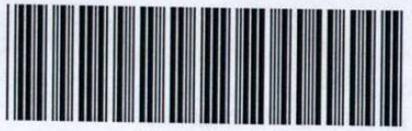


**" ESTUDIO INMUNOHISTOQUIMICO DE LOS RESEPTORES ESTROGENICOS
EN EL PULMON FETAL DEL RATON ALBINO
MUS - MUSCULUS "**

M.C.P. JORGE HOMERO MONTEMAYOR HINOJOSA

TM
RG60
M6
c.1



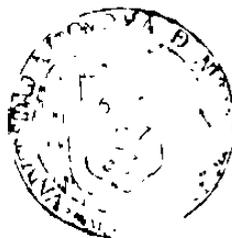
1080071356



DUPLICADO



BIBLIOTECA



BIBLIOTECA

A MIS PADRES:

Por el apoyo
desinteresado que
me permitió llegar
hasta aquí.

A MIS ASESORES:

Por el empeño puesto en la
realización de este trabajo
que gracias a su valiosa
cooperación ha llegado a su
culminación.

BURAI RANGELITA
UANL
FONDO
TESIS MAESTRIA

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA
SUBDIRECCION DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS DE POST-GRADO

"ESTUDIO INMUNOHISTOQUIMICO DE LOS RECEPTORES ESTROGENICOS
EN EL PULMON FETAL DEL RATON ALBINO
MUS-MUSCULUS"

"TESIS QUE EN OPCION AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS"

ESPECIALIDAD: MORFOLOGIA

PRESENTA: M.C.P. JORGE HOMERO MONTEMAYOR HINOJOSA.

MONTERREY, N.L.

ABRIL DE 1988

NOMBRE DEL ASESOR: M.C.P. Y PhD. JULIO SEPULVEDA SAAVEDRA

LUGAR DONDE SE DESARROLLO EL TRABAJO: FÁCULTAD DE MEDICINA

DE LA U.A.N.L. DEPTO. DE HISTOLOGIA.

INSTITUCION QUE LA AUSPICIO: U.A.N.L. Y S.E.P. CONVENIO 84010090.

I N D I C E

CONTENIDO	PAGS.
Introducción	1
Hipótesis de Trabajo	6
Material y Métodos	7
Resultados	10
Discusión	16
Resumen	20
Cuadros, Tablas y Figuras	22
Bibliografía	33

I N T R O D U C C I O N

La caracterización de la Biología del desarrollo del pulmón fetal ha sido objeto de intensa investigación en años recientes (1, 2, 3, 4). La principal motivación para esto, deriva de la existencia de la entidad clínica conocida como: "Síndrome de Dificultad Respiratoria del Recién Nacido" (SDR), una de las principales causas de muerte en recién nacidos prematuros sin malformaciones (5, 6, 7, 8). Esta patología resulta de una maduración pulmonar incompleta con producción insuficiente del FACTOR SURFACTANTE ANTI-ATELECTASIA, elemento cuya presencia es esencial para facilitar la distensión inicial de los pulmones del recién nacido (9, 10, 11, 12). Este se encuentra localizado en la interfase aire-líquido, provee una baja y variable tensión superficial e imparte una curva característica a esta interfase, disminuye la presión necesaria para distender el pulmón y mantiene la estabilidad en un rango amplio de volúmenes locales de llenado.

El factor surfactante consiste en un complejo fosfolipídico cuya composición se muestra en el cuadro número 1 (12, 13). Desde el punto de vista histopatológico la lesión presente en el SDR consiste en la aparición de membranas acidófilas que se encuentran en las paredes de los alveolos, no hay el intercambio adecuado del oxígeno y se produce el colapso alveolar (5, 6).

Las investigaciones efectuadas hasta la fecha han demostrado que las hormonas corticoesteroides y la tiroxina influyen acelerando la maduración pulmonar (4, 5, 6, 7, 8, 9).

También existen datos de tratamiento prenatal con glucocorticoides en la madre para la prevención del SDR en niños prematuros, por lo que se sabe que el tratamiento con corticoesteroides acelera la maduración pulmonar y eso justifica su aplicación en la prevención del SDR (14, 15, 16, 17).

En un estudio realizado por Dhanireddy, et al (18) sobre recién nacidos que presentaban SDR, se midieron niveles de tiroxina y prolactina demostrados por radioinmunoanálisis encontrándose cambios significati-

vos en las cantidades encontradas: Los niños sanos presentaban niveles de prolactina y tiroxina altos en sangre del cordón umbilical, en cambio los niños que presentaban el SDR tenían los niveles significativamente más bajos que los normales, y de estos los masculinos eran los que tenían los índices medios más bajos existentes. Existen evidencias preliminares de que la producción del surfactante es estimulada por la tiroxina, aminofilina y prolactina en los pulmones fetales de los conejos (18). Por otra parte, se ha observado que la incidencia de morbilidad y mortalidad del SDR es más alta en los varones que en las hembras en una relación de 3:1 y que la respuesta al tratamiento con corticoesteroides es diferente, siendo más efectiva en el sexo femenino. Naeye, et al (19), menciona que los pulmones de los productos del sexo femenino maduran más rápido que los pulmones del sexo masculino y que la enfermedad de las membranas hialinas es por lo tanto, más común en niños que en niñas.

Los estudios experimentales sobre el efecto de los esteroides sexuales en la determinación de estas diferencias,

es de controversia. Así se ha sugerido que el efecto se puede deber a una acción inhibitoria de los andrógenos - fetales sobre la síntesis del surfactante, aunque el mecanismo de este efecto inhibitorio no se ha determinado (20).

Thuresson (21) reporta en su artículo que los estrógenos actúan promoviendo la síntesis de dipalmitoilfosfatidilcolina y aumentan la formación de cuerpos lamelares (Organelos de almacén intracelular del factor surfactante) y la secreción del surfactante a través de un efecto indirecto relacionado con la activación ó la expresión de los receptores beta-adrenérgicos.

Durante el embarazo la placenta sintetiza grandes cantidades de estrógenos, aumentando la concentración de hormonas circulantes en los compartimientos materno y fetal particularmente al final de la gestación. Se ha reportado por Khosla (22) que la administración de 17 beta-estradiol a las conejas embarazadas estimula la producción del factor surfactante del pulmón de sus fetos, presentando aumento en los niveles del índice Lecitina/Esfingomielina.

Spellacy (23) hace hincapié en que el tratamiento con estrógenos en humanos no modificó la relación Lecitina/Es-fingomielina del líquido amniótico. En este artículo no se considera la posibilidad de que no traspase la barrera placentaria el compuesto empleado.

Se ha reportado la existencia de receptores a hormonas -estrogénicas en el pulmón de la rata adulta y en el pulmón fetal de hamster mediante estudios bioquímicos (24) Sin embargo no se ha investigado la existencia de receptores estrogénicos en forma sistemática durante la gestación en algún modelo animal; comparando los hallazgos -entre los sexos y considerado la posibilidad de que existan diferencias en las cantidades de receptores presen--tes entre ambos sexos.

