



**DIMORFISMO SEXUAL DURANTE EL DESARROLLO DEL  
PULMON FETAL DEL RATON ALBINO: ESTUDIO  
MORFOLOGICO Y BIOQUIMICO**

**POR**

**BIOL. ROSA PATRICIA PENILLA NAVARRO**

**TESIS PRESENTADA A LA  
FACULTAD DE MEDICINA**

**DE LA**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA**

**LA OBTENCION DEL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**CON ESPECIALIDAD EN MORFOLOGIA**

**Monterrey, N. L.**

**MARZO DE 1993**

TM

Z66

FM

199

P4



1020071218



**DIMORFISMO SEXUAL DURANTE EL DESARROLLO DEL  
PULMON FETAL DEL RATON ALBINO: ESTUDIO  
MORFOLOGICO Y BIOQUIMICO**

**POR**

**BIOL. ROSA PATRICIA PENILLA NAVARRO**

**TESIS PRESENTADA A LA  
FACULTAD DE MEDICINA**

**DE LA**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
LA OBTENCION DEL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**CON ESPECIALIDAD EN MORFOLOGIA**

**Monterrey, N. L.**

**MARZO DE 1993**


711  
26658  
FM  
1993  
P4



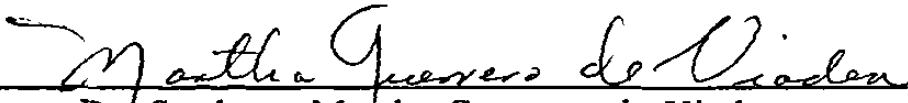
FONDO TESIS

24166

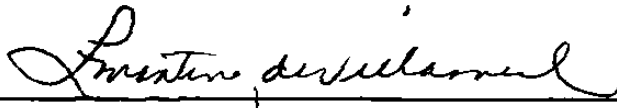
COMISION DE TESIS

  
\_\_\_\_\_

M.C/P. y Ph. D. Julio Sepúlveda Saavedra

  
\_\_\_\_\_

Dr. Sc. hum. Martha Guerrero de Viader

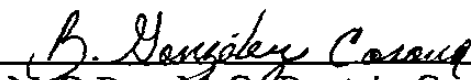
  
\_\_\_\_\_

M.C.P. y M.C. Laura Elia Martínez de Villarreal



\_\_\_\_\_

M.C.P. y M.C. María Esthela Morales Pérez

  
\_\_\_\_\_

M.C.P. y M.C. Beatriz González Corona

**Asesor: M. C. P. y Ph. D. Julio Sepúlveda Saavedra**

**Coasesor: Dr. Sc. hum. Martha Guerrero de Viader**

**Este trabajo se realizó en los Departamentos de Histología, Farmacología y Toxicología y en el laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.**

**Proyecto apoyado por la SEP. Convenio # 90-01-0213-588-01.  
Beca de CONACYT # 54603.**

**A mi familia:**

**Rosantina Navarro y Tiburcio Penilla**

**Nicolás Penilla**

**Cris Villarreal, José N., Jéssica, Amory y  
Rogelio Pecina**

**Sahara Ramírez y Américo Rodríguez**

**Américo, el compañero de mi vida**

**con Amor**



## AGRADECIMIENTOS

Ph. D. Julio Sepúlveda Saavedra, por su entusiasta manera de enseñarme biología celular e histología, por el apoyo que siempre me brindó y por su asesoría y críticas en la realización de esta tesis.

Dr. Sc. hum. Martha Guerrero de Viader, por introducirme en el mundo fascinante de la bioquímica aplicada, por su paciencia ante mi ignorancia y por su asesoría y críticas en la realización de esta tesis.

M. C. Beatriz González, por su asesoría al inicio de la tesis.

Dr. Mohammad H. Baddi por su asesoría en la parte bioestadística.

M. C. Américo David Rodríguez Ramírez, por su ayuda en la parte estadística y su asesoría en los programas de computación utilizados.

Dr. José María Viader, por su siempre incondicional ayuda.

Q. F. B. Enrique Ramírez Bond, mi maestro práctico.

Dra. Ma. Esthela Morales Pérez y Dra. Laura Elia Martínez de Villarreal por la revisión y sugerencias al escrito de la tesis.

Dr. Juan Manuel Solis Soto, mi gran compañero, maestro y amigo de cualquier momento.

Mis compañeros de la maestría Ricardo, Lupita, Eugenia y los maestros, de quienes aprendí un poco de la biología y medicina y con quienes pasé momentos muy duros pero finalmente maravillosos.

Juana María, Chiquis, Lorenzo y Mónica quienes de alguna manera me ayudaron en el desarrollo de mi tesis.

Dr. Mario Henri Rodríguez López director del Centro de Investigación de Paludismo, por darme la oportunidad de terminar con los puntos que finalizan para la obtención del grado.

## INDICE

	Página
PORTADA	I
COMISION DE TESIS	II
ASESORES	III
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTOS	V
INDICE	VI
INTRODUCCION	1
Hipótesis de trabajo	7
Objetivos	7
MATERIAL Y METODOS	8
Preparación del material biológico	8
Método de sacrificio	8
Estudio morfológico	9
Obtención de la muestra	9
Procesamiento del tejido pulmonar	9
Ultramicrotomía	10
Morfometría	10
Bioestadística	11
Estudio bioquímico	13
Lista de Abreviaturas	13
Método de obtención de las muestras	14
Homogeneización del tejido pulmonar	15
Análisis cuantitativo de proteínas	16
Preparación de soluciones	16
Procedimiento	16
Análisis cuantitativo de fosfolípidos	17
Preparación de soluciones	17
Extracción de fosfolípidos	18
Aislamiento de 1,2-dipalmitoil-3- <i>sn</i> -fosfatidilcolina	19
Medición indirecta de fosfolípidos	20
Análisis cualitativo de fosfolípidos	21
Bioestadística	21

<b>RESULTADOS</b>	<b>24</b>
<b>Peso, sexo y distribución de los fetos en el útero</b>	<b>24</b>
<b>Evaluación morfométrica</b>	<b>29</b>
Día 15 de gestación	30
Día 16 de gestación	31
Día 17 de gestación	31
Día 18 de gestación	32
Recién nacidos	33
<b>Evaluación bioquímica</b>	<b>38</b>
Proteínas	38
Fosfolípidos	41
Evaluación cualitativa	41
Evaluación cuantitativa	41
<b>DISCUSION Y CONCLUSIONES</b>	<b>50</b>
<b>Peso, sexo y distribución de los fetos en el útero</b>	<b>50</b>
<b>Morfología</b>	<b>51</b>
Dimorfismo sexual	52
<b>Bioquímica</b>	<b>54</b>
Dimorfismo sexual	54
<b>Perspectivas</b>	<b>56</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>57</b>
<b>LITERATURA CITADA</b>	<b>59</b>

## INTRODUCCION

El nacimiento es un evento crítico para el pulmón, ya que debe de estar preparado para admitir aire, mantener la inflación a distintos volúmenes de llenado y permitir el intercambio de gases (Burri y Weibel, 1977). Por lo tanto, los infantes recién nacidos tienen el riesgo de desarrollar el Síndrome de Dificultad Respiratoria (SDR) si sus pulmones no están maduros al nacimiento, independientemente de la edad gestacional o peso (Gluck y Kulovich, 1973). Aunque la frecuencia y mortalidad aumentan progresivamente, según la edad de gestación va retrocediendo a menos de 38 semanas en el humano (Taylor, 1971).

Durante las últimas dos décadas, se ha acrecentado el interés por solucionar este problema que atañe a los infantes nacidos prematuramente y que desarrollan el SDR, cuya causa está relacionada directamente con la síntesis y/o secreción deficiente del surfactante pulmonar (Farrell y Avery, 1975), la insuficiencia cualitativa y cuantitativa de éste en el momento del nacimiento conduce a la incapacidad mecánica de mantener la estabilidad del pulmón y por lo tanto a que exista un buen intercambio gaseoso.

El surfactante del pulmón, localizado en la interfase aire-líquido alveolar, existe como una monocapa particularmente rica en fosfolípidos saturados (Kotas, 1982). Siendo este el único material capaz de mediar la gran discontinuidad de energía existente en la superficie alveolar (King, 1984) o más específicamente, que tiene la capacidad de desarrollar una tensión de superficie baja estable, por consenso menos que 10 mN/m por área (Georke, 1974).

La producción del surfactante en el tejido pulmonar del humano y algunos animales, surge en el último 10-15% de la gestación (Kotas, 1982): en el humano a la semana 32 de gestación

(Lauweryns, 1970; Kotas, 1979), en el conejo a los 27 días de gestación y en la rata a los 20 días de gestación (Farrell y Kotas, 1976).

Cerca de dos tercios del contenido total de lípidos en el pulmón de mamíferos son fosfolípidos, y hay una notable constancia entre las diferentes especies estudiadas (bovino, pollo, perro, rana, cerdo de Guinea, humano, ratón, conejo, rata, pavo y tortuga) en el contenido de dos fosfolípidos principales, la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina, que corresponden al 48% y 22% respectivamente del total de fosfolípidos. Otros fosfolípidos presentes en apreciables cantidades en el pulmón son la esfingomiélna, fosfatidilserina y fosfatidilinositol, y en pequeñas cantidades el fosfatidilglicerol (Sanders, 1982).

En la composición de ácidos grasos de la fosfatidilcolina aislada del pulmón de varias especies (pollo, perro, rana, humano, mono, ratón, rata, pavo y tortuga), el palmitato es el principal ácido graso y además, arriba del 60% de los ácidos grasos de la fosfatidilcolina del pulmón son saturados. Entonces, es ahora bien aceptado que la 1,2-dipalmitoil-3-*sn*-fosfatidilcolina (DPPC) es el componente predominante del surfactante (Sanders, 1982).

Se han dado importantes avances con respecto al diagnóstico y tratamiento del SDR (Farrell y Avery, 1975) mediante el análisis del índice lecitina/esfingomiélna (Kay y Hoboins, 1984; Spellacy y col., 1973) para evaluar la maduración pulmonar durante la gestación y con el advenimiento del descubrimiento por Liggins (1969), quien encontró que corderos prematuros sobrevivieron cuando se les administró prenatalmente glucocorticoides.

En consecuencia, una serie de ensayos con hormonas han demostrado su eficacia para la aceleración de la madurez fetal: Ballard y col. (1980) y, Papageorgiou y col. (1981) con betametasona en humano; Kessler y col. (1982), Velásquez y Sepúlveda (1982) y, Torday y Dow (1984) con dexametasona en mono, ratón y rata,

respectivamente; Torday (1984a) con cortisol en rata; Nielsen y Torday, 1985 con  $17\beta$  estradiol y dexametasona en aves. Se sabe que la forma en que el cortisol acelera la madurez pulmonar, es estimulando la síntesis de fosfatidil colina disaturada por los pneumonocitos tipo II a través de la producción del factor pneumonocito-fibroblasto por el fibroblasto pulmonar (Torday, 1984b). Este descubrimiento en particular, confirma que la diferenciación celular pulmonar está influenciada por instrucciones derivadas del mesénquima dependientes de la regulación hormonal. Así el desarrollo inicial del pulmón desde la yema que emerge del tubo digestivo embrionario y su subsecuente patrón de ramificaciones, depende de las interacciones entre los elementos epiteliales y del mesodermo que los sostiene (Strang, 1977), aunque Zimmerman y col. (1984) encontraron que la membrana basal no es necesaria para la diferenciación epitelial celular del pulmón *in vitro*.

Aunque el pulmón, como un órgano heterogéneo, presenta varias decenas de tipos celulares, su región parenquimal contiene predominantemente 5 tipos celulares y su distribución relativa ha sido determinada para el pulmón de rata adulta por Weibel y Gil (1977) como se muestra en la tabla 1.

Los pneumonocitos tipo II, células productoras del surfactante pulmonar, han sido identificados en el feto de humano entre las semanas 22 y 26 de gestación, pero parecen ser más prominentes entre las semanas 34 y 36 de gestación (Farrell, 1982). Los principales marcadores ultraestructurales que caracterizan a este tipo celular son la presencia de cuerpos multi-laminares osmiofílicos, sitio de almacen intracelular de los fosfolípidos que componen al surfactante, además tiene abundantes mitocondrias, retículo endoplásmico, poliribosomas y aparato de Golgi, lo cual sugiere la capacidad de un alto grado de actividad metabólica (Farrell, 1982). Los cuerpos multi-laminares aparecen en el feto humano entre las semanas 18 y 20 de gestación (Lauweryns, 1970; Kotas, 1979), y en el ratón, Kauffman (1977b) los observó en el día 16 de gestación.

La administración de precursores marcados con radioisótopos como la colina- $H^3$  ha permitido seguir la secuencia de la síntesis de los fosfolípidos del surfactante observada por microscopía electrónica, lo cual ha revelado la secuencia típica de las células exócrinas: rápida obtención de los precursores desde los capilares, transferencia al retículo endoplásmico, síntesis de fosfolípidos, transferencia vía aparato de Golgi y proteínas especiales a los cuerpos multi-laminares osmiofílicos para el empaquetamiento y secreción hacia el espacio alveolar (Epstein y Farrell, 1975; Engle, 1982).

Por lo tanto, a los pneumonocitos tipo II se les atribuye una triada de funciones relacionadas con el surfactante: síntesis, almacen y secreción (Farrell, 1982).

Tabla 1. Distribución de los porcentajes de células en el pulmón de rata adulta.

CELULAS	PORCENTAJES
Pneumonocitos tipo I	10
Pneumonocitos tipo II	12
Endoteliales	40
Macrófagos alveolares	5
Células intersticiales	33

La observación de que el índice de mortalidad debida al SDR en el período neonatal es significativamente más alto en productos masculinos que en femeninos (Farrell y Avery, 1975; Kauffman, 1977a) aún con la aplicación de glucocorticoides (Nielsen y Torday, 1985; Torday y col., 1981; Torday, 1984a), llevó al desarrollo de estudios comparativos entre los sexos en varias especies (humano, rata, conejo y pollo): determinando el índice de lecitina/esfingomielina (Naeye y col., 1974; Torday y col., 1981), estudiando índices de presión-volumen pulmonar (Kotas y Avery,

1980; Truog y col., 1981; Kessler y col., 1982), cuantificando los niveles de receptores de membrana a hormonas (Dhanireddy y col., 1983; Khosla y Rooney, 1979; Spellacy y col., 1973) y por último, describiendo el desarrollo del pulmón y las interacciones celulares entre mesénquima y epitelio (Adamson y King 1984a; 1984b), así como aislando y cuantificando fosfolípidos de tejido pulmonar (Nielsen y Torday, 1985; Torday, 1984a y Torday y Dow, 1984), los que finalmente demostraron la existencia de un dimorfismo sexual durante el desarrollo del pulmón, particularmente en la última mitad del desarrollo fetal.

En base a criterios histológicos y bioquímicos, se ha demostrado la existencia de un dimorfismo sexual en el desarrollo del pulmón en las siguientes especies:

1. El humano (Dhanireddy y col., 1983; Naeye y col., 1974; Torday y col., 1981), durante las semanas 25 y 32 de gestación (Naeye y col., 1974).
2. La rata (Adamson y King, 1984a y 1984b; Torday, 1984a y 1984b; Torday y Dow, 1984), desde el día 18 hasta el día 21 de gestación (Adamson y King, 1984a).
3. El conejo, en el día 27 de gestación (Kotas y Avery, 1980).
4. El pollo, desde el día 15 al día 19 de gestación (Nielsen y Torday, 1985).

Para estos casos los pulmones de los fetos hembra se encuentran en ventaja en el desarrollo, principalmente en los siguientes 3 puntos que se presentan en orden cronológico:

- a) Durante el desarrollo fetal hay un disparo de la proliferación celular epitelial y endotelial con respecto a las células mesenquimatosas.
- b) La dinámica de la proliferación celular cesa para empezar la diferenciación celular.
- c) En la síntesis del surfactante.



La hembra experimenta estos 3 fenómenos antes que el macho, a excepción del pollo, el cual exhibe un patrón contrario al reportado para los mamíferos, en donde el macho lleva la delantera en el desarrollo pulmonar (Nielsen y Torday, 1985) prevaleciendo el dimorfismo sexual.

Se ha tomado en cuenta que la evaluación morfométrica de la composición celular, y citodiferenciación, así como del contenido de cuerpos multi-laminares y fosfolípidos relacionados con el surfactante, han resultado ser un método idóneo para detectar la existencia de un probable dimorfismo sexual en las especies, además el desarrollo del pulmón de ratón es un sistema conveniente para estudiar estos eventos ya que su cinética celular está bien definida (Kauffman, 1975).

La proliferación epitelial y la diferenciación celular del pulmón fetal de ratón se han estudiado con técnicas morfométricas. Por ejemplo, Kauffman (1977b) encontró una disminución en la proliferación celular a los 18 días y un rápido crecimiento de células tipo II entre el día 17 y 18 en ratones sin tratamiento, también usó técnicas morfométricas para comparar el volumen de espacios aéreos en los últimos días del desarrollo del pulmón fetal de ratón (Kauffman, 1977a).

Las etapas del desarrollo pulmonar en el ratón están bien definidas (Ten, 1981):

1. Pseudoglandular, representada histológicamente por túbulos delineados por epitelio columnar rodeado por abundante mesénquima (de los 9.5 a los 16.5 días de gestación).
2. Canalicular, con túbulos revestidos de epitelio cuboidal, haciendo contacto con el sistema capilar (de los 16.5 a los 17.5 días de gestación).

3. Saco terminal, con abundantes sacos alveolares revestidos por epitelio bajo (de los 17.5 días de gestación al 5o día postnatal).
4. Alveolar, donde se observan bolsas alveolares delineadas por epitelio cuboidal y plano, a partir del 5o día postnatal.

Sin embargo, no se han reportado diferencias sexuales durante el desarrollo del pulmón fetal de ratón, aún y con la importancia que tiene esta especie al ser utilizada como modelo experimental en el área básica de investigación, por sus ventajas de tener una rápida reproductividad, descendencia numerosa y por ser una especie accesible para cualquier experimento.

