madres a las que se les indujo diabetes experimental con Estreptozotocina, con respecto a los de madres control y citrato?

¿Existen cambios en la cantidad de la proteína D asociada al factor surfactante pulmonar en los neumocitos tipo II de los pulmones de crías de 21 días de gestación de madres diabetizadas con Estreptozotocina, en relación con las crías de madres control y citrato?

¿Existen cambios en la ultraestructura de los neumocitos tipo II de los pulmones de crías de 21 días de gestación de madres diabetizadas con Estreptozotocina, en relación con las crías de madres control y citrato?

Hipótesis

Ho: "Las crías de ratas sanas presentan peso corporal, longitud cráneo-caudal, desarrollo histológico del pulmón, distribución de la proteína D asociada al factor surfactante pulmonar en los neumocitos tipo II y ultraestructura del neumocito tipo II de características normales, al igual que las crías de ratas a las que se les indujo Diabetes *mellitus* experimental con Estreptozotocina".

$$\mu_1 = \mu_2$$

Ha: "Las crías de ratas a las que se les indujo Diabetes *mellitus* experimental con Estreptozotocina presentan diferencias en el peso corporal, en la longitud cráneo-caudal, en el desarrollo histológico del pulmón, así como en la distribución de la proteína D asociada al factor surfactante pulmonar en los neumocitos tipo II y ultraestructura del neumocito tipo II con respecto a las crías de ratas sanas".

$$\mu_1 \neq \mu_2$$

Objetivos

Objetivo general

Analizar la histología del pulmón en desarrollo y la ultraestructura del neumocito tipo II en las crías de ratas normales y de ratas a las que se les indujo *Diabetes mellitus* experimental con Estreptozotocina.

Objetivos específicos

- 1.- Analizar el peso y longitud cráneo-caudal de las crías de 21 días de gestación de madres del grupo control, del grupo citrato y de madres a las que se les indujo *Diabetes mellitus* experimental con Estreptozotocina.
- 2.- Analizar el peso del pulmón de crías de 21 días de gestación de madres del grupo control, del grupo citrato y de madres a las que se les indujo *Diabetes mellitus* experimental con Estreptozotocina.
- 3.- Analizar la histología del pulmón en las crías de 18, 19 y 21 días de gestación de madres del grupo control, del grupo citrato y de madres a las que se les indujo *Diabetes mellitus* experimental con Estreptozotocina, a microscopía de luz con la técnica histológica, cortes procesados con parafina, teñidos con hematoxilina y eosina.
- 4.- Describir la ultraestructura del neumocito tipo II del pulmón de crías de 21 días de gestación de madres del grupo control, del grupo citrato y de madres a las que se les indujo *Diabetes mellitus* experimental con Estreptozotocina.
- 5.- Cuantificar la proteína D asociada al factor surfactante pulmonar del neumocito tipo II con inmunomarcaje a nivel de microscopia electrónica de transmisión, en el pulmón de crías de 21 días de gestación de madres del grupo control, del grupo citrato y de madres a las que se les indujo *Diabetes mellitus* experimental con Estreptozotocina.

Variables

Variable dependiente:

Peso corporal y longitud cráneo-caudal de las crías de 21 días.

Peso del pulmón de las crías de 21 días.

Histología del pulmón de las crías.

Ultraestructura del neumocito tipo II.

Inmunodetección de la proteína D asociada al factor surfactante pulmonar.

Variable independiente:

Inducción de Diabetes *mellitus* experimental.

Materiales y métodos

El presente proyecto de investigación fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA) (Anexo A).

Diseño estadístico

Este trabajo de investigación es prospectivo y experimental de causa efecto. El tamaño de la muestra se determinó de tal modo que sea baja la probabilidad de cometer errores importantes (Méndez, *et al.*, 1990). Si el tamaño de la población es menor de un millón de elementos se considera finita (Marrugat, *et al.*, 1998). La probabilidad de cometer error tipo I se fijó en un valor α de 0.05 de nivel de significancia. Méndez, *et al.*, (1990), sugiere que el investigador fije una situación de alejamiento mínimo de la hipótesis de nulidad nombrada δ ; si además se conocen *a priori* las varianzas de las poblaciones iguales entre sí e iguales a σ^2 se calcula:

$$d = \frac{\delta}{\sqrt{2}} \sigma^2$$

y con este valor se recurrió a la tabla: tamaños de las muestras para comparar dos proporciones con $\alpha = 0.05$ (Tabla A.5 página 126 de Méndez, *et al.*, 1990); considerando la proporción mayor = 1.00 y la proporción menor = 0.50 cruzamos los datos y nos da el tamaño de la muestra: 10 biopsias para cada grupo (normal, citrato y experimental).

Animales de experimentación

Se seleccionaron al azar 9 ratas hembra de la cepa *Sprague-Dawley* adultas de 2 meses de edad y aproximadamente de 200 – 250 g de peso, nulíparas, provenientes del Bioterio del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL).

Cuidado de los animales

Los animales se mantuvieron en jaulas individuales en un ambiente de temperatura (23°C) y humedad controladas, con periodos de luz/oscuridad de 12/12 horas y alimentación con Purina Lab Chow y agua a libre demanda.

Diseño de los grupos de ratas.

Cada uno de los grupos de estudio estuvo constituido por 3 animales.

- El grupo I se utilizó como control normal.
- El grupo II fue tratado con 1 ml de solución amortiguada de citratos pH 4.5 JalmeK[®] (ácido cítrico, reactivo analítico (RA), agua destilada, RA y fosfato de sodio dibásico anhidro, RA [Na₂ HPO₄]) por vía intraperitoneal (técnica para aplicación intraperitoneal ver anexo B).
- El grupo III correspondió al grupo experimental o diabetizado, al que se le indujo DM con un derivado de la nitrosurea, Estreptozotocina (C₈H₁₅N₃O₇), (SO130 de SIGMA) (Al-Achi, *et al.*, A. 2001), que se administró a dosis única de 35 mg por kg de peso, diluido en 1 ml de solución de citrato 0.4 M a pH de 4.5 por vía intraperitoneal el día 5^o de la gestación (Amri, K *et al.*. 1985, Islas-Andrade, S. *et al.*, 2000, & López-Soldado, I. *et al.*, 2003).

Revisión del ciclo sexual de los animales de experimentación

A todas las ratas se les revisó diariamente el estado de sus ciclos sexuales mediante toma de muestras para citologías vaginales a las 9:00 horas, teñidas con la técnica de Papanicolaou. Las ratas que se encontraron en etapa de estro se colocaron con el macho por 12 horas o periodo largo de apareamiento (Endo, A. *et al.*, 1988). Después del apareamiento se realizó citología vaginal y la presencia de tapón mucoso vaginal y espermatozoides en los frotis determinaron el día 0 de la gestación (Baker, J. 1979).

Inducción y confirmación de Diabetes *mellitus* experimental

En el 5° día de la gestación, a las ratas de los grupos citrato y de DM experimental, se les administró por vía intraperitoneal la solución de citrato y la Estreptozotocina respectivamente.

Las ratas de todos los grupos, se pesaron y midieron sus glicemias al inicio de cada semana y el día de la obtención de las crías. Se pesaron en una báscula modelo EQ-4NP de la marca Torrey y se obtuvo muestras de sangre periférica (una gota) al inicio de cada semana, por punción de la vena dorsal de la cola (anexo B) (Bourbon, *et al.*, 1985; & Vanheest, *et al.*, 1997) para determinar las glicemias por medio de glucómetro (One Touch Ultra de Life Scan, Jonson & Jonson, S. A).

Obtención de las crías

Se obtuvieron las crías vía cirugía cesárea de las ratas adultas de los grupos normal, citrato y diabetizado, según los días del calendario gestacional determinado, es decir, los días 18, 19 y 21 (Bourbon, *et al.*, 1985; Pinter, *et al.*, 1991; & Cunha, *et al.*, 2001) previa anestesia administrada por vía respiratoria con éter etílico anhidro (*vide infra*) (CH₃CH₂)₂O P. M. 7412 (Meyers, *et al.*, 1980; & Cunha, *et al.*, 2001). Se ha observado

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

que esta cepa de rata *Sprague-Dawley* tiene entre 10 y 12 crías por camada; se seleccionaron al azar 5 hembras y 5 machos que conformaron el tamaño de la muestra, en cada uno de los grupos se representaron a las 3 progenitoras.

Técnica de anestesia con éter etílico anhídrido

Para anestesiarse la rata *Sprague-Dawley* con éter etílico se colocó el animal en una cámara para lo cual se usó un frasco de boca ancha con tapa, en cuyo fondo se colocó un trozo de algodón empapado con éter etílico con una malla de alambre sobre el algodón; enseguida se introdujo al animal dentro del frasco y se tapó inmediatamente; se observó como disminuyen la frecuencia y la profundidad de las respiraciones. Cuando la rata ha quedado dormida se saca de la cámara y se continúa con mascarilla, la cual consistió en un frasco pequeño con una torunda de algodón humedecido con éter etílico en el fondo, colocado en la nariz del animal (Quintanar, 2004).

Técnica de cirugía para la obtención de las crías

Previa anestesia con éter etílico y con la rata en decúbito dorsal se preparó la región abdominal (tricotomía y asepsia). Se procedió a realizar una incisión longitudinal de la apófisis xifoides al pubis; y 2 incisiones, derecha e izquierda, del pubis a la cresta ilíaca, (estos cortes incluyeron toda la pared abdominal) dejando al descubierto los órganos pélvicos. Se identificaron los cuernos uterinos ocupados, se procedió a retirarlos haciendo un corte transversal en la porción cefálica de la vagina, se colocaron en una caja de Petri con solución fisiológica, en donde se disecaron para obtener las crías. A continuación se introdujo la punta de la tijera en el diafragma torácico a un lado del apéndice xifoides (lo que ocasiona paro respiratorio y muerte sin dolor) y se retiró la mascarilla de anestesia (Quintanar, 2004), se procedió al

empaquetamiento (bolsa amarilla) para el destino final como marca la norma oficial mexicana (NOM) NOM-087-ECOL-SSA1-2002.

Obtención de datos de las crías

Se obtuvieron las crías y se seleccionaron al azar 5 hembras y 5 machos para cada uno de los grupos, representando a las 3 progenitoras; las crías que sobraron se sacrificaron y se almacenaron. Las crías se pesaron en una báscula modelo EQ-4NP de la marca Torrey y se midieron sus longitudes cráneo-caudales con un vernier; se determinó el género midiendo la distancia ano-genital (la de los machos es el doble que el de las hembras) bajo un estéreo-microscopio (Sepúlveda, *et al.*, 1992) y se sacrificaron por decapitación (Pinter, *et al.*, 1991; & López-Soldado, *et al.*, 2003). Finalmente se obtuvieron las biopsias y se introdujeron en la solución fijadora.

Análisis de los tejidos

Microscopía de luz

A 10 crías (5 hembras y 5 machos), que se obtuvieron de cada uno de los grupos (representando a las 3 progenitoras), y de cada uno de los días de gestación señalados previamente, se les disecó los pulmones y se fijaron en formalina al 10% amortiguada (anexo C) y se procesaron con la técnica rutinaria de parafina para cortes histológicos (para revisar la técnica histológica para ML ver anexo D). Se realizaron 20 cortes histológicos seriados (Méndez, 1990) a cada biopsia, mismos que se tiñeron con hematoxilina y eosina, finalmente se analizaron para la descripción de la histología del desarrollo del pulmón por etapas pseudoglandular, canalicular y sacular.

Microscopía electrónica de transmisión

A las crías (5 hembras y 5 machos) de 21 días de gestación se les realizó disección de tórax, se aisló el pulmón, se pesó y se obtuvo una biopsia del lóbulo medio del pulmón derecho el cual se fijó con glutaraldehído al 2.5%. Las muestras de pulmón se procesaron para cortes ultrafinos de 85 nm, los cuales se utilizaron para evaluar la ultraestructura de los neumocitos tipo II, (para revisar la técnica de MET ver anexo F).

Inmunocitoquímica

Al grupo de crías de 21 días de gestación (5 hembras y 5 machos) obtenidas de cada grupo experimental, se les realizó disección del tórax, se aisló el pulmón, se pesó, se obtuvo una biopsia del lóbulo medio del pulmón derecho y se fijó con glutaraldehído al 2.5% por 24 h. Las biopsias se procesaron para inmunodetección con anticuerpos. El primer anticuerpo monoclonal de ratón (anticuerpo monoclonal IgG anti proteína D asociada al factor surfactante pulmonar, 3132 Chemicon®) reaccionó contra el dominio tipo lectina de dicha proteína D, el 2º anticuerpo fue anti-IgG de ratón, marcado con oro coloidal (20 nm) (Ted Pella® 15753 para MET) dejando en los tejidos la marca de oro que identifica a la proteína D (técnica inmunocitoquímica (ICQ) anexo E).

Procedimiento de conteo de la inmunodetección

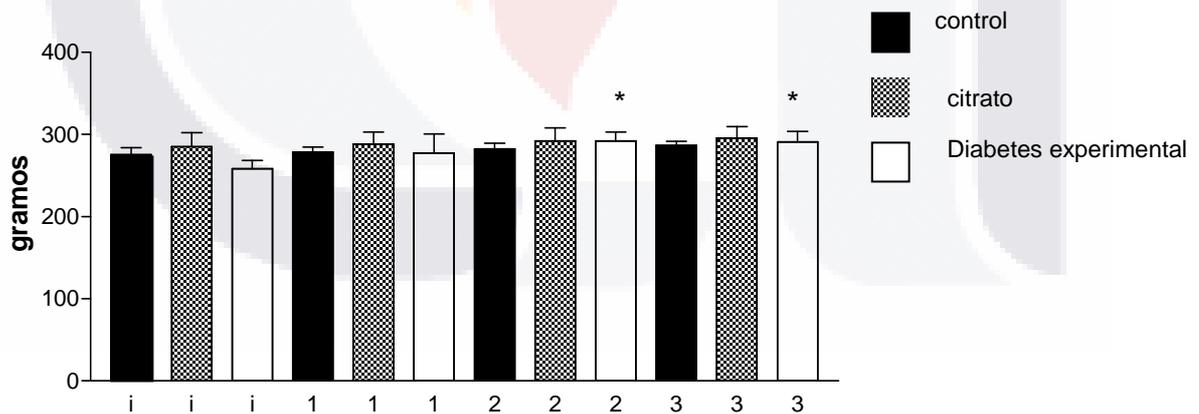
Los cortes finos (85 nm) de tejido en las rejillas de níquel fueron procesados para ICQ y observados al MET, se identificaron los neumocitos tipo II, se tomaron micrografías de seis de ellos (3 hembras y 3 machos) como lo hicieron otros investigadores (Doping, 1996; & Mayhew, 2005); las micrografías se tomaron a 2X y se imprimieron a 3.1X obteniendo un aumento de 14000X; posteriormente con el sistema procesador de imágenes Image Pro Plus Versión 4.5.1. (Media Cybernetics) se cuantificó la inmunodetección en todo el campo fotografiado (intracelular y extracelular).