H I P O T E S I S D E T R A B A J O

Debido a que la cantidad de hormonas estrogénicas que --
circula es igual en los cordones umbilicales de los pro-
ductos de ambos sexos y, la maduración pulmonar es mas -
rápida en las hembras y las enfermedades por maduración
insuficiente son mas frecuentes en los varones, se plan-
tea la posibilidad de que existan en el tejido pulmonar
fetal de los productos del sexo femenino, unas protefñas
capaces de ligar a las hormonas estrogénicas (Receptores
estrogénicos) que se encuentran circulando desde la ma--
dre al producto y/o que son producidas por la placenta.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

A.- Obtención de Pulmones. Para este trabajo se utilizaron ratonas albinas cepa CDI, de edad gestacional -- previamente conocida, a partir del día 15 de la gestación y hasta el día del parto. Para la obtención de los productos se sacrificaron por inhalación de cloroformo 5 hembras preñadas por cada día gestacional procediéndose a extraer los fetos (aproximadamente 12 fetos por camada).

La identificación del sexo se llevó a cabo mediante la observación directa de las gónadas bajo el microscopio estereoscópico.

Posteriormente se extrajeron los pulmones separándose los machos de las hembras.

Se congelaron en isopentano con nitrógeno líquido a una temperatura de -100°C , y se pasaron a un criostatato para su ulterior sección obteniéndose cortes de 5 micras de grosor.

Se verificó los correcto de la congelación con tinciones de hematoxilina y eosina.

B.- Técnica Inmunohistoquímica empleada para demostrar la presencia de los receptores estrogénicos:

- 1.- Incubación de los cortes con polifosfato de estradiol (Ayerst) 1 hora
- 2.- Lavado para remover el estrógeno no ligado 15 min.
- 3.- Incubación con un anticuerpo antiestrógeno (Calbiochem) o 1er. anticuerpo. 30 min.
- 4.- Lavado en buffer de Fosfato pH7, 4 para remover -- depósito inespecífico 15 min.
- 5.- Incubación con anticuerpo anti-antiestrogeno (Calbiochem) marcada con peroxidasa de rábano (2° anticuerpo). 30 min
- 6.- Lavado buffer de Fosfato pH7, 4 para remover depósito inespecífico. 15 min.
- 7.- Demostración de los depósitos de peroxidasa con la 3'3 diaminobencidina como sustrato (SIGMA) y - - H_2O_2 .

Las laminillas se observaron al microscopio de campo claro (Carl Zeiss) y se fotografiaron muestras representativas. De cada laminilla se llevó a cabo una cuenta porcentual, contándose 100 células epiteliales y 100 células mesenquimatosas de 5 campos distintos obtenidos al azar, anotándose el número de células positivas. Se usó en cada trabajo un testigo positivo que consistió en un

corte de útero de ratona virgen y como controles se utilizaron cortes del mismo pulmón en los que o bien se omitió la incubación con el estradiol o el anticuerpo anti-antiestradiol, o se incubaron con un antiestrógeno conocido como Tamoxifen.

C.- Análisis de Datos. Las cuentas celulares obtenidas de las 5 camadas utilizadas para cada día gestacional, se expresaron en valores promedio con desviación estandard. Se llevó a cabo una comparación estadística con la prueba T de Student, de los siguientes parámetros:

- 1.- Para cada sexo en forma aislada, las células positivas totales, las células epiteliales totales y las mesenquimatosas totales, para conocer el patrón temporal que siguen en el curso de los días observados en la gestación.
- 2.- En forma comparativa para cada día gestacional entre los productos machos y hembras, para identificar las posibles diferencias existentes.

R E S U L T A D O S

Todas las descripciones se hicieron al microscopio de campo claro.

Los resultados de las cuentas celulares se expresan en forma de \bar{v} desviación estandaros y se muestran en las tablas 1, 2, 3.

DIA 15.- El pulmón se encuentra en la etapa pseudoglandular, se encuentran los tubos endodérmicos epiteliales revestidos por un epitelio columnar que descansa en una membrana basal continua. Debajo de la membrana basal se encuentran células mesenquimatosas que recuerdan fibroblastos, fibras musculares lisas inmaduras y ocasionalmente capilares.

En los pulmones de las hembras encontramos una gran positividad en los núcleos de las células epiteliales en forma de un precipitado café -- obscuro presente en forma granular. Células que revisten los tubos bronquiales y la positividad se presenta también en las células mesenquimatosas, aunque en menor cantidad (Fig. 1, 2, 3, 4). Se encontró una ligera positividad -

en las membranas citoplasmáticas de algunas células epiteliales, las cuales no se tomaron en cuenta para el conteo, por considerarse un depósito inespecífico. En los pulmones de los machos el número de células positivas encontradas es menor, también en ambos tipos celulares (tabla 2, 3 y gráfica 1, 2).

Se encontró un leve precipitado fuera de los elementos celulares que corresponde a un precipitado inespecífico.

Los controles son negativos y el testigo resultó siempre positivo (fig. 5).

DIA 16.- Etapa canalicular temprana.

En esta etapa se pueden delinear los acinos y la formación de los futuros bronquiolos respiratorios, el epitelio columnar comienza a atenuarse en algunas zonas y a disminuir su tamaño, permitiéndonos diferenciar algunos tipos celulares en cuanto a su forma y tamaño. En los pulmones de las hembras existe una disminución en la positividad en relación al día anterior tan-

to en las células epiteliales como en las mesenquimatosas (tablas 2, 3 y gráficas 3, 4). Se presenta de nuevo un precipitado inespecífico intracelular.

En esta etapa los pulmones de los machos presentan abundante positividad en los núcleos de las células epiteliales (sin llegar a ser tan abundantes como en las hembras del día 15). En cuanto a las células mesenquimatosas su positividad aumenta levemente en comparación al día 15.

DIA 17.- Etapa canalicular tardía.

En esta etapa el revestimiento de las vías aéreas es fácilmente distinguible y encontramos unas células cúbicas o redondeadas que corresponden a neumocitos tipo II.

Otras células del epitelio columnar se aplanan completamente y constituyen los neumocitos tipo I, son células escamosas con citoplasma muy adelgazado.

En el pulmón de las hembras, se encuentra de

nuevo una positividad acentuada en los núcleos epiteliales y también aumenta en las células mesenquimatosas; en los machos la cantidad de positividad es menor en relación al día anterior en ambos sexos y en relación a las hembras del mismo día (tabla 1, 2, 3 y gráficas 1, 2, 3, 4).

DIA 18 .- Etapa de sacos alveolares.

Es la etapa previa al nacimiento, es una etapa ligeramente más avanzada que la anterior: Los bronquiolos respiratorios observados son tubos limitados por un epitelio que contiene neumocitos tipo I y II. Los futuros conductos alveolares y los sacos alveolares se forman en esta etapa. Estas estructuras son sáculos limitados por un epitelio plano simple. Las depresiones de las paredes de estos sacos pueden considerarse alveolos primitivos.

En esta etapa, en los pulmones de las hembras se encuentra una gran disminución en la positividad de los núcleos de las células epiteliales

en relación al día anterior, esto se presenta - también en las células mesenquimatosas, en cambio los pulmones de los machos presentan positi vidad menor en los núcleos de las células epite liales y de igual forma hay una moderada positi vidad en las mesenquimatosas. Haciendo una com paración con el día anterior las hembras presen taron una disminución considerable en ambos tipos celulares y por el contrario los machos tuvieron un leve aumento también en ambos tipos celulares.