### **Hipótesis de trabajo**

El pulmón del ratón albino *Mus musculus* presenta dimorfismo sexual durante la última sexta parte del desarrollo gestacional, manifestándose en la composición celular relativa, evolución de la proliferación celular, citodiferenciación y en la concentración de la 1,2-dipalmitoil-3-*sn*-fosfatidilcolina y del fosfolípido total.

### **Objetivos**

1. Identificar por microscopía óptica diferencias sexuales en la composición celular del parénquima pulmonar y en el contenido de cuerpos multi-laminares de los pneumonocitos tipo II, a partir del día 15 al 18 de gestación y en los productos recién nacidos (RN).
2. Comparar el contenido pulmonar de la 1,2-dipalmitoil-3-*sn*-fosfatidilcolina (principal marcador del surfactante) y del fosfolípido total entre ambos sexos en los días 17 y 18 de gestación y en los productos RN.
3. Correlacionar los resultados de ambas pruebas: morfométrica y bioquímica.

## MATERIAL Y METODOS

### Preparación del material biológico

Se detectaron los ratones hembra primerizas (*Mus musculus* pertenecientes a la cepa CD-1 Charles River Breeding Laboratories) en fase de estro por inspección genital; se cruzaron durante dos horas por la mañana (10.00-12.00 h) y se trabajó con aquellas hembras en donde se identificó el tapón vaginal con lo cual se determinó el día "0" de la gestación.

### Método de sacrificio

Se sacrificaron por dislocación cervical, ratones hembra con 15, 16, 17 y 18 días de embarazo. Los fetos se extrajeron por histerectomía durante las 10.00 y la 13.00 h de la fecha de gestación esperada, éstos y los productos RN se pesaron de inmediato en una balanza analítica Mettler AE160®.

En cada disección se tomó en cuenta la distribución de los fetos en el útero (cuerno derecho e izquierdo) para detectar la correlación con el sexo y peso corporal. Los fetos considerablemente pequeños en tamaño y peso con respecto al resto de su camada se excluyeron del estudio.

Cada feto se decapitó y seccionó transversalmente a nivel del músculo diafragmático, éste se removió y los pulmones se extrajeron en bloque. La limpieza del pulmón se hizo en solución de Hanks; cada lóbulo se disecó del hilio y por último se secó ligeramente con papel absorbente. El sexo de los productos se determinó por la posición de las gónadas en el día 15 de gestación, por la forma de las gónadas en los días 16, 17 y 18 de gestación y por inspección genital en los productos RN bajo un microscopio estereoscópico Zeiss.

## **Estudio Morfológico**

### **Obtención de la muestra**

De los ratones hembra sacrificados, se seleccionaron sólo aquellos que alcanzaron a tener un mínimo de 3 fetos hembra y 3 fetos macho en su camada, hasta completar al menos 3 camadas por día de gestación.

### **Procesamiento del tejido pulmonar**

De cada feto se extrajo el lóbulo derecho, se lavó y limpió con solución de Hanks bajo un microscopio estereoscópico, el procesamiento del tejido se hizo por la técnica de microscopía electrónica como se explica en seguida:

- a) Fijación en solución Karnovsky-Ito (4 g de formaldehído, 0.04 g de ácido pícrico y 8 ml de glutaraldehído al 25%, aforada a 100 ml con agua ultrapura) a temperatura ambiente por 1 h.
- b) Lavado 3 veces con Buffer de Cacodilatos al 0.1 M por 5 min cada uno.
- c) Postfijación con Tetraóxido de Osmio acuoso al 2% por 30 min a 4°C.
- d) Lavado 3 veces con Buffer de Cacodilatos al 0.1 M por 5 min cada uno.
- e) Estabilización con Nitrato de Uranilo alcoholico al 1% por 30 min.
- f) Lavado 3 veces con Buffer de Cacodilatos al 0.1 M por 5 min cada uno.
- g) Deshidratación con concentraciones ascendentes de Acetona: 30%, 50%, 70% y 90% por 5 min cada uno.
- h) Aclaramiento con Acetona al 100%, 3 cambios por 5 min cada uno.
- i) Preinclusión con Acetona-Resina epóxica 1:1 (v/v) por 1 h.

- j) Inclusión en Resina epóxica pura por 1 h en moldes planos de plástico.
- k) Polimerización de 12 a 72 h a 60 °C.

El material utilizado para la técnica de microscopía electrónica fueron productos de Pelco.

### **Ultramicrotomía**

Una vez alcanzada la dureza ideal de la resina, los bloques de las piezas-muestra se rebajaron con una navaja bajo un microscopio estereoscópico hasta formar una pirámide. Posteriormente se llevaron al ultramicrotomo Ultratome V LKB, para la obtención de cortes semifinos (0.5  $\mu\text{m}$  de grosor) a 3 niveles distintos de cada pieza. Se utilizaron cuchillas de vidrio hechas en el Knife-Maker LKB. Los cortes se montaron en porta objetos y se tiñeron con Azul de Toluidina. En las claves asignadas para cada corte no se reveló el sexo al cual pertenecían, con lo cual se evitó un prejuicio en el análisis morfométrico celular.

### **Morfometría**

Los cortes se observaron en un fotomicroscopio Karl Zeiss con un ocular reticulado, para el análisis morfométrico de las células epiteliales, endoteliales y mesenquimatosas, las que se fueron sumando en un contador de células mecánico.

Se cuantificó la composición celular de 5 campos de cada corte (siendo un campo la unidad muestral) dando un total de 15 campos para cada pulmón (Figura 1). Se escogió el primer campo por conveniencia y los otros 4 seguidos en línea recta hacia la derecha, quitando así un sesgo de selección. Del total de células en 45 campos ( $n=45$ ) correspondientes al muestreo celular de una camada se obtuvo el valor de la media y el error estándar.

La identificación de células alveolares y cuerpos multi-laminares se hizo apartir del día 17 de gestación hasta el día del nacimiento, en un fotomicroscopio Zeiss conectado a un sistema analizador de imágenes computarizado Morphon. La morfometría se llevó a cabo a un aumento del ocular de 100X, y una amplificación final de 125X para las células tipo I y 200X para las tipo II, donde se detectó el tiempo de aparición de los pneumocitos tipo II y su porcentaje con respecto al total de pneumocitos (por cada 5 campos se determinó el porcentaje de pneumocitos tipo II, dando sólo un dato por corte, 3 por pulmón y por lo tanto 9 por camada), el contenido de los cuerpos multi-laminares en los pneumocitos tipo II en 45 campos por camada y el tiempo de aparición de los mismos. Los porcentajes de las células alveolares y las cantidades de cuerpos multi-laminares se expresaron en forma de cifras promedio y error estándar.

### **Bioestadística**

Todos los datos obtenidos durante la disección (peso del feto, sexo y su distribución en el útero), y los datos morfométricos de las cantidades relativas de cada tipo celular y de cuerpos multi-laminares en el pulmón, se capturaron en el programa Micro Soft Excel en una computadora Macintosh Iix (Apple Computer Inc.).

Con el propósito de proporcionar una recta de la edad fetal del ratón durante su desarrollo sugerida por el peso corporal en gramos, se obtuvieron intervalos de confianza del 95% (Daniel, 1985) de los pesos fetales de las camadas disecadas en este trabajo, para cada día de gestación, en el programa Stat Wiew 512 para Macintosh con la siguiente fórmula:

$$\bar{X} = t (ES)$$

donde:

$\bar{X}$  = a la media de los pesos fetales

t = al valor de la prueba t de student

ES = al error estándar

Los datos de las disecciones se sometieron primero a un análisis de chi-cuadrada en el programa Stat Wiew para Macintosh para determinar si el sexo es independiente de la posición del feto en el útero; para lo cual se juntaron los datos de todos los días de gestación analizados (n=388 fetos). Posteriormente se compararon los pesos fetales de un cuerno del útero contra los pesos fetales del otro cuerno en un ANOVA de un factor (Stat Wiew) para cada día de gestación (17 y 18) y productos RN. Con el mismo análisis y en los mismos días de gestación se compararon los pesos de los fetos entre los sexos.

Los datos morfométricos de los tipos celulares y cuerpos multi-laminares del pulmón pertenecientes a las repeticiones de cada día de gestación (15, 16, 17 y 18) y productos RN se sometieron a la prueba de homocedasticidad de Bartlett (Zar, 1984) para decidir si la comparación de sus medias debe hacerse en un análisis paramétrico o no paramétrico, posteriormente al ANOVA, un análisis de varianza de un factor (camada) sobre la variable medida (tipo celular), ambos en el programa SPSS para Macintosh. Después de comprobar la homogeneidad de los datos entre las capas de cada día de gestación, éstas se juntaron en un sólo grupo por variable y sexo y por último sus medias se compararon estadísticamente entre el sexo para comprobar la existencia de alguna diferencia morfológica significativa mediante la prueba t de Student no pareada (sexo y variable) en el programa Stat Wiew. Todas las pruebas se manejaron con un 95% de confianza.

Las medias de las variables morfológicas se graficaron en los programas Cricket Graph 1.3.1 y Delta Graph 1.5 y el esquema de la metodología en el programa Super Paint 3.0, todos para Macintosh.

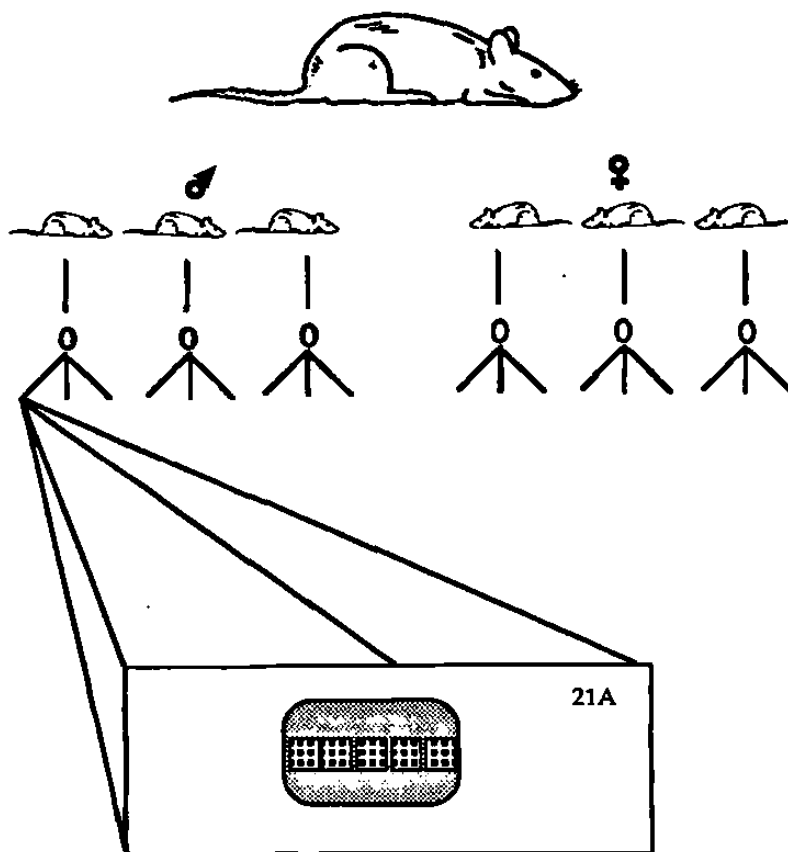


Figura 1. Esquema que representa el número de datos tomados por camada, donde un campo es la unidad muestral, por lo tanto  $n=45$  por camada para cada sexo.

## Estudio Bioquímico

### Lista de abreviaturas

Tris-HCL  
 EDTA  
 $\text{Na}_2\text{CO}_3$   
 NaOH  
 $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$

Hidrocloruro de Trisma  
 Acido tetraacético Etilenodinitrilo  
 Carbonato de Sodio  
 Hidróxido de Sodio  
 Sulfato de Cobre pentahidratado



Tartrato de Na-K-4 H <sub>2</sub> O	Tartrato de Sodio Potasio tetrahidratado
Tartrato de Cu	Tartrato de Cobre
BSA	Albúmina de Suero Bovino
OsO <sub>4</sub>	Tetraóxido de Osmio
CCL <sub>4</sub>	Tetracloruro de Carbono
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato de Potasio Monobásico
(NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> 4 H <sub>2</sub> O	Molibdato de Amonio tetrahidratado
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Acido Sulfúrico
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Oxido de Aluminio
NH <sub>4</sub> OH	Hidróxido de Amonio
BBOT	(2,5-Bis-(5'- <i>ter</i> -Butilbenzoxazolil-[2']) tiofenol)

Todo el material de vidrio utilizado se lavó previamente con detergente líquido Extrán de Merck, y después con mezclas de cloroformo-metanol para evitar residuos de grasa que pudieran alterar los resultados.

### Método de obtención de las muestras

Los grupos se formaron por camadas, se trabajaron con no menos de 5 grupos en cada día de gestación (17 y 18) y en los RN; se empezó con el día 17 de gestación tomando en cuenta que la producción del surfactante del humano y algunos animales se inicia en el último 10-15% de la gestación, según Kotas (1982). Se registraron la edad gestacional de los fetos, peso corporal, sexo y peso de los pulmones húmedos en bloque de cada grupo experimental. Los pulmones de los productos pertenecientes a cada camada se separaron por sexo y se congelaron en nitrógeno líquido, posteriormente se trabajaron en el mismo tiempo y en las mismas condiciones. Un resumen de la metodología se muestra esquematizado en la figura 2.

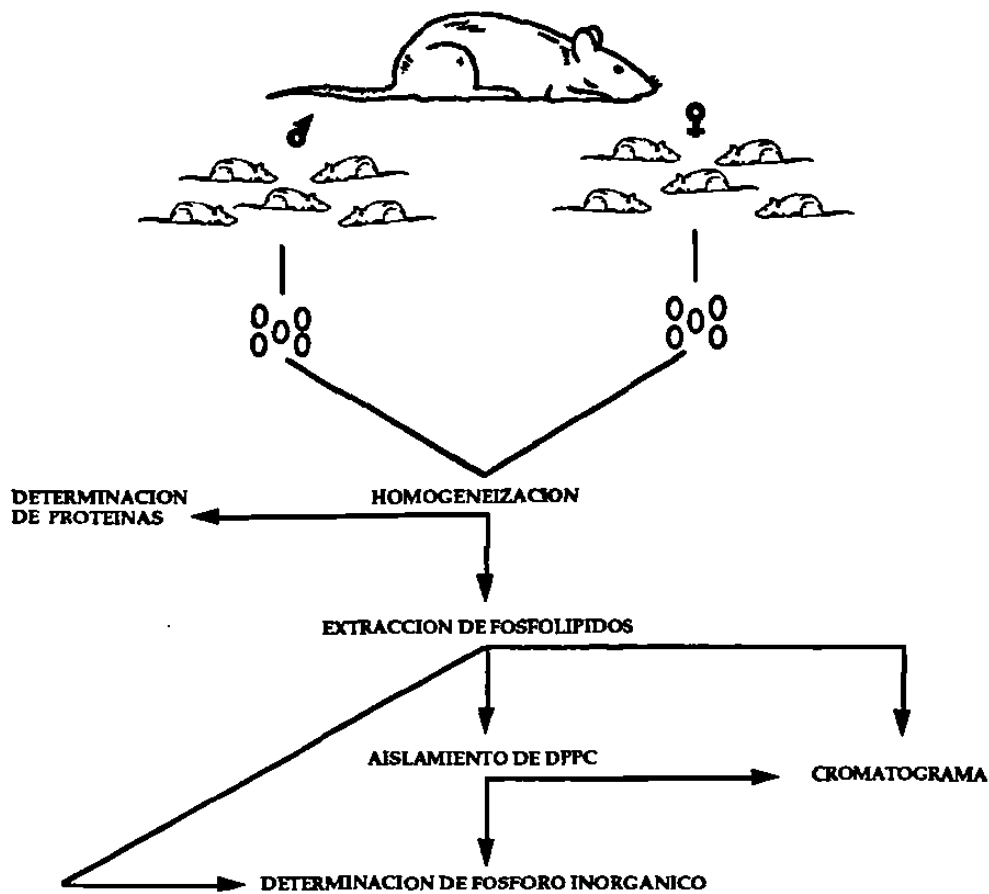


Figura 2. Representación esquemática de la metodología empleada para el estudio bioquímico.

### Homogeneización del tejido pulmonar

Los pulmones congelados pertenecientes a los grupos de cada edad gestacional se homogeneizaron (Homogeneizador Bellco) empleando un pistilo de teflón en una solución de sacarosa 0.25M, tris-HCL 10mM y EDTA 1mM a un pH de 7.4 (8.6 g de sacarosa, 29.2 mg de EDTA y 1 ml de solución TRIS 1M, todos de Sigma, aforado a 100 ml con agua ultrapura) a una velocidad de 9 rpm por 3 min. El homogenado se filtró a través de una gasa y se aforó a 2 ml (si la

cantidad homogeneizada era aproximada a 200 mg de tejido húmedo) ó a 5 ml (si la cantidad homogeneizada era aproximada a los 500 mg de tejido húmedo) con solución de sacarosa. El volumen total se separó en porciones de 0.5 ml ó 1 ml a tubos Eppendorf y éstos se congelaron a  $-8^{\circ}\text{C}$ .

