



**EFFECTO DE LA DEXAMETASONA SOBRE LAS FIBRAS
DEL TEJIDO CONECTIVO PULMONAR FETAL
DEL RATON ALBINO
(MUS MUSCULUS)**

TESIS

**QUE EN OPCION AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN MORFOLOGIA**

PRESENTA:

BIOL, JUAN MANUEL SOLIS BOTO

MONTERREY, N.L. ABRIL 1989

TM
RG60
S6
C.1



1080072418

EFFECTO DE LA DEXAMETASONA SOBRE LAS FIBRAS
DEL TEJIDO CONECTIVO PULMONAR FETAL
DEL RATON ALBINO
(Mus musculus).

POR
BIOL. JUAN MANUEL SOLIS SOTO

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.
Abril/1989

T M
RF600
S6



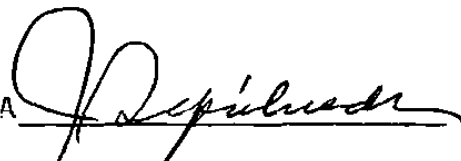
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA
SUBDIRECCION DE ESTUDIOS DE POST-GRADO

EFFECTO DE LA DEXAMETASONA SOBRE LAS FIBRAS
DEL TEJIDO CONECTIVO PULMONAR FETAL
DEL RATON ALBINO
(Mus musculus).


BIOL. JUAN MANUEL SOLIS SOTO

COMISION DE TESIS:

M.C.P. Y Ph.D. JULIO SEPULVEDA SAAVEDRA



M.C.P. Y Dr.med. CARLOS E. DE LA GARZA G.



M.C.P. Y M.C. BEATRIZ GONZALEZ DE PEREA.



M.C.P. Y Dr.med. GUADALUPE ARREDONDO DE A.



Med.Cir. Y M.C. EDMUNDO LLAMAS ALBA



ESTE TRABAJO FUE REALIZADO BAJO LA ASESORIA DEL
M.C.P. Y Ph.D. JULIO SEPULVEDA SAAVEDRA, EN LOS
LABORATORIOS DE HISTOQUIMICA Y CULTIVO DE TEJIDOS
DEL DEPARTAMENTO DE HISTOLOGIA DE LA FACULTAD DE
MEDICINA, DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON.

UN AGRADECIMIENTO SINCERO A:

M.C.P. Y Ph. D. JULIO SEPULVEDA SAAVEDRA, POR SU ORIENTACION, TRANSMISION DE CONOCIMIENTO, Y POR EL TIEMPO QUE HIZO EL FAVOR DE DEDICARME.

LOS MIEMBROS DE LA COMISION DE TESIS, POR SUS VALIOSAS CRITICAS Y COMENTARIOS, ADEMAS DE SU DISPOSICION Y AMABILIDAD.

A MI ABUELA ...

ANDREA GUERRERO DE SOLIS
A SU MEMORIA...

YO DUDO DE TODO, DE LO UNICO QUE NO DUDO ES DE QUE
DUDO, Y AL DUDAR ME DOY CUENTA DE QUE EXISTO.

SAN AGUSTIN

EL HOMBRE ES LA MEDIDA DE TODAS LAS COSAS, EN LAS
QUE SON PORQUE SON Y EN LAS QUE NO SON PORQUE NO SON.

PROTAGORAS

LA VIDA ES TODO, TODO ES RACIOCINIO;

LA MUERTE ES NADA, NADA ES IDIOTEZ.

ZANATA'S

INDICE

INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	3
MATERIAL Y METODOS	9
RESULTADOS	12
DISCUSION Y CONCLUSIONES	25
RESUMEN	31
BIBLIOGRAFIA	33

INTRODUCCION

El síndrome de sufrimiento respiratorio del recién nacido (SSR), continúa siendo la principal causa de enfermedad y muerte en infantes prematuros, a pesar del progreso en su prevención y tratamiento (Gluck y Kulovich, 1973; Shields y Resnick, 1979; Kerepesi y Aranyi, 1985).

La dexametasona, entre otros glucocorticoides, se emplea terapéuticamente para prevenir el SSR, administrándola a la madre con riesgo de parto prematuro.

Con el uso de los glucocorticoides para acelerar la producción de surfactante antenatal, el riesgo de presentación del SSR ha sido reducido significativamente (Bishop, 1981). Sin embargo, el papel farmacológico de los glucocorticoides sobre las diferentes etapas del desarrollo pulmonar aún no se encuentra totalmente caracterizado - (Honig et al, 1984), especialmente en cuanto a lo que se refiere al componente mesenquimatoso, del que derivan las fibras del tejido conectivo, ya que los estudios hasta la fecha se han enfocado sobre el epitelio alveolar, a pesar de que las fibras colágenas y elásticas tienen un papel clave en el desarrollo alveolar pulmonar (Amy et al, 1977; Loosli y Potter, 1959). Las fibras colágenas estabilizan y controlan el crecimiento del epitelio en el pulmón en desarrollo (Wessells, 1970), y las fibras elásticas regulan la luz alveolar al evitar el movimiento libre de partes de las paredes alveolares (Emery, 1970).

Tomando en cuenta que el efecto de los glucocorticoides sobre el pulmón en desarrollo, cuando son empleados para prevenir el SSR, aún no se encuentra completamente caracterizado, y que la administración de esteroides sobre las proteínas constituyentes de las fibras del tejido conectivo, colágena y elastina, produce resultados variables en tejidos antenatales y neonatales, consideramos ne

cesario realizar este trabajo, en el que se determinó por métodos morfométricos y químico-cuantitativos el efecto de la dexametasona sobre las fibras del tejido conectivo pulmonar, durante el desarrollo fetal del ratón albino.

ANTECEDENTES

El desarrollo del pulmón en el ratón puede ser dividido en periodos de acuerdo a un criterio histológico: Periodo pseudoglandular desde el día 9.5 al día 16.6; - Canalicular desde el día 16.6 al día 17.4; Saco terminal desde el día 17.4 hasta el día 5 postnatal; Alveolar a partir del día 5 postnatal (Ten Have-Opbroek, 1981).

El factor etiológico primario predisponente al desarrollo del síndrome de sufrimiento respiratorio es la inmadurez pulmonar (Smith et al, 1979), más específicamente la falta de surfactante, originada por una biosíntesis y secreción deficientes debido a la inmadurez de las células epiteliales alveolares tipo II (Gluck et al, 1971). Para acelerar la maduración pulmonar se emplean glucocorticoides. Su uso se inició cuando Liggins (1969), encontró que corderos prematuros fueron inesperadamente viables, sin síndrome de sufrimiento respiratorio, después de la administración prenatal de dexametasona, y sugirió que esto podría ser el resultado de la aparición acelerada de surfactante. Esto fue comprobado por De Lemos y colaboradores (1970), quienes administraron cortisol a fetos de corderos y observaron una maduración pulmonar aumentada, estimada por medidas de mecánica pulmonar y actividad del extracto de la superficie pulmonar. Estudios posteriores en conejos (Kotas y Avery, 1971), monos (De Lemos y Mc Laughlin, 1973), y humanos (Liggins y Howie, 1972), hicieron evidente que los glucocorticoides podrían acelerar significativamente la maduración pulmonar con respecto a la síntesis y secreción del surfactante.