CAPÍTULO 2

Resultados

Ratas adultas

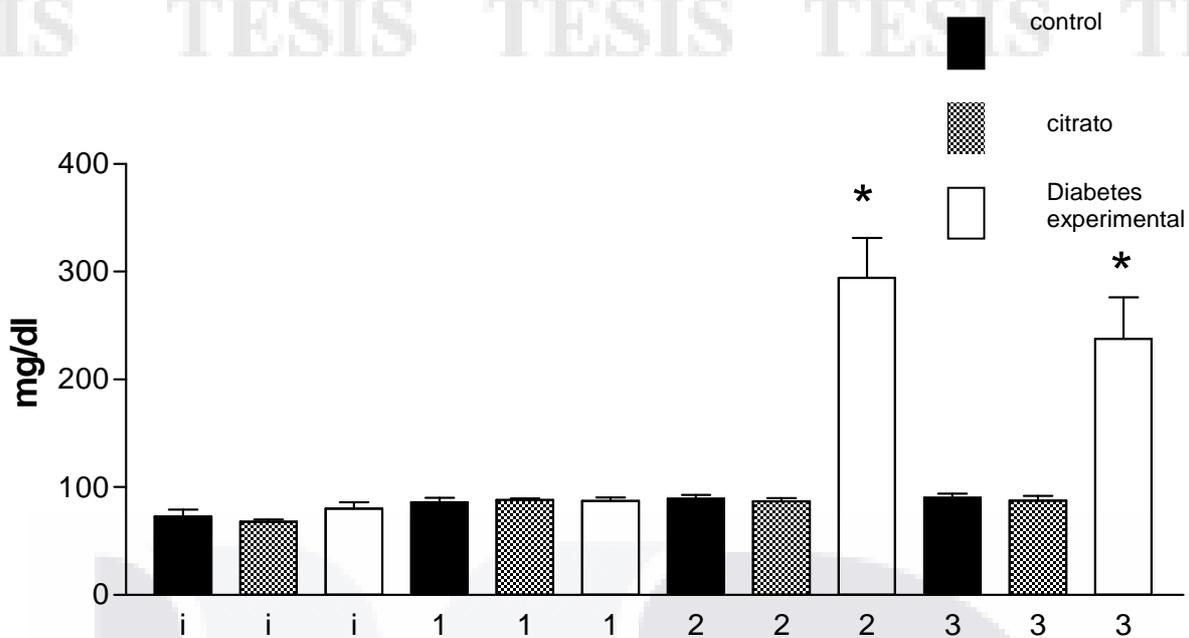
Los animales adultos fueron pesados y medida su glicemia al inicio y a los 7, 14 y 21 días de la gestación, obteniendo promedios de peso en g en el grupo control de 275, 278, 282 y 286; y glicemia de 72, 86, 89 y 90 mg. El grupo testigo 285, 288, 292 y 295 g de peso y 67, 88, 86 y 87 mg de glicemia. Del grupo diabetizado se obtuvieron 258, 277, 292 y 290 g de peso y 80, 87, 294 y 237 mg de glicemia. Para el análisis estadístico se realizó la prueba t de Student y los pesos y glicemias de las madres de los grupos control y testigo no presentaron diferencias significativas mientras que las cifras de las glicemias del grupo experimental si fueron estadísticamente significativa en la 2ª y 3ª semana ($p < 0.001$) (Gráfica No. 1 y 2).



Gráfica No. 1: Gráfica que muestra los pesos corporales de las ratas madres.

i= inicio, 1= primera semana, 2= segunda semana, 3= tercera semana.

* El peso tuvo un aumento significativo la 2ª y 3ª semana en el grupo Diabetes experimental respecto a los grupos control y citrato altamente significativo con valor de $P < 0.001$ y $P = 0.002$ (baja significancia) respectivamente.



Gráfica No. 2: Gráfica que muestra las glicemias de las ratas madres.

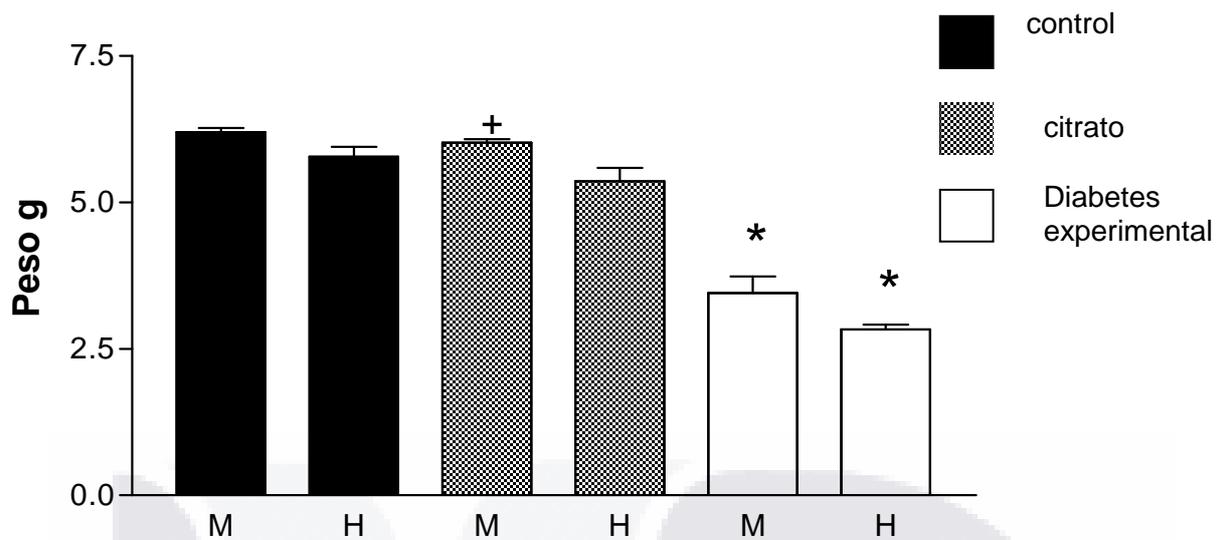
i= inicio, 1= primera semana, 2= segunda semana, 3= tercera semana.

*Las ratas del grupo Diabetes experimental tuvieron glicemias elevadas altamente significativas respecto a los controles y citrato con un valor de $P < 0.001$

Crías

Las crías de las ratas fueron estudiadas por género, de las de 21 días de gestación se obtuvo las medidas antropométricas siguientes: longitud cráneo-caudal (c-c) (mm), peso corporal (g) y el peso del pulmón (g).

De las crías de 21 días se registraron promedios para el grupo control en las hembras 42.8 mm de longitud c-c, 5.78 g de peso corporal y el peso del pulmón fue de 0.2368 g; para los machos los datos fueron 43.2 mm, 6.2 g y 0.2410 g respectivamente. Para el grupo testigo las crías hembras fueron 41 mm, 5.36 g y 0.1779 g; y los machos 42.8 mm, 6.02 g y 0.1927 g respectivamente. Las crías del grupo diabetes experimental mostraron longitud c-c, peso corporal y peso del pulmón en las hembras 2.8 mm, 3.01 g y 0.08 g; los machos 3.4 mm, 3.25 g y 0.11 g respectivamente. Las cifras fueron menores y estadísticamente significativas ($p < 0.001$) en las crías de progenitoras diabetizadas. En estos datos no hubo diferencias por género (Gráficas 3, 4 y 5).

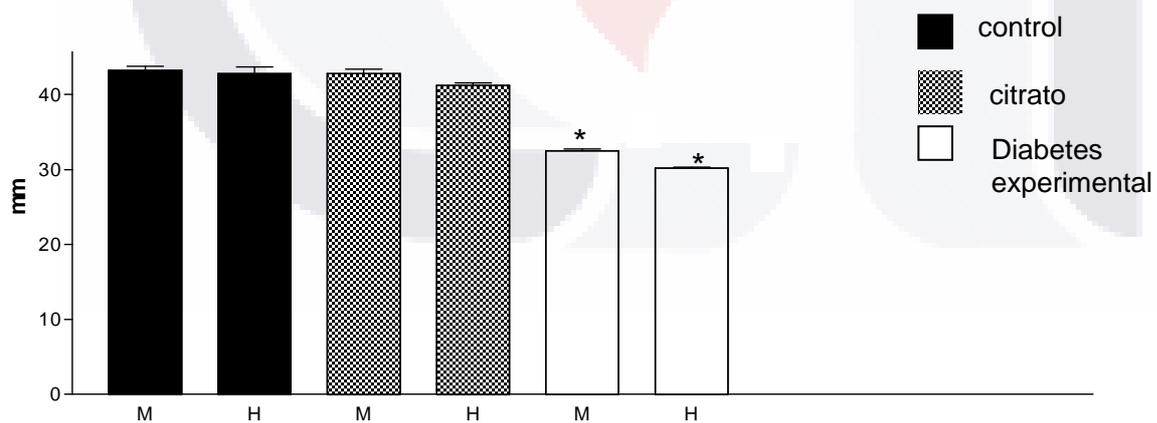


Gráfica No. 3: Gráfica que muestra los pesos corporales de las crías.

M= macho, H= hembra.

+Al comparar por género solo hay diferencia significativa en los machos del grupo citrato por ser más pesados con valor de $P= 0.02$ que indica baja significancia.

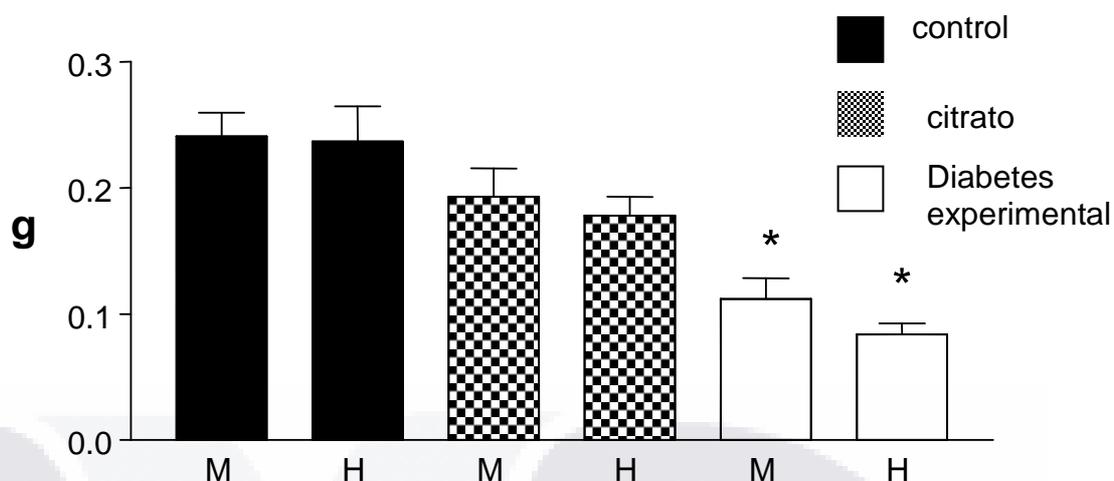
*Al comparar por grupo hay disminución altamente significativa en el peso de machos y hembras del grupo Diabetes experimental con un valor de $P<0.001$



Gráfica No. 4: Gráfica que muestra la longitud cráneo-caudal de las crías

M= macho, H= hembra

*Al comparar la longitud cráneo-caudal por grupo hay disminución altamente significativa en el grupo Diabetes experimental ($P<0.001$).



Gráfica No. 5: Gráfica que muestra el peso del pulmón de las crías.

M= macho, H= hembra

*Al comparar por grupo hay disminución altamente significativa en el grupo Diabetes experimental (P<0.001).

Tejido pulmonar procesado para microscopía de luz

Se obtuvieron biopsias de pulmón de 18, 19 y 21 días de gestación, las cuales se procesaron con la técnica histológica rutinaria y se tiñeron con hematoxilina y eosina.

El tejido pulmonar de las crías de 18 días de desarrollo mostró estructuras tubulares que caracterizan a la etapa pseudoglandular; dichas estructuras estuvieron revestidas internamente de células altas con núcleo basal y citoplasma claro en los tres grupos, pero, se observaron diferencias significativas en el grupo de diabetes experimental que consistió en que las estructuras tubulares son de menor tamaño (Figura 1).

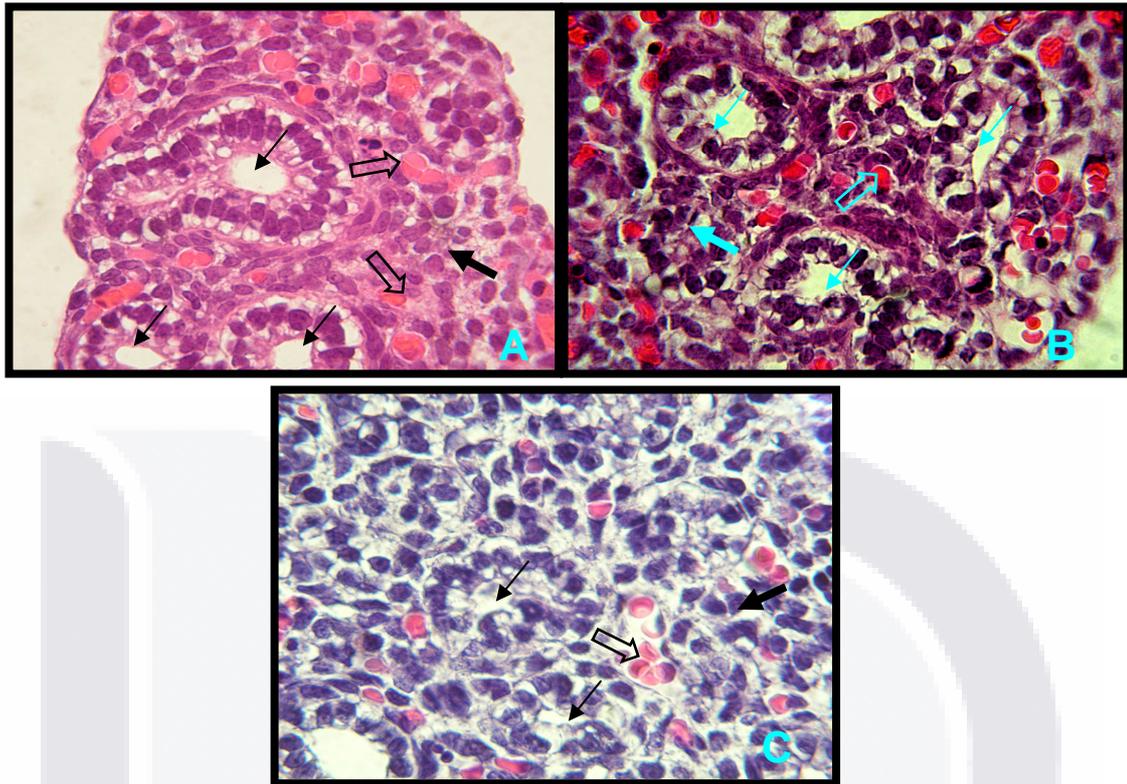


Figura 1: Micrografía de pulmón de cría de rata de 18 días de gestación. **(A)** grupo control y **(B)** grupo citrato. Muestran el parénquima pulmonar normal para la edad: etapa pseudoglandular. Se observan estructuras tubulares (flechas delgadas) llamadas pseudoglándulas en cortes transversales y oblicuos, originadas del endodermo; el resto del tejido (flecha gruesa) corresponde al mesénquima que da sus derivados por ejemplo vasos sanguíneos (flechas abiertas) que son de los primeros derivados. **(C)** diabetes experimental. Muestra el parénquima pulmonar con retraso en su desarrollo para la edad: se observan estructuras tubulares (flecha delgada) llamadas pseudoglándulas, originadas del endodermo; el resto del tejido (flecha gruesa) corresponde al mesénquima que da sus derivados por ejemplo vasos sanguíneos que son de los primeros derivados (flecha abierta). Hematoxilina y Eosina, 400X.