### **Análisis cuantitativo de proteínas**

La determinación de proteínas del homogenado pulmonar se realizó por el método de Lowry y col. (1951) como sigue:

#### **Preparación de soluciones**

- a) Solución A: 10 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  se disolvieron en 50 ml de  $\text{NaOH}$  1N (20 g  $\text{NaOH}$  aforados a 500 ml con agua ultrapura) y se aforaron a 500 ml con agua ultrapura.
- b) Solución B: 5g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  se disolvieron en agua ultrapura y se aforaron a 100ml.
- c) Solución C: 10 g de tartrato de Na-K-4  $\text{H}_2\text{O}$  se disolvieron en agua ultrapura y se aforaron a 100 ml.
- d) Solución D (preparado el día de la determinación): 1 ml de solución B se mezcló con 1 ml de solución C y 8 ml de agua destilada.
- e) Solución E o solución de tartrato de Cu: 50 ml de la solución A se mezclaron con 1 ml de la solución D.
- f) Reactivo fenólico de Folin-Ciocalteu: se trabajó con una dilución de 1:1 con agua ultrapura (5ml:5ml).
- g) La solución estándar fue BSA preparada a una concentración de  $200 \mu\text{g}/\text{ml}$  (10 mg de albúmina se aforó a 50 ml con agua ultrapura).

#### **Procedimiento**

Alícuotas de 25  $\mu\text{l}$  del homogenado diluido 1:3 (v/v, 100  $\mu\text{l}$  de homogenado y 300  $\mu\text{l}$  de agua ultrapura) se colocaron en tubos de

ensayo de 5 ml, se agregaron 475  $\mu$ l de agua ultrapura y 2.5 ml de la solución E, se mezclaron durante 20 s y se dejaron reposar durante 10 min. Transcurridos los 10 min se agregaron 250  $\mu$ l del reactivo fenólico de Folin-Ciocalteu, se agitaron y se dejaron a temperatura ambiente durante 30 min, después se efectuaron las lecturas contra el blanco (agua ultrapura) a 750 nm en un espectrofotómetro de doble haz Beckman (Acta CIII). Cada determinación se efectuó por triplicado.

El contenido de proteínas se determinó con la curva de calibración usando como estándar una solución de BSA (tabla 2).

### **Análisis cuantitativo de fosfolípidos**

#### **Preparación de soluciones**

El  $\text{OsO}_4$  se preparó a una concentración de 6 mg/ml de  $\text{CCl}_4$ , (Productos Químicos de Monterrey S. A.) previamente destilado y se almacenó en la oscuridad a 4 °C.

La solución estándar de la DPPC (Sigma) se preparó a una concentración de 1 mg/ml de cloroformo-metanol (Productos Químicos Monterrey, S.A.) 1:1 (v/v) y se almacenó en la oscuridad a 4 °C.

El estándar de fósforo se obtuvo comercialmente de Sigma, o bien se preparó de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck) a una concentración de 8  $\mu$ g de fósforo/ml (se pesaron 87.9 mg de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en 250 ml de agua ultrapura y 10 ml de esta solución se aforaron a 100 ml con agua ultrapura).

El Fiske 1 se preparó con 2.2 gr de  $(\text{NH}_4)_3\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (Mallinckrodt) y 20 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Productos Químicos de Monterrey, S. A.) aforado a 1 Lt con agua ultrapura. El Fiske 2 se obtuvo comercialmente de Sigma (Fiske & Subbarow Reducer), compuesto

por 1-Amino-2 Naftol-4 Acido Sulfúrico, Bisulfito de Sodio y Sulfito de Sodio Anhidro.

Tabla 2. Esquema seguido para la curva de calibración de proteínas.

$\mu\text{g}$ de proteína	$\mu\text{l}$ estándar	$\mu\text{l}$ agua	ml solución E	$\mu\text{l}$ reactivo fenólico de Folin-Ciocalteu
0	0	500	2.5	250
5	25	470	2.5	250
10	50	450	2.5	250
25	125	370	2.5	250
50	250	250	2.5	250
75	375	125	2.5	250
100	500	0	2.5	250
Muestras	0	475	2.5	250

### Extracción de Fosfolípidos

Alícuotas de 0.5 ml ó 1 ml del homogenado (por triplicado para cada experimento) se procesaron para la extracción de fosfolípidos por el método de Bligh y Dyer (1959) utilizando cloroformo-metanol 1.25 ml:2.5ml (v/v), las muestras se mezclaron por 20 s en un vórtex, y posteriormente se les agregaron 1 ml de cloroformo y 1 ml de agua ultrapura y nuevamente se mezclaron por 20 s. Se separó la fase orgánica por centrifugación (3000 rpm por 10 min a 4°C, en una centrífuga CRU-500, DAMON/IEC DIVISION) y se filtró a tubos de ensayo de 8 ml con filtros predoblados de filtración rápida libres de grasas (Aldrich). Se hizo una nueva extracción a la fase acuosa. El extracto orgánico se llevó a sequedad bajo corriente de nitrógeno y posteriormente se llevó a un volumen de 1ml con mezclas de cloroformo-metanol 1:1 (v/v).

### Aislamiento de 1,2-dipalmitoil-3-*sn*-fosfatidilcolina

La purificación de la DPPC se llevó a cabo por el método de Mason y col. (1976). Se tomó una alícuota de 600  $\mu$ l de cada extracto de fosfolípidos en tubos de 10 ml y se llevaron a sequedad bajo corriente de nitrógeno, los fosfolípidos insaturados del extracto se reaccionaron con 300  $\mu$ l de  $\text{CCl}_4$  que contiene 1.8 mg de  $\text{OsO}_4$ , por 15 min o hasta que se observó un color oscuro, posteriormente las muestras se llevaron a sequedad bajo corriente de nitrógeno. Los residuos se disolvieron en una cantidad mínima de cloroformo-metanol 20:1 (v/v) y se depositaron en el frente de una microcolumna (pipeta Pasteur de 8 ml) rellena de 0.8 g de  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , la alúmina neutra de Merck se activó previamente por 1 h a 110 °C.

Los lípidos neutros que no se fijaron al  $\text{OsO}_4$  se eluyeron primero con 10 ml de una mezcla de cloroformo-metanol 20:1 (v/v) y la DPPC se eluyó posteriormente con 5 ml de una mezcla de cloroformo-metanol- $\text{NH}_4\text{OH}$  7M (Productos Químicos de Monterrey, S. A.) 70:30:2 ml (v/v). Los fosfolípidos insaturados atrapados por el  $\text{OsO}_4$  se observaron en una franja negra en la parte superior de la columna.

Para determinar la validez de éste método se prepararon cantidades conocidas del estándar de la DPPC por triplicado (0.25, 2, 2.15, 3.30 y 4.00  $\mu$ g, cantidades verificadas en el espectrofotómetro de doble haz Beckman, Acta CIII a una longitud de onda de 770 nm) y se pasaron por columnas de alúmina para conocer el grado de recuperación del fosfolípido al someterse a esta técnica.

Las cantidades de la DPPC recuperadas de las columnas tanto de las muestras como del estándar de la DPPC se secaron bajo corriente de Nitrógeno y se llevaron a 1ml con una mezcla de cloroformo-metanol 1:1 (v/v), para determinar fósforo total.

## Medición indirecta de fosfolípidos

La determinación de fósforo inorgánico se llevó a cabo por el método de Bartlett (1958). Se tomaron alícuotas de 300  $\mu$ l del extracto de fosfolípidos de las muestras y del estándar de la DPPC pasados por las columnas de alúmina así como 100  $\mu$ l del extracto de fosfolípidos (todos por triplicado); se secaron bajo corrientes de nitrógeno y se digirieron con 500  $\mu$ l de ácido perclórico (Sigma) en un baño de arena a 180°C por 1 h o hasta que se aclaró por completo la muestra.

El contenido de fósforo inorgánico se determinó con la curva de calibración usando una solución estándar de fósforo. Una vez que las muestras estuvieron digeridas junto con los estándares, se sometieron al esquema como se explica en la tabla 3. Las muestras y los estándares se agitaron por 20 s en un vórtex y se colocaron en baño María por 15 min tapados sin presión con canicas o embudos cerrados.

Las absorbancias de las muestras y estándares se leyeron contra el blanco (agua ultrapura) a temperatura ambiente en el espectrofotómetro de doble haz a una longitud de onda de 770 nm.

Tabla 3. Esquema seguido para la curva de calibración de fósforo.

$\mu$ g de fósforo	$\mu$ l estándar	$\mu$ l agua	$\mu$ l HClO <sub>4</sub>	ml Fiske 1	$\mu$ l Fiske 2
0	0	1000	500	5	200
0.25	31	969	500	5	200
0.5	63	937	500	5	200
1	125	875	500	5	200
2	250	750	500	5	200
4	500	500	500	5	200
8	1000	0	500	5	200
Muestras	0	1000	500	5	200

## **Análisis cualitativo de fosfolípidos**

La identidad de los fosfolípidos se evaluó por cromatografía en capa fina. Se aplicaron volúmenes de 5, 20 y 100  $\mu$ l de los estándares de fosfolípidos (lecitina/esfingomielina de Sigma y DPPC, ambos preparados a 1 mg/ml), de los extractos de fosfolípidos de pulmón y de la DPPC purificada de estos extractos, respectivamente, con capilares minicaps de 5 $\mu$ l (Hirschmann Labor Glas) en cromatofolios de aluminio recubiertos de gel de sílice G con un grosor de 0.2 mm. Los cromatofolios se eluyeron en sistemas cerrados. El sistema de solventes fue cloroformo-metanol con BBOT (Aldrich)-ácido acético glacial (Sigma)-agua 25:12.5:3.5:1.5 (v/v).

La presencia del agente cromogénico BBOT permitió la visualización por fluorescencia de los fosfolípidos en los cromatofolios a una longitud de onda de 254 nm en un transiluminador de luz ultravioleta (Hofer Scientific Instrument) y se determinaron sus R<sub>f</sub> (relación que existe entre la distancia de corrimiento de los compuestos y el corrimiento del frente del solvente desde el punto donde se colocó la muestra). Los cromatofolios posteriormente se expusieron a un segundo agente cromogénico -vapores de yodo (Sigma)- para la verificación de la pureza de la DPPC aislada de los extractos de fosfolípidos, ya que por ser una molécula saturada no debe de reaccionar con el yodo, por lo tanto si la pureza es efectiva no deben de revelarse las manchas que se observaron por fluorescencia.

## **Bioestadística**

Las rectas de calibración se calcularon por el método de mínimos cuadrados en el programa Lotus Symphony 2.0 para IBM. En el mismo programa se evaluaron los cálculos siguientes: Las cantidades de proteínas y fósforo de las muestras utilizando los datos proporcionados por las rectas de calibración por medio de la fórmula:



$$y = a + bx$$

donde:

y = al valor de la absorbancia de la muestra

a = al intercepto o el origen de la recta

b = a la pendiente de la recta

x = a la cantidad de proteína o fósforo de la muestra desconocida

las concentraciones de las mismas por medio de las fórmulas:

$$P = \frac{x * v_h}{th * a_h * f_d} \quad FT = \frac{x * v_h * v_e}{th * a_h * a_e * 31} \quad FDPPC = \frac{x * v_h * v_e * v_{DPPC}}{th * a_h * a_e * a_{DPPC} * 31}$$

donde:

P = concentración de proteínas (mg prot/g tej húmedo)

FT = concentración de fósforo total ( $\mu$ mol FT/g tej húmedo)

FDPPC = concentración de fósforo de la DPPC ( $\mu$ mol FDPPC/g tej húmedo)

x = cantidad de proteína o de fósforo de la muestra

v<sub>h</sub> = volumen de aforación del homogenado

th = gramos de tejido homogeneizado

a<sub>h</sub> = alícuota tomada de homogenado

f<sub>d</sub> = factor de dilución

v<sub>e</sub> = volumen de aforación del extracto

a<sub>e</sub> = alícuota del extracto

31 = peso del fósforo

v<sub>DPPC</sub> = volumen de aforación de la DPPC purificada

a<sub>DPPC</sub> = alícuota de la DPPC purificada

y los cálculos estadísticos de media, desviación estándar de la media, error estándar de la media y coeficiente de variación de la media.

Las concentraciones se trabajaron en mg de proteína/g de tejido húmedo,  $\mu$ moles de fosfolípido total/g de tejido húmedo y  $\mu$ moles de DPPC/g de tejido húmedo. La concentración de proteínas de los pulmones y los pesos fetales se sometieron a un análisis de regresión múltiple en el programa SPSS para Macintosh para verificar alguna correlación entre las dos variables durante los últimos dos días de gestación y en productos RN. Finalmente se

trabajaron 4 variables de concentraciones:  $\mu\text{mol}$  de fosfolípido total/g de tejido húmedo,  $\mu\text{mol}$  de fosfolípido total/mg de proteína,  $\mu\text{mol}$  de DPPC/g de tejido húmedo y  $\mu\text{mol}$  de DPPC/mg de proteína.

Para verificar la homogeneidad de cada una de las 4 variables en los grupos repetitivos dentro de cada día gestacional y para cada sexo, se realizó un análisis de varianza de un factor (grupo) sobre la concentración de fosfolípidos en cada variable (SPSS para Macintosh). Como los grupos no fueron homogéneos en sus datos (ver resultados), se realizaron dos análisis de regresión múltiple (Systat 5.0), primero para probar la hipótesis nula:  $B=0$  en cada grupo repetitivo, después para probar si los valores de las concentraciones (variable dependiente, Y) se veían afectados por sus respectivos pesos fetales (variable independiente, X). Una vez hechas las regresiones múltiples cuyos resultados indicaron que hay correlación entre los valores de las concentraciones de fosfolípidos y los pesos fetales y que por lo tanto podíamos confiar en el análisis de regresión, los datos se emplearon en un análisis de covarianza para el ajuste de medias (variable dependiente) afectadas por los pesos fetales (variable independiente) según Steel and Torrey (1988), en el programa Systat 5.0.

Los datos ajustados de las 4 variables se sometieron a la prueba de Bartlett para la homogeneidad de varianzas (Systat 5.0) para cada día de gestación, variable y sexo (prueba necesaria para decidir si la comparación de sus medias debe hacerse en un análisis paramétrico o no paramétrico). Por último, para la comparación de las medias y sus desviaciones estándar entre los sexos, se realizaron 2 ANOVA, uno de dos factores (sexo y día) sobre los valores ajustados en las 4 variables y otro de un factor (sexo) sobre los valores ajustados de las 4 variables, ambos en el programa Stat View 512 para Macintosh.

Las medias de las 4 variables se graficaron en los programas ya mencionados.

## RESULTADOS

Los intervalos del 95% de confianza correspondientes a los pesos de los fetos en gramos (sin considerar el sexo), para cada día de gestación, están representados en la figura 3 y sus datos respectivos en la tabla 4.

### **Peso, sexo y distribución de los fetos en el útero**

El análisis de Chi cuadrada demostró una completa independencia del sexo del feto con la disposición de éste en el útero ( $p=0.54$ ). Sin embargo, tanto fetos hembra como machos presentaron porcentajes de presencia ligeramente mayores en el cuerno izquierdo que los presentes del mismo sexo en el cuerno derecho (figura 4a), esto es del total de hembras en el útero el 56% estaban en el cuerno izquierdo y del total de machos en el útero el 53% estaban en el cuerno izquierdo (tabla 5); siempre los fetos macho en mayor cantidad en ambos cuernos del útero, el 55% en el cuerno derecho y el 52% en el cuerno izquierdo (tabla 6). Esto hace un total de fetos del 8% mayor (hembras y machos) en el cuerno izquierdo del útero que en el cuerno derecho (figura 4b).

Los pesos fetales (sin considerar el sexo) resultaron iguales en ambos cuernos del útero en los últimos dos días de gestación y en los productos RN, los valores de "p" obtenidos en el ANOVA fueron: 0.054, 0.210 y 0.834 en los días 17, 18 y productos RN, respectivamente.

De los últimos dos días de gestación (17 y 18) y en los productos RN sólo en el día 18 los pesos de los fetos en el útero fueron significativamente diferentes entre los sexos, presentando los fetos macho un peso promedio más alto de  $1.294 \text{ g} \pm 0.011 \text{ (ES)}$  que los fetos hembra  $1.241 \text{ g} \pm 0.012 \text{ (ES)}$  con un valor de  $p < 0.01$  (tabla 7 y figura 5).

Tabla 4. Intervalos de confianza de los pesos fetales de ratón para cada día de gestación.

DIAS DE GESTACION	$\bar{X} \pm IC$ en gramos	n	ES	% CV
15	0.389±0.015	29	0.008	2.06
16	0.675±0.021	43	0.011	1.63
17	0.931±0.017	218	0.008	0.86
18	1.269±0.017	193	0.008	1.01
RN	1.506±0.027	192	0.014	0.93

n= número de fetos, ES= error estándar y CV= coeficiente de variación de la media.

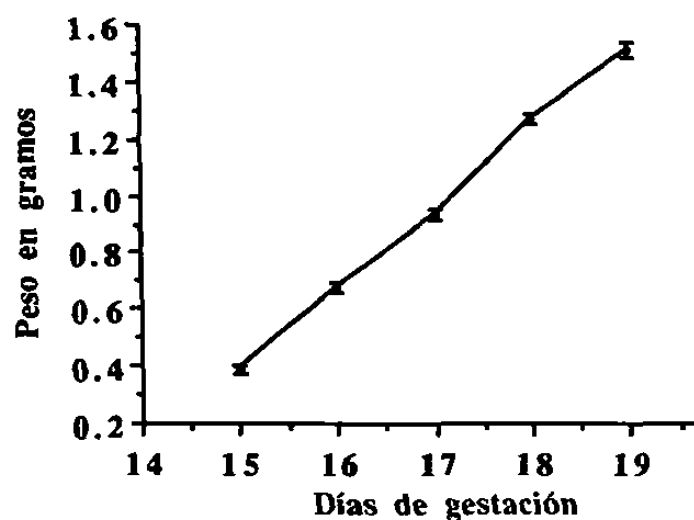


Figura 3. Intervalos de confianza de los pesos fetales de ratón para cada día de gestación, con un coeficiente de variación de la media menor al 5%. El día 19 corresponde a productos RN.

**Tabla 5. Porcentaje del sexo de los fetos de ratón en el útero.**

VARIABLES	CUERNO DERECHO	CUERNO IZQUIERDO
Hembras	43.96%	56.04%
Machos	47.09%	52.91%
Total de fetos	45.62%	54.38%

n=388 fetos totales.