DIA 19 .- Etapa alveolar.

Esta se encuentra caracterizada por la presen cia de pequeños y grandes tubos de paredes li sas revestidos por células tipo I y tipo II.

Se ha observado que la aparición de nuevos septo tos en esta etapa coincide con la proliferación de fibroblastos.

En períodos posteriores, con la disminución de la población celular en el septo y el aumento de la colágena, el septo adquiere forma de adu l to.

En el pulmón de las Hembras se encuentra positi
tividad nuclear en las células epiteliales en
nequeñas cantidades al igual que en las célu-
las mesenquimatosas. de igual manera en los -
pulmones de los machos se encuentra una leve
positividad tanto en las células epiteliales
como en las mesenquimatosas.

D I S C U S I O N

El presente estudio permite verificar la hipótesis planteada al principio, en relación a la existencia de las células que contienen receptores estrogénicos.

En primer lugar, dichos receptores están presentes en el parénquima pulmonar fetal de ambos sexos demostrado con la técnica empleada y se encuentran desde el primer día del estudio que corresponde al día 15 de la gestación y se desconoce si anteriormente están presentes.

La positividad de los R.E. está presente tanto en las células mesenquimatosas como en las células epiteliales, aunque con algunas diferencias que se describirán más adelante. En los diferentes días estudiados se observaron diferencias importantes en cuanto a la cantidad y distribución de las células positivas, sin embargo siempre existe un patrón definido para cada sexo, siendo mayor la positividad total en las hembras, de tal manera que el día 15 de la gestación los receptores estrogénicos son más abundantes en las células epiteliales de las hembras que en las de los machos y que las células totales positivas son, con mucho, más abundantes en las hem-

bras. Sin embargo, al siguiente día (16avo. día) encontramos una inversión de la relación anterior, al presentarse mayor cantidad de células epiteliales positivas en el macho que en la hembra, pero sin llegar a los números alcanzados por ésta, las células mesenquimatosas también presentan esta variación.

De nuevo el día 17 las células epiteliales positivas son mas abundantes en las hembras que en los machos haciendo notar que no alcanzan los niveles que presentaban el día 15; las células mesenquimatosas también aumentan acercándose a los niveles presentes en el día 15. Al día 18 - las hembras presentan los números de células positivas - mas bajos registrados hasta esta etapa del desarrollo y es superada por los machos en forma significativa

Al final o sea el día 19 ó el primer día post-parto, los dos sexos tienden a igualarse en cuanto a número de células positivas aunque ambos presentan cifras muy inferiores a las encontradas en los primeros días.

Con esta demostración se concluye que se presenta una variabilidad cíclica en los resultados, dependientes de las cantidades de células positivas a los receptores es-

trogénicos en el parénquima pulmonar fetal; sin embargo. es importante señalar lo siguiente: Los receptores estrogénicos se encuentran presentes en el 15avo. día de gestación y se presentan en mayor cantidad en las hembras - que en los machos.

A pesar de existir un patrón cíclico, los machos no alcanzan el número total de células positivas presentes en las hembras hasta el final del estudio.

Al final declinan en ambos sexos en el post-parto.

En algunos de los días estudiados se presentan diferencias significativas entre ambos sexos por ejemplo el día 15.

Con lo anterior se puede esperar que el parénquima pulmonar de la hembra en comparación con el macho responderá en forma mas rápida y a mas temprana edad a la presencia de estrógenos, al presentar mayor cantidad de receptores estrogénicos. En la literatura se ha reportado que la maduración del pulmón es mas rápida en la hembra que en el macho (25).

Estas variaciones pueden tener relación con las distintas velocidades de maduración reportada para ambos sexos

en otras especies y que anteceden al parto.

En relación al patrón cíclico observado, parece corresponder al ritmo circadiano presente reportado por varios autores en otros sistemas como hepatocitos de rata usando ultracitoquímica y observando cambios en actividad de enzimas lisosomales (26).

Debemos tener presente que estos resultados son desde el punto de vista morfológico y deberán confirmarse para su ulterior validez y demostración de la respuesta biológica al ponerlos en contacto con estrógenos, por ejemplo - en un sistema "in vitro".

De esta manera llevaremos a cabo una correlación entre - los resultados morfológicos vistos con esta técnica y - los resultados biológicos de efectos reales de captación mediante los receptores. La respuesta esperada sería: - Aceleración de la maduración morfológica estudiada con - microscopio de luz y microscopio electrónico, así como - maduración bioquímica, manifestada por una estimulación temprana de la síntesis del surfactante.

R E S U M E N

Se utilizó una técnica inmunohistoquímica para la identificación de receptores a hormonas estrogénicas en las células del pulmón fetal de ratón albino cepa CD-1 para identificar posibles diferencias entre los sexos y entre las poblaciones celulares del pulmón.

Los fetos se estudiaron a partir de los 15 días de gestación hasta el día del parto (duración de la gestación 18 ± 1 día). El estudio se hizo acumulando los pulmones fetales de 5 camadas (aprox. 12 fetos por camada), separados por sexo. Los resultados indicaron que:

- 1.- Se identifican células con receptores estrogénicos en el pulmón de ambos sexos.
- 2.- A lo largo de los días estudiados las cantidades de células con receptores presentan variaciones cíclicas, con picos c/24 horas, tendiendo a disminuir hasta el día de su nacimiento.
- 3.- Los pulmones de las hembras presentan en el primer día gestacional estudiado la mayor cantidad de células positivas; mientras que en el macho se observa el pico mas alto hasta el día 16 gestacional, siendo

significativamente menor que para la hembra.

4.- Las células epiteliales totales se correlacionan con las células positivas totales, principalmente en las hembras. Las células mesenquimatosas presentan menos variaciones.

5.- Estas diferencias pueden tener relación con los distintos niveles de maduración reportados en la literatura asociados con el sexo.

La composición del FACTOR SURFACTANTE es la siguiente:

DIPALMITOILFOSFATIDILCOLINA	41%
FOSFATIDILCOLINAS monosaturadas	25%
FOSFATIDILETANOLAMINA	5%
FOSFATIDILSERINA Y GLICEROL	4%
LISOLECITINA	2%
COLESTEROL	8%
GLICERIDOS	4%
ESFINGOMIELINA	1%
ACIDOS GRASOS	1%
PROTEINAS	9%

TABLA No. 1

CELULAS POSITIVAS TOTALES

D. G.	H		M		HAY DIF. SIGNIF. ESTADIS- TICAMENTE. $Tt=2.776 \approx .05$	
	\bar{x}	S	\bar{x}	S		
15	615.00	58.13	170	26.15	t= 9.87	SI
16	212.33	39.68	334.67	33.50	t=3.06	SI
17	495.67	55.19	231.67	18.01	t=6.36	SI
18	149.33	25.42	290.67	36.90	t=4.46	SI
19	113.00	34.77	66.00	9.85	t=1.84	NO

CORRELACION:

DIAS VS. CELULAS:

- 0.752

CORRELACION:

DIAS VS. CELULAS:

0.545

CORRELACION: H M Tt=2.770

- 0.055

✓ = .05

D.G. = Dia gestacional
H = Hembras
M = Machos
n = 1,500 células contadas

TABLA No. 2

CELULAS EPITELIALES +

D. G.	H		M		HAY DIF. SIGNIFICATI- to VA ENTRE H y M = .05 Tt=2.776	
	\bar{x}	S	\bar{x}	S	to	SI
15	331.00	56.10	94	26.28	to=5.41	SI
16	118.67	28.36	218.67	27.68	to=3.57	SI
17	275.33	30.27	117.0	13.00	to=6.80	SI
18	58.00	23.00	143.33	17.95	to=4.14	SI
19	72.33	28.36	40.67	9.87	to=1.49	NO

CORRELACION

DIA VS. CELULAS:

- 0.735

CORRELACION

DIA VS. CELULAS:

-0.438

CORRELACION H M Tt-2.776

- 0.136

D.G = Dia gestacional

H = Hembras

M = Machos

n = 1.500 Células contadas

TABLA No. 3
 C E L U L A S M E S E N Q U I M A T O S A S +

D. G.	H		M		to to=15.43	HAY DIF. SIGNIF. ENTRE H y M =.05 Tt-2.776
	\bar{x}	S	\bar{x}	S		
15	284.00	19.05	76.00	1.00		SI
16	93.67	14.47	116.00	10.15	to=1.785	NO
17	220.33	53.25	114.67	21.46	to=2.604	NO
18	91.33	5.03	147.33	19.14	to=4.003	SI
19	40.67	9.87	25.33	1.53	to=2.173	NO

$$\alpha = 0.5$$

$$t_{\alpha} = 2.776$$

D. G. = Dia gestacional
 H = Hembras
 M = Machos
 n = 1,500 Células contadas

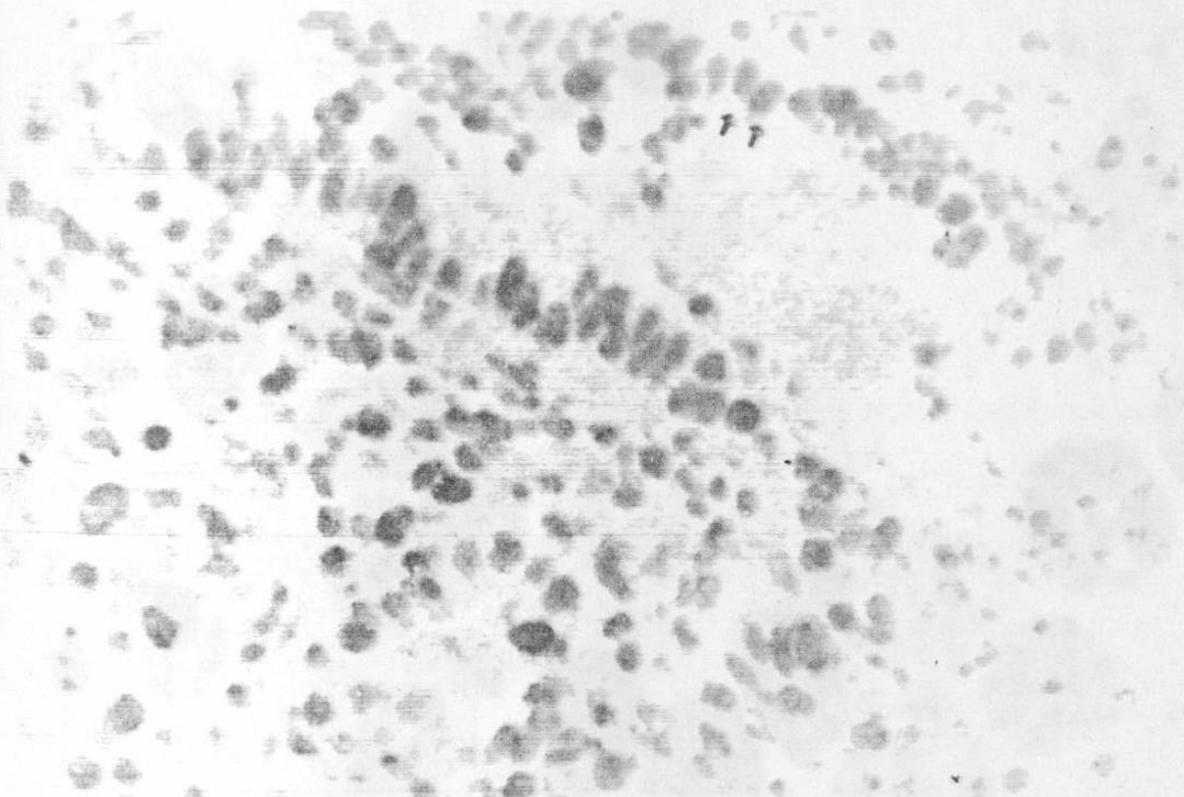
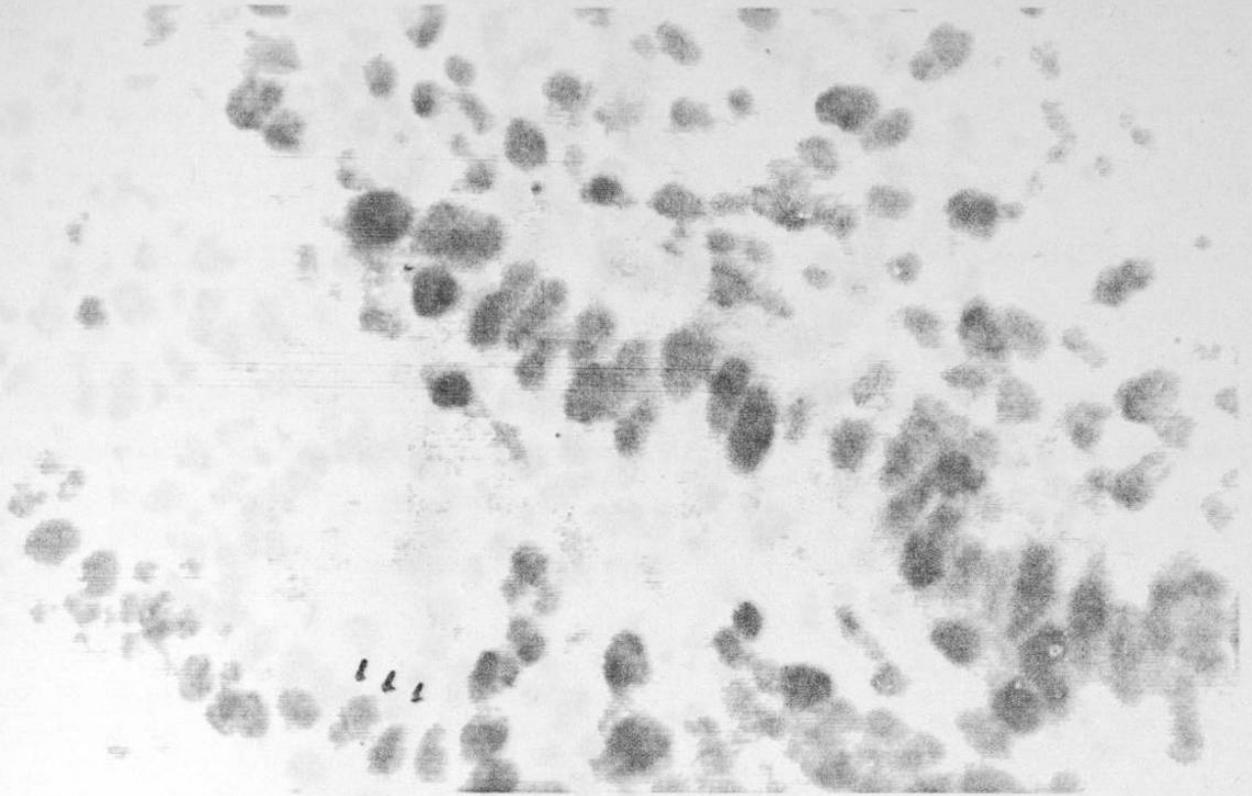