A los 19 días de gestación el tejido pulmonar de los grupos control y citrato mostraron la etapa canalicular característica, ya que las células han disminuido de tamaño y porque al ocurrir las divisiones dicotómicas se alargan las estructuras tubulares de la etapa anterior preparándose para la siguiente etapa. Asimismo, en esta edad (19 días) en el grupo experimental se observó que el desarrollo se detuvo en la etapa pseudoglandular; sin embargo, las estructuras tubulares tienen luz amplia y las células que las revisten son más bajas que en la etapa anterior (Figura 2).

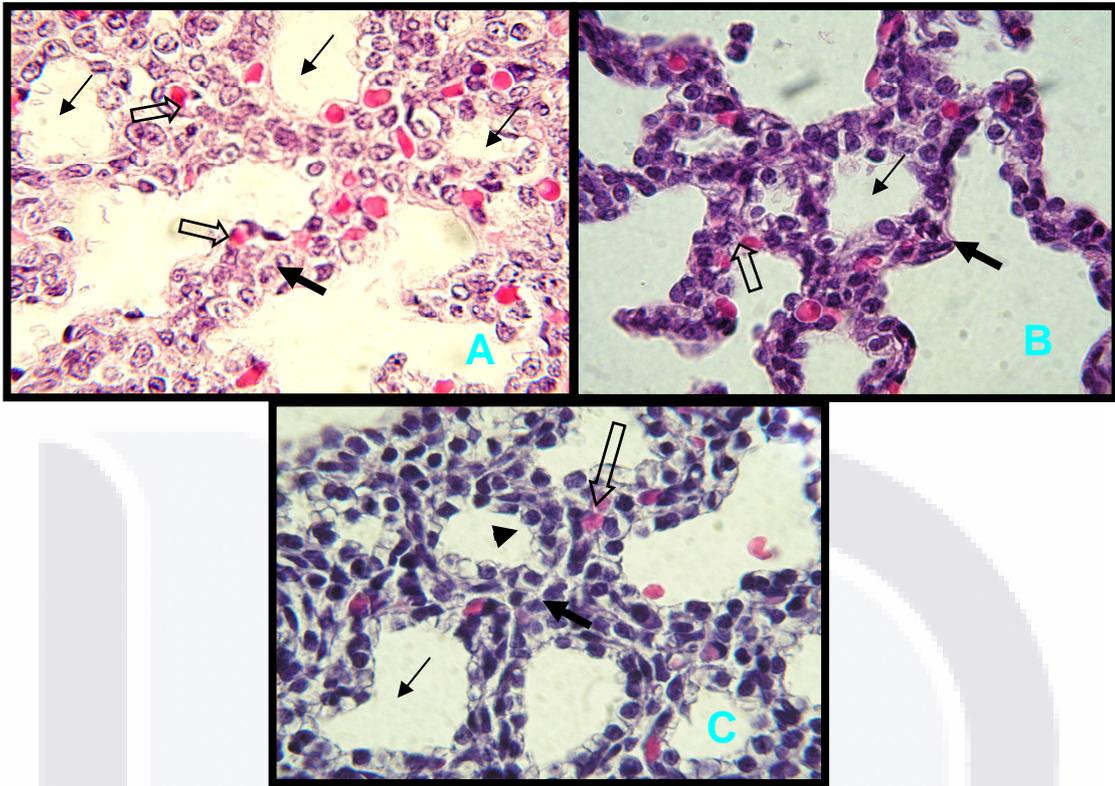


Figura 2: Micrografía de pulmón de cría de rata de 19 días de gestación. **(A)** grupo control y **(B)** grupo citrato. Muestran el parénquima pulmonar normal para la edad: etapa canalicular. Se observan canalículos (flechas delgadas) revestidos por células cúbicas originadas del endodermo; las paredes de los canalículos (flecha gruesa) corresponde a futuros tabiques originados en parte por el mesénquima, en el interior se identifican vasos sanguíneos (flechas abiertas). **(C)** diabetes experimental. Muestra el parénquima pulmonar con retraso en su desarrollo para la edad: se observan estructuras tubulares (flecha delgada) llamadas pseudoglandulas con células bajas (punta de flecha) comparadas con la etapa pseudoglandular pero altas en relación a los grupos controles de 19 días, originadas del endodermo; el resto del tejido (flecha gruesa) corresponde al mesénquima que da sus derivados por ejemplo vasos sanguíneos que son de los primeros derivados (flecha abierta). Hematoxilina y Eosina, 400X.

En las muestras del tejido pulmonar de las crías de 21 días de gestación de los grupos normal y citrato se observaron con las características de la etapa sacular conformada por espacios aéreos revestidos por neumocitos tipo I que se identificaron por células planas cuyo núcleo sobresale a la superficie aérea y su citoplasma mostró prolongaciones que revistieron al tabique y que cubrieron al neumocito tipo II. Separando a los sacos, se observaron los tabiques inter-alveolares formados de tejido conectivo, fibras y vasos sanguíneos; mientras que el tejido pulmonar de las crías del

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

grupo de diabetes experimental mostró características de etapas tempranas del desarrollo ya que se observaron tubos revestidos por células en proceso de diferenciación, es decir células altas con núcleo grande y citoplasma claro (Figura 3).

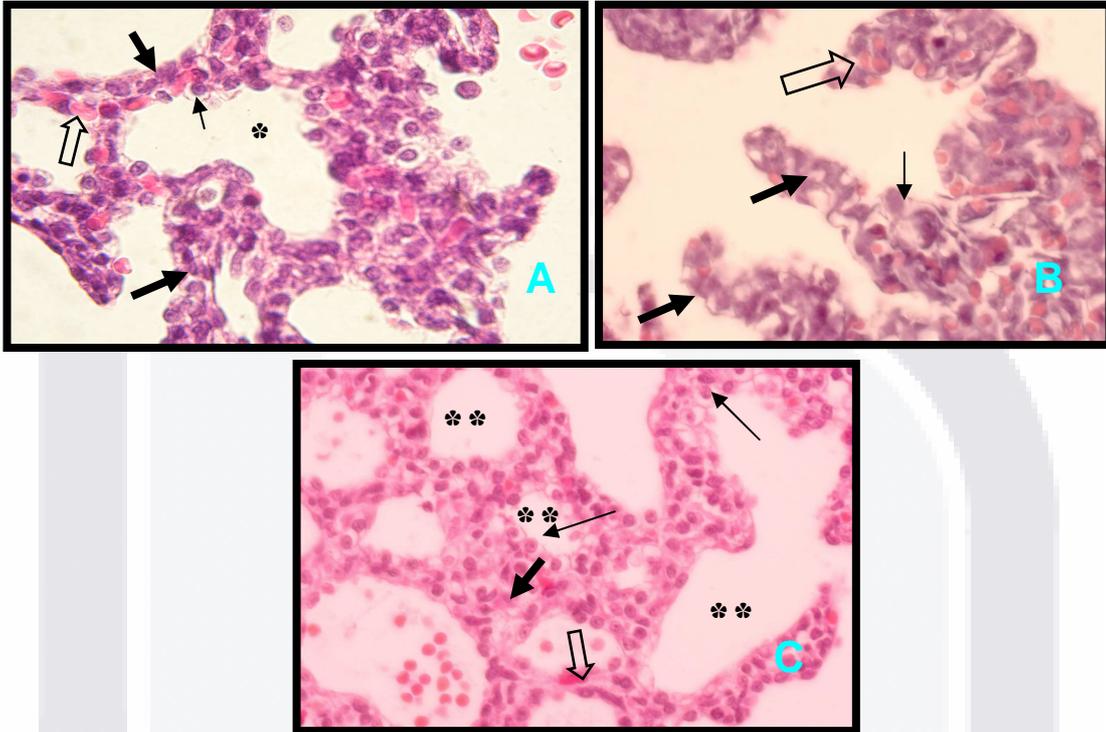


Figura 3: Micrografía de pulmón de cría de rata de 21 días de gestación. **(A)** grupo control y **(B)** grupo citrato. Muestran el parénquima pulmonar normal para la edad: etapa sacular. Se observan sacos alveolares (*) revestidos por células cúbicas originadas del endodermo (flecha delgada); los alveolares están separados por los tabiques interalveolares (flecha gruesa), en el interior se identifican vasos sanguíneos (flechas abiertas). **(C)** Diabetes experimental. Muestra el parénquima pulmonar con retraso en su desarrollo para la edad: se observan estructuras tubulares (**) como en la etapa canalicular, revestidas por células cúbicas (flecha delgada); el resto del tejido (flecha gruesa) corresponde al mesénquima que da sus derivados por ejemplo vasos sanguíneos (flecha abierta). Hematoxilina y Eosina, 400X.

Tejido pulmonar procesado para microscopía electrónica de transmisión

Los cortes finos (85 nm) de tejido pulmonar de los grupos control, citrato y diabetes experimental, procesados para MET, fueron observados para la identificación y análisis de los neumocitos tipo II.

En los tejidos (3 hembras y 3 machos) del grupo control y citrato se identificaron y analizaron los neumocitos tipo II, consideradas como células cúbicas rodeadas por la membrana celular y con microvellosidades en la superficie apical. Además, presentaban un núcleo grande y organitos citoplasmáticos abundantes, entre ellos los cuerpos lamelares que caracterizan estas células (Figura 4).

En los tejidos del grupo diabetes experimental se observaron neumocitos inmaduros, son células columnares precursoras de los neumocitos, se identificaron por contener glucógeno en forma de gránulos densos localizados en el citoplasma dirigidos hacia la porción apical de la célula; los organitos celulares localizados hacia la porción basal de la célula (Figuras 5 y 6).



Figura 4: Micrografía de pulmón de cría de rata de 21 días de gestación del grupo control. Célula neumocito tipo II: (N) núcleo: se observa la cromatina dispersa en el centro, la cromatina condensada en la periferia y poros nucleares (flecha blanca); (M) mitocondrias; (C) espacios que corresponden a los cuerpos lamelares; (flecha delgada) porción apical de la célula; (flecha gruesa negra) uniones intercelulares; (flecha gruesa blanca) poro nuclear. MET 14,000X.

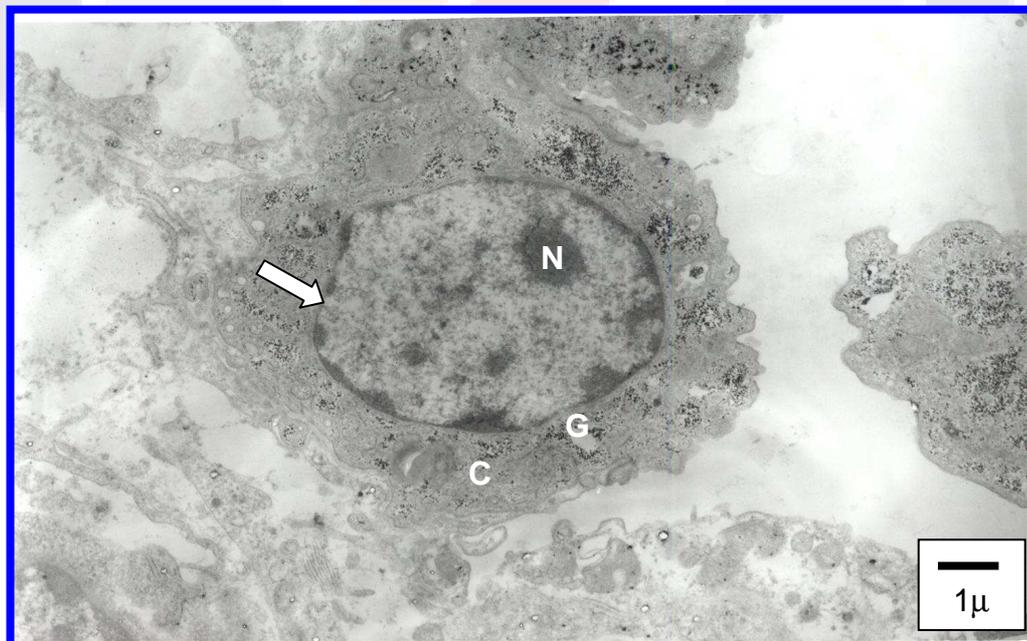


Figura 5: Micrografía de pulmón de cría de rata de 21 días de gestación del grupo diabetes experimental. Célula precursora del neumocito tipo II: (N) núcleo: (flecha blanca) poro nuclear, cromatina dispersa en el centro, muy abundante en comparación con los grupos controles y la cromatina condensada en la periferia escasa en comparación con los grupos controles; (C) citoplasma, (G) acúmulos de glucógeno que se observan como gránulos densos. MET 14,000X.