**Tabla 6. Porcentaje de los fetos de ratón en el útero.**

VARIABLES	CUERNO DERECHO	CUERNO IZQUIERDO	TOTAL DE FETOS EN EL UTERO
Hembras	45.2%	48.34%	46.91%
Machos	54.8%	51.66%	53.09%

n=388 fetos totales.

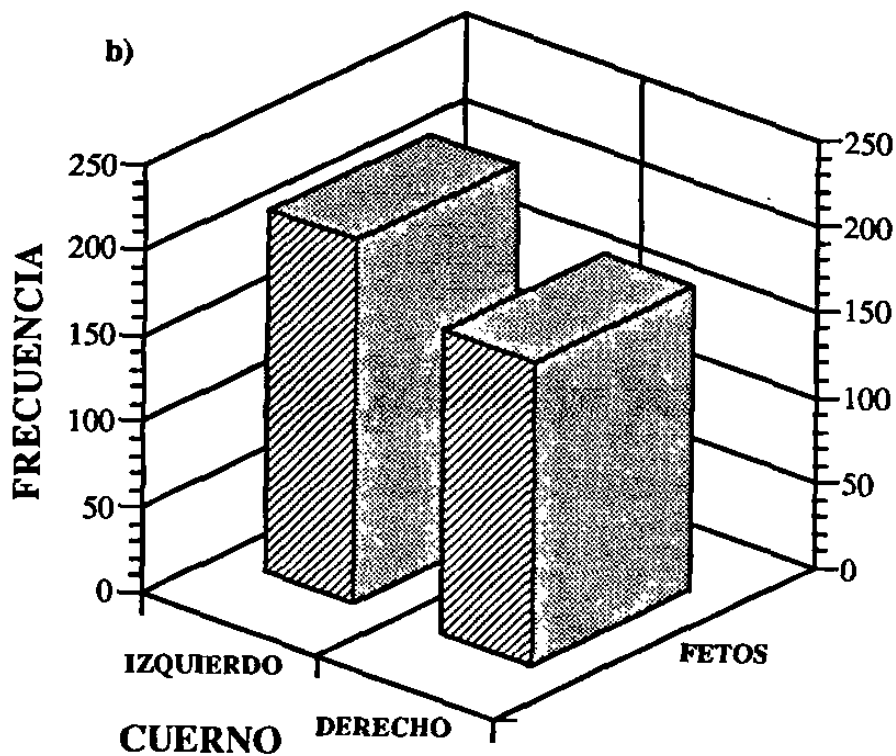
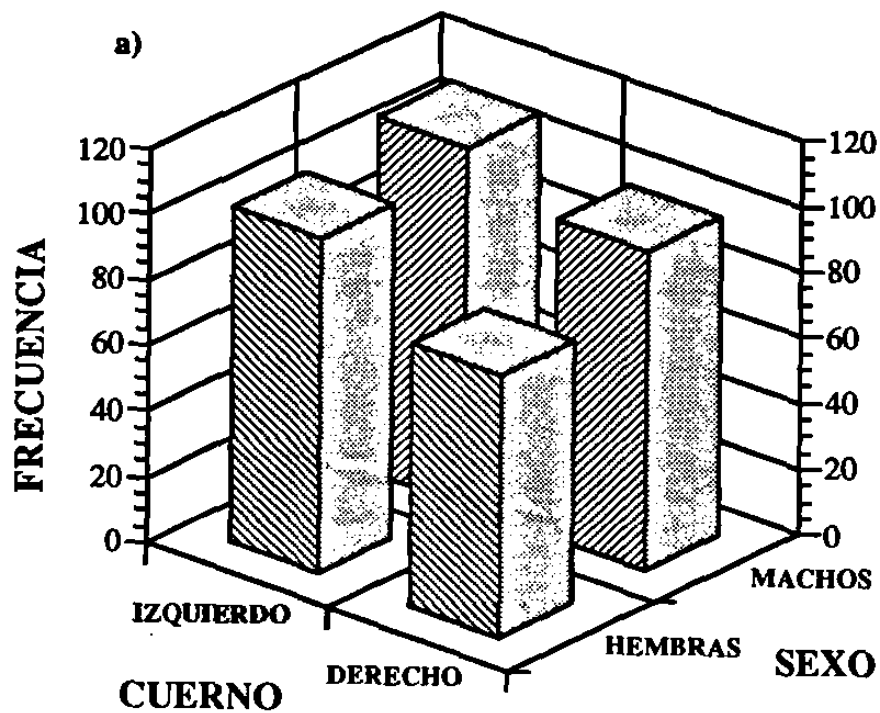


Figura 4.a) Distribución sexual de los fetos en el útero y b) Frecuencia de los fetos en el útero, sin considerar el sexo.  $n=388$  fetos.

Tabla 7. Comparación de los pesos fetales de ratón en desarrollo entre el sexo.

Días de gestación	Peso en gramos $\bar{x} \pm ES$		n		% CV		p
	HEMBRAS	MACHOS	HEMBRAS	MACHOS	HEMBRAS	MACHOS	
17	0.922±0.011	0.939±0.013	105	113	1.19	1.38	0.310
18	1.241±0.012	1.294±0.011	89	104	0.97	0.85	0.002
RN	1.479±0.024	1.530±0.015	89	103	1.62	0.98	0.068

$\bar{x}$  = media, ES= error estándar, n= número de datos, CV= coeficiente de variación de la media. Los valores de "p" corresponden al ANOVA de un factor.

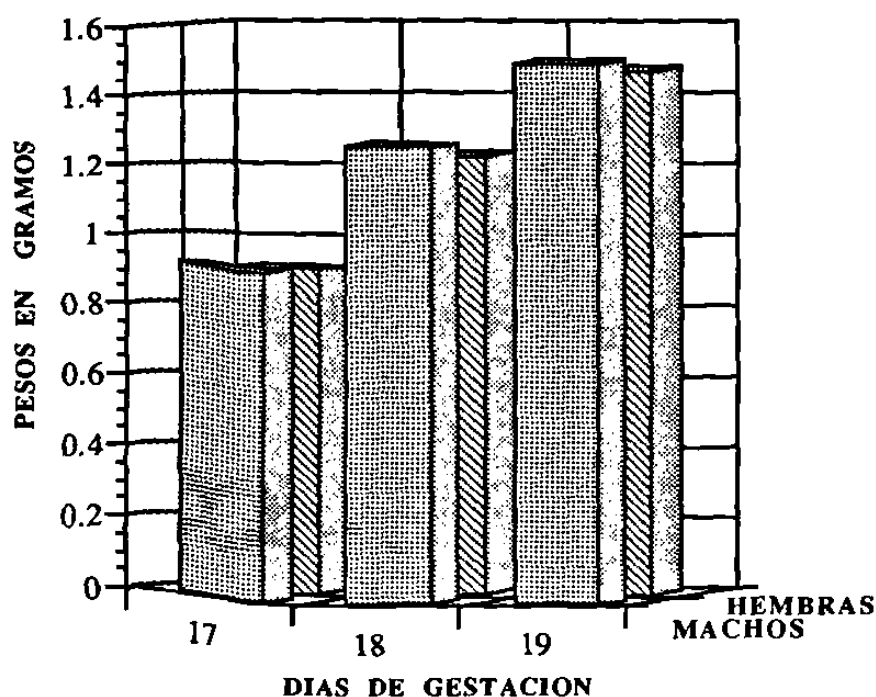


Figura 5. Pesos de los fetos en los últimos dos días de gestación y en productos RN con un coeficiente de variación de la media menor al 5%. El día 19 corresponde a productos RN.

## Evaluación Morfométrica

Las pruebas de Bartlett y ANOVA en los datos de los conteos celulares presentaron valores de "p" mayores a 0.05, indicando que las varianzas de las medias entre las repeticiones (camadas) y en cada día de gestación son iguales, con lo cual se dió apoyo al uso de los análisis paramétricos (ANOVA y t de Student) y a la igualdad de los grupos repetitivos en cada día de gestación respectivamente, para poder ser comparados con la prueba t de Student entre los sexos.

Las proporciones de las medias de los 3 tipos celulares por día para ambos sexos se describen en la tabla 8, en donde las células mesenquimatosas se mantienen en mayores porcentajes durante todos los días de gestación analizados, le siguen las células epiteliales y en una proporción considerablemente menor las células endoteliales.

Tabla 8. Proporciones celulares en el pulmón de ratón en desarrollo.

Días de gestación	HEMBRAS			MACHOS		
	Epitelio	Endotelio	Mesénquima	Epitelio	Endotelio	Mesénquima
15	36%	6%	58%	36%	6%	59%
16	41%	7%	52%	38%	6%	57%
17	36%	9%	54%	35%	7%	58%
18	23%	9%	63%	26%	12%	62%
RN	37%	12%	51%	32%	11%	57%

Las proporciones se obtuvieron de las medias de células, ver tabla 9.



### Día 15 de gestación

La masa pulmonar consiste de un sistema tubular ramificado, delineado por epitelio alto aparentemente pseudoestratificado (etapa pseudoglandular), y pequeños tubos semicerrados revestidos de epitelio cúbico con su citoplasma cargado de gránulos de glucógeno. Las estructuras tubulares se encontraron rodeadas por abundantes células del mesénquima como se observa en la figura 6. La apariencia histológica fue la misma para los pulmones de ambos sexos, como se demostró con la morfometría de la composición celular, donde no hubo diferencias significativas entre los pulmones de ambos sexos (tabla 9 y figuras 7 y 8).

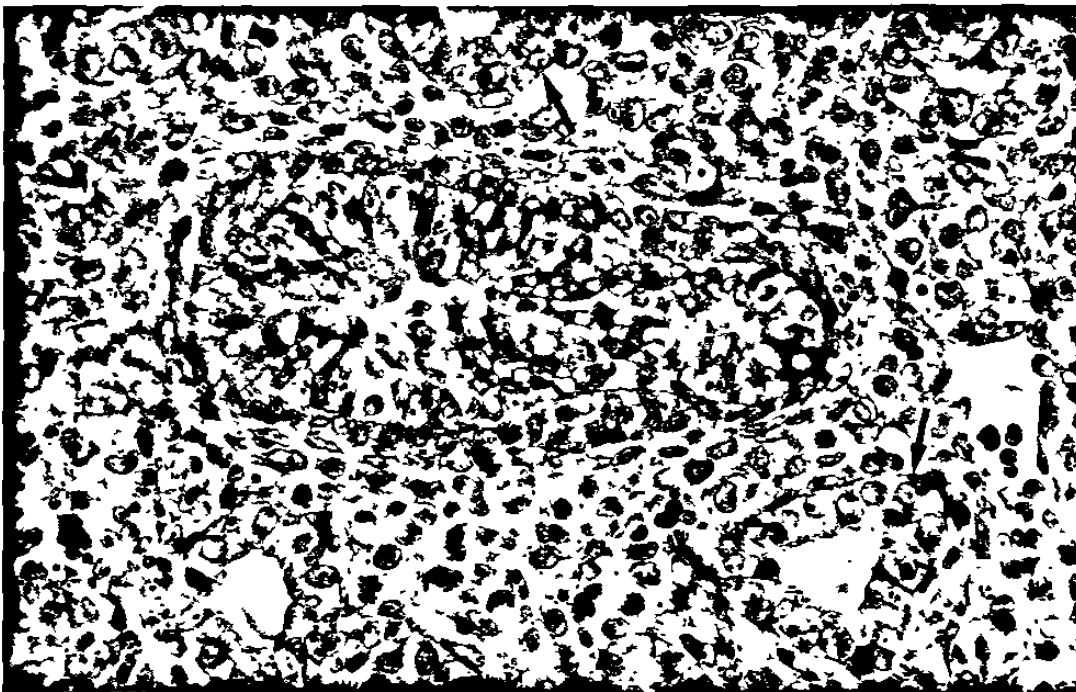


Figura 6. Corte histológico del pulmón fetal de ratón hembra de 15 días de gestación. Las flechas indican los tubos de epitelio cúbico aparentemente pseudoestratificado rodeados por las células del mesénquima. 40X.

### **Día 16 de gestación**

Se observaron abundantes vasos sanguíneos en el mesénquima (figura 9); los tubos de epitelio cúbico aún con depósitos de glucógeno se encontraron con una luz estrecha (etapa canalicular) y aparentemente fueron más abundantes en pulmones de hembras que de machos. Los resultados morfométricos mostraron evidencia de la cantidad superior de tubos en la hembra, presentando sus pulmones una media más alta de células epiteliales por campo que los pulmones de machos con un valor de  $p < 0.05$  (tabla 9 y figuras 7 y 8). El índice epitelio/mesénquima también se vió afectado por las diferencias en la cantidad de células epiteliales entre el origen sexual de los pulmones como se observa en la figura 8.

### **Día 17 de gestación**

Los tubos de epitelio cúbico tuvieron una luz más amplia, originando que el epitelio se extendiera más libremente sobre su membrana basal (en la figura 10 se representa la diferencia observada entre el pulmón de ambos sexos). Los capilares establecieron conexión con el epitelio cúbico, el cual en la mayoría de los casos ya ha mostrado citodiferenciación iniciándose la formación de cuerpos multi-laminares. En cuanto a la morfometría, se encontró que la población de células mesenquimatosas por campo fue más alta en pulmones de fetos macho que de hembras. Una diferencia muy marcada fue evidente en el contenido celular de cuerpos multi-laminares en el citoplasma de los pneumocitos tipo II, conteniendo los pulmones de hembras una cantidad más alta con respecto a los pulmones de machos (tablas 9 y 10, y figuras 7, 8 y 11). Los pulmones de los fetos hembra también tuvieron porcentajes más altos de pneumocitos tipo II que los machos, pero estas diferencias no fueron significativas debido a que las varianzas en ambos sexos fueron casi iguales.

Tabla 9. Diferencias en la composición celular del pulmón de ratón en desarrollo entre el sexo.

Días de gestación	Epitelio		Endotelio		Mesénquima		Índice E/M		Pneum. II	
	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho
15	211±113 (53)	203±111 (55)	323±025 (74)	316±024 (73)	333±089 (28)	330±081 (26)	086±013 (1615)	073±005 (878)		
16	254±083 (37)	212±066 * (31)	437±024 (54)	472±024 (58)	326±083 (28)	321±084 (31)	096±007 (77)	078±008 * (411)		
17	195±081 (41)	194±077 (35)	501±032 (64)	421±029 (68)	290±138 (58)	327±114 * (37)	091±006 (70)	092±014 (1625)	977±050 (15)	942±061 (8)
18	1296±048 (37)	1344±057 (42)	798±036 (45)	614±030 * (48)	356±111 (33)	324±106 * (35)	046±008 (697)	050±004 (85)	782±088 (119)	742±129 * (18)
RN	1233±064 (51)	1107±057 (51)	398±025 (62)	381±026 (62)	172±087 (54)	2012±094 * (49)	101±010 (106)	080±008 (106)	593±179 (32)	6197±237 (41)

Los valores corresponden a la  $\bar{x} \pm ES$  de células con  $n=135$  para todos los días, con excepción del día 16 con  $n=180$ ;  $n=18$  para pneumonocitos tipo II en el día 17 y en RN;  $n=36$  en el día 18. El número en los paréntesis es el coeficiente de variación de la media.

\* Los pulmones de las hembras son significativamente diferentes a los pulmones de los machos,  $p<0.05$  según la prueba t de Student.

### Día 18 de gestación

La formación de sacos fue evidente y los pneumonocitos tipo I y II se observaron bien diferenciados. También se observó con claridad la barrera sangre-aire y la abundancia de las figuras mielínicas en los espacios aéreos (figura 12). En el análisis morfométrico persistieron las diferencias sexuales en la cantidad de mesénquima, aunque esta vez los pulmones de las hembras tuvieron un marcado disparo en la cantidad de células mesenquimatosas observadas por campo con respecto a los pulmones de los fetos macho, los que se mantuvieron de una manera estable como en el día anterior. Los cuerpos multi-laminares en el citoplasma de los pneumonocitos tipo

II pertenecientes a los pulmones de hembras permanecieron en cantidades superiores con respecto a los pulmones de machos, pero en los pulmones de ambos sexos se encontró una baja en la concentración citoplasmática de estos organelos en comparación con el día anterior. Los pulmones de los fetos de hembras presentaron una  $\bar{X}$  más alta de endotelio por campo y de porcentaje de pneumonocitos tipo II que los pulmones de machos (tablas 9 y 10, y figuras 7, 8 y 11).

### Recién nacidos

Los septos de tejido pulmonar son delgados (figura 13), pero aún así se encontraron alternando con gruesos, sobre todo en los pulmones de fetos macho. Los pulmones presentaron conductos que se ramifican y terminan en sáculos. La mayoría de la superficie de intercambio de gas se encontró cubierta por pneumonocitos tipo I (planos con largas extensiones citoplasmáticas) y en menor número por pneumonocitos tipo II. En el recuento celular aún persistió la diferencia en la cantidad de células mesenquimatosas por campo entre el sexo de los fetos, aunque los pulmones de ambos sexos declinaron en la cantidad de estas células con respecto a los días anteriores, sobrepasando los pulmones de hembras a un nivel más bajo que los de machos (tablas 9 y 10, y figuras 7, 8 y 11).

Un resumen de las diferencias encontradas en la composición celular y cuerpos multi-laminares está representado en la tabla 18.