Posteriormente, fue reportado que la administración transplacentaria de dexametasona aceleraba la morfogénesis y la citodiferenciación del epitelio alveolar en el pulmón fetal del ratón (Velázquez y Sepúlveda, 1982).

Otro estudio reporta que la administración de dexametasona a ratas macho adultas originó un aumento en la cantidad de fosfolípidos de los cuerpos lamelares del pulmón, sin mostrar efecto sobre otros compartimientos intracelulares del epitelio alveolar, ni en otros órganos, como hígado y riñón (Young y Silbajoris, 1986).

Por otra parte, la tasa de mortalidad debida al síndrome de sufrimiento respiratorio en el periodo neonatal es significativamente más alta en los varones que en las mujeres (Farrel y Avery, 1975), ésto es probablemente debido a la menor producción de surfactante pulmonar por los primeros, ya que hay significativamente menos fosfatidilcolina asociada a surfactante en el fluido amniótico de éstos que de hembras durante el último trimestre de gestación humana (Torday et al, 1981). Además, se ha reportado que entre la semana 25 y 32 de gestación humana, los pulmones de fetos de mujeres son más maduros que los de varones, ésto con base a un criterio histológico (Naeye et al, 1974). De igual manera Kotas y Avery (1980), observando la apariencia histológica del pulmón de fetos machos de conejo, encontraron que el órgano muestra paredes de tejido más gruesas y menos uniformidad en su expansión, en comparación con las hembras.

Las fibras colágenas tienen un papel clave en el desarrollo alveolar pulmonar (Amy et al, 1977; Loosli y Potter, 1959). Se ha demostrado su importancia en la morfogénesis destruyendo o distorsionando selectivamente su patrón de crecimiento (Alescio, 1973; Wessells y Cohen, 1968), y se ha observado que en el pulmón en desarrollo el crecimiento del epitelio es estabilizado y controlado por estas fibras, las cuales crean una barrera para la formación de ramificaciones, excepto en puntos especiales en donde esta barrera es interrumpida permitiendo al epitelio crecer y ramificarse (Wessells, 1970). De manera

similar, las fibras elásticas se encuentran en sitios en donde el alveolo va a dividirse en subunidades, y parecen evitar el movimiento libre de partes de las paredes alveolares de modo que regulan la luz alveolar (Emery, 1970).

Al nacimiento, en el pulmón de mamíferos, las fibras de colágena son detectadas en el intersticio, mientras el tejido elástico no está todavía formado en cantidades apreciables (Burri y Weibel, 1977).

Johnson y colaboradores (1978), sugirieron que los volúmenes pulmonares fetales aumentados encontrados en el mono rhesus, después de la administración de betametasona, podrían ser debidos a alteraciones en el tejido conectivo.

Observaciones clínicas sugieren que los glucocorticoides pueden afectar profundamente al metabolismo de los componentes del tejido conectivo, como colágena, elastina, glucosaminoglicanos y fibronectina (Cutroneo et al, 1981; Oikarinen et al, 1986).

La dexametasona disminuye la incorporación de prolina- H^3 en colágena de diversos tejidos adultos (Cutroneo et al, 1981). Hay reportes en hepatocitos de rata en cultivo (Guzelian et al, 1984), y en células de la malla trabecular del ojo humano (Hernández et al, 1985). Además se ha encontrado que disminuye la cantidad de RNA mensajero para colágena $\alpha 1(I)$ (Jefferson et al, 1985). Sin embargo, se ha reportado que la colágena tipo IV es incrementada por la dexametasona en células de fibrosarcoma humano (Oikarinen et al, 1986), y en epitelio mamario de rata (Salomon et al, 1981).

El análisis de los efectos de los glucocorticoides sobre la producción de colágena en fibroblastos de piel humana en cultivo, ha mostrado que bajo condiciones de incubación similares, la síntesis de colágena es inhibida en cultivos de fibroblastos de piel adulta, pero usualmente estimulada en cultivos de fibroblastos fetales (Booth

et al, 1982). Se ha encontrado que la hidrocortisona y otros disminuyen la producción de colágena en fibroblastos de piel humana adulta (Priestley, 1978; Russell et al, 1978; Mc Coy et al, 1980). Sin embargo, se ha reportado que la hidrocortisona, prednisolona y el succinato de hidrocortisona ocasionan aumento en la biosíntesis de colágena en fibroblastos de piel de embrión humano (Harvey et al, 1984; Doherty y Saarni, 1976; Saarni y Tammi, 1978).

Oikarinen y colaboradores (1984), reportaron que la dexametasona ocasionó una reducción en los niveles de RNA mensajero para colágena tipo I, en fibroblastos de tendón de embrión de pollo de 17 días.

Al aislar polysomas de dermis de rata recién nacida tratadas previamente con diacetato de triamcinolona (un glucocorticoide), se observó una disminución en la incorporación de prolina- H^3 en colágena, comparada con la incorporación del mismo aminoácido en otras proteínas, indicando una disminución selectiva en la síntesis de colágena (Mc Nelis y Cutroneo, 1978). Este mismo glucocorticoide inhibió la síntesis de colágena tipo I y tipo III en la piel y en el pulmón de rata (Shull y Cutroneo, 1983).

Verbruggen y Abe (1982), encontraron que la síntesis de colágena tipo III disminuye, pero que la producción de colágena tipo I permanece sin alterarse por efecto de otros glucocorticoides (dexametasona y corticosterona), en fibroblastos dérmicos de dos cepas de ratón de 1 a 3 días de nacidos.

La administración de dexametasona ocasionó una disminución en la cantidad de RNA mensajero de colágena $\alpha 1(I)$ y colágena $\alpha 2(I)$ en piel de pollos recién nacidos, y en cultivo de fibroblastos de piel y pulmón originó una disminución en la síntesis de colágena y en la cantidad de RNA mensajero para colágena $\alpha 1(I)$ y colágena $\alpha 2(I)$ (Sterling et al, 1983).

Eichner y Rosenbloom (1979), inyectaron hidrocortisona a embriones de pollo, 24 horas más tarde aislaron aortas y

las incubaron con glicina- H^3 , observando que existía una disminución en la síntesis de colágena y un aumento en la síntesis de elastina.

Un incremento en la producción de elastina en fibroblastos del ligamento de la nuca de bovino fetal fue reportado al incubarlos con dexametasona, se observó que la estimulación era dependiente de las condiciones del cultivo (Mecham et al, 1981). Posteriormente, Mecham y colaboradores (1984), encontraron los mismos resultados reportando además que la dexametasona, y otros glucocorticoides, no inducen la síntesis de elastina en células indiferenciadas, las cuales no están expresando activamente el fenotipo de elastina.

La colágena puede ser identificada por microscopía de campo claro con técnicas especiales de coloración, con el uso del método de Van Gieson con fucsina ácida (Sheehan y Hrapchak, 1980). Empleando microscopía de polarización, y tiñendo con Rojo Sirio, se puede identificar específicamente la colágena (Sweat et al, 1964).

Las fibras elásticas y las fibras de elastina es posible identificarlas por la técnica de Resorcina-fucsina, sin embargo no es posible identificar fibras de oxytalán individuales (Bock y Stockinger, 1984).