FIG. 1 y 2 PULMON FETAL DE RATON MACHO DE 15 DIAS DE GESTACION. LAS FLECHAS INDICAN LA NEGATIVIDAD DE LAS CELULAS EPITELIALES; AUMENTO 1000 X TECNICA INMUNOHISTOQUIMICA.

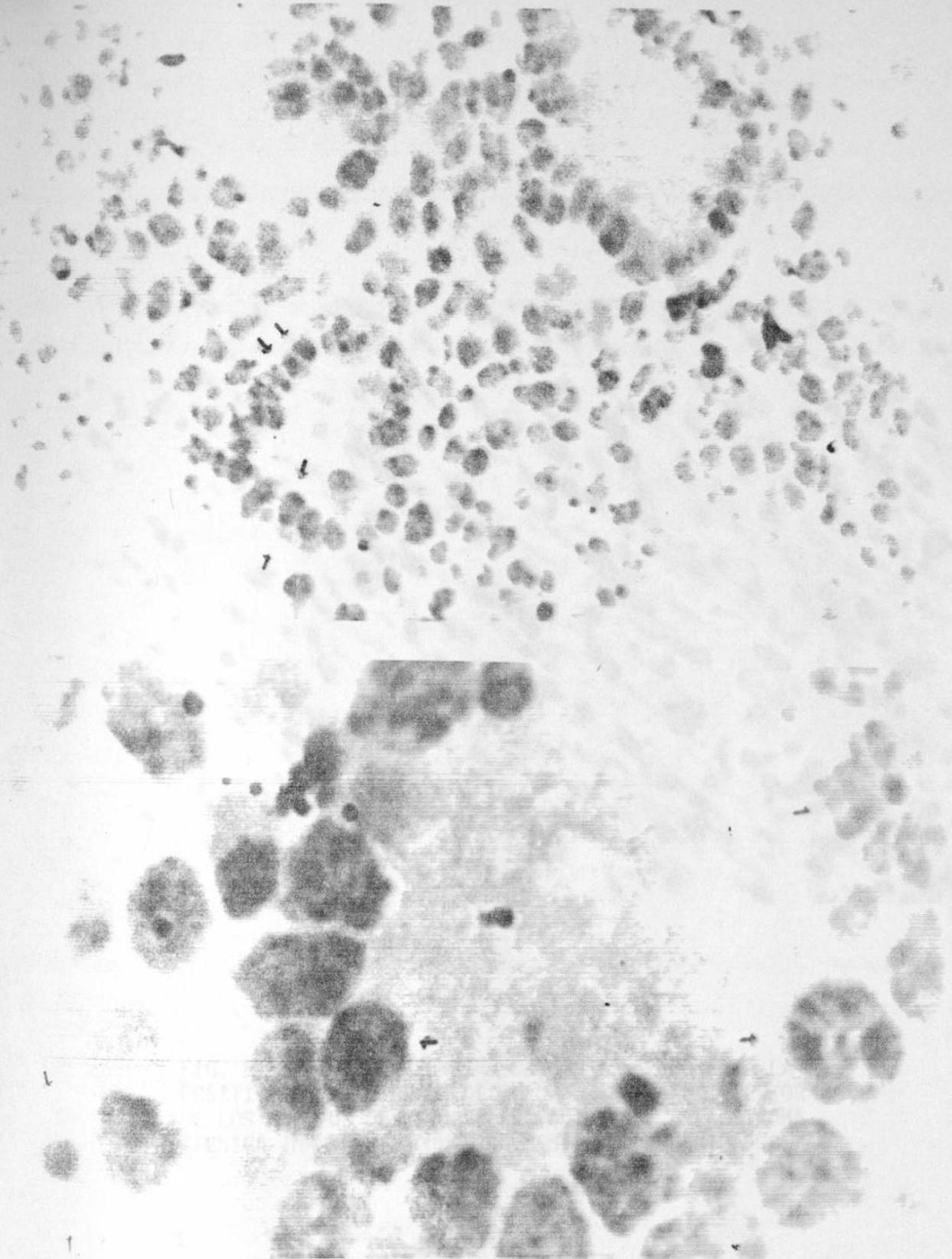


FIG. 3 y 4. PULMON FETAL DE RATON HEMBRA DE 15 DIAS DE GUSTACION. LAS FLECHAS INDICAN LA POSITIVIDAD EN LAS CELULAS EPITELIALES TECNICA INMUNO-HISTOQUIMICA: AUMENTO 1000 X.