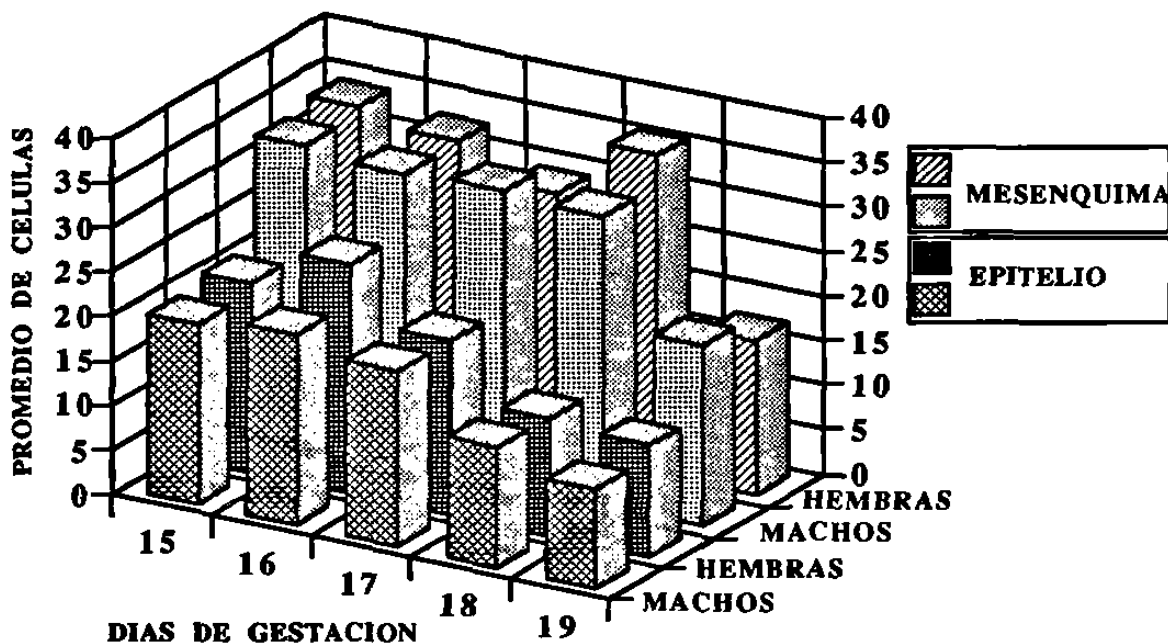


Figura 7. Células epiteliales y mesenquimatosas durante el desarrollo del pulmón fetal de ratón. El día 19 corresponde a productos RN.

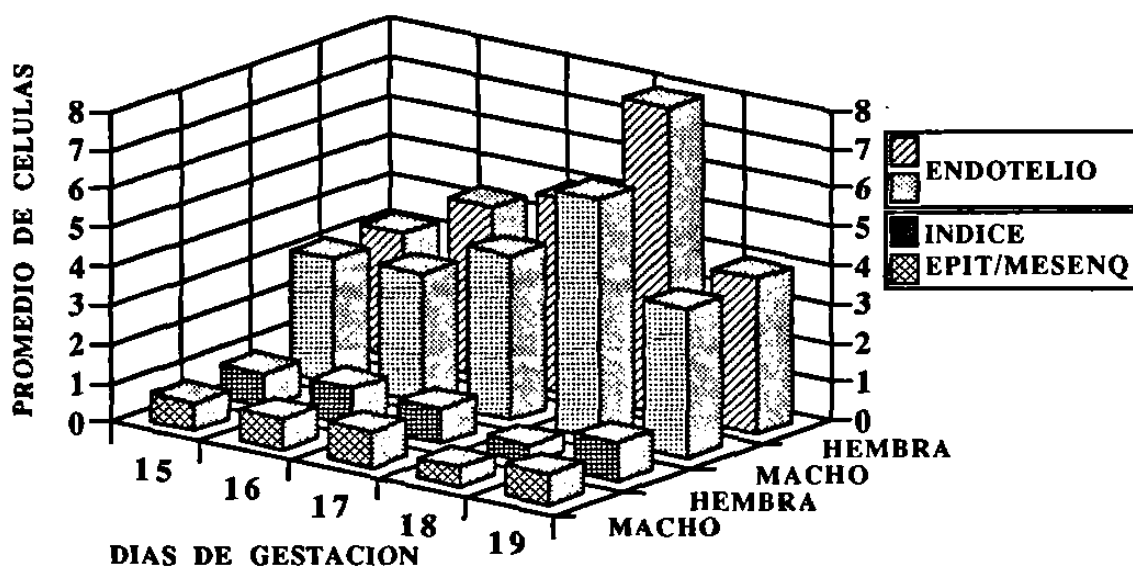


Figura 8. Células endoteliales e índice epitelio mesénquima durante el desarrollo del pulmón fetal de ratón. El día 19 corresponde a productos RN.

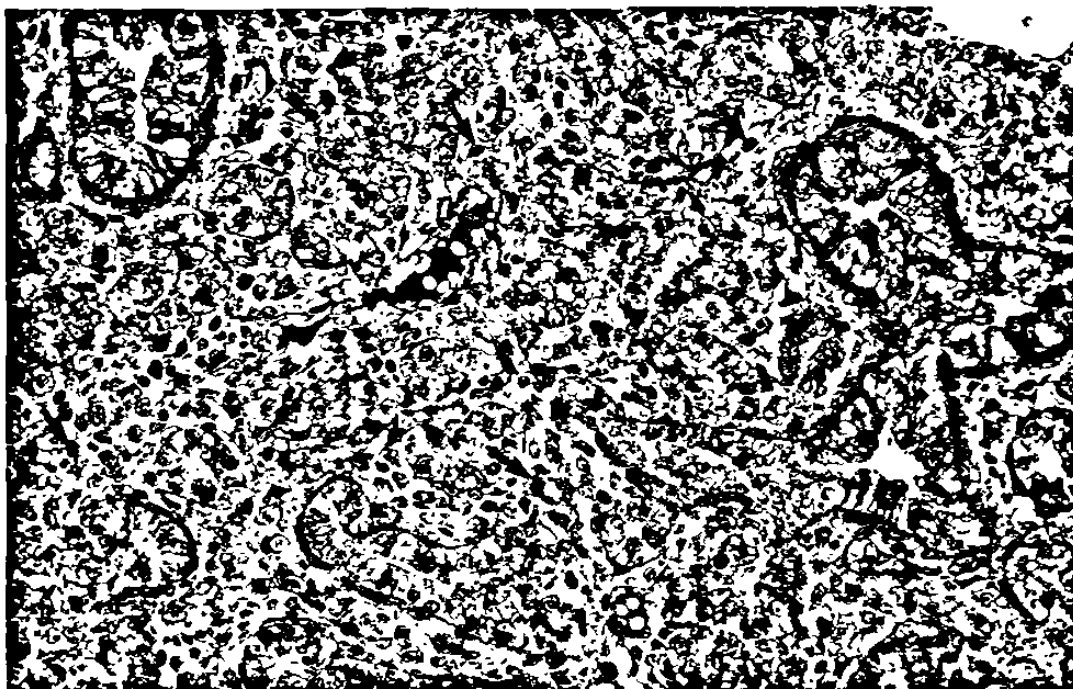


Figura 9. Corte histológico de pulmón fetal de ratón macho de 16 días de gestación. Las flechas indican los vasos sanguíneos en el parénquima pulmonar. 25X.

Tabla 10. Cuerpos multi-laminares en el pulmón de ratón en desarrollo.

Días de gestación	Cuerpos Multi-Laminares		
	Hembras	Machos	
17	143.52±6.85 (4.77)	109.72±5.84 (5.32)	*
18	101.56±6.13 (6.03)	83.98±4.69 (5.58)	*
RN	37.94±2.41 (6.35)	38.80±2.27 (5.85)	

Los valores corresponden a la  $\bar{x} \pm ES$  con  $n=90$  para los días 17 y 18 y  $n=135$  para RN. El número en los paréntesis es el coeficiente de variación de la media.

\*Los pulmones de las hembras son significativamente diferentes a los pulmones de los machos,  $p<0.05$  según la prueba t de Student.

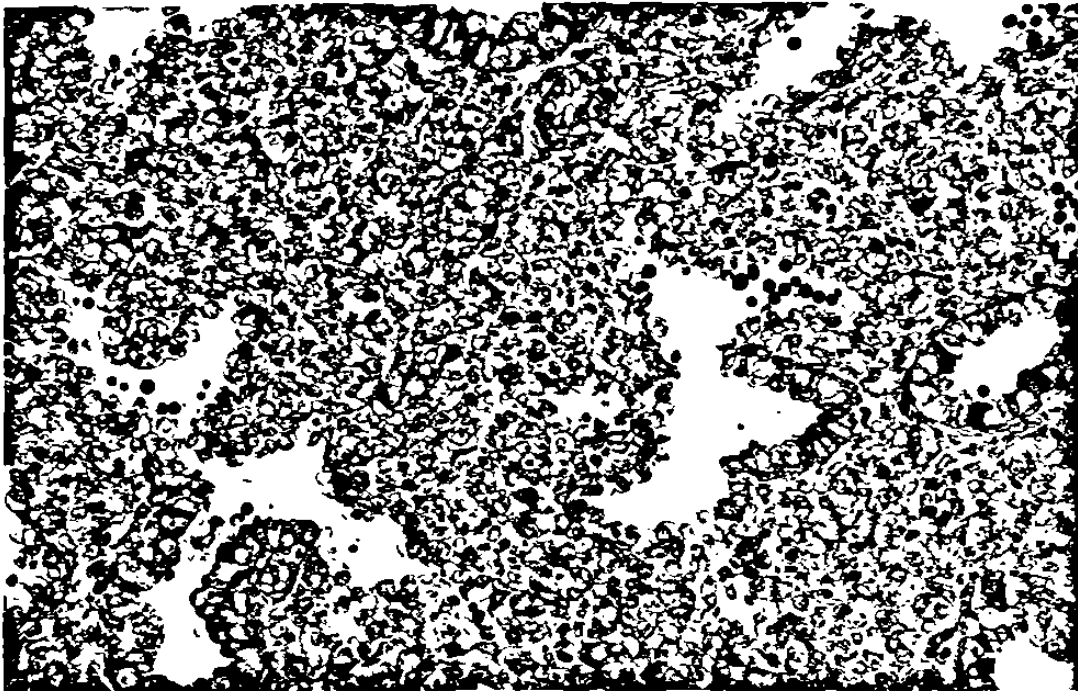


Figura 10. Cortes histológicos de pulmón fetal de ratón hembra (arriba) y macho (abajo) de 17 días de gestación. En el pulmón de hembra se observa mayor cantidad de espacios aéreos y más grandes que en el de macho. 25X.

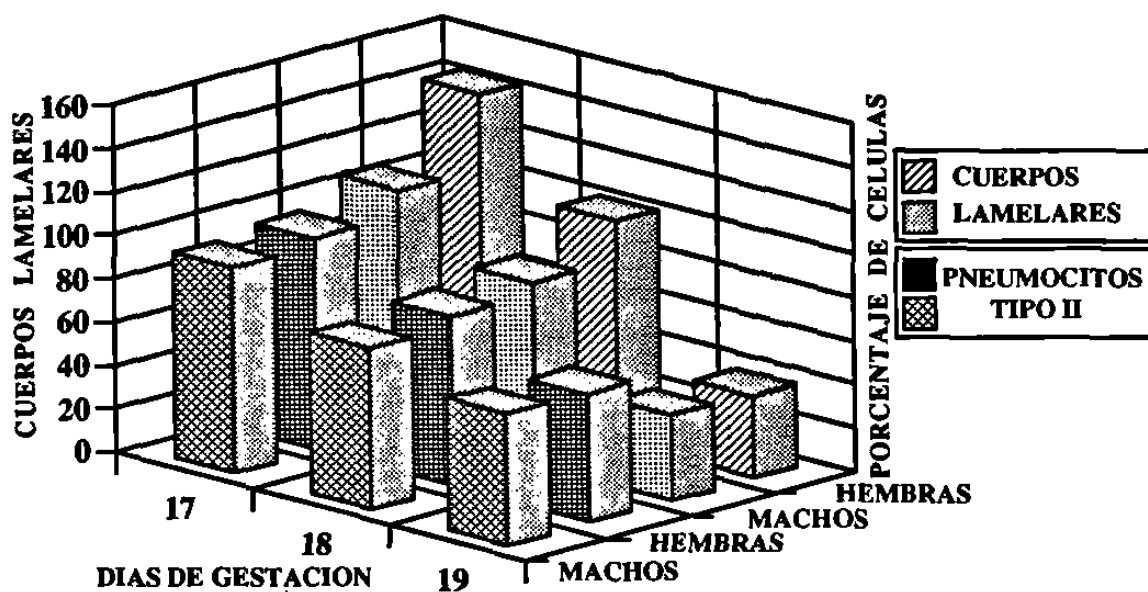


Figura 11. Pneumocitos tipo II y cuerpos multi-laminares durante el desarrollo del pulmón fetal de ratón. El día 19 corresponde a productos RN.

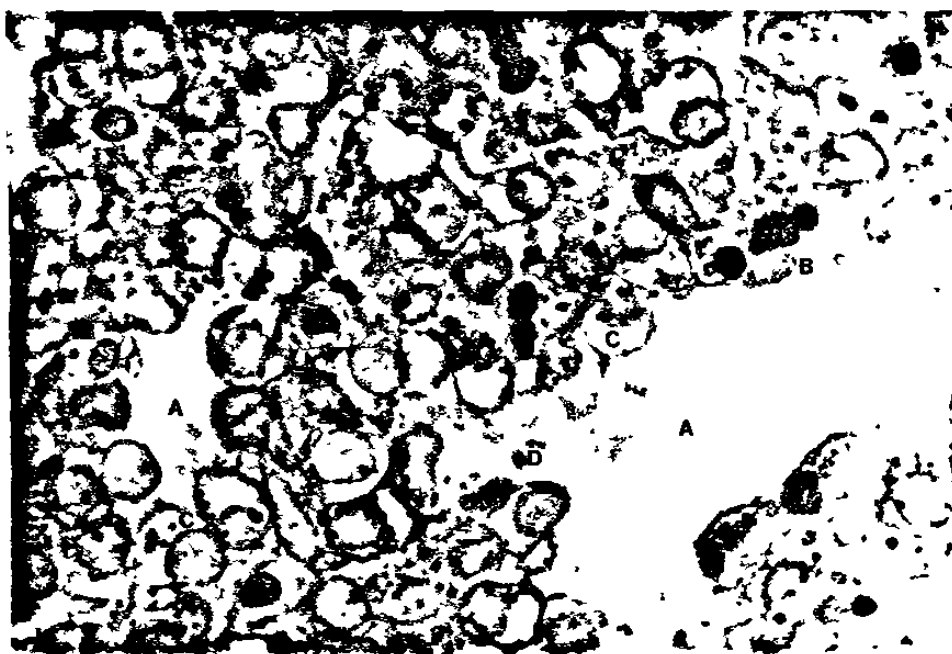


Figura 12. Corte histológico de pulmón fetal de ratón macho de 18 días de gestación. A) sáculos aéreos, B) pneumocitos tipo I, C) pneumocitos tipo II y D) Figuras mielínicas. 100X.



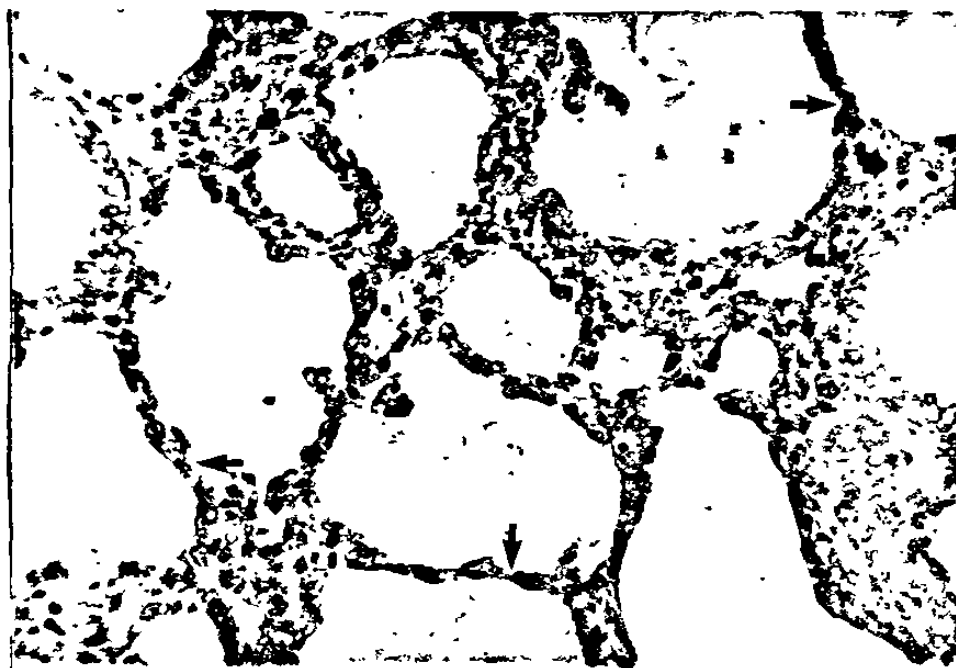


Figura 13. Corte histológico de pulmón fetal de ratón macho recién nacido. Las flechas indican los septos de tejido pulmonar adelgazados. 25X.

## Evaluación Bioquímica

### Proteínas

Una gráfica de las cantidades conocidas de albúmina y sus absorbancias (figura 14) representa la media de las rectas de calibración ( $n=11$ , y CV de la media  $<5\%$ ) realizadas en la medición de proteínas de los homogenados de tejido pulmonar con un valor medio de  $R^2=0.996$ .

La concentración de proteínas (mg de proteína/g de tejido húmedo) durante los últimos 3 días de gestación, en ambos sexos, están representados en la figura 15 y sus datos correspondientes en

la tabla 11. En el análisis de regresión múltiple no se encontró correlación entre la concentración de proteínas del pulmón fetal y el peso de los fetos en los últimos dos días de gestación y en RN tanto para hembras ( $p=0.33$ ) como para machos ( $p=0.34$ ), por lo que no hay un efecto del peso fetal sobre su cantidad de proteínas en el pulmón durante los últimos dos días de gestación y en RN.