El procesamiento de un tejido con la técnica histológica no tiene efecto sobre la cantidad de hidroxiprolina o de proteínas, y se pueden emplear cortes para determinar estos parámetros por métodos espectrofotométricos (Schwartz et al, 1985). Esto permite emplear el mismo material utilizado en un estudio morfológico.

La hidroxiprolina es un marcador analítico conveniente para colágena, ya que este aminoácido se encuentra únicamente en cantidades significativas en otra proteína estructural, la elastina (Goldberg y Rabinovitch, 1983), la cual es el componente principal de las fibras elásticas. La coláge-

na contiene aproximadamente un 10% de hidroxiprolina (Bradley et al, 1974), y la elastina un 1% (John y Thomas, 1972).

Tomando en cuenta que el grado de afectación de los glucocorticoides, empleados para prevenir el SSR, aún no se encuentra totalmente caracterizado, y observando los resultados variables que se reportan del efecto de los glucocorticoides sobre las proteínas constituyentes de las fibras del tejido conectivo en tejidos fetales y neonatales, es que se propuso la siguiente hipótesis:

"La administración transplacentaria de dexametasona a fetos del ratón albino, altera la cantidad de fibras del tejido conectivo del pulmón en desarrollo".

En base a la hipótesis anterior se plantearon los siguientes objetivos:

a) Detectar alteraciones en la cantidad de fibras del tejido conectivo pulmonar originadas por la administración de dexametasona durante el desarrollo fetal por métodos morfométricos.

b) Detectar variaciones en la cantidad de colágena durante la morfogénesis pulmonar, causadas por un glucocorticoide administrado por vía placentaria, por métodos químico-cuantitativos.

c) Correlacionar los resultados de los dos objetivos anteriores, variaciones en la cantidad de colágena, con variaciones en la cantidad de fibras colágenas.

d) Contribuir a la caracterización de los efectos inducidos por la administración de glucocorticoides sobre el pulmón en desarrollo cuando se desea acelerar su maduración.

MATERIAL Y METODOS

Se emplearon 64 ratonas albinas (Mus musculus) de la cepa CD-1 (Charles River Breeding Laboratories), las que se colocaron con los machos durante dos horas. La identificación del tapón vaginal indicó el día 0 de la gestación. Las hembras preñadas recibieron fosfato sódico de dexametasona a una dosis diaria de 1 mg/Kg de peso corporal (Kauffman, 1975), por vía intramuscular a partir del día 14 y hasta el día 18 de gestación. Hembras grávidas control no recibieron ningún tratamiento.

Las ratonas fueron sacrificadas por dislocación cervical cada 24 horas. Se obtuvieron los fetos a partir del día 15 de gestación hasta el día del parto (día 19). Se utilizaron neonatos de 1, 2 y 3 días. Fetos y neonatos se pesaron y se les midió la longitud cráneo-rabadilla, para comprobar su edad gestacional. Se obtuvieron los pulmones por disección bajo microscopio estereoscópico, se identificó el sexo y fueron separados en pulmones-macho y pulmones-hembra.

Los pulmones obtenidos se fijaron en formaldehído al 10%. La deshidratación se llevo a cabo en alcohol etílico y se incluyeron en parafina.

Análisis Morfométrico.

Cortes de 5 micras de espesor fueron obtenidos con un microtomo de tipo Minot, tiñéndose con las técnicas de Van Gieson (Sheehan y Hrapchack, 1980), y de Rojo Sirio (Junqueira et al, 1978) para las fibras colágenas, y con la técnica de Resorcina-fucsina (Putt, 1972) para las fibras elásticas.

Las laminillas teñidas por Van Gieson y por Resorcina-fucsina fueron analizadas con el microscopio de campo claro, y las teñidas por Rojo Sirio con el microscopio de polarización.

Para el análisis morfométrico se empleó el método de

muestreo de puntos.

Debido a la heterogeneidad en la distribución de las fibras colágenas en pulmones de fetos de 15 y 16 días, y a que las fibras elásticas aún no aparecen en fetos de esta edad, los pulmones de éstos no fueron analizados por el método de muestreo de puntos.

La estimación cuantitativa se realizó en productos desde los 17 días de gestación hasta 3 días postparto, y se empleó un ocular con una rejilla de 121 puntos. En cada laminilla, se muestrearon 5 ó 6 campos no consecutivos, evitando bronquios y vasos de grueso calibre, y la pleura. Se cuantificaron los puntos que coincidieron con las fibras y se trabajó con las medias aritméticas del total de campos, las cuales fueron confrontadas en el análisis estadístico.

Todos los muestreos fueron repetidos por lo menos tres veces en pulmones de fetos o neonatos de ratonas diferentes, tanto en ratonas tratadas como en ratonas control.

La amplificación total empleada para hacer las cuantificaciones fue de 320X en las laminillas teñidas por Van Gieson y por Resorcina-fucsina, y de 256X en el caso de las teñidas con Rojo Sirio.

Análisis Bioquímico.

La concentración de colágena fue calculada determinando la concentración de hidroxiprolina (Huszar, 1980), en cortes de pulmones incluidos en parafina (Schwartz et al, 1985), utilizándose los mismos pulmones empleados para el estudio morfométrico.

- Los cortes fueron colocados en tubos de vidrio y desparafinados. Se agregaron 265 μ l de NaOH 4M y se colocaron a 120°C por 30 minutos. Del hidrolizado se tomaron 15 μ l para determinar proteínas, a los 250 μ l restantes se les ajustó el pH a 6 con ácido cítrico 1.4 N y se agregó 1.25 ml de cloramina T. Después de 20 mi-

nutos se agregaron 1.25 ml del reactivo aldehído-ac. perclórico. Se mezcló y se incubó por 20 minutos a 70°C. Se determinó la absorbancia a 550 nm en un espectrofotómetro Turner. Las lecturas de absorbancia de los cortes se compararon con lecturas de concentraciones conocidas de hidroxiprolina, que se utilizaron como estandar.

Se cuantificó la cantidad de proteínas por la reacción con ninhidrina (Hirs, 1967), como referencia para expresar la cantidad de hidroxiprolina por cantidad de proteína.

- Se tomaron 15 μ l de los tubos anteriores, después de la hidrólisis alcalina, y se les agregaron 235 μ l de NaOH 4M. Se colocaron a 120°C por una hora 30 minutos más. Se neutralizó el pH con ácido acético glacial. Se agregaron 190 μ l del reactivo de ninhidrina. Se agitaron y se colocaron en autoclave por 15 minutos. Se les agregó 5.5 ml de etanol al 50%. Se agitó y se centrifugó. En el sobrenadante se determinó la absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro Turner. Las lecturas de absorbancia de los cortes se compararon con lecturas de concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina, que se utilizaron como estandar.

Análisis Estadístico.

Se emplearon análisis de varianza y prueba "t" de Student para determinar si se encontraban diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de colágena y en la cantidad de fibras entre los pulmones tratados con dexametasona en comparación con pulmones sin tratamiento. Se realizó un análisis de correlación para determinar si la cantidad de colágena y la cantidad de fibras colágenas después del tratamiento con dexametasona estaban correlacionadas.

RESULTADOS

ESTUDIO MORFOMETRICO.