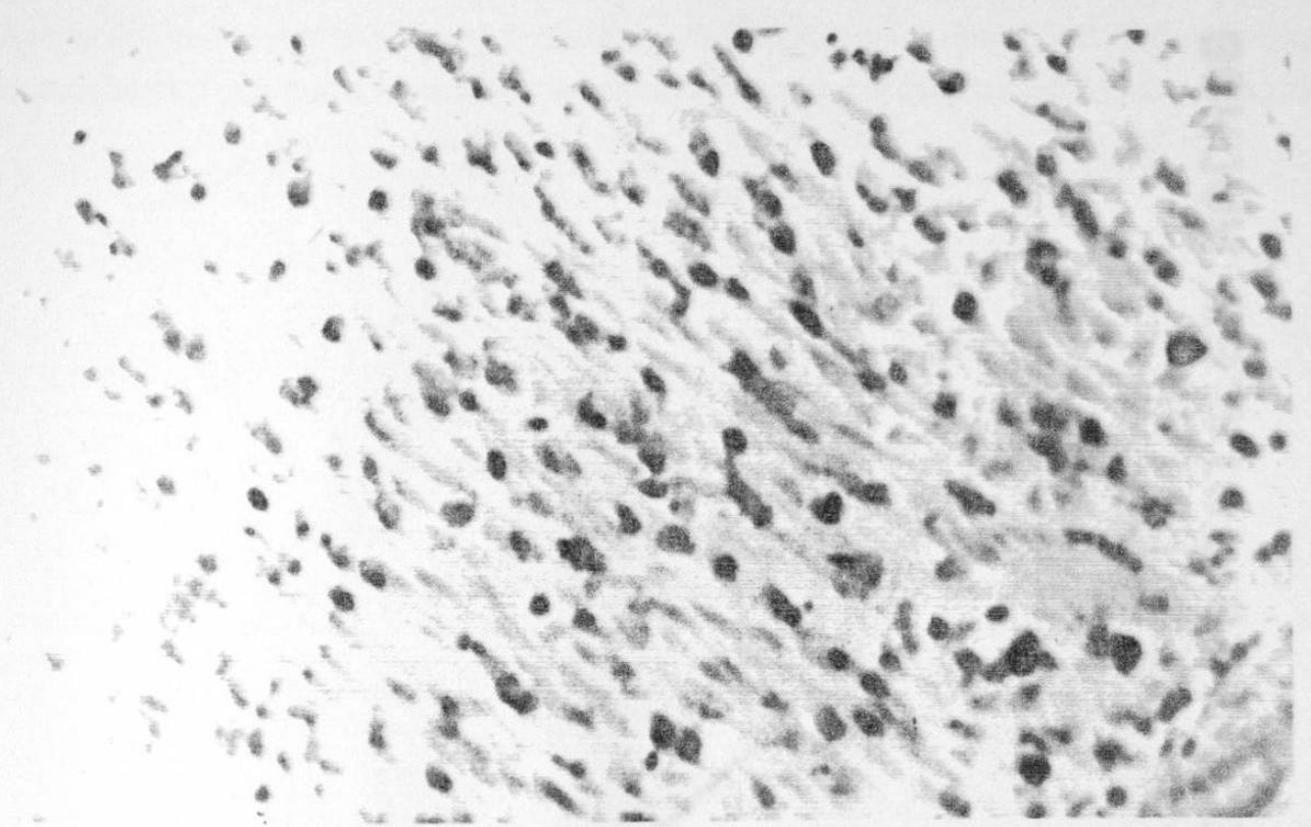
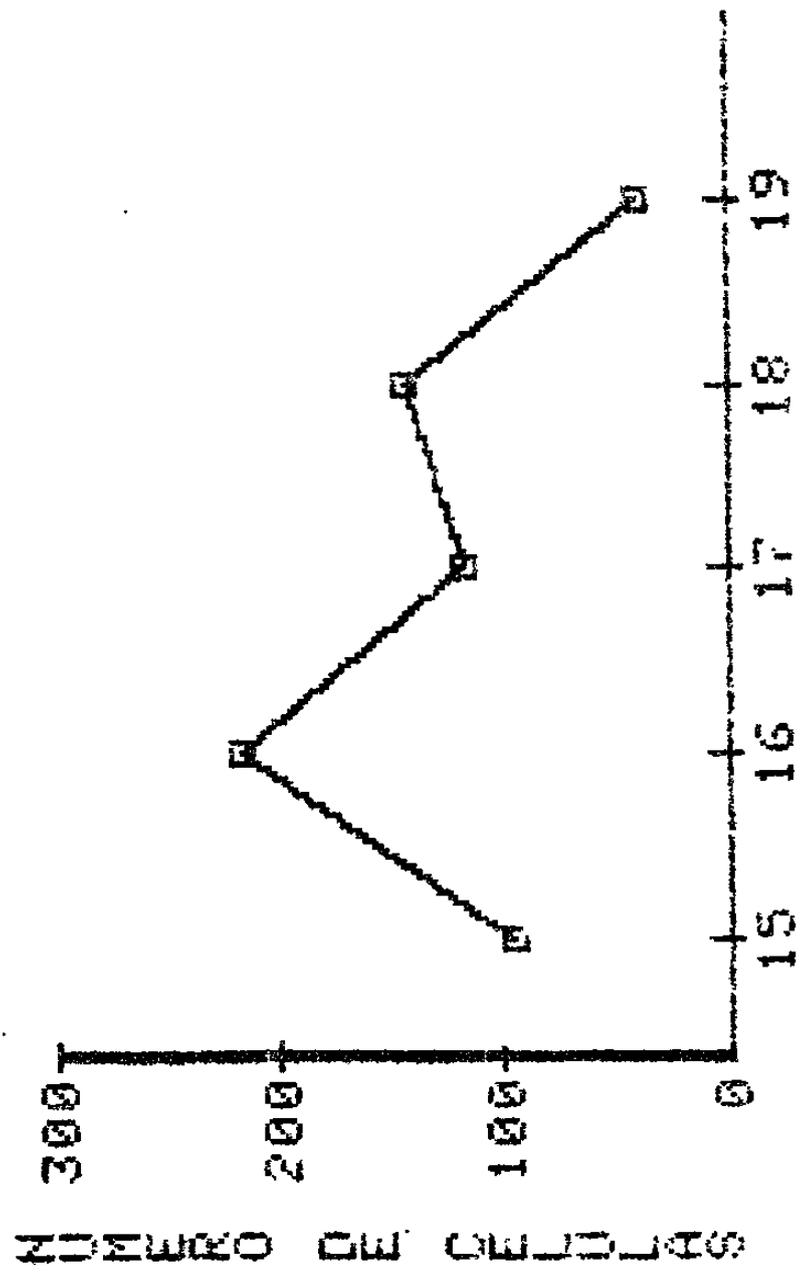
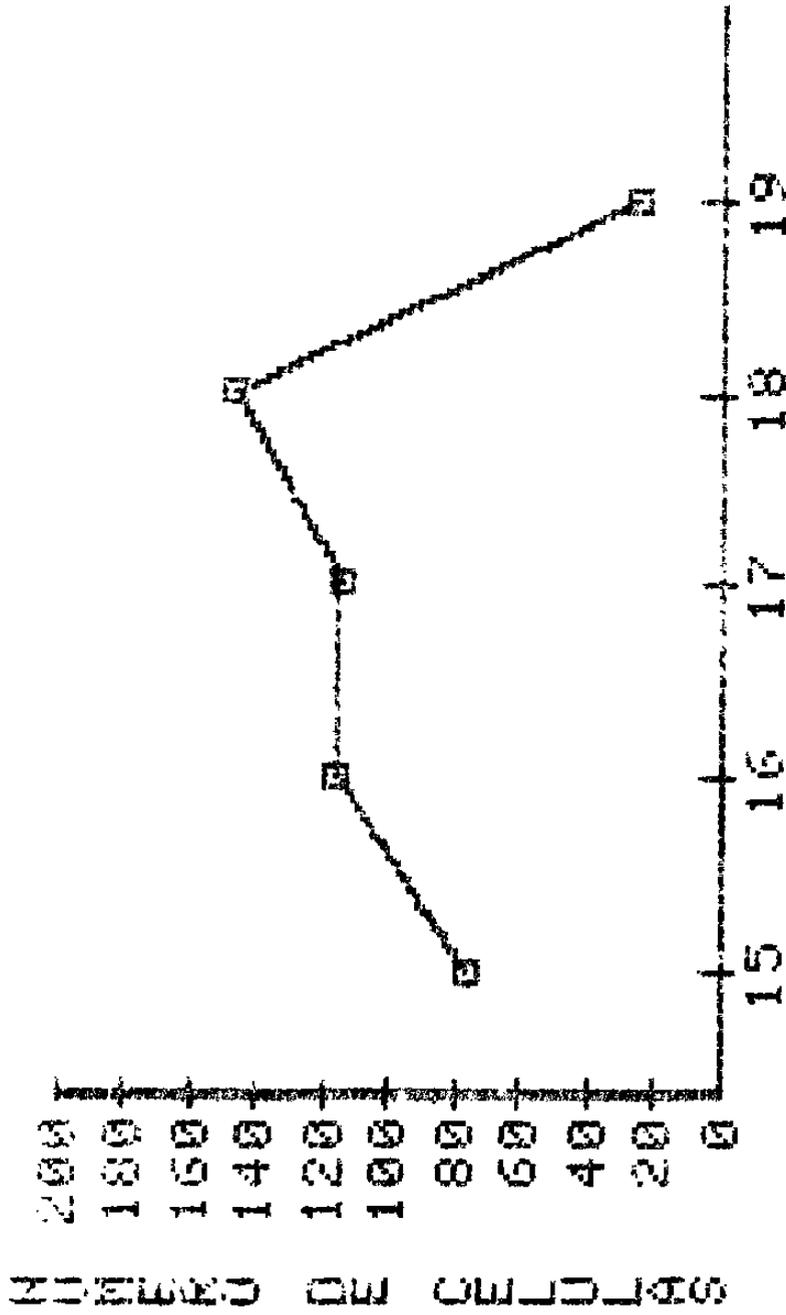