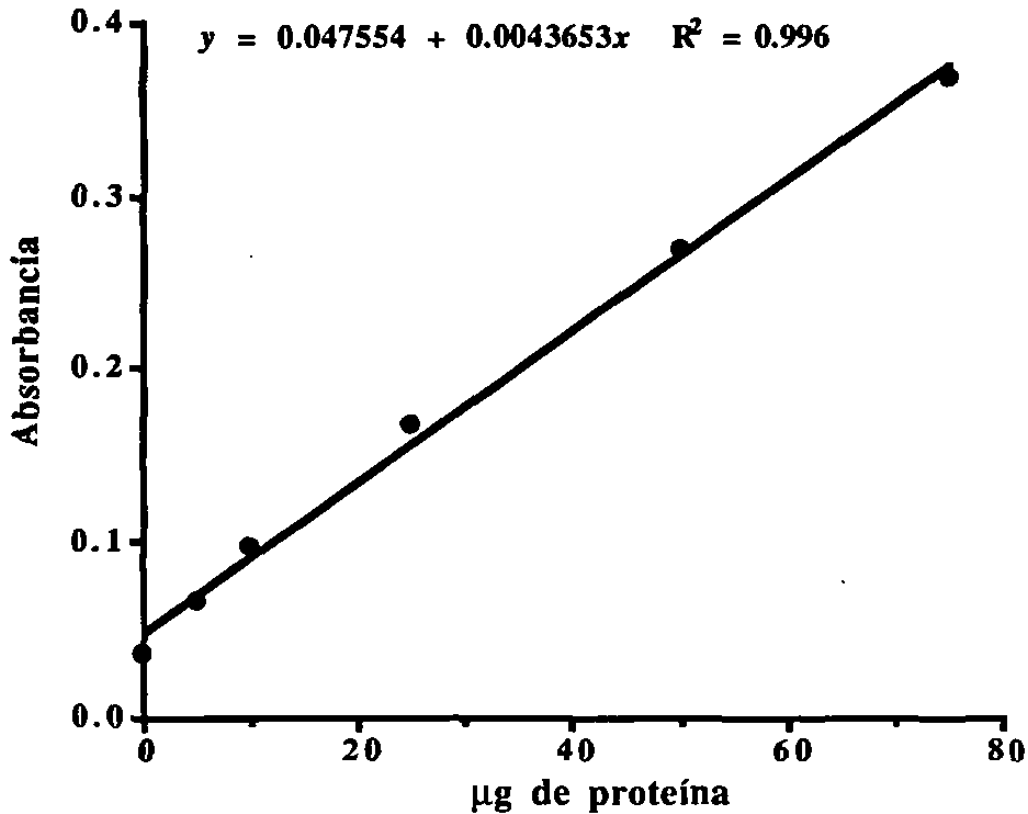


Figura 14. Gráfica promedio de las rectas de calibración ( $n=11$ ) empleadas para el cálculo de la concentración de proteínas cuyo coeficiente de variación de la media fue menor al 5%.

Tabla 11. Concentración de proteínas en el pulmón de ratón durante los últimos dos días de gestación y en RN.

Días de gestación	mg proteína/g tej. húmedo		n		% CV	
	$\bar{x} \pm ES$					
	HEMBRAS	MACHOS	HEMBRAS	MACHOS	HEMBRAS	MACHOS
17	8.44±0.58	8.63±0.30	6	11	6.90	3.54
18	7.92±0.74	7.94±0.99	5	5	9.35	12.54
RN	10.05±0.68	8.06±0.63	5	6	6.77	7.86

$\bar{x}$  = media, ES= error estándar, n= número de camadas, CV= coeficiente de variación de la media.

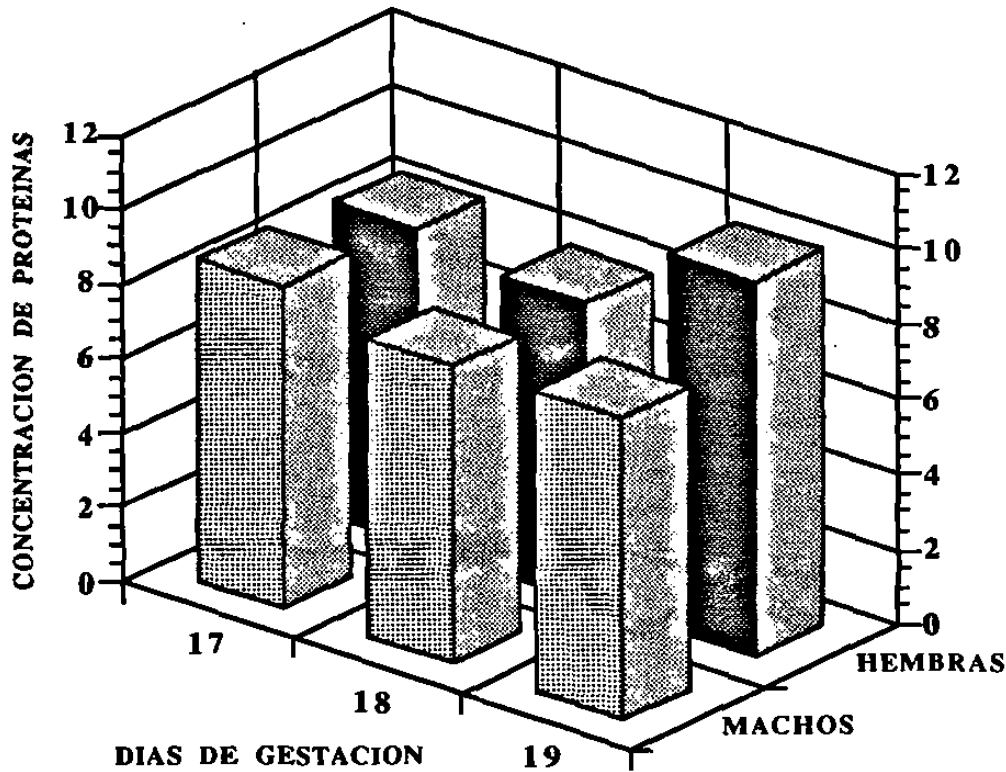


Figura 15. Concentración de proteínas en ambos sexos durante los últimos dos días de gestación. El día 19 corresponde a productos RN.

## Fosfolípidos

### Evaluación cualitativa

Los valores de los Rf de los fosfolípido extraídos y de la DPPC purificada observados por fluorescencia correspondieron a los valores de los Rf de los estándares lecitina y DPPC (0.61 y 0.52 respectivamente). El estándar de la DPPC y la DPPC purificada de los extractos de fosfolípidos no se revelaron con el segundo agente cromogénico (yodo) a diferencia de la fosfatidil colina y otros fosfolípidos los cuales se observaron con yodo, lo cual reafirma la pureza de la DPPC.

### Evaluación cuantitativa

La gráfica de las cantidades de fósforo y sus absorbancias (figura 16) representa una media de las rectas de calibración realizadas ( $n=8$  y CV de la media  $<5\%$ ) en la medición de fósforo inorgánico de las muestras de fosfolípido pulmonar, con un valor promedio de  $R^2=0.999$ .

La tabla 12 presenta los porcentajes de recuperación de fósforo de 5 cantidades de estándar de la DPPC cromatografiadas en alúmina, cuyo porcentaje de recuperación fue en promedio  $95\pm 2.14$  ( $\bar{X}\pm ES$ ) y coeficiente de variación de la media de  $2.26\%$ .

Los valores de los grupos repetitivos en cada una de las cuatro variables determinadas ( $\mu\text{mol}$  de fosfolípido total/g de tejido húmedo,  $\mu\text{mol}$  de fosfolípido total/mg de proteína,  $\mu\text{mol}$  de DPPC/g de tejido húmedo y  $\mu\text{mol}$  de DPPC/mg de proteína) dentro de cada día gestacional fueron rechazados como grupos homogéneos por el ANOVA de un factor, obteniéndose valores de  $p<0.01$ . Sin embargo, se encontró una alta correlación en el análisis de regresión múltiple entre los valores de las concentraciones de fosfolípidos y el peso de los fetos respectivos para los dos días de gestación analizados y en

RN ( $R^2 > 0.96$ ), como se observa en la tabla 13 rechazándose la Hipótesis nula ( $H_0$ ):  $B=0$  entre los dos días de gestación y en RN (B1, B2 y B3) y para cada variable a un 99% de confianza con valores de  $p < 0.01$ , lo cual indicó que las concentraciones de fosfolípidos y el peso de los fetos están relacionados linealmente. Todos los valores de las concentraciones de fosfolípidos (variable dependiente) se vieron afectados por su peso fetal correspondiente (la variable independiente) según otro análisis de regresión múltiple cuya  $H_0$  dice que los valores de Y no son afectados por los valores de X donde se obtuvieron valores de  $p < 0.01$ . Por lo tanto, las medias de los datos de cada grupo repetitivo fueron ajustados con el análisis de covarianza (un ejemplo de las medias de los grupos pertenecientes a dos variables ajustadas está en la tabla 14). Los datos ajustados tuvieron varianzas homogéneas según la prueba de Bartlett a un 95% de confianza.

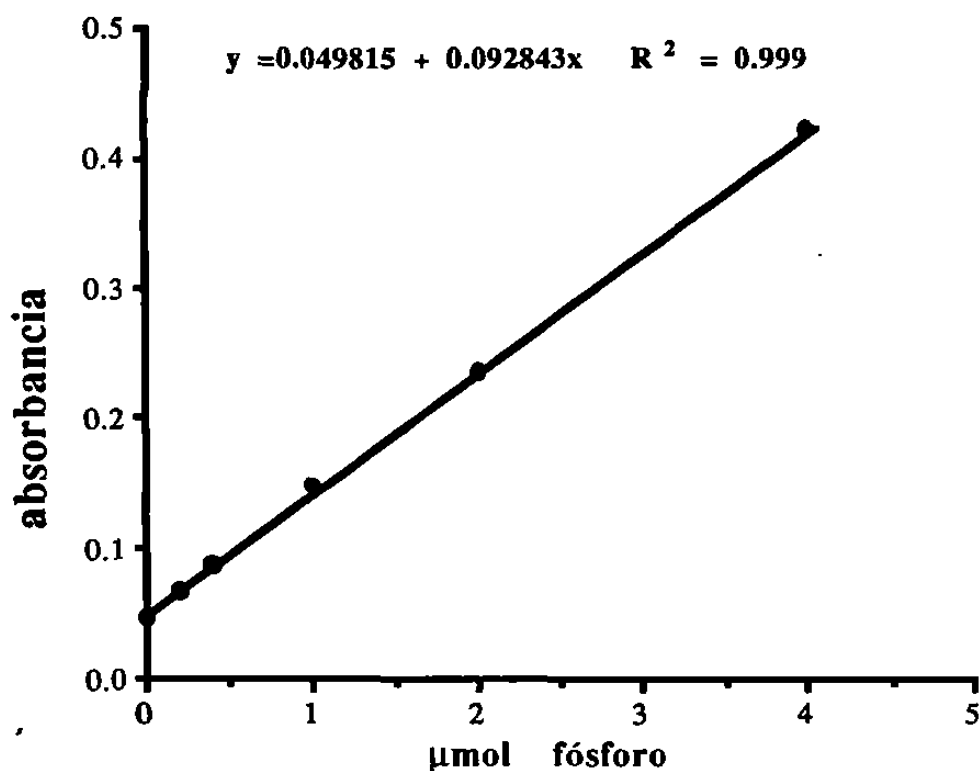


Figura 16. Media de las rectas de calibración ( $n=8$ ) empleadas para el cálculo de la concentración de fósforo inorgánico cuyo coeficiente de variación de la media fue menor al 5%.

Tabla 12. Evaluación del método de Masón con estándar de DPPC.

Fósforo depositado en $\mu\text{g}$	Fósforo recuperado de la columna en $\mu\text{g}$	Porcentaje de recuperación
0.25	0.24	96%
2.07	1.86	90%
2.14	2.11	99%
3.30	3.30	100%
4.00	3.60*	90%

\*corresponde a la media de 2 datos ó 2 columnas, las otras cantidades son de un dato de una columna.

Tabla 13. Valores de correlación entre concentraciones de fosfolípidos y pesos fetales de las cuatro variables analizadas.

VARIABLES	HEMBRAS			MACHOS		
	n	p	R <sup>2</sup>	n	p	R <sup>2</sup>
$\mu\text{mol FLT/g}$ tej. húmedo	16	0.000	0.997	21	0.000	0.988
$\mu\text{mol FLT/g}$ proteína	16	0.000	0.976	21	0.000	0.986
$\mu\text{mol DPPC/g}$ tej. húmedo	16	0.000	0.991	18	0.000	0.980
$\mu\text{mol DPPC/g}$ proteína	16	0.000	0.960	18	0.000	0.979

Los valores de "p" corresponden a un análisis de regresión múltiple donde  $H_0: B=0$  en los últimos dos días de gestación analizados y en productos RN.

Tabla 14. Valores de medias ajustados con el análisis de covarianza.

Días de gestación	HEMBRAS				MACHOS			
	$\mu\text{mol}$ FLT/mg prot	ajustado	$\mu\text{mol}$ DPPC/mg prot	ajustado	$\mu\text{mol}$ FLT/mg prot	ajustado	$\mu\text{mol}$ DPPC/mg prot	ajustado
17	1.56	1.45	0.19	0.25	1.14	1.10	0.15	0.20
	1.50	1.28	0.20	0.16	1.08	0.99	0.16	0.14
	0.97	1.14	0.09	0.09	1.11	0.90	0.15	0.09
	1.28	1.34	0.21	0.19	1.08	1.00	0.16	0.14
	1.47	1.49	0.29	0.28	0.95	1.20	0.22	0.25
	1.25	1.32	0.18	0.18	1.05	1.02	0.18	0.15
					0.92	1.06		
					1.17	1.04		
					1.08	1.02		
					1.03	1.06	0.12	0.17
18	2.12	1.70	0.56	0.43	1.42	1.46	0.35	0.35
	2.06	1.61	0.45	0.39	1.71	1.36	0.33	0.29
	1.33	1.59	0.32	0.37	1.39	1.32	0.31	0.27
	1.38	1.74	0.38	0.46	1.32	1.46	0.32	0.34
	1.45	1.69	0.37	0.43	1.11	1.36	0.22	0.29
RN	2.55	2.03	0.85	0.60	2.36	1.99	0.71	0.60
	2.21	2.22	0.71	0.71	2.17	1.97	0.66	0.59
	1.85	2.14	0.57	0.66	2.07	2.04	0.60	0.63
	1.76	1.83	0.43	0.50	1.96	2.04	0.66	0.63
	1.81	1.95	0.47	0.56	1.31	1.84	0.34	0.52

Cada dato corresponde a la media de un grupo experimental.

En la tabla 15 se muestra el porcentaje de DPPC presente en el total de fosfolípidos, aislado en cada día de gestación analizado y para ambos sexos.

Las diferencias tanto de la concentración de fosfolípido total como de la DPPC (en las cuatro variables) en los dos días analizados y RN fueron significativas de un día de gestación a otro con valores de  $p < 0.01$ , según el análisis de varianza y sin considerar el sexo (sus datos están en la tabla 16 y figura 17).

El análisis de varianza para saber el efecto de los factores sexo y día sobre las concentraciones de fosfolípidos indicó que hay diferencias significativas entre los valores ajustados de las cuatro

variables, tanto entre los sexos como en los dos días de gestación analizados y en RN ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, el ANOVA de un sólo factor indicó valores más específicos: en el día 17 las concentraciones de  $\mu\text{mol}$  de DPPC/g de tejido húmedo y  $\mu\text{mol}$  de DPPC/mg de proteínas son iguales entre hembras y machos, pero las concentraciones de  $\mu\text{mol}$  de fosfolípido total/g de tejido húmedo y  $\mu\text{mol}$  de fosfolípido total /mg de proteínas son diferentes entre los sexos, presentando las hembras concentraciones más altas que los machos ( $p < 0.01$ ). Durante el día 18 de gestación las concentraciones de las cuatro variables fueron significativamente diferentes entre los sexos ( $p < 0.01$ ), manteniendo los fetos hembra las concentraciones más altas. Por último en los RN las diferencias de concentraciones de fosfolípidos se presentaron solamente en dos variables:  $\mu\text{mol}$  de fosfolípido total/g de tejido húmedo y  $\mu\text{mol}$  de DPPC/g de tejido húmedo ( $p < 0.01$ ) donde aún prevalecieron las concentraciones más altas en los fetos hembra (tabla 17 y figura 18).

Un resumen de las diferencias sexuales encontradas en la concentración de fosfolípidos en el pulmón de ratón durante el último cuarto de su gestación está representado en la tabla 18.

Tabla 15. Porcentaje de DPPC presente en el total de fosfolípidos del pulmón fetal de ratón.

Días de gestación	HEMBRAS				MACHOS			
	n	$\mu\text{mol FLT/mg prot}$	$\mu\text{mol DPPC/mg prot}$	%	n	$\mu\text{mol FLT/mg prot}$	$\mu\text{mol DPPC/mg prot}$	%
17	6	$1.34 \pm 0.05$	$0.19 \pm 0.02$	14.50	11	$1.02 \pm 0.03$	$0.16 \pm 0.02^*$	14.86
18	5	$1.67 \pm 0.03$	$0.42 \pm 0.04$	24.90	5	$1.39 \pm 0.03$	$0.31 \pm 0.01$	22.13
RN	5	$2.04 \pm 0.07$	$0.61 \pm 0.08$	29.67	5	$1.97 \pm 0.03$	$0.59 \pm 0.02$	30.06

Los valores son la  $\bar{x} \pm \text{ES}$  de las repeticiones (n) que se hicieron en cada día de gestación. \* n=8.



Tabla 16. Concentración de fosfolípidos en el pulmón de ratón en los últimos dos días de gestación y en RN.