Los pulmones de fetos y neonatos tratados con el glucocorticoide, con base en la apariencia histológica, mostraron un desarrollo más avanzado, en comparación con los pulmones control. Esto fue más notable en pulmones de fetos de 16 días, en los cuales los tratados con dexametasona se encontraron en la etapa canalicular (fig. 1), mientras los pulmones sin tratamiento se encontraron en la etapa pseudoglandular de la morfogénesis pulmonar (fig. 2).

La apariencia microscópica de los pulmones de neonatos de 3 días controles y tratados fue muy semejante (figs. 3 y 4), se encontraron en la etapa de saco terminal del desarrollo pulmonar.

Debido a la heterogeneidad en la distribución de las fibras colágenas en los pulmones de fetos de 15 y 16 días, éstos no fueron analizados por el método de muestreo de puntos. Las fibras se encontraron únicamente alrededor de los túbulos epiteliales y en la pleura. Los pulmones de fetos tratados con dexametasona mostraron mayor cantidad de túbulos epiteliales (figs. 5 y 6), y por lo tanto mayor cantidad de fibras colágenas.

No se observaron fibras elásticas en pulmones de fetos de 15 días. Estas empezaron a aparecer en pulmones de fetos control de 16 días (fig. 7), mientras en los animales tratados de la misma edad, más desarrollados en su morfogénesis pulmonar, había mayor cantidad.

El análisis morfométrico sobre las fibras colágenas y elásticas, se realizó en pulmones de fetos de 17 y 18 días, recién nacidos, y en neonatos de 1, 2 y 3 días. La tabla I muestra los resultados del efecto del tratamiento con dexametasona sobre las fibras colágenas y elásticas, en cada uno de los días tratados.

Fig. 1. Pulmón de feto de ratón de 16 días de desarrollo tratado con dexametasona, en la etapa canalicular de la morfogénesis pulmonar, a) epitelio; b) mesénquima; c) fibras colágenas. Rojo Sirio. 160X

Fig. 2. Pulmón de feto de ratón control de 16 días de desarrollo, en la etapa pseudoglandular de la morfogénesis pulmonar. a) epitelio; b) mesénquima. Van Gieson. 200X.

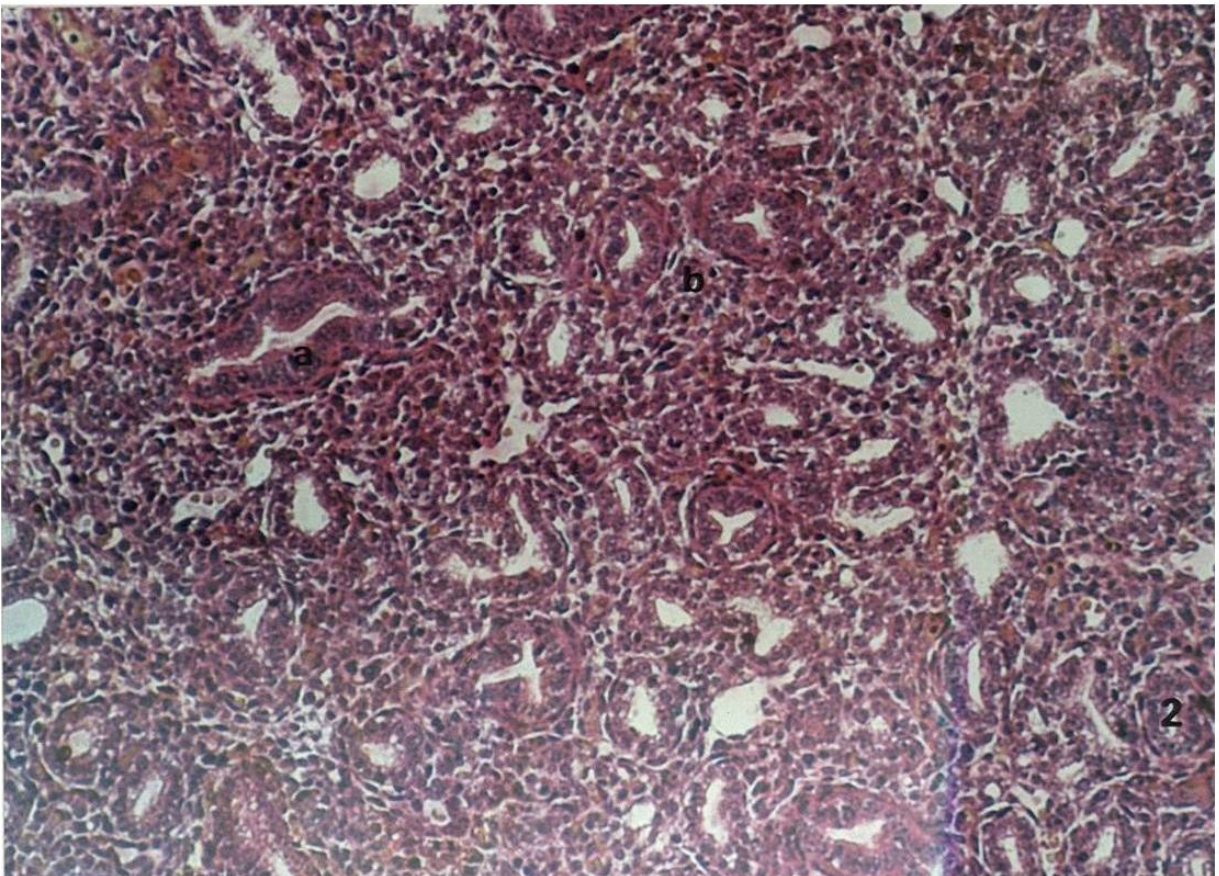
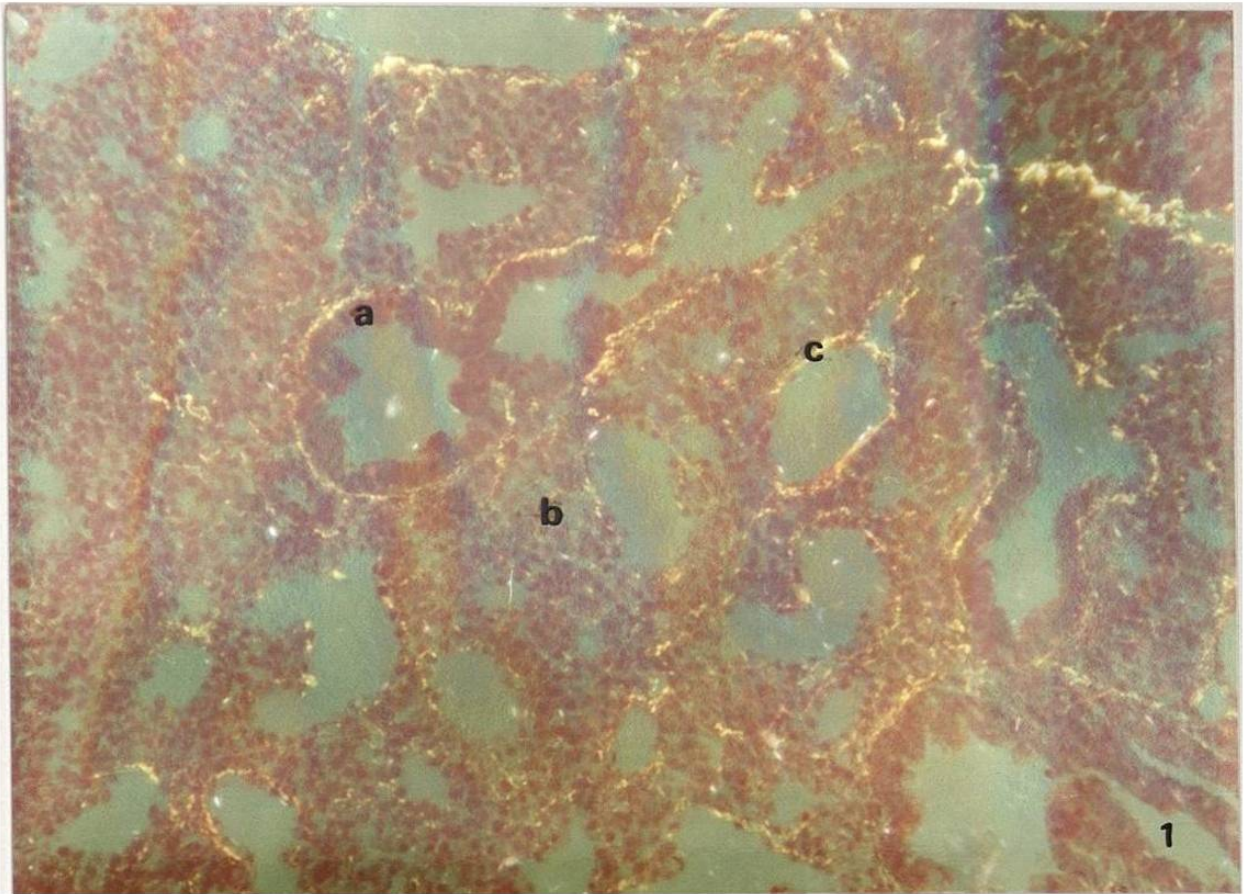