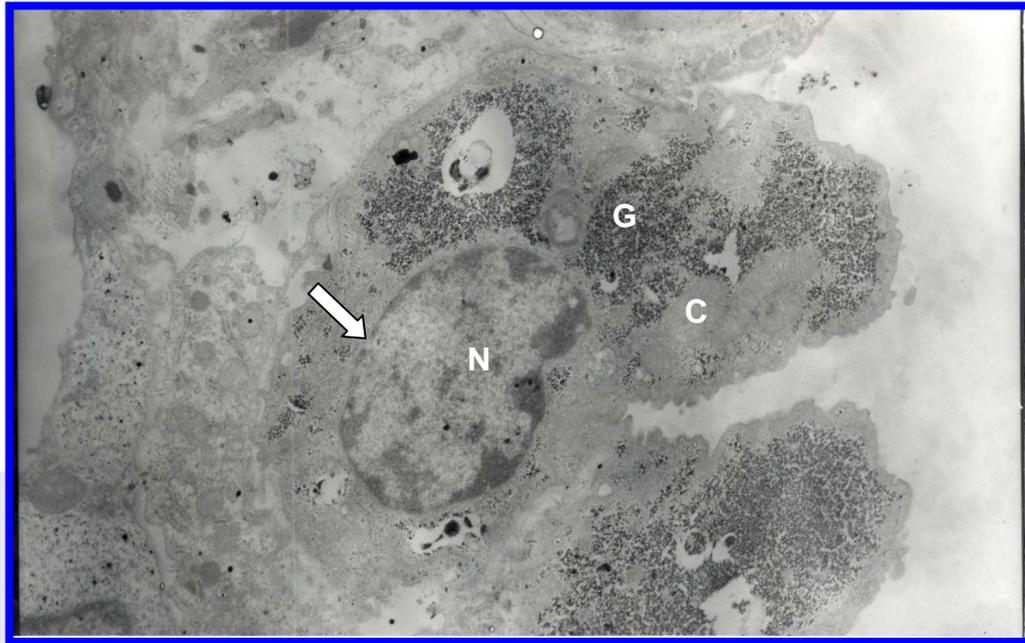


Figura 6: Micrografía de pulmón de cría de rata de 21 días de gestación del grupo diabetes experimental. Célula precursora del neumocito tipo II: (N) núcleo: (flecha blanca) poro nuclear, cromatina dispersa en el centro, muy abundante en comparación con los grupos controles y la cromatina condensada en la periferia, escasa en comparación con los grupos controles; (C) citoplasma, (G) acúmulos de glucógeno que se observan como gránulos densos. MET 14,000X.

El tejido pulmonar de las crías de 21 días de gestación de los grupos control y citrato mostraron características de la etapa sacular, conformada por sacos aéreos revestidos por neumocitos tipos I y II (Figura 3) diferenciados a partir de las células columnares de origen endodérmico como está publicado (Carlson, 2000; Strang, 1977; Ten Have-opbroek, *et al.*, 1981 & Burri, 1997) y separados por tabiques formados de tejido conectivo; en los cuales se observan los vasos sanguíneos y células de sostén como lo describe Meyrick, *et al.* (1970). Los neumocitos tipo I son células planas con núcleos centrales, citoplasma escaso y prolongaciones citoplasmáticas (Figura 7A) tienen 50 μm de diámetro, cubren 95% de la superficie alveolar y con los vasos sanguíneos forman la barrera de intercambio gaseoso (Meyrick, *et al.*, 1977); y, los neumocitos tipo II son células cúbicas con función secretora con núcleos esféricos y más organitos que los neumocitos tipo I (Manchaoui, *et al.*, 2002; Bishop, *et al.*, 2004 & Feng, *et al.*,

2005) entre ellos, los cuerpos lamelares que lo caracterizan (Figura 7B), tienen 9 μ m de diámetro, cubren 5% de la superficie alveolar (Meyrick, *et al.*, 1977).

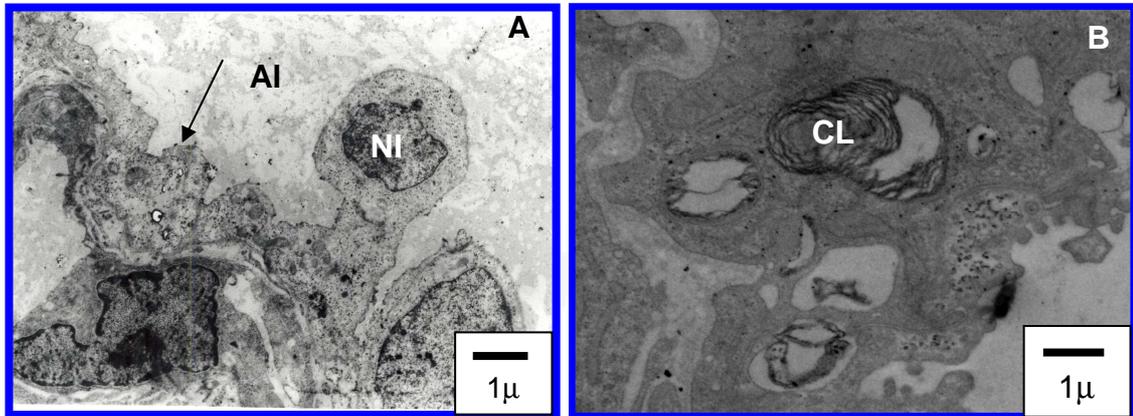


Figura 7: Micrografía de pulmón de cría de 21 días de gestación, grupo control. A) Neumocito tipo I (NI), célula plana con núcleo que protruye hacia la luz del alveolo (AI); prolongación citoplasmática del NI (flecha). B) Citoplasma del neumocito tipo II donde se observan los cuerpos lamelares (CL). MET 14,000X.

Tejido pulmonar procesado para inmunocitoquímica y cuantificación de la inmunodetección.

Los cortes finos (85 nm) de tejido pulmonar de los grupos control, citrato y diabetes experimental, procesados para MET e ICQ, fueron observados para la identificación y cuantificación de la proteína D asociada al factor surfactante pulmonar en neumocitos tipo II.

Se identificó y cuantificó la inmunodetección, contabilizando en promedio 262 y 283 marcas de oro en tejidos de grupos control y citrato respectivamente (Figuras 8 y 9).

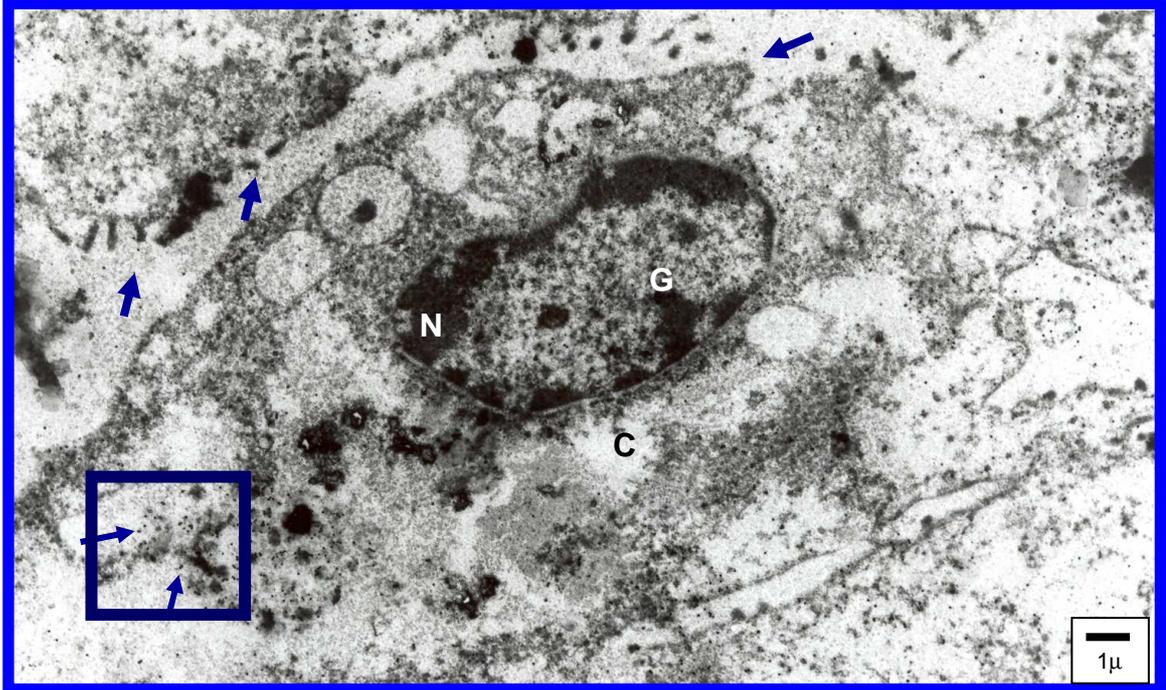


Figura 8: Micrografía de pulmón de cría de rata de 21 días de gestación del grupo control. Célula neumocito tipo II: (N) núcleo, (C) citoplasma, el recuadro indica con flechas la inmunodetección de la proteína D asociada al factor surfactante pulmonar el cual se localiza dentro y fuera de la célula (flecha gruesa). MET con inmunodetección 14,000X.

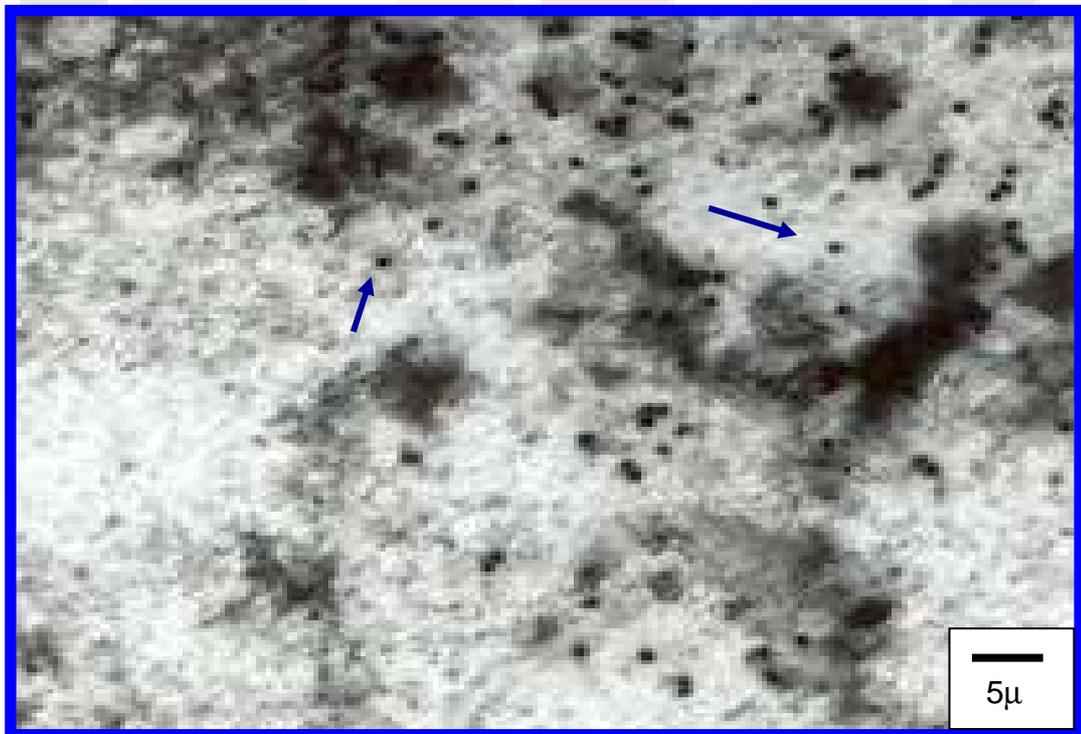


Figura 9: Magnificación del recuadro señalado en la Figura 8. Pulmón de cría de 21 días de gestación, grupo control. Citoplasma del neumocito tipo II donde se señala con flechas la inmunodetección de la proteína D asociada al factor surfactante pulmonar. MET con inmunodetección 14,000X.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Así mismo se hizo la identificación y cuantificación de la inmunodetección en los tejidos del grupo diabetes experimental encontrando un promedio 94 marcas (Figuras 10 y 11).

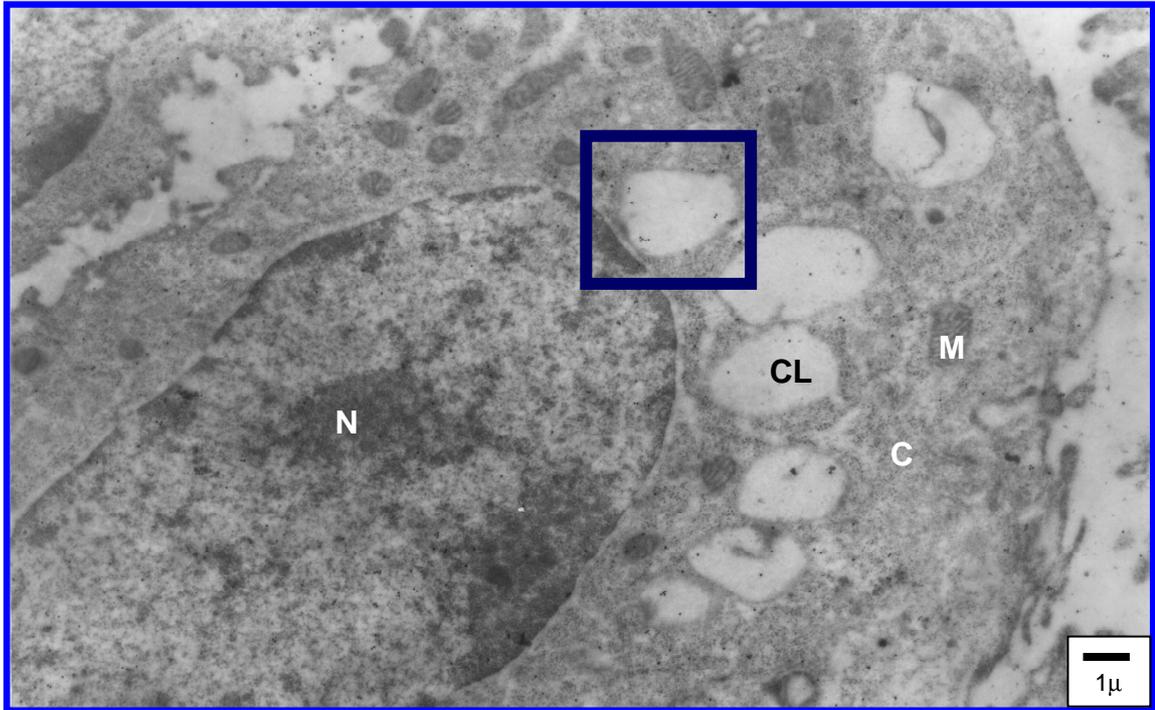


Figura 10: Micrografía de pulmón de cría de rata de 21 días de gestación del grupo diabetes experimental. Célula neumocito tipo II: (N) núcleo, (C) citoplasma, el recuadro indica el espacio que corresponde a cuerpo lamelar (CL). MET con inmunodetección 14,000X.