Días de gestación	n	$\mu\text{mol FLT/g}$ de tej. húmedo	$\mu\text{mol FLT/mg prot}$	n	$\mu\text{mol DPPC/g}$ de tej. húmedo	$\mu\text{mol DPPC/mg prot}$
17	17	9.714±0.288 (2.96)	1.135±0.044 (3.91)	14	1.443±0.148 (10.28)	0.172±0.016 (9.63)
18	10	11.766±0.360 (3.06)	1.529±0.050 (3.29)	10	2.831±0.158 (5.57)	0.362±0.021 (3.30)
RN	10	17.719±0.841 (4.75)	2.005±0.038 (1.88)	10	5.256±0.289 (5.50)	0.600±0.020 (3.32)

Los valores de las concentraciones son la  $\bar{x} \pm \text{ES}$  sin considerar el sexo de los fetos. El número en el paréntesis es el CV de la media.

Tabla 17. Diferencias sexuales en la concentración de fosfolípidos del pulmón fetal de ratón.

Días de gestación	$\mu\text{mol de FLT/g de tej. húmedo}$		$\mu\text{mol FLT/mg prot}$		$\mu\text{mol DPPC/g de tej. húmedo}$		$\mu\text{mol DPPC/mg prot}$	
	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho
17	10.93±0.33 (6)	9.05±0.22 * (11)	1.34±0.05 (6)	1.02±0.03 * (11)	1.5±0.27 (6)	1.36±0.17 (8)	0.19±0.03 (6)	0.15±0.02 (8)
18	12.75±0.18 (5)	10.78±0.25 * (5)	1.67±0.03 (5)	1.39±0.03 * (5)	3.20±0.15 (5)	2.46±0.14 * (5)	0.42±0.02 (5)	0.31±0.02 * (5)
RN	20.13±0.43 (5)	15.31±0.31 * (5)	2.04±0.07 (5)	1.97±0.04 (5)	5.91±0.36 (5)	4.60±0.17 * (5)	0.61±0.04 (5)	0.59±0.02 (5)

Los valores son la  $\bar{x} \pm \text{ES}$  de las repeticiones (n) que se hicieron en cada día de gestación. \* Los pulmones de las hembras son significativamente diferentes a los pulmones de los machos,  $p < 0.01$  según el ANOVA.

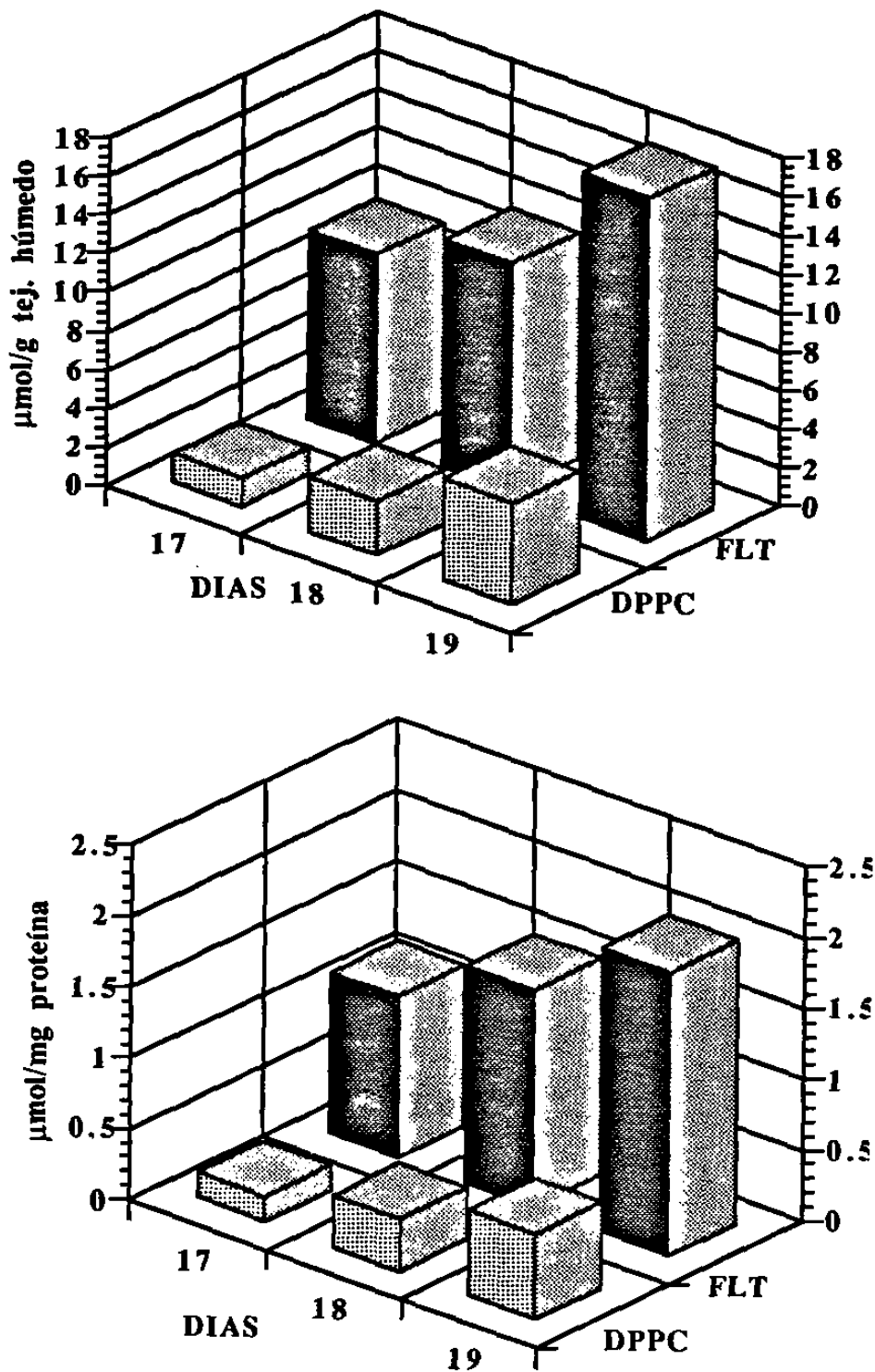


Figura 17. Concentración de fosfolípidos en el pulmón de fetos (sin considerar el sexo) en los últimos dos días de gestación. El día 19 corresponde a productos RN.

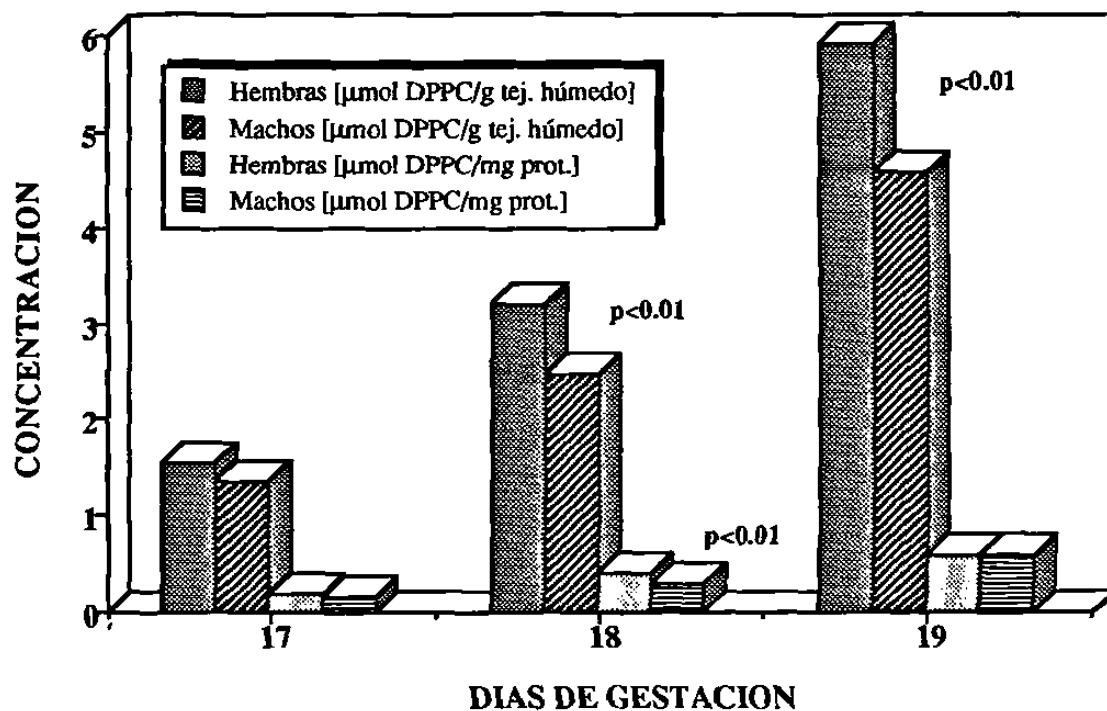
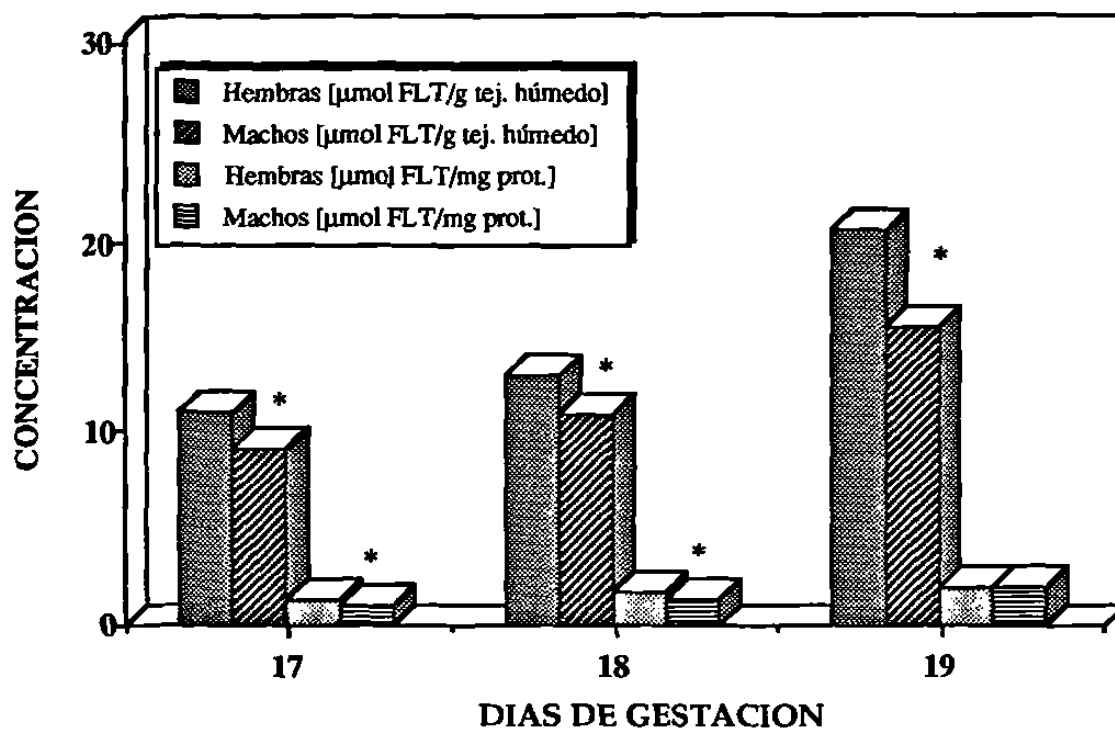


Figura 18. Diferencias sexuales en la concentración de fosfolípido total \* $p < 0.01$  (arriba) y de la DPPC (abajo) en el pulmón fetal de ratón. El día 19 corresponde a productos RN.

Tabla 18. Diferencias morfológicas y bioquímicas atribuibles al sexo durante el desarrollo del pulmón fetal de ratón.

VARIABLES	DIAS DE GESTACION				
	15	16	17	18	RN
Epitelio		*			
Endotelio				*	
Mesénquima			*	*	*
Indice E/M		*			
Pneumonocitos tipo II				*	
Cuerpos multi-laminares			*	*	
µmol Fosfolípido Total /g de tej.húmedo			*	*	*
µmol Fosfolípido Total /mg de proteínas			*	*	
µmol DPPC/g de tej.húmedo				*	*
µmol DPPC/mg de proteínas				*	

\*Diferencia significativa entre los sexos, con un valor de  $p < 0.05$ .

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

Estos resultados permiten confirmar la hipótesis propuesta, por lo que, existe un dimorfismo relacionado con el sexo en la última sexta parte del desarrollo del pulmón fetal del ratón albino, primero en la estructura histológica del pulmón y después en el contenido fosfolipídico, en donde el aumento de la concentración de la DPPC está correlacionado con el aumento de la síntesis y secreción de los cuerpos multi-laminares.

### **Peso, sexo y distribución de los fetos en el útero**

Se proporciona una gráfica de los pesos fetales y sus rangos de confiabilidad correspondientes a los últimos 5 días de gestación, sin embargo aunque existan curvas muy exactas para la determinación de la edad basándose en el peso fetal o embrionario, no resuelven el problema que hay cuando es necesario rechazar una camada de fetos que no cayeron dentro del rango de confianza de la edad esperada, por lo tanto, es preferible que se lleven a cabo ajustes de los datos cuando son numéricos, como fue el caso de este trabajo donde se encontró una correlación de las variables medidas (concentración de fosfolípidos) y el peso fetal de los ratones.

Aunque el sexo del feto fue estadísticamente independiente de su distribución en el útero, se encontró un 12% más de hembras y un 6% más de machos en el cuerno izquierdo que en el derecho, además hubo mayor producción de machos que de hembras en ambos cuernos con un total del 6% por arriba de las hembras.

Las diferencias significativas de pesos fetales entre los sexos encontradas en el día 18 de gestación fueron de un 2% más altas para el macho, algo menor al reportado por Watanabe y Endo (1988) y

Endo y Watanabe (1988) para la misma especie, cuya diferencia es de 5 a 6% más alto para el macho a término.

## **Morfología**

El porcentaje más alto en la distribución celular del parénquima pulmonar en desarrollo corresponde a las células mesenquimatosas, cuyo porcentaje varió de 51 a 63 y cuya proporción tiende a bajar al final de la gestación debido en parte al aumento proporcional de las células endoteliales, que van de 6 a 12% en la etapa canalicular del desarrollo pulmonar que ocurre entre los 16 y 18 días de gestación (Ten, 1981).

En los días 15 y 16 de gestación hubo un aumento en el porcentaje de las células epiteliales, donde se evidencía el crecimiento acelerado epitelial con respecto a los otros dos tipos celulares, y como también es reportado por Kauffman (1977b), hubo un descenso significativo hacia el día 18 que coincide con el estado de diferenciación a pneumocitos tipo I y II que inicia a finales del día 16 hasta el día 18 de gestación. Es en esta etapa donde las células mesenquimatosas alcanzan sus valores proporcionales más altos del 62% y 63% machos y hembras, respectivamente. Farrell (1982) identificó Pneumonocitos tipo II en el humano poco después de la mitad de su gestación (56%) y Lauweryns (1970) y Kotas (1979) los cuerpos multi-laminares poco antes de la mitad de gestación (46%), sin embargo en el ratón, (como se encontró en este trabajo) tanto los pneumocitos tipo II como los cuerpos multi-laminares se empiezan a observar entre el día 16 y 17 de gestación, esto es en el 85% de desarrollo o en el último séptimo de su gestación.

Sin embargo, los valores proporcionales encontrados en este trabajo, aún en el día del nacimiento del ratón no coinciden con los reportados para el pulmón de rata adulta (Weibel y Gil, 1977) en donde las células endoteliales representaron el porcentaje más alto

con respecto a los demás tipos celulares, lo cual indica que después del nacimiento seguirán ocurriendo cambios en la proporción celular del parénquima pulmonar del ratón.

### **Dimorfismo sexual**

La diferencia en la madurez del pulmón entre el sexo empieza con el disparo del crecimiento celular epitelial por parte de la hembra en el día 16 de gestación, con una mayor cantidad de estas células y por consiguiente una histología con mayor cantidad de tubos revestidos de epitelio; según Adamson y King (1984b) esto indica una temprana ramificación y formación de pequeños sáculos que más tarde se desarrollan en alveólos y, además se conoce que hay hormonas involucradas para estimular la diferenciación más rápidamente en la hembra, y que retardan la diferenciación en el macho (Adamson y King 1984b).

Para los siguientes días de gestación hasta el día del nacimiento la cantidad de células epiteliales de la hembra está en la misma proporción que la del pulmón de macho, lo cual indica que en un momento previo al día 17, después del disparo del crecimiento epitelial de la hembra, el pulmón de macho también experimenta el mismo fenómeno y vuelve a bajar para el día 17 de gestación.

Lo mismo podría suceder con las células endoteliales, ya que desde el día 17 de gestación la hembra empieza a desarrollar su sistema de conducción sanguíneo, pero no es sino hasta el día 18 de gestación que estas diferencias entre el sexo son significativas. El pulmón del macho también experimenta un disparo en el crecimiento celular endotelial del día 17 de gestación al 18, pero no alcanza los niveles celulares del pulmón de la hembra.

El comportamiento del mesénquima resultó más complicado: en el día 17 de gestación la hembra presentó una baja en el número

de células comparado con el pulmón del macho, lo cual probablemente indica un estado latente de división celular, que se vuelve a disparar en el día 18, superando significativamente el número de células del pulmón del macho y nuevamente en el día del nacimiento el pulmón de la hembra presenta una decaída en el número de células aún más drástico, quedando por debajo del nivel medio celular del mesénquima del pulmón del macho. Este fenómeno apenas se empieza a observar en el pulmón del macho para el día del nacimiento, en donde también baja el número de células en forma drástica.

La diferenciación de las células epiteliales la experimenta de igual forma primero la hembra desde el día 17, pero es estadísticamente significativa hasta el día 18. La disminución en el porcentaje de pneumonocitos tipo II hacia el día del parto se debe al incremento proporcional de los pneumonocitos tipo I, lo cual apoya la teoría del origen de los pneumonocitos tipo I por los pneumonocitos tipo II (Kauffman, 1980).