Fig. 3. Pulmón de neonato de ratón de 3 días tratado con dexametasona en la etapa de saco terminal de la morfogénesis pulmonar. Resorcina-fucsina. 160X

Fig. 4. Pulmón de neonato de ratón control de 3 días en la etapa de saco terminal de la morfogénesis pulmonar. Resorcina-fucsina. 160X

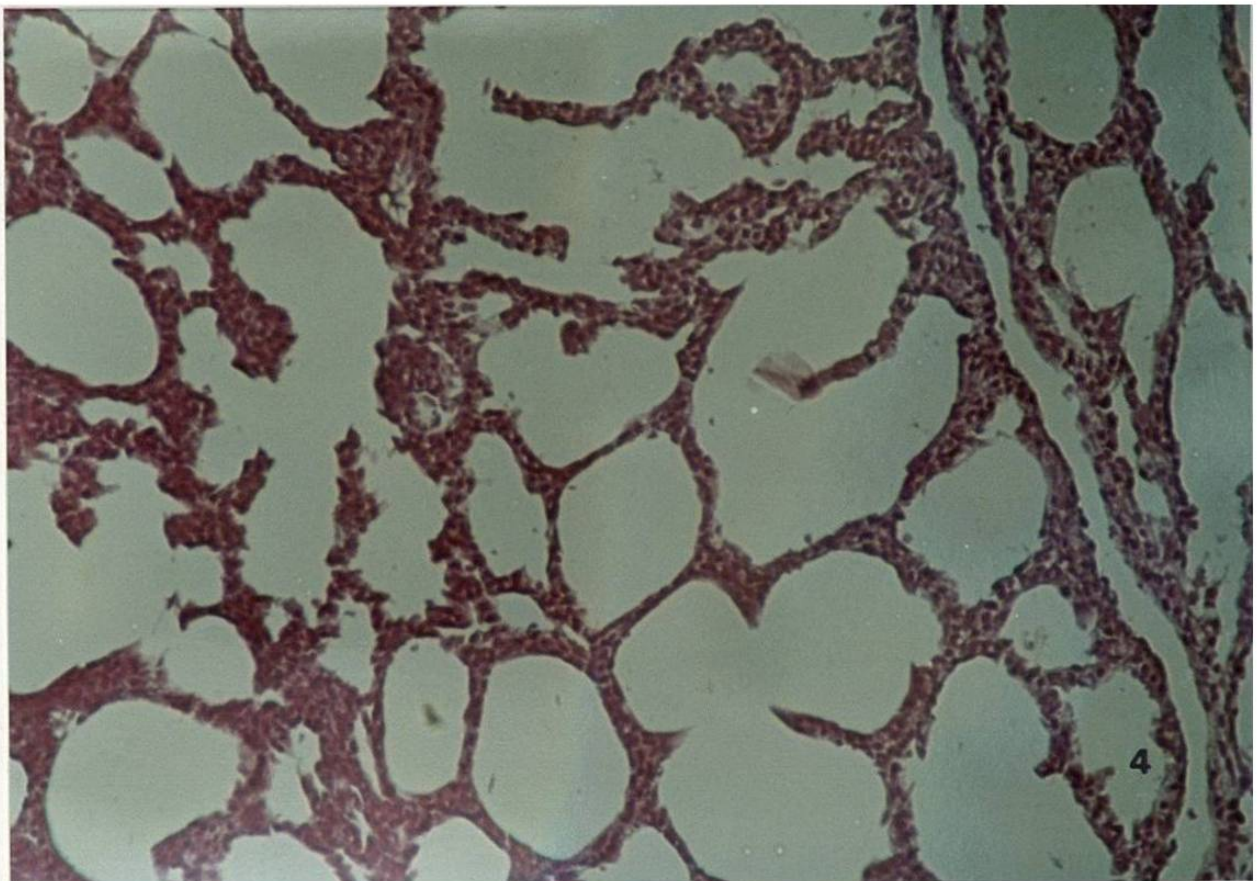
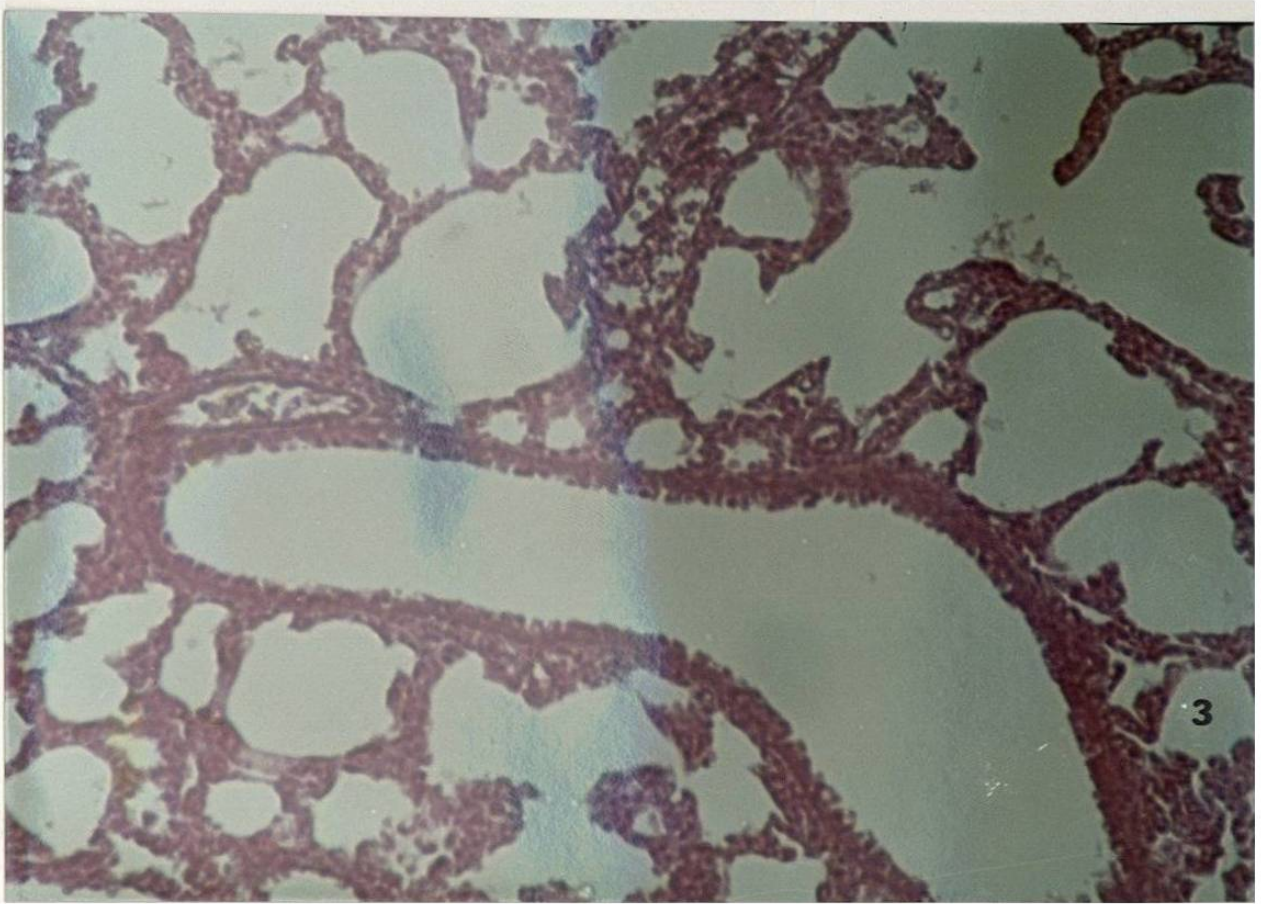