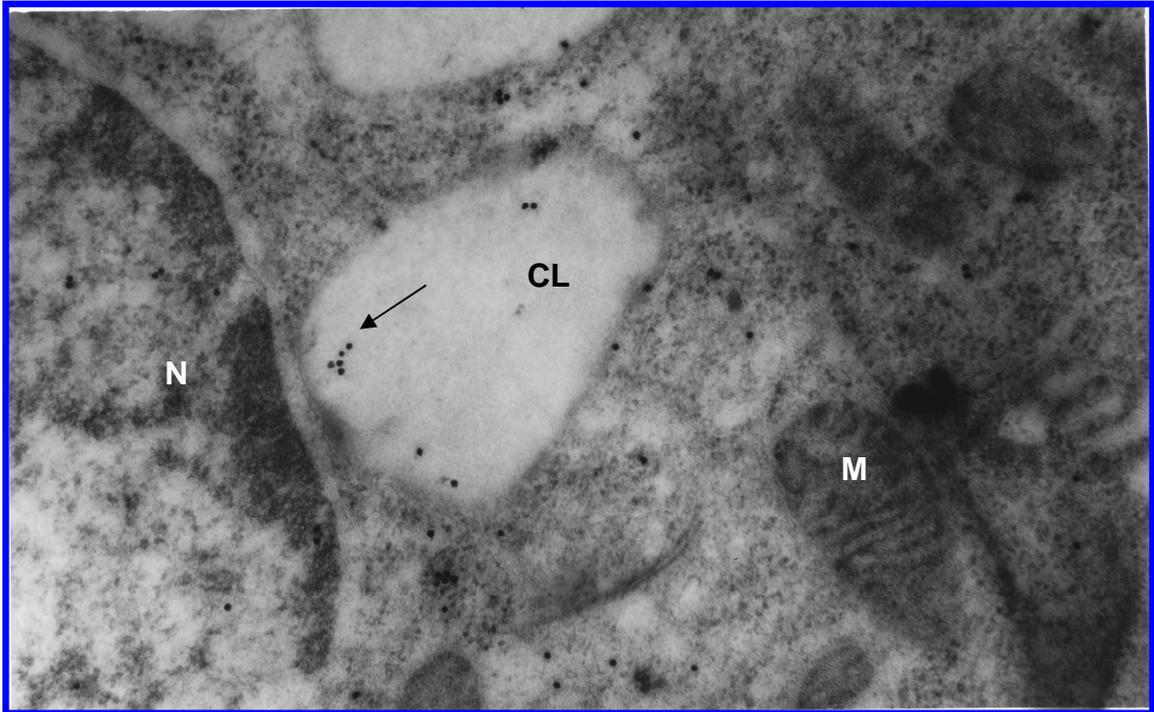
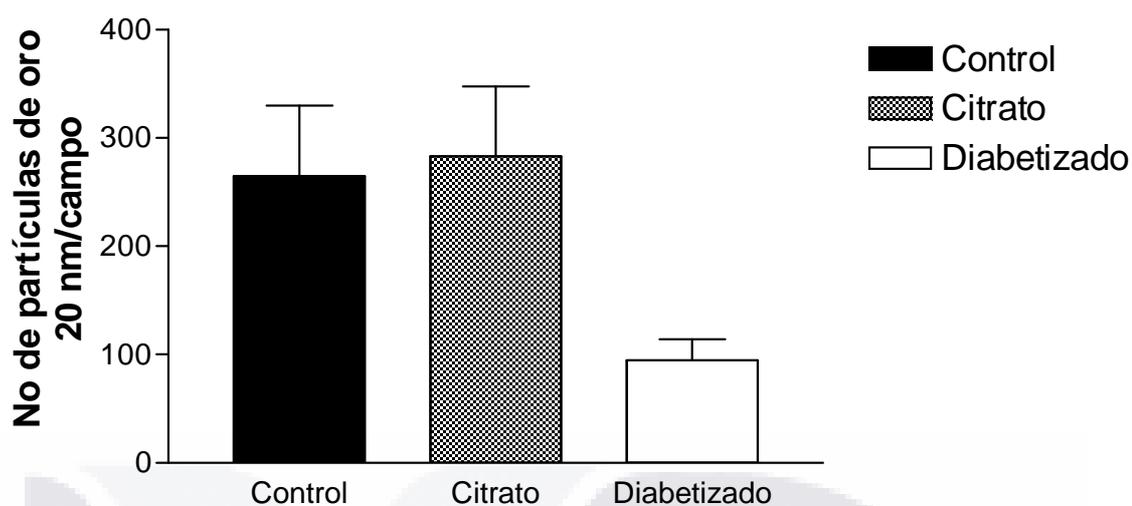


Figura 11: Magnificación del recuadro señalado en la Figura 10. Pulmón de cría de 21 días de gestación, grupo diabetes experimental. Cuerpo lamelar (CL) donde se señala con flechas la inmunodetección de la proteína D asociada al factor surfactante pulmonar que está disminuida en comparación con los controles, (N) núcleo y mitocondria (M). MET con inmunodetección 14,000X.

Los promedios de la cuantificación de la inmunodetección fue de 262 para el grupo control, 283 para el grupo citrato y de 94 para el grupo diabetes experimental, se realizó el análisis estadístico y se graficaron los datos, resultando una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.0062$) (Gráfica 6).



Gráfica No. 6.- Gráfica que muestra los promedios de marca de oro por campo. El grupo diabetes experimental muestra disminución estadísticamente significativa ($P < 0.0062$).

CAPÍTULO 3

Discusión, conclusiones y recomendaciones

Introducción

Los resultados del presente trabajo aceptan la hipótesis propuesta, ya que las progenitoras a las que se les indujo DM experimental con EZT se diabetizaron y mantuvieron su diabetes todo el tiempo del experimento; sus crías presentaron bajo peso corporal y del pulmón, disminución en la longitud cráneo-caudal, retraso en el desarrollo de la región alveolar del pulmón observada con ML, retraso en la diferenciación del neumocito tipo II observada con MET y disminución en la proteína D asociada al surfactante pulmonar detectada por inmunodetección a nivel de MET, todo ello en relación con los grupos control y citrato.

La DM es una enfermedad crónico-degenerativa que requiere atención médica y cuidados personales y familiares, a pesar de ello se desarrollan complicaciones ya que la glucosa forma puentes entre las cadenas proteicas, proceso conocido como glucosilación que lleva a la deformación de la proteína y por lo tanto a estimular el sistema inmune y daño irreversible de los tejidos (González *et al.*, 2001). La Secretaría de Salud (INEGI, 2002) señala que para las mujeres la DM es la primera causa de muerte y para los varones la segunda; en países desarrollados es la cuarta de las primeras cinco causas de muerte (Silva, 2004). Estos datos son preocupantes ya que la DM está clasificada como una de las patologías degenerativas y afecta la productividad de las personas entre otras cosas, en forma importante, la DMG perjudica seriamente tanto a la mujer como a su hijo en las diferentes etapas del desarrollo intrauterino.

El diagnóstico de DM se hace con una glucemia plasmática con ayuno de 8 horas \geq 126mg/dl o una curva de tolerancia a la glucosa \geq 200 mg/dl después de 2 horas (Resnick, *et al.*, 2000; & Contreras, 2004); en la clasificación se agrega la DMG con prevalencia de 1-14% de todos los embarazos (Contreras, 2004) y corresponden a todas aquellas mujeres con hiperglucemia detectada por vez primera durante el embarazo, el diagnóstico se hace con la prueba de tolerancia a la glucosa para lo cual la ADA publica que con carga de 100 ó 75 g de glucosa oral y con un resultado a las 2 horas de 140 mg/dl se hace el diagnóstico; y la OMS publica que con carga de 75 g de glucosa oral y con un resultado a las 2 horas de 140 mg/dl se hace el diagnóstico (Setji, *et al.*, 2005). La DMG se comporta como DM tipo II en el 98% de los casos (Contreras, 2004).

Para este trabajo, la importancia de la DMG radica en que el desarrollo intrauterino en los primeros estadios así como el embrión y feto tienen complicaciones desde banales hasta graves, estas últimas ponen en riesgo la vida del embrión, feto y recién nacido.

Progenitoras

En esta investigación se indujo DM con EZT al día 5º de la gestación de la rata *Sprague-Dawley* de acuerdo al esquema llevado a cabo por Amri, *et al.*, (2001) y López-Soldado, *et al.* (2003), 48 horas después los animales obtuvieron promedios de glucemias con 8 horas de ayuno de 300 mg/dl, lo que permite asegurar que nuestros animales de experimentación tuvieron DM grave ya que Cunha, *et al.*, (2001) reporta que cifras entre 120 – 200 mg/dl corresponden a DM grave; los animales mantuvieron a hiperglucemia todo el tiempo del experimento, mientras que los animales de los grupos citrato y control permanecieron con glucemias dentro de límites normales.

Crías

Las crías se obtuvieron a los días 18, 19 y 21 de la gestación, según lo propuesto, vía cesárea como lo hacen otros investigadores (Cunha, *et al.*, 2001).

De acuerdo a los objetivos planteados, de las crías de 21 días de gestación se obtuvo el peso corporal y del pulmón así como la longitud cráneo-caudal.

El peso corporal de las crías de 21 días de gestación de madres control y citrato fue de 5-6 g, de acuerdo a como está publicado en la literatura para estos grupos (Bourbon, *et al.*, 1985; & Pinter, *et al.*, 1991), mientras que el peso corporal de las crías de madres diabetizadas fue bajo, 3 g, como lo reporta Bourbon, *et al.*, (1985).

La longitud cráneo-caudal de las crías de 21 días de gestación de madres con diabetes experimental fue menor a los de los grupos control y citrato como está publicado (Bourbon, *et al.*, 1985).

El peso del pulmón (0.08 – 0.11 g) de las crías de 21 días de gestación de madres con diabetes experimental fue menor a los de los grupos control y citrato (0.17 – 0.24 g) como lo encontraron otros investigadores (Bourbon, *et al.*, 1985; & Cunha, *et al.*, 2001), esto hace sospechar de inmadurez del órgano.

Se registró disminución en el peso corporal, en el peso del pulmón y de la longitud cráneo-caudal (gráfica 4); lo que sugiere un retraso en el desarrollo de la cría y hace sospechar un retraso en el desarrollo del pulmón. Al respecto Cunha, *et al.*, (2001) publicó que la DM grave ocasiona bajo peso al nacer tanto en humanos como en modelos experimentales por efecto de la hiperglucemia materno-fetal; por lo anterior consideramos que la disminución en el peso del pulmón es acorde al bajo peso corporal y a la disminución en la longitud cráneo-caudal.

Análisis histológico de la región periférica del pulmón

En el presente trabajo, en los tejidos de 18 días de gestación se observó la etapa pseudoglandular caracterizada por estructuras tubulares revestidas de células altas con núcleo basal y citoplasma claro como está reportado en la literatura (Strang 1977; Burri, 1997 & Ten Have-opbroek *et al.*, 1981; & Carlson, 2000), esto fue observado en los 3 grupos pero con diferencias en los tejidos del grupo diabetes experimental ya que a la observación microscópica las estructuras tubulares son de menor tamaño y presentan abundantes células mesenquimáticas entre ellas (Figura 1).

A los 19 días de gestación el tejido pulmonar de los grupos control y citrato mostraron la etapa canalicular, caracterizada por disminución en el tamaño de las células que revisten las estructuras tubulares, ya que por citodiferenciación, al término de ésta etapa formarán neumocitos tipo II (Strang 1977; Ten Have-opbroek, *et al.*, 1981; & Carlson, 2000), estos a su vez, se diferenciarán a neumocitos tipo I (Mamchaoui, *et al.*, 2002; Bishop, 2004; & Feng, *et al.* 2005); además en esta etapa se desarrolla la barrera alveolo-capilar y para el final de dicho periodo se inicia el desarrollo del surfactante pulmonar (Burri, 1997). En nuestro trabajo, los tejidos del grupo diabetes experimental evidenciaron que el desarrollo se detuvo en la etapa pseudoglandular, aunque, con estructuras tubulares de luz amplia en comparación con los tejidos de las crías de 18 días y revestidas por células cúbicas (Figura 2).

En los tejidos del grupo diabetes experimental se observaron etapas tempranas, caracterizadas por estructuras tubulares revestidas por células en proceso de diferenciación hacia los neumocitos, son cilíndricas, con núcleo basal y citoplasma claro, al respecto Bourbon, *et al.*, (1985) publicaron que la DM independientemente de la severidad, retarda la diferenciación de los neumocitos tipo II. En el presente trabajo se encontró un traslape de las etapas pseudoglandular y canalicular con tabiques

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

gruesos y dentro de ellos las estructuras tubulares conocidas como seudoglándulas; otros autores reportan retraso en la maduración del pulmón y disminución o ausencia del surfactante pulmonar (Oliveros, *et al.*, 1999) por efecto de la hiperglucemia materno-fetal entre otros factores (Nold, *et al.*, 2004).

Los tejidos de pulmón procesados para MET de las crías de 21 días de gestación de madres control y citrato mostraron neumocitos tipo II cubiertos por finas prolongaciones citoplasmáticas de los neumocitos tipo I, unidas a su membrana por complejos de unión, éstas células son cúbicas, su membrana celular presenta microvellosidades en la porción apical; citoplasma con organitos como mitocondrias, retículo endoplásmico, complejo de Golgi y los que la caracterizan que son los cuerpos lamelares, sitio de ubicación del surfactante pulmonar por lo que son los organitos secretorios (Feng, N. *et al.*, 2005); su núcleo es grande, redondeado y central, muestra poros nucleares en su membrana y la cromatina dispersa en el centro y la condensada en la periferia (figura 4); los tejidos del grupo diabetes experimental carecen de neumocitos bien diferenciados como los encontrados a nivel de ML y descritos previamente, lo que se identifica son células precursoras de los neumocitos, caracterizadas por ser columnares, localizarse una enseguida de la otra, tener membrana celular con ausencia de microvellosidades, citoplasma con abundantes aglomerados de glucógeno en la región apical y escasos organitos citoplasmáticos; el núcleo es central, muestra poros nucleares en su membrana y cromatina dispersa abundante en comparación con los neumocitos de los grupos control y citrato; puede ser debido a que se encuentran en proceso retrasado de diferenciación ya que la presencia citoplasmática de glucógeno en aglomerados abundantes (figura 5 y 6) indica que será el sitio donde se sinteticen los lípidos del surfactante y maduren o se formen los cuerpos lamelares, además, estos aglomerados reducen el citoplasma y desplazan los organitos a la periferia (Santos-Briz, *et al.*, 2001; & Ridsdale, 2004); al

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

21 día de gestación de la rata, los aglomerados de glucógeno deben estar ausentes (Ridsdale, *et al.*, 2004), su presencia indica células inmaduras que en este trabajo relacionamos con la DMG incontrolada; Kikkawa, citado por Liu, L. *et al.* (1996) publicó que si están aumentados los aglomerados de glucógeno están bajos los cuerpos lamelares. Estas células inmaduras tienen cromatina dispersa en el núcleo y aglomerados de glucógeno citoplasmático lo que indica la inmadurez (Geneser, 2000; & Kikkawa, citado por Liu, 1996) del pulmón en las crías de 21 días de gestación en relación con los neumocitos de las crías de los grupos control y citrato. Estos hallazgos de inmadurez de los neumocitos indican una deficiencia en el surfactante pulmonar al momento del nacimiento y por lo tanto se sugiere que la DM se asocia con retraso en la madurez del pulmón fetal, como lo publica Piper, (1993) y que esto ocasione incremento en el riesgo de desarrollar el síndrome de dificultad respiratoria que presentan los recién nacidos de término, de mujeres diabéticas incontroladas (Bose, *et al.*, 1980; & Cordero, *et al.*, 1998).