FIG. 5 UTERO DE RATONA NO GESTANTE, SE OBSERVA LA POSITIVIDAD COMO GRANULOS COLOR CAFE EN EL INTERIOR DE LOS NUCLEOS DE CELULAS EPITELIALES Y DEL ESTROMA. TECNICA INMUNO-HISTOQUIMICA COMPLETA. AUMENTO 500 X.

GRAFICA 1

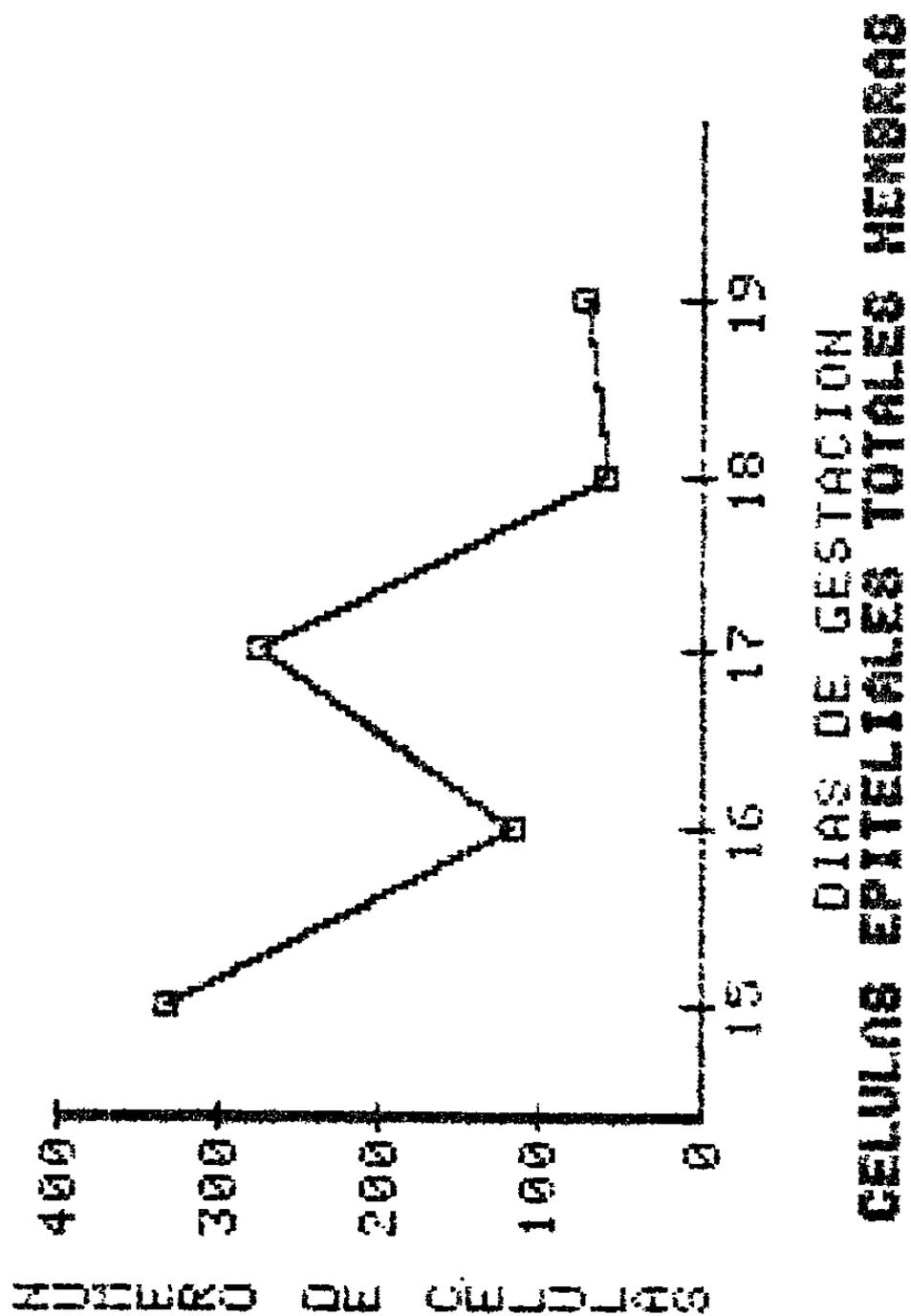


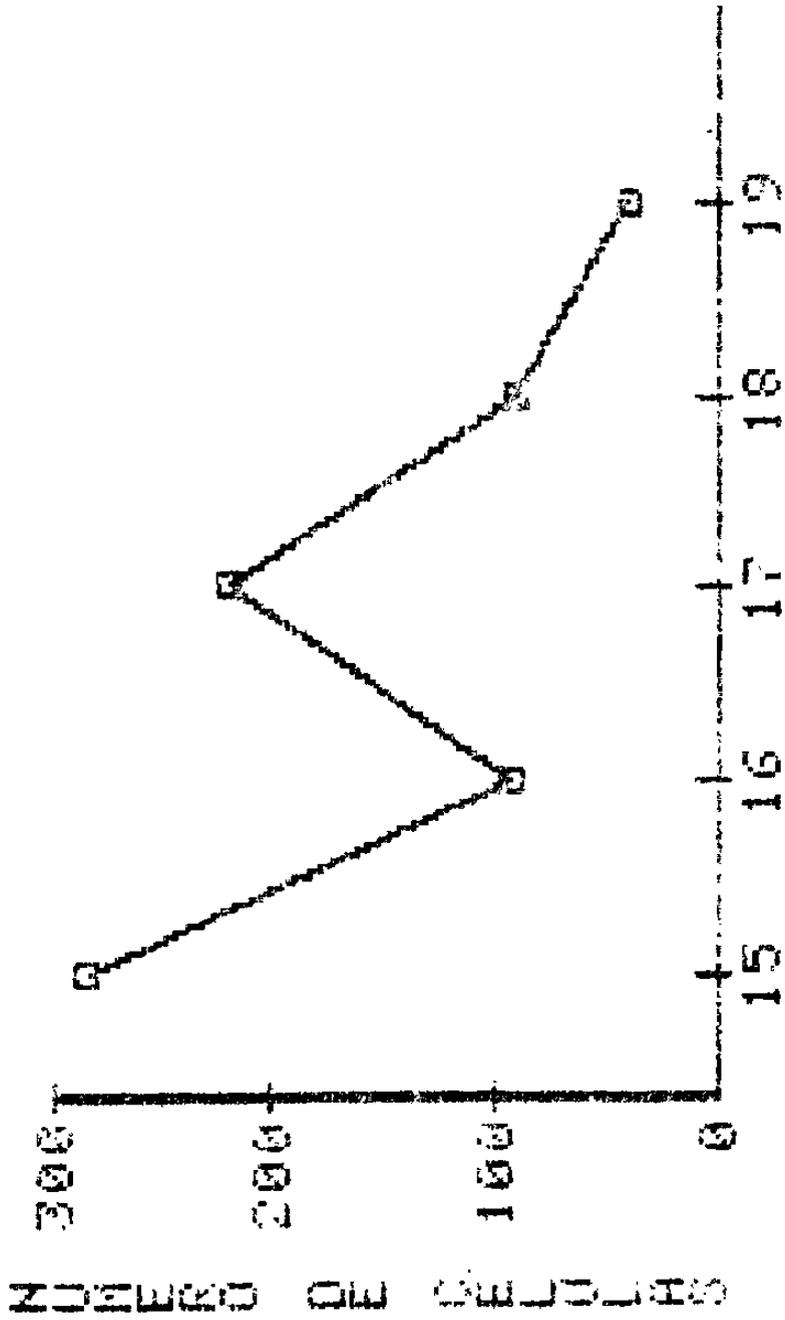
CELULAS EPITELIALES TOTALES HACIENDOS



CELULAS RESEÑADAS MATERNAS TOT. MACHOS
DIAS DE GESTACION

GRAFICA 3





CELULAS MENSURACIONES TOT. HENSERAS
 DIAS DE GESTACION

MINI 430 T

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Breeze, R. and Turk, M.: "Cellular Structure, Function and organization in the Lower Respiratory Tract". Environ. H. Persp. 55:3-24, 1984.
- 2.- Kauffman, S.M.D.: "Proliferation Growth and Differentiation of Pulmonary Epitelium in Fetal Mouse - Lung Exposed Transplacentally to Dexamethasone". The INTL. Acad. of Path. 36:395-401, 1977.
- 3.- Cutz, E.M.D., et al: "Effect of Surfactant Prophylaxis on - Lung Maturation in Premature Primates". Am. J. of Path. 92:581-591, 1978.
- 4.- Enhoring, G.M.D., et al: "Prevention of Neonatal Respiratory Distress Syndrome by Tracheal instillation of Surfactant". Pediatr. 76:145-153, 1985.
- 5.- Robertson, N.R.C.: "Advances in Respiratory distress Syndrome". B.M.J. 284:917-918, 1982.

- 6.- Ogden, B.E.M.D., et al: "Lung Lavage of Newborns With
Respiratory Distress Syndrome".
Chest. 83:315-335, 1983.
- 7.- Robertson, B.: "Current Counter-Current Theories on Lung
Surfactant". Scand. J. Resp. Dis. 57:199-
207, 1976.
- 8.- Ikegami, M.M.D. and Jacobs, H.M.D.: "Surfactant Function in
Respiratory Distress Syndrome".
The J. of Pediat. 102:443-447,
1983.
- 9.- Enhoring, G.: "Surfactant in The Treatment of Respiratory
Distress Syndrome". Devel. Pharmacol, Vol.
267-272, 1983.
- 10.- Massaro, D. et al: "Surfactant Deficiency in Rat Without a
Decreased amount of extracellular Surfactant".
The J. of Invest. Clin. 71:1536-1543, 1983.
- 11.- Rooney, S.D.: "Lung Surfactant". Environ. H. Persp. 55:205
-226, 1984.
- 12.- Rooney, S.D.: "The Surfactant System and Lung Phospholipid
biochemistry". Am. Rev. Dis. 131:439-460,
1985.

- 13.- Gluck, M.D.: "Surfactant 1972". Pediatric Clin. of North-America". 19:325-331, 1972.