Fig. 5. Pulmón de feto de ratón de 15 días tratado con dexametasona en la etapa pseudoglandular de la morfogénesis pulmonar. a) fibras colágenas; b) epitelio c) mesénquima. Rojo Sirio. 400X.

Fig. 6. Pulmón de feto de ratón control de 15 días en la etapa pseudoglandular de la morfogénesis pulmonar. a) fibras colágenas; b) epitelio; c) mesénquima. Rojo Sirio. 190X.

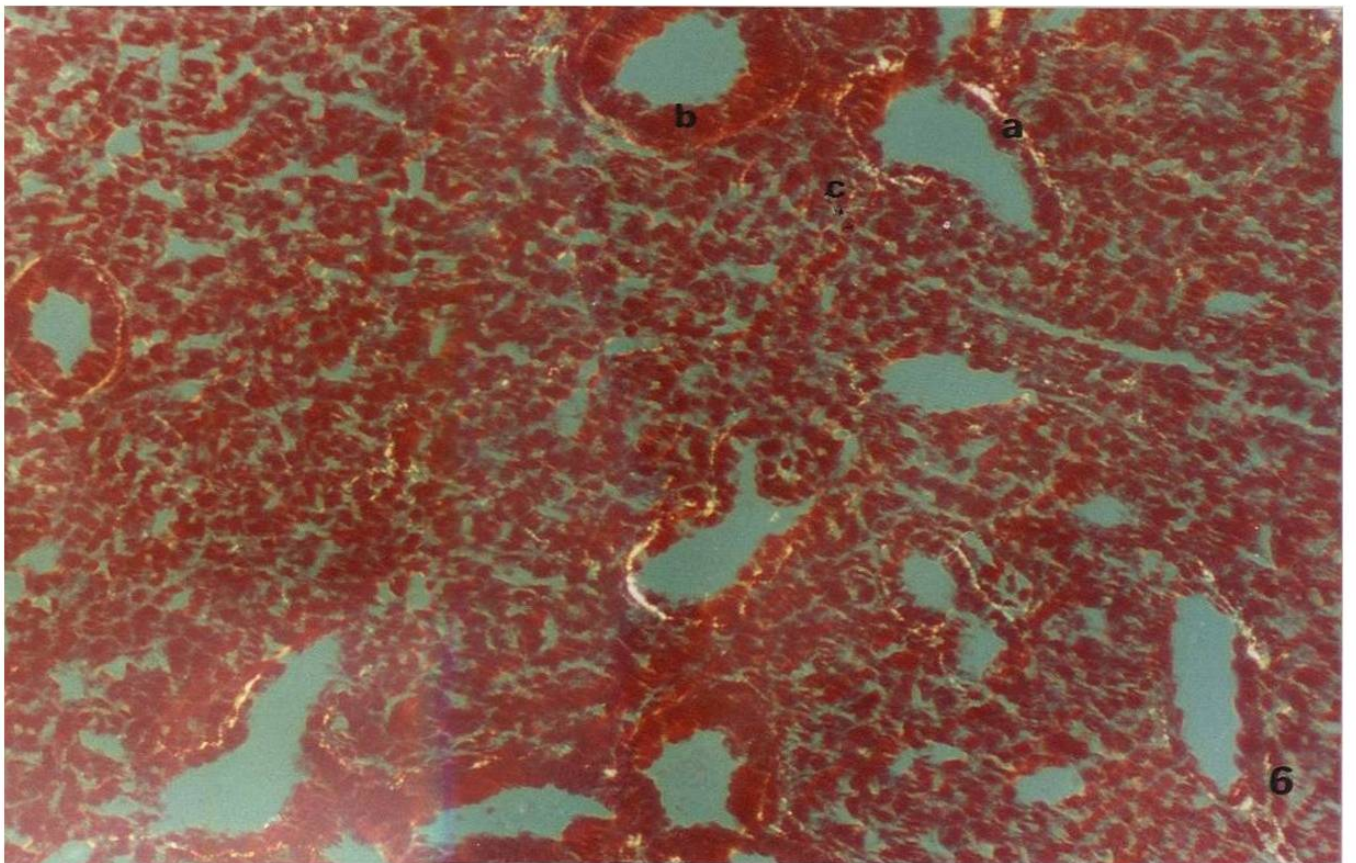
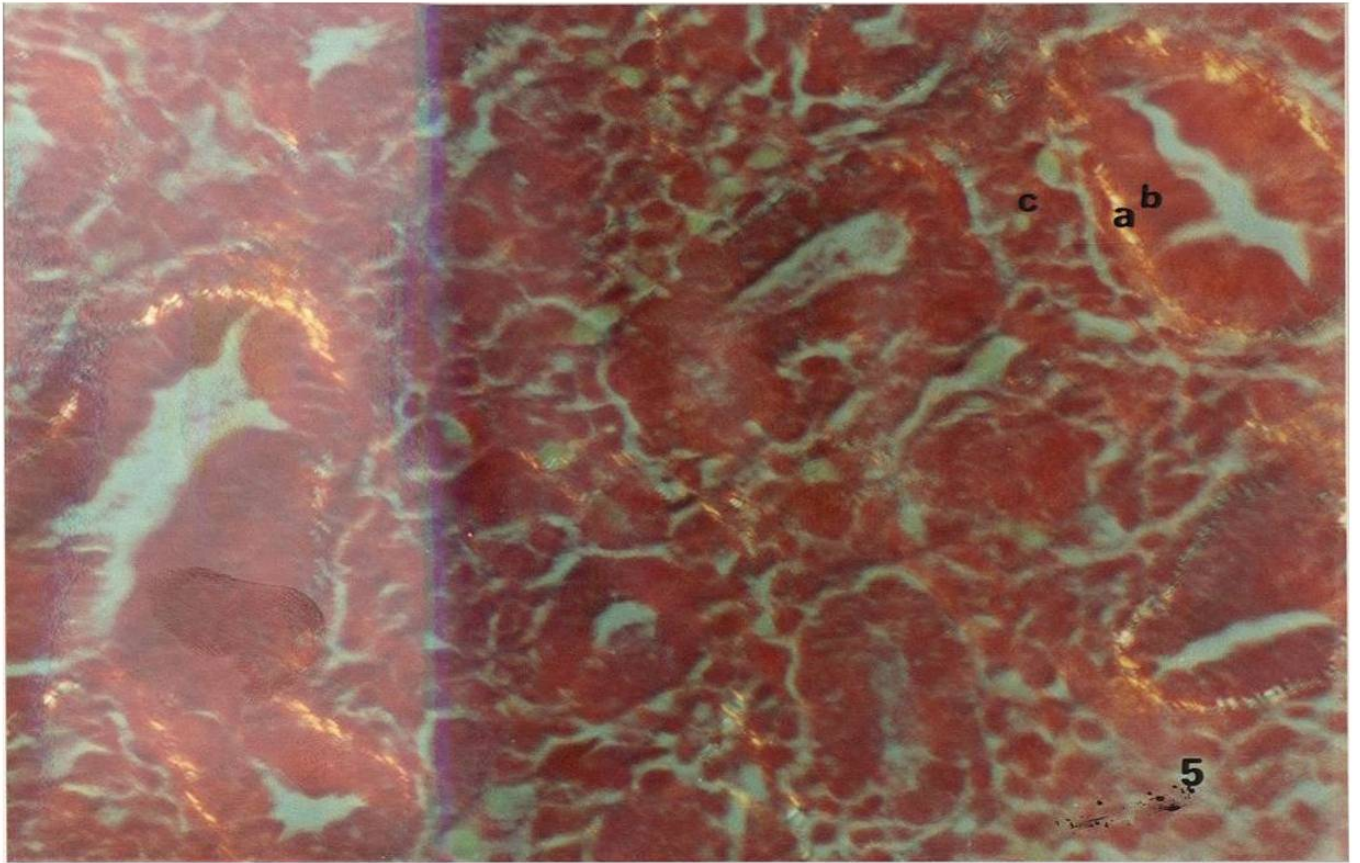