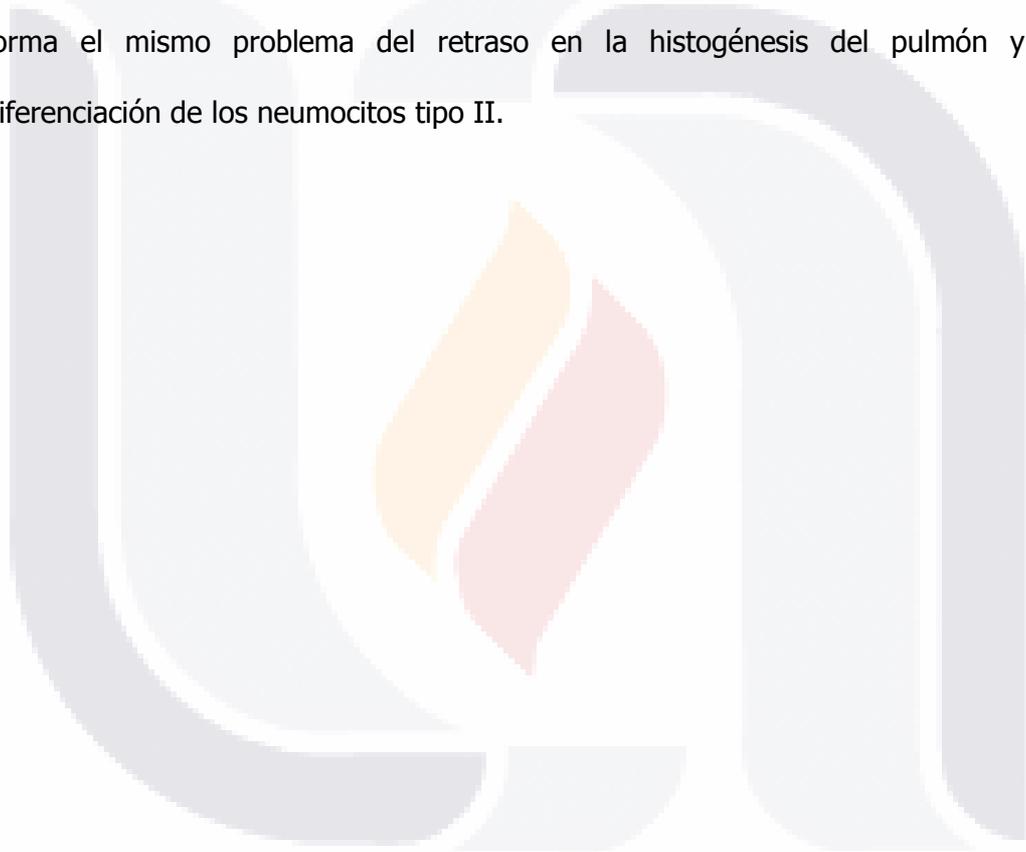
En relación a los tejidos procesados para MET con ICQ, para cuantificar la proteína D asociada al factor surfactante pulmonar, se identificó el inmunomarcaje como partículas negras de inmuno-oro de 20 nm de diámetro (figura 8), se encontraron aisladas o en pequeños grupos identificados dentro y fuera del neumocito tipo II (figura 9); Kasper, *et al.* (2002) publican que además de localizarse en los neumocitos tipo II, se hallan en macrófagos, células de Clara, células productoras de moco y fluidos pulmonares. En este trabajo se cuantificaron las marcas de oro en campos microscópicos cubiertos por un neumocito tipo II, cuantificando las marcas de oro dentro y fuera de la célula, encontramos, una disminución significativa en los tejidos del grupo diabetes experimental lo que concuerda con el retraso en la diferenciación del neumocito tipo II que mostró el análisis por MET.

Factores que influyen en el retraso del desarrollo del pulmón

Con respecto a que factor o factores ocasionan el retraso en el desarrollo histológico de la región alveolar del pulmón, algunos investigadores establecen que la hiperglucemia fetal ocasiona hiperinsulinemia y que esta hormona es la responsable del retraso en el desarrollo del pulmón por inhibición de la producción de surfactante, bloqueo o inhibición de los receptores pulmonares para el cortisol o inhibición de las enzimas del ciclo del surfactante y por hipoglucemia (Danglot-Banck, *et al.*, 2004); que la hiperinsulinemia ocasiona hipoglucemia y esta es responsable del retraso por alteración de la organogénesis (Sadler, 2007); en el caso de la secreción de la insulina, en la rata, para el 11º día de desarrollo intrauterino en el páncreas se observan las primeras células β y entre los días 15 y 18 hay una mayor organización de ellas, pero con niveles bajos de insulina desde el día 13 hasta el 2º día posparto (Øster, *et al.*, 1998), por lo que consideramos que ni la hiperinsulinemia ni la hipoglucemia son responsables del retraso en el desarrollo del órgano, y concluimos que en la rata, el retraso en el desarrollo de la región periférica del pulmón se debe a la hiperglucemia materno-fetal como lo mencionan Bourbon, *et al.* (1985), ya que la alta concentración de la glucosa materna, atraviesa la barrera placentaria y en los embriones y fetos ocasiona un retraso en el desarrollo del pulmón, porque inhibe las mitosis de las células endodérmicas por disminución del ácido ascórbico intracelular y aumento del ácido dehidroascórbico (Danglot-Banck, *et al.*, 2004). Los hijos de mujeres diabéticas son macrosómicos (Doping, *et al.*, 1996; & Nold, *et al.*, 2004) pero con complicaciones al nacimiento, entre las cuales está la inmadurez pulmonar (Hering, 2004), en ellos el páncreas empieza a secretar insulina al final del 5º mes, cuando está terminando la etapa canalicular del desarrollo del pulmón, entonces, al inicio del desarrollo del pulmón, el feto humano tiene hiperglucemia y esta puede ocasionar el retraso en el

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

desarrollo, después del 5º mes, en la etapa sacular tienen hiperinsulinemia por hiperplasia de islotes pancreáticos e hipoglucemia fetal lo que puede ocasionar que continúe el retraso en el desarrollo del pulmón; al nacimiento y en las primeras horas de nacido los hijos de mujeres diabéticas tienen hiperinsulinemia e hipoglucemia. Por lo anterior sugerimos que la mujer con *Diabetes mellitus* durante el embarazo (gestacional o no) el embrión y/o feto sufre la hiperglucemia, la hiperinsulinemia y la hipoglucemia aislados o traslapados, por lo que los tres factores ocasionan de diferente forma el mismo problema del retraso en la histogénesis del pulmón y en la diferenciación de los neumocitos tipo II.



Conclusiones

La DMG experimental en la rata *Sprague-Dawley* causa:

- 1.- Disminución del peso corporal y del pulmón de las crías.
- 2.- Disminución del peso húmedo del pulmón de las crías.
- 3.- Retraso en la histogénesis de la región periférica del pulmón.
- 4.- Retraso en la diferenciación del neumocito tipo II.
- 5.- Disminución en la producción de proteína D asociada al factor surfactante pulmonar.

Recomendaciones

Estando en el área de las Ciencias de la Salud debemos cumplir con el juramento hipocrático que se resume en:

- 1.- Educar a la población (forma parte de la prevención).
- 2.- Seguir investigando (para ofrecer un manejo vanguardista a los pacientes).
- 3.- Diagnóstico y tratamiento oportunos así como la prevención de las complicaciones.

Perspectivas

Las observaciones previamente expuestas nos permiten planear una serie de interrogantes que será necesario aclarar en la búsqueda del conocimiento sobre los efectos de la DM en los diferentes períodos y procesos del desarrollo del pulmón.

- 1.- Evaluación del glucógeno citoplasmático en la histogénesis del pulmón.
- 2.- Estudio ultraestructural de organelos citoplasmáticos del neumocito tipo II.
- 3.- Evaluación bioquímica de la síntesis y secreción de surfactante pulmonar.
- 4.- Estudiar el comportamiento de los organelos citoplasmáticos hacia la DM.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Anexo A

Carta del Comité de Ética, aprobación del proyecto de investigación



**M. en C. MARÍA GUADALUPE TREVIÑO ALANIS.
P R E S E N T E.**

2006. Año del Bicentenario del natalicio del Benemérito de las Américas. Don Benito Juárez García.

Por este conducto le comunicamos que el Comité de Bioética Institucional de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, analizó el trabajo titulado " *Alteraciones en la morfología de la región alveolar del pulmón de rata de 21 días de gestación prevenientes de madres con diabetes experimental,*" en su sesión del día 10 de agosto del año en curso. Al respecto, la comisión antes citada encontró que dicho trabajo se apeg a las normas de la bioética y legales, que regulan el manejo adecuado de los animales en trabajos de investigación científica.

Para los fines legales que correspondan, se emite este dictamen a los 10 días del mes de Agosto del año 2006.

**ATENTAMENTE
" SE LUMEN PROFERRE"
Aguascalientes, Ags. 10 Agosto 2006.**

Dr. Armando Santacruz Torres _____
Dr. Fernando Jaramillo Juárez _____
Dr. Rubén Ruvalcaba Fregoso _____
Dra. Beatriz Alicia Rosales Gutiérrez _____
Dr. Raúl Franco Díaz de León _____
Dra. Ma. Del Carmen Terrones Saldívar _____

ccp. Dr. Javier Ventura Juárez
ccp. Lic. Rosa del Carmen Zapata/ Jefa de Apoyo a la Investigación



Técnica de aplicación intraperitoneal

Para la aplicación intraperitoneal una persona sujeta la rata con su mano derecha por todo su cuerpo cubriendo con la palma la espalda, rodeando con los dedos el cuerpo cerca del cuello por debajo de las axilas de sus extremidades anteriores; con la mano izquierda la sujeta por la cola y las extremidades posteriores mientras la otra persona aplica el tratamiento. Para la rata *Sprague-Dawley* se utiliza la jeringa plastipak® de 16 x 0.5 mm, código de color naranja, previamente preparada; introduciendo la aguja en el cuadrante inferior izquierdo del abdomen y cerciorándose de estar en el peritoneo e inyectando la solución, posteriormente regresamos la rata a su jaula (Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional CINVESTAV, 2005).

Técnica para la punción de la vena dorsal de la cola

Para la obtención de la muestra de sangre es necesario sujetar suavemente al animal, localizar la vena dorsal de la cola, realizar la asepsia, perforar la piel y la vena de un solo movimiento con aguja 30 x 0.7 mm dirigiendo el bisel hacia arriba con un ángulo de penetración casi paralelo a la vena (Morton, D. B. *et al.*, 1993).

Anexo C

Formalina

(cantidades para 1 litro)

Formaldehído (CH ₂ O)	100 ml
Fosfato monobásico de sodio (monohidratado) NaH ₂ PO ₄ (H ₂ O)	4.0 g
Fosfato dibásico de sodio (anhidro) Na ₂ HP ₄	6.5 g
Agua destilada	900 ml

(Prophet, E. B., *et al.*, 1992).

Anexo D

Técnica Histológica

1.- Obtención de la pieza.

Con respecto a la obtención de la pieza corresponde a un órgano o tejido y el tamaño recomendable es 1 cm³, debe ser sumergido inmediatamente al fijador.

2.- Fijación¹.

Una vez obtenida una pieza con el fin de evitar la autólisis por sus propias enzimas o bacterias es necesario que sea inmediatamente tratada con el fijador que permite preservar la morfología y composición química de los componentes del tejido, de tal manera que aquello que se va a observar con el microscopio corresponda a lo que existía cuando los tejidos formaban parte del cuerpo vivo. La fijación se obtiene en un plazo variable de uno a cuatro días de acuerdo con el tamaño de la pieza.

3.- Deshidratación².

Las piezas o muestras de órgano que se retiran del fijador están embebidas en agua, la cual impide que la parafina las impregne para que se logre la penetración de ella, es necesario la deshidratación y aclaración o diafanización. La cual se logra con alcoholes graduales de menor o mayor grado; se recomienda usar alcohol etílico.

¹ Formalina: método para prepararla en el anexo B de este documento.

² Después de la fijación se deshidrata empezando por alcohol de 60, 70, 80, 96 y 96% una hora en cada uno; seguir con alcohol isopropílico absoluto 2 cambios de una hora cada uno; seguir con una solución 1:1 de alcohol isopropílico absoluto y xilol por una hora.

4.- Aclaración o diafanización³.

Una vez terminado el proceso de deshidratación se procede con el adelaramiento empleando benceno ó tolueno ó xilol ó cloroformo, (solventes orgánicos aromáticos). Los reactivos que se usan para la deshidratación no se mezclan con la parafina, por lo tanto los agentes aclarantes son sustancias miscibles (solubles) tanto en el xilol como en la parafina. El mas utilizado en la técnica histológica es el xilol.

5.- Pre-inclusión (impregnación de parafina)⁴.

Es el método por el cual se le da solidez a la textura de los tejidos, incluyendo una sustancia sólida en el seno del mismo tejido, sirviendo de soporte a los elementos anatómicos, y a la vez ayuda para hacer cortes delgados. Siendo la parafina la sustancia mas utilizada actualmente en el laboratorio. La parafina es una mezcla de hidrocarburos derivados del petróleo saturados de diferentes puntos de fusión, sólidos a la temperatura ordinaria, es de color blanco, insolubles en agua pero soluble en xilol. El grado de fusión para incluir es de 56 °C a 58 °C.

6.- Inclusión Definitiva.

En parafina líquida, esto se hace con ayuda de una unidad de inclusión, la cual consiste en un depósito que mantiene la parafina líquida a temperatura de 56° a 58° y una platina que está a cierto grado de congelación.

Modo de hacerlo:

Se colocan las piezas en moldes metálicos sirviendo un poco de parafina líquida, luego se orientan las muestras de tejido, después se cubre totalmente con parafina y se tapa

³ Dos cambios de una hora cada uno en xilol.