La cantidad de cuerpos multi-laminares en el citoplasma de los pneumonocitos tipo II también disminuyó en los productos RN, lo cual según se observó va correlacionado con el aumento de figuras mielínicas en los espacios alveolares (indicadores de la secreción del surfactante). Es conveniente hacer estos estudios tomando en cuenta los días medios de gestación (15.5, 16.5, 17.5 y 18.5), ya que muchos eventos que no se lograron observar pudieron haber ocurrido entre el tiempo que no se analizó y, entonces se podría explicar el comportamiento celular que se observa en el pulmón de hembras y no en el de machos.

La síntesis del surfactante en el ratón (demostrado por los cuerpos multi-laminares intracelulares y las figuras mielínicas en el pulmón) empieza a desarrollarse aproximadamente en el último 13% del desarrollo gestacional, lo cual coincide con la síntesis del surfactante en el humano (Kotas, 1982) y otros animales que inicia en el último 10-15% de la gestación.



El dimorfismo sexual morfológico en el ratón empieza en el último 16% de la gestación, cuando está terminando la etapa pseudoglandular. En la rata empieza en el último 14% de la gestación (Adamson y King, 1984a; 1984b; Torday, 1984a; Torday y Dow, 1984), también durante la etapa pseudoglandular. Pero en el humano empieza en el último 26% de la gestación (Dhanireddy y col., 1983; Naeye y col., 1974; Torday y Dow, 1984), aunque en este nivel el desarrollo pulmonar se encuentra en la etapa sacular.

### **Bioquímica**

La cromatografía en capa fina mostró la eficacia de la extracción por el método de Bligh y Dyer (1959), logrando identificar fosfatidilcolina, esfingomielina, colesterol y otros fosfolípidos. El método de Mason resultó óptimo para separar la DPPC de los demás fosfolípidos, como se demostró en la cromatografía en capa fina al ser observadas manchas fluorescentes con BBOT a luz ultravioleta, cuyos Rf correspondieron al Rf del estándar de la DPPC. Esta pureza fue demostrada al exponer el mismo cromatofolio con un segundo agente cromogénico (vapores de yodo) donde no se revelaron las manchas correspondientes a la DPPC que sí habían fluorescido con BBOT debido a que el yodo solo reacciona con dobles enlaces y la DPPC es saturada.

### **Dimorfismo sexual**

El porcentaje correspondiente a la DPPC del total de fosfolípidos en el pulmón fue aumentando con el tiempo, de 14.5% en el día 17 a 30% en los RN, y fue en el día 18 de gestación donde la hembra presentó un nivel de casi el 3% más alto de DPPC que los machos. Estas proporciones entre los sexos se nivelaron en el día del parto, presentando ambos sexos un 30% de contenido de DPPC en el total de fosfolípidos. Lo anterior soporta el reporte de Sanders (1982) donde menciona que el 60% de fosfatidilcolina (constituyendo de

fosfatidilcolina el 48% del total de fosfolípidos) es 1,2-dipalmitoil-3-*sn*-fosfatidilcolina, y que corresponde a un 29% de DPPC del total de fosfolípidos.

La diferencia de concentraciones de fosfolípido total y DPPC de un día a otro es muy significativa, lo que indica que en un día hay una extensa síntesis de fosfolípidos y también de DPPC que es superior al día anterior.

Aunque las concentraciones de fosfolípidos fueron significativamente mayores en la hembra desde el día 17 de gestación, parece que la DPPC la empiezan a sintetizar en una forma proporcional entre los sexos y es hacia el día 18 cuando la hembra ejerce un disparo en la síntesis de DPPC sobrepasando las concentraciones contenidas en los pulmones de los machos, volviéndose a nivelar ambos sexos en el día del parto.

Nuevamente es demostrado ahora con análisis bioquímicos que la síntesis del surfactante en el pulmón de ratón empieza entre el día 16 y 17 de gestación, es decir entre el último 11-16% de su desarrollo gestacional.

En conclusión el dimorfismo sexual inicia en el día 16 de gestación y termina en el día del parto, siendo más marcado en el día 18 de gestación, en donde la hembra se ve favorecida en la organogénesis en los siguientes puntos:

- Número de células epiteliales superior al macho en el día 16 de gestación.
- Número de células endoteliales superior al macho en el día 18 de gestación.
- Maduración de pneumocitos tipo II en mayor proporción que el macho en el día 18 de gestación.
- Mayor cantidad de cuerpos multi-laminares que el macho en los días 17 y 18 de gestación.

- Mayor cantidad de fosfolípido que el macho en los días 17 y 18 de gestación y en los productos RN.
- Mayor cantidad de 1,2-dipalmitoil-3-*sn*-fosfatidilcolina que el macho en el día 18 de gestación y en los productos RN.

Es la primera evidencia de una diferencia morfológica y bioquímica relacionada con el sexo durante el desarrollo normal del pulmón fetal de ratón. La desventaja encontrada en el macho de esta especie coincide con lo reportado para otras especies. Esto se correlaciona con las observaciones realizadas en el humano, donde los productos masculinos tienen una incidencia del Síndrome de Dificultad Respiratoria superior al de los productos femeninos.

### **Perspectivas**

Este dimorfismo sexual en el desarrollo del pulmón en el ratón, debe tenerse en cuenta en el diseño de los experimentos donde es utilizado como modelo, ya que los efectos observados en la hembra son diferentes a los observados en el macho por el dimorfismo en el desarrollo de sus pulmones.

## RESUMEN

El surfactante pulmonar es de gran importancia para mantener la estabilidad del pulmón en la respiración. Su insuficiencia cualitativa y cuantitativa en el momento del nacimiento, conduce a la incapacidad mecánica para mantener la estabilidad pulmonar, un buen intercambio gaseoso y por consiguiente a la aparición del Síndrome de Dificultad Respiratoria (SDR), cuyo riesgo de presentación aumenta inversamente con la madurez gestacional del pulmón, y la incidencia más alta se da cuando el nacimiento ocurre entre las semanas 31 y 37 de la gestación. El índice de mortalidad debida al SDR del recién nacido es significativamente más alto en productos masculinos que en femeninos, aún con el tratamiento con glucocorticoides empleados para acelerar el desarrollo pulmonar.

En el presente trabajo se realizaron estudios morfométrico y bioquímico, comparativos del desarrollo del pulmón fetal de ratón de diferentes sexos durante la última sexta parte de su gestación. En el estudio morfométrico se evaluó la composición celular, la evolución de la proliferación celular y la citodiferenciación. En el estudio bioquímico se determinó la concentración de la dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC, principal componente del surfactante pulmonar) así como del contenido en el pulmón de fosfolípido total, y proteínas. El tejido pulmonar fetal de ratón albino (cepa CD-1) se procesó por la técnica de microscopía electrónica para el estudio morfométrico (15-18 días de gestación y en productos RN), en el cual se tomaron como índices de diferenciación: el porcentaje de pneumocitos tipo 2, la cantidad de cuerpos multilaminares, células epiteliales, endoteliales y mesenquimatosas. En el estudio bioquímico se determinó la cantidad de proteínas al homogenado del tejido pulmonar según Lowry y col. (1951). Los fosfolípidos se extrajeron selectivamente (Bligh y Dyer, 1959) y la DPPC se aisló de manera cuantitativa (Mason y col., 1976). La pureza del fosfolípido aislado se verificó mediante cromatografía en capa fina. La concentración de fosfolípido total y de la DPPC se

determinó midiendo fósforo por el método de Bartlett (1958). Los resultados se sometieron a análisis estadísticos.

Los resultados morfométricos mostraron diferencias en la composición celular del pulmón a partir de los días 16 al 18 de gestación y en los productos RN. Las diferencias más marcadas se presentaron el día 18, en el cual las hembras mostraron mayor cantidad de células endoteliales, células del mesénquima y pneumocitos tipo 2, y estos últimos un mayor número de cuerpos multi-laminares en su citoplasma. Los resultados bioquímicos mostraron concentraciones de la DPPC y de fosfolípido total más altas en hembras que en machos en los días 17 y 18 de gestación y en los productos RN. Estos resultados permiten afirmar que existen diferencias morfológicas y bioquímicas en el desarrollo del pulmón fetal de ratón atribuibles al sexo, siendo favorecida la organogénesis y madurez bioquímica en la hembra.

## LITERATURA CITADA

- Adamson, I. and G. M. King. 1984a. Sex-related differences in cellular composition and surfactant synthesis of developing fetal rat lungs. *Am. Rev. Respir. Dis.* 129: 130-134.
- , 1984b. Sex differences in development of fetal rat lung. II. quantitative morphology of epithelial mesenchymal interactions. *Lab. Invest.* 50: 461-468.
- Ballard P. L., R. A. Ballard, J. P. Granberg, S. Sniderman, P. D. Gluckman, S. L. Kaplan and M. M. Grumbach. 1980. Fetal sex and prenatal bethametasone therapy. *J. Pediatrics.* Vol. 97, No. 3, pp. 451-454.
- Bartlett G. R. 1958. Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.* Vol. 234, No. 3 466-468.
- Bligh, E. and W. J. Dyer. 1959. A rapid method of lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.
- Burri, P. H. and E. R. Weibel. 1977. Ultrastructure and morphometry of the developing lung. In: *Development of the lung. Lung biology in health and disease.* W. A. Hodson. ed. Marcel Dekker, Inc., New York. 6:215-268.
- Daniel, W.W.1985. Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud. Ed. Limusa. pp. 121-125 y 140-142.
- Dhanireddy, R., Y. F. Smith, M. Hamosh, D. K. Mullon, J. W. Scalon and P. Hamosh. 1983. Respiratory distress syndrome in the newborn: relationship to serum prolactin, thyroxine, and sex. *Biol. Neonate.* 43: 9-15.

- Endo, A. and T. Watanabe. 1988. Interlitter variability in fetal body weight in mouse offspring from continuous, overnight, and short-period matings. *Teratology*. 37: 63-67.
- Engle, M. J. 1982. Cellular and subcellular sites of lung lipid metabolism. In: Farrel, P. M. (editor). *Lung development: biological and clinical perspectives*. Academic Press. 1: 239-258.
- Epstein, M. F., and Farrell, P. M. 1975. The choline incorporation pathway: Primary mechanism for *de novo* synthesis in fetal primate lung. *Pediatr. Res.* 9: 658.
- Farrell, P. M. and M. E. Avery. 1975. Hyaline membrane disease. *Am. Rev. Resp. Dis.* 3: 657-688.
- Farrell, P. M. and Kotas, R. V. 1976. The prevention of hyaline membrane disease: New concepts and approaches to therapy. *Adv. Pediatr.* 23: 213-269.
- Farrell, P. M. 1982. *Lung development: biological and clinical perspectives*. Academic Press. 1:13-25
- Georke, J. 1974. Lung surfactant. *Biochim. Biophys. Acta.* 334: 241-261.
- Gluck, L. and Kulovich, M. V. 1973. Fetal lung development. *pediatr. Clin. North. Am.* 20: 367-379.
- Gross, I. and C. M. Wilson. 1983. Fetal rat lung maturation: initiation and modulation. *J. Appl. Physiol: Environ. Exercise Physiol.* 55 (6): 1725-1732.

- Kauffman, Shirley L. 1975. Kinetics of pulmonary epithelial proliferation during prenatal growth of the mouse lung. *Anat. Rec.* 183: 393-404.
- \_\_\_\_\_. 1977a. Acceleration of canaliculo development in lungs of fetal mice exposed transplacentally to dexamethasone. *Lab. Invest.* 36 (4): 395-401.
- \_\_\_\_\_. 1977b. Proliferation, growth, and differentiation of pulmonary epithelium in fetal mouse lung exposed transplacentally to dexamethasone. *Lab. Invest.* 37 (5): 497-501.
- \_\_\_\_\_. 1980. Cell proliferation in the mammalian lung. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 22: 131-91.
- Kay, H. H. and J. C. Hoboins. 1984. Correlation of amniotic fluid estrogens with L/S ratios and urinary estriols. *J. Rep. Med.* 29(4): 222-226.
- Kessler, D. L., W. E. Truog, J. H. Murphy, S. Palmer, T. A. Standaert, D. E. Woodrum, and A. Hodson. 1982. Experimental hyaline membrane disease in the premature monkey effects of antenatal dexamethasone. *Am. Rev. Respir. Dis.* 126: 62-69.
- Khosla S. S. and S. A. Rooney. 1979. Stimulation of fetal lung surfactant production by administration of 17-estradiol to the maternal rabbit. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 133: 213-216.



- King, R. J. 1984. Isolation and chemical composition of pulmonary surfactant. In: Robertson, B., Van Golde, L. M. G. and Batenburg, J. J.(Editors). *Pulmonary surfactant*. Elsevier Science Publishers B. V. 1: 1.
- Kotas, R. V. 1979. Surface tension forces and liquid balance in the lung. In "Neonatal pulmonary care" (D. W. Thibeault y G. A. Gregory, ed.), pp. 35-53. Addison-Wesley, Menlo Park, California.
- Kotas, R. V. 1982. Physiology assessment of lung surfactant. In: Farrel, P. M. (editor). *Lung development: biological and clinical perspectives*. Academic Press. 1: 57-86.
- Kotas, R. V. and M. E. Avery. 1980. The influence of sex on fetal rabbit lung maturation and on the response to glucocorticoid. *Am. Rev. Res. Dis.* 121: 377-380.
- Lauweryns, J. M. 1970. "Hyaline membrane disease" in newborn infants. Macroscopic, radiographic, and light and electron microscopic studies. *Hum. Pathol.* 1: 175-191.
- Liggins, G. C. 1969. Premature delivery of fetal lambs infused with glucocorticoids. *J. Endocr.* 45: 515-523.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folio phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265.
- Mason, R. J., J. Nellenbogen, and J. A. Clements. 1976. Isolation of disaturated phosphatidylcolina with osmium tetroxido. *J. Lipid Res.* 17: 281-284.

- Moawad, A. H., L. P. River and Chin Chu Lin. 1985. Estrogen increases-adrenergic binding in the preterm fetal rabbit lung. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 151: 514-519.
- Naeye, R. L., R. K. Freeman, and W. A. Blanc. 1974. Nutrition, sex and fetal lung maturation. *Pediat. Res.* 8: 200-204.
- Nielsen H. C. and J. S. Torday. 1985. Sex differences in avian embryo pulmonary surfactant production: evidence for sex chromosome involvement. *Endocrinology.* 117(1): 31-37.
- Papageorgiou A. N., E. Colle, E. Farri-Kostopoulos and M. M. Gelfand. 1981. Incidence of respiratory distress syndrome following antenatal betamethasone: role of sex, type of delivery, and prolonged rupture of membranes. *Pediatrics.* Vol. 67, No. 5, pp. 614-616.
- Sanders, R. L. 1982. The chemical composition of the lung and the composition of pulmonary surfactant. In: Farrel, P. M. (editor). *Lung development: biological and clinical perspectives.* Academic Press. 1: 179-210.
- Snyder, J. M., K. J. Longmuir, J. M. Johnston, and C. R. Mendelson. 1983. Hormonal regulation of the synthesis of lamellar body phosphatidylglycerol and phosphatidylinositol in fetal lung tissue. *Endocrinology.* 112: 1012-1018.
- Spellacy, W. N., W. C. Buhi, F. C. Riggall and K. L. Holsinger. 1973. Human amniotic fluid lecithin/sphingomyelin ratio changes with estrogen or glucocorticoid treatment. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 115(2): 216-218.
- Steel, R. G. y J. H. Torrey. 1988. *Bioestadística. principios y procedimientos.* Segunda edición. MacGraw-Hill. pp. 392-441.

- Strang, L. B. 1977. Morphology of lung development. In: Neonatal respiration physiological and clinical studies. Ed. Blackwell Scientific Publications. 1-19.
- Taylor, P. M. 1971. Insuficiencia respiratoria en el neonato. En: Clínicas Obstétricas y Ginecológicas. Biología Perinatal. Interamericana. 763-789.
- Ten, Have-Opbroek A. 1981. The development of the lung in mammals: An analysis of concepts and findings. *Am. J. Anat.* 162: 201-219.
- Torday, J. S., H. C. Nielsen, M. Fencel and M. E. Avery. 1981. Sex differences in fetal lung maturation. *Am. Rev. Respir. Dis.* 123: 205-208.
- Torday, J. S. 1984a. The sex difference in type II cell surfactant synthesis originates in the fibroblast *in vitro*. *Experimental Lung Research.* 7: 187-194.
- \_\_\_\_\_. 1984b. Dihydrotestosterone inhibits fibroblast-pneumocyte factor-mediated synthesis of saturated phosphatidylcolina by fetal rat lung cells. *Biochimica et Biophysica Acta.* 835: 23-28.
- Torday, J. S. and K. E. Dow. 1984. Synergistic effect of triiodothyronine and Dexamethasone on male and female fetal rat lung surfactant synthesis. *Dev. Pharmacol. Ther.* 7: 133-139.
- Torday, J. 1986. Dihydrotestosterone (DHT) Uncouple cell interactions in developing lung progress in development biology, Part B. 425-428.

- Truog, W. E., D. L. Kessler, S. Palmer, J. Murphy, D. E. Woodrum and W. A. Hodson. 1981. Differential effect of sex in experimental hyaline membrane disease in newborn monkeys. *Am. Rev. Respir. Dis.* 124: 435-439.
- Velásquez, B. J. and J. Sepúlveda. 1982. Influence of transplacental NA-872 and dexamethasone therapy on fetal and newborn mouse lung. *Respiration.* 43: 389-400.
- Watanebe, T. and Endo. 1988. Digit development and embryonic weight in mice: analysis of sex-related time difference and mating period-related interlitter variability. *Teratology.* 38: 157-163.
- Weibel, E. R., and Gil, J. 1977. Structure-function relationships at the alveolar level. In "Bioengineering Aspects of the Lung" (J. B. West, ed.), p. 1. Dekker, New York.
- Zar, J. H. 1984. *Biostatistical Analysis*. Second Edition. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, N. J. 181-183.
- Zimmermann, B., J. Barrach, J. Merker and N. Hinz. 1984. Basement membrane formation and lung cell differentiation in vitro. *European J. of Cell Biology.* 36: 66-73.