Fig. 7. Pulmón de feto de ratón control de 16 días en la etapa pseudoglandular de la morfogénesis pulmonar. a) fibras elásticas; b) epitelio; c) mesénquima. Resorcina-fucsina. 860X

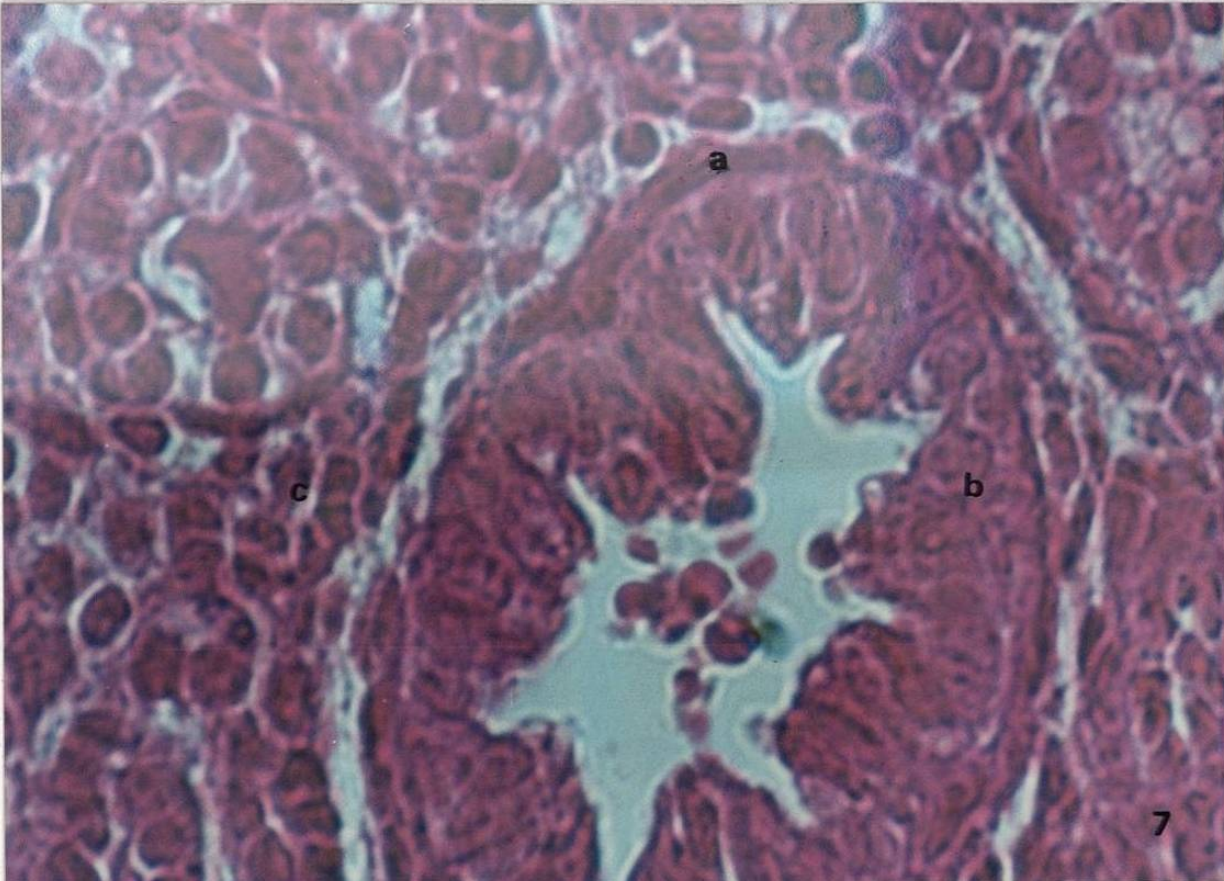


Tabla I. Efecto de la dexametasona sobre las fibras del tejido conectivo del pulmón en desarrollo. Fibras colágenas teñidas por Rojo Sirio (RS) y por Van Gieson (VG), y fibras elásticas teñidas por Resorcina-fucsina (RF).