⁴ Parafina líquida, dos cambios de 1 hora cada uno.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

con una parte del molde de plástico o anillo de inclusión, y posteriormente enfriarlos hasta que solidifique la parafina y proceder a la microtomía.

7.- Microtomía.

Es el método mediante el cual se obtienen cortes delgados de los bloques de parafina que contienen el tejido a analizar, para esto se emplea el microtomo rotatorio tipo Minot o simplemente microtomo de parafina cuchilla fija.

8.- Adhesión de los cortes.

Una vez obtenido el número deseado de cortes, estos se depositan en un baño de flotación, para el cual se usa agua destilada a temperatura de 40 a 45°C. En el baño de flotación se procura extenderlos y eliminar las arrugas que aparezca sobre el corte, una vez extendido; se procede a montarlo en un portaobjetos, al cual los cortes se adhieren con albúmina de Mayer, las preparaciones se acomodan en una canastilla y se deja secar al aire.

9.- Desparafinación e Hidratación.

Desparafinación:

Consiste en remover la parafina del tejido, y es necesario pasar los cortes a un horno de laboratorio a temperatura 45 a 50°C mayor al punto de fusión de la parafina, (por lo menos durante 12 hrs), y posteriormente a xilol.

Hidratación:

Es el ingreso del agua al tejido y se logra pasando las preparaciones una vez desparafinadas en una mezcla de:

Xilol etanol (1:1)	10 inmersiones.
Etanol absoluto	10 inmersiones.
Alcohol 96	10 inmersiones.
Agua destilada	10 inmersiones.

De esta manera se restaura el agua de los tejidos y quedan listos para ser teñidos.

10.- Coloración rutinaria.

Reactivos	Tiempos
1. Xilol.	5 min.
2. Xilol – etanol (1:1).	5 min.
3. Etanol absoluto.	2 min.
4. Alcohol 96°.	2 min.
5. Agua destilada.	1 enjuague lento.
6. Hematoxilina.	2 min.
7. Agua de la llave (2 lavados)	Enjuague lento.
8. Alcohol ácido.	Inmersión rápida.
9. Agua de la llave (2 lavados).	Enjuague lento.
10. Agua amoniacal.	2 inmersiones rápidas.
11. Agua de la llave.	Enjuague lento.
12. Agua destilada.	Enjuague lento.
13. Eosina.	6 inmersiones.
14. Alcohol 96°.	10 inmersiones.
15. Alcohol 96°.	1 min.
16. Etanol absoluto (2 cambios).	2 min.
17. Etanol - xilol (1:1).	3 min.
18. Xilol.	2 min.
19. Xilol.	3 min.
20. Montaje (resina sintética)	

(Prophet, E. B., *et al.*, 1992).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Inmunodetección con anticuerpos marcados con oro coloidal para microscopia electrónica de transmisión

Técnica recomendada para incluir tejidos en L-R White

1.- Fijar con Paraformaldehído 2%, Glutaraldehído 0.5% en solución amortiguadora de fosfatos 0.1M en horno de microondas por 10 minutos a baja potencia, 150 W a 4 °C.

(En una caja de tinción grande se coloca agua fría con hielos, en ella se coloca una caja pequeña con 50 ml del fijador indicado anteriormente y se procede a fijar el tejido).

2.- Enjuagar dos veces con solución amortiguadora de fosfatos 0.1M, 1X,10 minutos a temperatura ambiente.

3.- Etanol 70% dos cambios 15 minutos cada uno; 90% 5 minutos; 96% 5 minutos.

4.- Infiltrar durante 15 minutos a 50 °C con una mezcla 1:1 de etanol al 100% y resina LR-White en horno de microondas a potencia baja.

5.- Infiltrar tres veces de 10 minutos cada uno a 50 °C con LR-White 100%.

6.- Polimerizar por 15 minutos a 95 °C en horno de microondas.

7.- Polimerizar por 1 hora a 95 °C en horno de microondas.

8.- Hacer cortes semifinos a 400 nm.

9. Elegir el área para hacer cortes ultrafinos de 85 nm y montarlos sobre rejillas de níquel.

Inmunotinción

Notas Importantes:

- Todas las soluciones utilizadas en esta técnica deben de estar Filtradas.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- La preparación de las soluciones deben de ser recientes de preferencia del mismo día.
 - Tanto las ventanas como la puerta deben de estar cerradas y no debe prenderse el aire acondicionado.
 - Se utilizan pipetas Pasteur nuevas.
 - Las pinzas con punta fina utilizadas en esta técnica no deben de tocar el papel filtro, solo hay que tomar la rejilla.

Solución bloqueadora

Solución amortiguadora de fosfatos 1X: 100 ml. + NaCl 900mg (0.9 g) + 10 μ l Tween 20 + Albúmina sérica bovina 1% (1 g).

Se emplean cortes finos de 85 nm de espesor en rejillas de 200-300 mesh (SPI-2020N) de níquel o cobre.

1.- Bloqueo de sitios libres. En una caja de Petri grande se coloca papel parafilm y se enumera del 1 al 5 en la parte superior y en la parte inferior se escribe el material utilizado; después se le coloca una gota (40 μ l) de solución bloqueadora en donde están marcados los números. Colocando las rejillas por la parte brillante hacia arriba y la parte oscura (con los tejidos) hacia abajo 1h 30 minutos a temperatura ambiente.

2.- Se enjuaga la rejilla con solución bloqueadora, sujetando con las pinzas de punta fina la rejilla, utilizando pipeta nueva se vacía poco a poco la solución entre las pinzas con la finalidad de que se laven ambas caras de la rejilla. Se decanta la rejilla con papel filtro; tocando de un extremo la rejilla con el papel filtro.

3.- Incubación primer anticuerpo. En otra caja de Petri grande con papel parafilm se agrega una gota del anticuerpo primario diluido 1:20 y 1:40 en solución bloqueadora, por toda la noche sellándola con papel parafilm.

NOTA: Se hace una cámara húmeda agregando varias gotas de agua destilada en toda la caja Petri.

- 4.- Lavar 3 veces con solución bloqueadora.
- 5.- Decantar sobre papel filtro.
- 6.- Se coloca el 2º anticuerpo chivo o conejo marcado con oro coloidal 40 nm 1:40, dejándolo incubar por 1h 30 min.
- 7.- Lavar 3 veces con solución bloqueadora.
- 8.- Se coloca 1 gota de solución amortiguadora de fosfatos 1X (una vez) por 5 min.
- 9.- Enjuagar con solución bloqueadora las rejillas.
- 10.- Decantar sobre el papel filtro.
- 11.- Colocar gotas de glutaraldehido al 2.5 % para fijar por 15 minutos.
- 12.- Lavar 3 veces con agua destilada.
- 13.- Decantar con papel filtro.
- 14.- Colocar las rejillas en caja de Petri chica con papel filtro para dejarlas secar por 15 minutos.
- 15.- Hacer contraste con Uranilo por 20 minutos.

NOTA: no debe de usarse uranilo viejo, tiempo máximo para poderse utilizar 2 meses y medio. Si no hay debemos preparar nuevo.

Deben de darse de 2 a 4 minutos de espacio entre rejilla y rejilla cuando se coloque en el Uranilo para poder lavar.

Ejemplo: 20-16-12-8-6-4.

- 16.- Lavar 3 veces con agua destilada.
- 17.- Decantar en papel filtro.
- 18.- Colocar 1 gota de Plomo y sobre ella la rejilla con la cara brillante hacia arriba, por 1 min.

NOTA: no debe de usarse plomo viejo tiempo máximo para poderse utilizar 2 meses y medio. Si no hay que preparar nuevo.

NOTA: se coloca hidróxido de sodio en la caja Petri cuando se coloque el plomo.

19.- Lavar 3 veces con agua destilada.

20.- Decantar en papel filtro.

21.- Colocarlas en la caja Petri chica con papel filtro, para dejarlas secar.

NOTA IMPORTANTE: cada caja de Petri que se utilice ya sea con papel parafilm y papel filtro se enumera para no perder la secuencia de rejillas.

22.- Observación: La observación de los cortes se hará en Microscopio Electrónico de Transmisión Zeiss EM-9.

(Hayat, M. A. 1993; Maunsbach, A.B. *et al.*, 1999 & Hayat, M. A. 2002).

Anexo F

Técnica de microscopía electrónica de transmisión

- 1.- Obtención de la pieza, se recomienda biopsias no mayores de 1 mm³.
- 2.- Fijación: las biopsias se colocan en glutaraldehído al 2.5% en solución amortiguadora de fosfatos al 0.1 M en horno de microondas por 10 minutos a potencia de 150 W a 4° C, en baño de hielo, posteriormente se dejan por un tiempo de 20 horas en el mismo fijador a 4° C; se enjuagan las biopsias con solución amortiguadora de fosfatos 1X por 10 minutos a temperatura ambiente.
- 3.- Deshidratación:
 - a) Alcohol al 70%: 2 cambios de 15 minutos cada uno.
 - b) Alcohol al 90%: 2 cambios de 5 minutos cada uno.
 - c) Alcohol al 96%: 2 cambios de 5 minutos cada uno.
 - d) Alcohol al 100%: 2 cambios de 15 minutos cada uno.
- 4.- Infiltración:
 - a) Resina LR-White y etanol al 100%, hacer una mezcla 1:1 y dejar las biopsias por 15 minutos a 50°C, en horno de microondas a potencia de 150W, a baño de hielo.
 - b) Resina LR-White al 100%: infiltrar 3 veces de 10 minutos cada uno a 50°C, en horno de microondas a potencia de 150W en baño de hielo; sacarlas y dejarlas por 1h 30 min a temperatura ambiente.
- 5.- Inclusión:
 - a) Colocar la resina en moldes de inclusión con previa identificación de la muestra.
 - b) Polimerizar con 3 sesiones de 2 minutos en el nivel 1 del horno de microondas en baño de hielo.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

c) Polimerizar por 1 hora a 95°C en horno de microondas, enseguida los tejidos se dejarán por 24 horas en la estufa a 70 °C.

6.- Corte en Ultramicrotomo:

a) Realizar pirámide en el bloque.

b) Cortes semifinos a 400 nm para buscar el área que interesa.

c) Teñir con azul de toluidina.

d) Observar al microscopio de luz y elegir el área que interesa ver en cortes ultrafinos de 85 nm.

e) Realizar pirámide para corte fino.

f) Realizar cortes ultrafinos de 85 nm.

g) Montar los cortes sobre rejillas de níquel o cobre.

7.- Contraste:

a) Acetato de uranilo al 5% por 20 minutos.

b) Lavar en agua destilada.

c) Citrato de Plomo por 1 minuto.

d) Lavar en agua destilada.

8.- Observación: La observación de los cortes se hará en Microscopio Electrónico de Transmisión Zeiss EM-9.

(Hayat, M. A. 1993 & Arvid, B. M. *et al.*, 1999).

BIBLIOGRAFÍA

Al-Achi, A. & Greenwood, R. (2001). A brief report on some physiological parameters of streptozocin-diabetic rat. *Drug Dev Ind Pharm*, Vol. 27, No. 5, pp. 465-468.

American Diabetes Association (2003). Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, Vol. 26, supplement 1, pp. 103-105.

Amri, K., Freund, N., Doung Van Huyen, J., Merlet-Bénichou, C. & Lelièvre-Pégorier, M. (1985). Altered nephrogenesis due to maternal diabetes is associated with increased expression of IGF-II/mannose-6-phosphate receptor in the fetal kidney. *Diabetes*, Vol. 34, No. 8, pp. 734-743.

Arvid, B. M. & Björn, A. A. (1999). *Biomedical Electron Microscopy. Illustrated Methods and interpretations*. San Diego, California: Academia Press.

Baker, J. (1979). Reproduction and breeding. *The laboratory rat. Academic Press, New York*, Vol. 1, pp. 154-156.

Bishop, A.E. (2004). Pulmonary epithelial stem cells. *Cell Prolif.* Vol.37,pp.89-96.

Bose, C., Manne, D., D'Ercole, J. & Lawson, E. (1980). Delayed fetal pulmonary maturation in a rabbit model of the diabetic pregnancy. *J Clin Invest.* Vol. 66, pp. 220-226.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Bourbon, J., Pignol, B., Marin, L., Rieutort, M., & Tordet, C. (1985). Maturation of fetal rat lung in diabetic pregnancies of graduated severity. *Diabetes*. Vol. 34, No.8, pp. 734-743.

Burri, P. (1997). Structural aspects of prenatal and postnatal development and growth of the lung. J. McDonald (Ed.), *Lung Growth and Developmen*. Vol.100,pp.1-36.

Cao, Y., Tao, J.Q., Bates, S., Beers, M., & Haczku, A. (2004). IL-4 induces production of the lung collectin surfactant protein-D. *J Allergy Clin Immunol*. Vol. 113, No. 3, pp. 439-444.

Carlson, B. (2000). *Embriología humana y biología del desarrollo* (2ª ed). Madrid, España: Harcourt, S. A.

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) (2005). Procedimiento interno pp-11-02 para el manejo de las especies más comunes de los animales de laboratorio del CINVESTAV. Recuperado el 9 de septiembre de 2005 de: <http://cinvestav.mx/upeal/PI-11-02.html#2>

Contreras, C. (2004). Diabetes y Embarazo. C. Contreras (Ed.), *Diabetes Mellitus*. (2ª ed.) pp 201-223. Chile: Salesianos, S. A.

Cordero, L., Treuer, S. (1998). Management of infants for diabetic mothers. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*. Vol. 152, No. 3, pp.246-249.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Cunha, M., de Mattos, I., Calderon, P., Delgi, M., Japur, A., & Curi, P. (2001). Perfil Fosfolípido Pulmonar em Recém-nascidos de Ratas Diabéticas. *Ginecol Obstet Brasil*, Vol. 23, No. 1, pp. 9-14.

Danglot-Banck, C. & Gómez-Gómez, M. (2004). Los hijos de madres diabéticas. *Rev Mex Pediatr* . 71:248-257.

Doping, G., Kuijpers, A., Vinet, r. & Pollard, H. (1996). Comparison of LR White and Unicryl as embedding media for Light and electrón immunomicroscopy of chromaffin cells. *The journal of histochemistry and cytochemistry*. Vol. 44, No. 3, pp 289-295.

Endo, A., Watanabe, T. (1988). Interlitter variability in fetal body weight in Morse offspring from continuous overnight and short-period matings. *Teratology Vol. 37*, pp. 63-67.

Fehrenbach, H. (2001). Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. *Respiratory Research*, Vol 2 No. 1, pp. 33-46.