- 14.- Liggins, G.C., Howie, R.N.: "A Controlled Trial of Antepartum Glucocorticoid Treatment for Prevention of the Respiratory Distress Syndrome in Premature Infants". Pediat. 50:515-525, 1972.
- 15.- Velásquez, B. and Sepúlveda J.: "Studies of the influence of Ambroxol and Dexamethasone on maturation of Surfactant System in Lung of Albino Mice". Prog. Resp. Res.: 15:256-260, Karger, Basel, 1981.
- 16.- Ballard, L.P.: "Corticosteroids and Respiratory Distress syndrome: Status 1979". Pediat. 63:163-165, 1979.
- 17.- Papageorgiou, A.N., et al: "The Antenatal use of beta-methasone in the prevention of Respiratory Distress Syndrome: A Controlled Double-blind Study". Pediat. 63-73-79, 1979.

- 18.- Dhanireddy, R., et al: "Respiratory Distress Syndrome in the Newborn: Relationship to serum pro-lactin Thyroxin and Sex". Biol. Neonate, 43:9-15, 1983.
- 19.- Naeye, R.L., et al: "Nutrition, Sex and Fetal Lung Maturation". Pediatr. Res. 8:200-204, 1974.
- 20.- Torday, J.S.: "The Sex Difference in the Type II Cell Surfactant Synthesis Originates in the Fibroblast in vitro". Exptl. Lung Res. 7:187-194, 1984.
- 21.- Thuresson, A.K. Ph.D., et al: "Estrogen Stimulates Formation of Lamellar Bodies and Release of Surfactant in the Rat Fetal Lung". Am. J. Obstet. Gynecol. 151:506-513, 1985.
- 22.- Khosla, S.S., and Rooney, S.A.: "Stimulation of Fetal Lung Surfactant Production By Administration of 17 Beta-estradiol to the Maternal Rabbit". Am. J. Obstet. Gynecol, 213-215, 1979.

- 23.- Spellacy, W.N., et al: "Human Amniotic Fluid Lecithin/Sphingomyelin Ratio Changes With Estrogen or Glucocorticoid". Am. J. Obstet Gynecol. 115:216-218, 1973.
- 24.- Morishige, W.K., et al: "Receptors for Androgen and Estrogen in the rat Lung". Endoc. 102:1827-1837, 1978.
- 25.- Pasqualine, J.R., et al: "Specific Estradiol Binding in the Fetal Uterus and Testis of guinea Pig". J. of Ster. Biochem., 7:1034-1038, 1976.
- 26.- Uchiyama, et al: "Circadian Changes of Lysosomal Enzyme Activities in Rat Hepatocytes Using Ultra cytochemistry". Libro de Resúmenes de XI Congreso Internacional de Anatomía, Agosto 17 al 23 de 1980.