Feng, N. H., Lin, H., Wang, J. S., Chou, S. T., Ma, H. K., Rooney, S., & Lu, J. F. (2005). Differential expresión of a V-type ATPase C subunit gene, *Atp6v1c2*, during culture of rat lung type II pneumocytes. *Journal Biomedical Science*. Vol. 12, pp. 899-911.

García, H., Rosadas, F. (2002). Morbilidad en el recién nacido con fetopatía diabética. *Revista Médica IMSS*, Vol. 40, No. 1, pp. 5-10.

Geneser, F., (2000). *Histología. Sobre bases moleculares* (3ª ed). Madrid, España: Editorial Médica Panamericana, S. A.

Gilbert, K., Petrovic-Dovat, L. & Rannels, E. (1997). Hormonal control of Compensatory Lung Growth. J. McDonald(Ed.), *Lung Growth and Developmen*. Vol.100, pp.627-660.

González, E. (2002). Diabetes mellitus experimental: etiología de las malformaciones congénitas en descendientes de ratas diabéticas. *Revista Cubana Endocrinol.* Vol. 13, No. 1, pp. 53-63.

González, J. & Medina, J. (2001). *Patología molecular*. Madrid, McGraw-Hill/Interamericana de España, S. A. U.

Gutiérrez, H., Carrillo, M., Pestaña, S. & Santamaría, M. (2006). Pacientes diabéticas embarazadas: experiencia institucional. *Ginecol Obstet Mex.* Vol. 74, pp. 187-192.

Hayat, M. A. (1993). *Stains and Cytochemical Methods*. New Jersey, United States: Plenum Press.

Hayat, M. A. (2002). *Microscopy, Immunohistochemistry, and Antigen Retrieval Methods. For light and electron microscopy*. New Jersey, United States: Kluwer Academic/Plenum Publishers.

Hering, E. (2004). El Hijo de Madre Diabética. C. Contreras (Ed.), *Diabetes Mellitus*. (2ª ed.) pp 235-239. Chile: Salesianos, S. A.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Hugues, H. B., Rodríguez, G. J. C. & Rodríguez G. J. C. (2001). Animales de laboratorio en la endocrinología: Biomodelos de la Diabetes Mellitus tipo 1. *Revista Cubana Endocrinol*, Vol. 12, No.3, pp. 168-177.

Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) (2002). Estadísticas de mortalidad en México: muertes registradas en el año 2001. *Salud Pública de México*, Vol. 44, No. 6, pp. 565-581

Islas-Andrade, S., Revilla, M., Escobedo, J., Polanco, A., Palomino, M., & Feria, A. (2000). Streptozotocin and alloxan in experimental diabetes: comparison of the two models in rats. *Acta Histochem. Cytochem* Vol. 33, No.3, pp. 201-208.

Kasper, M., Sims, G., Koslowski, R., Kußß, H., Thuemmler, M., Fehrenbach, H., & Auten, R. (2002). Increased surfactant protein D in rat airway goblet and Clara cells during ovalbumin-induced allergic airway inflammation. *Clin Exp Allergy*. Vol. 32, pp. 1251-1258.

Kierszenbaum, A. (2007). *Histology and cell biology. An introduction to pathology*. Philadelphia, PA, United States: Mosby Elsevier.

Krahl, V. E. (1955). Current concept of the finer structure of the lung. *Archives of Internal Medicine*. Vol. 96, pp. 342-356.

Kuhn III, Ch. (1976). The cells of the lung and their organelles. R, Crystal (Ed.), *Lung biology in health and disease* (pp. 3-47). St. Louis Missouri: W. Alan Hudson.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Liu, L., Rannels, S., Falconieri, M., Phillips, K. & Wolpert, E. (1996). The testis isoform of the phosphorylase kinase catalytic subunit (PhK- γ T) plays a critical role in regulation of glycogen mobilization in developing lung. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 271, No. 20 (17), pp 11761-11766.

Lomellí, C. (1996). *Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio*. México, D. F.: Academia Nacional de Medicina.

López-Soldado, I., & Herrera E. (2003). Different Diabetogenic Response to Moderate Doses of Streptozotocin in Pregnant Rats, and Its Long-Term Consequences in the Offspring. *Experimental Diabetes. Research*, Vol. 4, pp.107-118.

Mallampalli, R., Acarregui, M. & Snyder, J. (1997). Differentiation of the alveolar epithelium in the fetal lung. J. McDonald (Ed.), *Lung Growth and Developmen*. Vol. 100, pp. 119-162.

Manchaoui, K., & Makhloufi, Y., & Saumon, G. (2002). Glucosa transporter gene expresión in freshly isolated and culture rat pneumocytes. *Acta Physiol Scand*. Vol. 175, pp. 19-24.

Marrugat, J., Vila, J., Pavesi, M. & Sanz, F. (1998). Estimación del tamaño de la muestra en la investigación clínica y epidemiológica. *Medicina Clínica*. Vol. 111, No.7, pp. 267-276.

Mason, R. (2006).Biology of alveolar type II cells.*Respiratory*.Vol.11, pp.S12-S15.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Maunsbach, A.B. & Afzelius, B. A. (1999). *Biomedical Electron Microscopy, Illustrated Methods and interpretations*. San Diego, California: Academic Press.

Mayhew, T. (2005). How to count your gold: A tutorial on TEM immunogold label quantification. *Microscopy and Analysis*, Vol. 19, No. 2 pp. 9-12.

Mendelson, C. (2000). Role of transcription factors in fetal lung development and surfactant protein gene expression. *Annu Rev Physiol*, Vol. 62, pp 875-915.

Méndez, I., Namihira, D., Moreno, L. & Sosa, C. (1990). *El protocolo de investigación*. México, D. F.: Trillas, S. A. de C. V.

Mendoza, T., Morales, M., Jiménez, P. & Escobedo, F. (2005). Retrazo en la madurez pulmonar fetal en embarazadas complicadas con diabetes gestacional. *Ginecología y Obstetricia de México*, Vol. 73, pp. 183-193.

Meyers H, Jawetz, E. & Goldfien, A. (1980). Medical Pharmacology. Review of Medical Pharmacology. *Lange Medical Publications*, 20:205. Los Altos California.

Meyrick, B., & Reid, L. M. (1970). The alveolar wall. *British Journal of Diseases of the Chest*, Vol. 64, pp. 121-140.

Meyrick, B. & Reid, L. M. (1977). Ultrastructure of alveolar lining and its development. C, Lenfant (Ed.), *Lung biology in health and disease* (pp. 135-214). London, England: W. Alan Hodson.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Minoo, P. (2000). Transcriptional regulation of lung development: emergence of specificity. *Respir Res.* Vol. 1, No. 2, pp. 109-115

Morton, D. B., Abbot, D., Barclay, R., Close, B. S., Ewbank, R., Gask, D., Heath, M., Mattic, S., Poole, T., Seamer, J., Thompson, A., Trussel, B., West, C. & Jennings, M. (1993). Extracción de sangre en los mamíferos y aves de laboratorio. Primer informe. *Laboratory Animals*, Vol. 27, pp. 1-22.

Mosby (1995). Diccionario de medicina, Chile: Océano.

Mosby's Drug Consult (2005). Streptozocin. Recuperado el 16 de agosto de 2005 de: <http://home.mdconsult.com/das/drug/view/49572283-2/1/2278/top?>

Nold, J., & Georgieff, M. (2004). Infante of diabetic mothers. *Pediatric Clinics of North America*. Vol. 51, No. 3, pp. 585-603.

Odom, M. & Ballard, P. (1997). Developmental and Hormonal Regulation of the Surfactant System. J. McDonald (Ed.), *Lung Growth and Developmen*. Vol. 100, pp. 495-576.

Oliveros, M., Nuñez, O. & Chirinos, J. (1999). El recién nacido de la madre diabética. *Diagnóstico*. Vol. 38, No. 2, pp. 1-12.

Organización Mundial de la Salud (O.M.S.) (2003). Los casos de diabetes podrían duplicarse en países en desarrollo durante los próximos 30 años. Recuperado el 8 de febrero de 2005 de: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2003/pr86/es/>

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Øster, A., Gensen, J., Serup, P., Galante, P., Madsen, O., & Larsson, L. (1998). Rat Endocrine Pancreatic Development in Relation to Two Homeobox Gene Products(Pdx-1 and Nkx 6.1). *Journal Histochemistry and Cytochemistry*, Vol 46, pp 707-715.

Palomino, A. M., Mosalve, R., Cárdenes, M.C., Polanco, A. & Islas-Andrade, S. (1998). Efecto de la Diabetes Inducida sobre la Reproducción y el Desarrollo. *Ginecología y Obstetricia de México*, Vol. 66, No.11, pp. 399-405.

Pinter, E., Peyman, J., Show, K., Jamieson, J., & Warshaw, J. (1991). Effects of Maternal Diabetes on Fetal Rat Lung Ion Transport. *J. Clin. Invest*, Vol. 87, pp. 821-830.

Piper, O. (1993). Does maternal diabetes delay fetal pulmonary maturity? *Am J Obstet Gynecol*, Vol. 168, pp. 783-786.

Prophet, E. B., Mills, B. & Arrington J. B. (Eds.). (1992). *Métodos Histotecnológicos*. Washington, D.C.: Instituto de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP).

Quintanar, A. (2004). *Anatomía macroscópica de los sistemas de órganos*. Manuscrito no publicado, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Ags., Ags., México.

Real Academia Española (2001) *Diccionario de la lengua española* (21° Edición, Tomo 1 -2) Madrid, España: ESPASA.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Resnick, H., Harris, M. I., Brock, D. B. & Harris, R. B. (2000). American diabetes Association Diabetes Diagnostic Criteria, Advancing Age, and Cardiovascular Disease Risk Profiles. *Diabetes Care*. Vol.23, No.2, pp.176-180.

Rhoades, R. & Tanner, G. (1995). *Fisiología médica*. Barcelona: Masson.

Ridsdale, R. & Post, M. (2004). Surfactant lipid synthesis and lamellar body formation in glycogen-laden type II cells. *AJP-Lung Cell Mol Physiol*, 2004, 287:L743-L751.

Ridsdale, R., Tseu, I., Roth-Kleiner, M., Wang, J. & Post, M. (2004). Increased phosphatidylcholine production but disrupted glycogen metabolism in fetal type II cells of mice that overexpress CTP: phosphocholine cytidyltransferase. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 279, No. 53, pp 55946-55957.

Rooney, S. A.(1984).Lung surfactant.*Enviroment Health Perspective*.Vol.55,pp.205-226.

Rooney, S. A. (2001). Regulation of surfactant secretion. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*. Vol. 129, pp.233-243.

Ross, M. & Kaye, P. (2005). *Histología* 4ª ed. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana S.A. de C. V.

Sadler, (2007). *Embriología Médica* 10ª ed. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana S. A. de C. V.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Santos-Briz, A., Martinez, M. & Sotelo, M. (2001). Ultraestructura del carcinoma bronquioloalveolar de pulmón. *Rev Esp Patol* 2001, 34(4):303-310.

Second Annual Report on Carcinogens (1981). *Streptozotocin*. Recuperado el 8 de febrero de 2005 de: <http://ntp-server.niehs.nih.gov/ntp/roc/eleventh/profiles/s163stre.pdf>

Secretaria de Salud (2002). Norma oficial mexicana 087-ECOL, protección ambiental – salud ambiental – residuos peligrosos biológico – infecciosos, México.

Sepúlveda, J. & Arredondo, G. (1992). *Métodos de análisis en la investigación morfológica*. Manual no publicado, Universidad Autónoma de Nuevo León, Deptos. De Histología y Embriología. Monterrey, N. L., México.

Setji, T., Brown, A. J. & Feinglos, M. N. (2005). Gestational Diabetes Mellitus. *Clinical Diabetes*. Vol. 23, No.1, pp. 17-24.

Silva, M. (2004). Epidemiología de la diabetes mellitus. Contreras (Ed.), *Diabetes Mellitus*. (2ª ed.) pp 13-19. Chile: Salesianos, S. A.

Sorokin, S. P. (1970). The cells of the lungs. In: Morphology of experimental respiratory carcinogenesis. Proceedings of a biology division, Oak Ridge National Laboratory Conference held in Galinburg, Tennessee, May 13-16. P. Nettsheim, M. G. Hanna, Jr. & J. W.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Strang, L. B. (1977). Morphology of lung development in: Neonatal respiration Melbourne. *Blackwell Scientific Publications*, pp. 1-19. Ten Have-opbroek, A. A. W. (1981). The development of the lung in mammals: an analysis of concepts and findings. *The American Journal of Anatomy*. Vol. 162, pp. 201-219.

Van Golde, L., Batenburg, J. & Robertson B. (1994). The Pulmonary Surfactant System. *American Physiology Soc*. Vol. 9, pp 13-20.

Vanheest, J. & Roodgers, C. (1997). Effects of exercise in diabetic rats before and during gestation on maternal and neonatal outcomes. *The American Journal of Phycology Endocrinol Metab*. Vol. 273, No. 4, pp. E727-E733.

Whitsett, J. A. (2002). Intrinsic and innate defenses in the lung: intersection of pathways regulating lung morphogenesis, host defense, and repair. *The Journal of Clinical Investigation*, Vol. 109, No.5, pp. 565-569.

Wright, J. K., Nwariaku, F. N., Clark, J. & Falck, J. C. (1999). Effect of diabetes mellitus on endotoxin-induced lung injury. *Archives of surgery*, Vol. 134, No.12, pp.1354-1359.

Yang, X., Donaldson, K. & M_{AC}Nee, W. (1998). Lipopolysaccharide-induced Alveolar Epithelial Permeability: the Role of Nitric Oxide. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, Vol. 157, pp. 1027-1033.

GLOSARIO

Acino: cualquiera de los lóbulos de una glándula compuesta, dicese también de las dilataciones sacciformes terminales de un conducto estrecho, como los alveolos de los pulmones.

Biopsia: muestra de tejido tomada de un ser vivo con fines diagnósticos.

Cría: conjunto de hijos que tienen de un parto, o en un nido, los animales.

Diabetes: pasar a través de. Refiriéndose al padecimiento que elimina la orina en cantidad excesiva.

Histogénesis: generación y desarrollo de los tejidos orgánicos normales o patológicos.

Lectinas: glicoproteínas presentes tanto en animales como en vegetales, bacterias o virus, que se caracterizan por ser capaces de unirse a carbohidratos específicos, libres o que forman parte de glicanos o de glicoproteínas.

Mellitus: miel.

Muestra biológica: parte anatómica o fracción de órganos o tejidos, excreciones o secreciones obtenidas de un ser humano o animal vivo o muerto para su análisis⁵

Retardo: atrasar, diferir o suspender la ejecución de algo.

Revestimiento: capa o cubierta.

Seudo: falso.

(Real Academia Española 2002 & Mosby 1995).

⁵ NOM-087-ECOL-SSA1-2002