	DIA	CONTROL	P	TRATADO
PRENATAL	17	RS= 23.020±2.13*(8)**	<0.05	25.479±1.57(8)
		VG= 18.111±1.27(6)	<0.05	20.222±1.35(6)
		RF= 13.938±1.17(8)	<0.05	16.063±1.56(8)
	18	RS= 26.433±1.65(6)	NS***	27.233±1.65(6)
		VG= 21.067±0.88(6)	NS	21.800±0.76(6)
		RF= 16.200±1.15(6)	<0.05	17.900±0.97(6)
RN****	19	RS= 27.500±1.37(6)	NS	28.400±1.12(6)
		VG= 22.833±0.95(6)	NS	23.333±0.64(6)
		RF= 18.567±0.56(6)	<0.05	19.633±0.76(6)
POSTNATAL	1	RS= 30.700±0.89(6)	NS	31.000±1.52(6)
		VG= 24.533±0.88(6)	NS	24.667±1.00(6)
		RF= 21.333±1.03(6)	<0.05	22.600±0.42(6)
	2	RS= 31.033±1.61(6)	NS	31.300±0.91(6)
		VG= 24.733±1.44(6)	NS	25.100±0.94(6)
		RF= 25.033±1.09(6)	NS	25.867±0.98(6)
	3	RS= 31.200±0.48(6)	NS	31.900±0.89(6)
		VG= 25.533±0.26(6)	NS	26.100±2.92(6)
		RF= 26.556±1.51(6)	NS	27.194±0.85(6)

*= Media ± desviación estandar de puntos que coincidieron con fibras.

**= n, se muestrearon 3 ó 4 camadas diferentes, 1 pulmón-macho y 1 pulmón-hembra en cada camada.

***= Diferencia no significativa.

****= Recién nacidos.

ESTUDIO BIOQUIMICO.

En esta fase se analizaron cortes de pulmones de fetos de 15, 16, 17 y 18 días, recién nacidos, y neonatos de 1, 2 y 3 días. Se determinó la concentración de hidroxiprolina, como una medida de la colágena, y la concentración de proteínas, como referencia para expresar la cantidad de colágena por miligramo de proteína. Los resultados del tratamiento con dexametasona sobre la cantidad de colágena del pulmón son mostrados en la tabla II y en la figura 8.

Tabla II. Efecto de la dexametasona sobre la cantidad de colágena en el pulmón en desarrollo.

	DIA	CONTROL	P	TRATADO
PRENATAL	15	14.193±1.37*(6)**	NS***	15.515±1.00(6)
	16	15.418±0.79(6)	<0.05	16.923±0.95(6)
	17	17.513±1.66(6)	<0.05	19.634±0.86(6)
	18	19.845±1.39(6)	NS	20.372±1.65(6)
RN°	19	19.949±1.15(6)	NS	21.567±1.69(6)
POSTNATAL	1	20.637±1.59(6)	NS	21.699±1.15(6)
	2	21.390±1.19(6)	NS	22.065±1.40(6)
	3	22.357±1.21(6)	NS	22.658±1.54(6)

* ± Media + desviación estandar en microgramos de colágena por miligramo de proteína.

** ± Pulmones analizados, se muestrearon 3 camadas diferentes, 1 pulmón-macho y 1 pulmón-hembra por cada camada.

*** = Diferencia no significativa.

° = Recién nacidos.

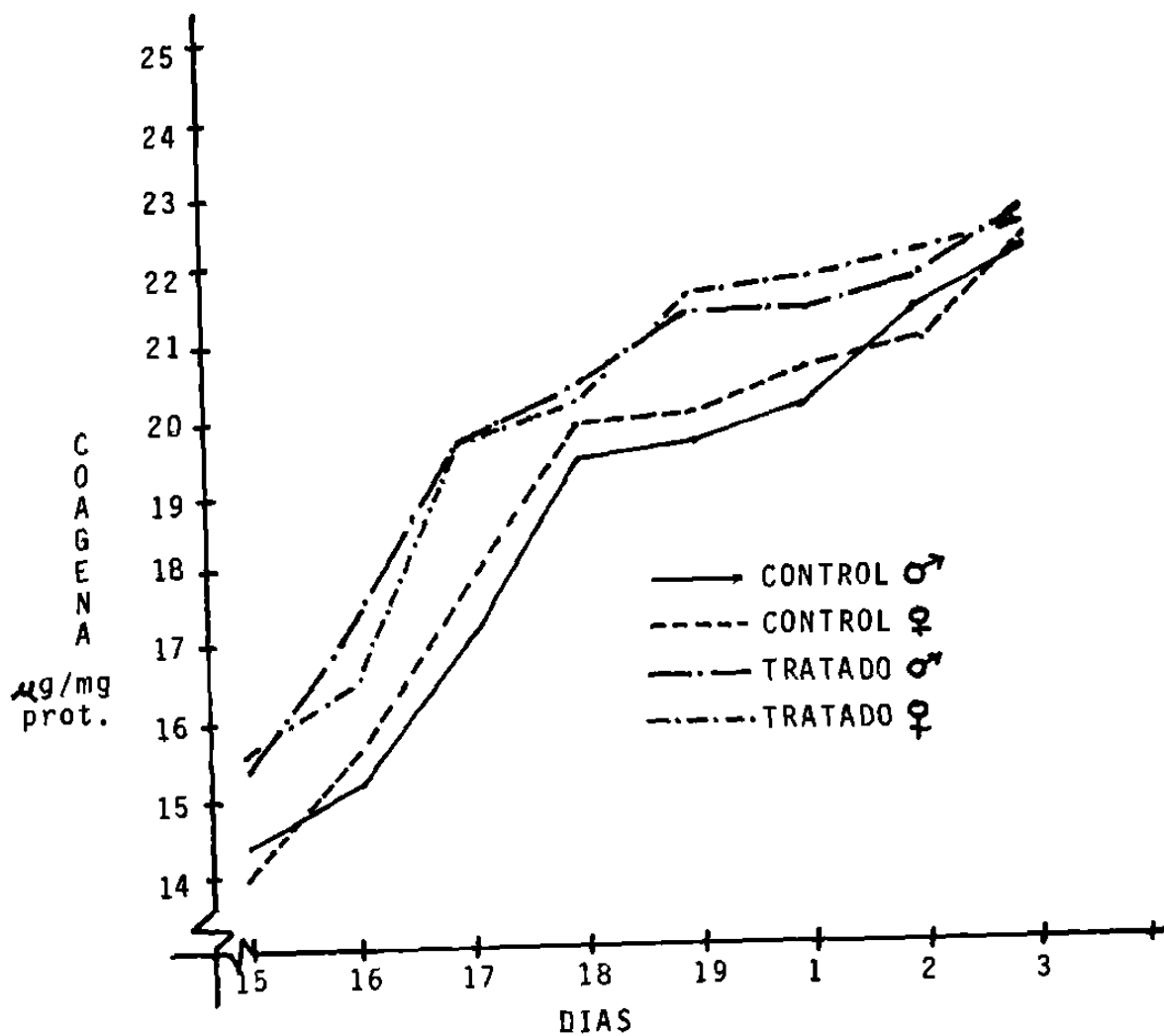


Fig. 8. Colágena de pulmones de fetos y neonatos, machos y hembras, con y sin tratamiento con dexametasona.

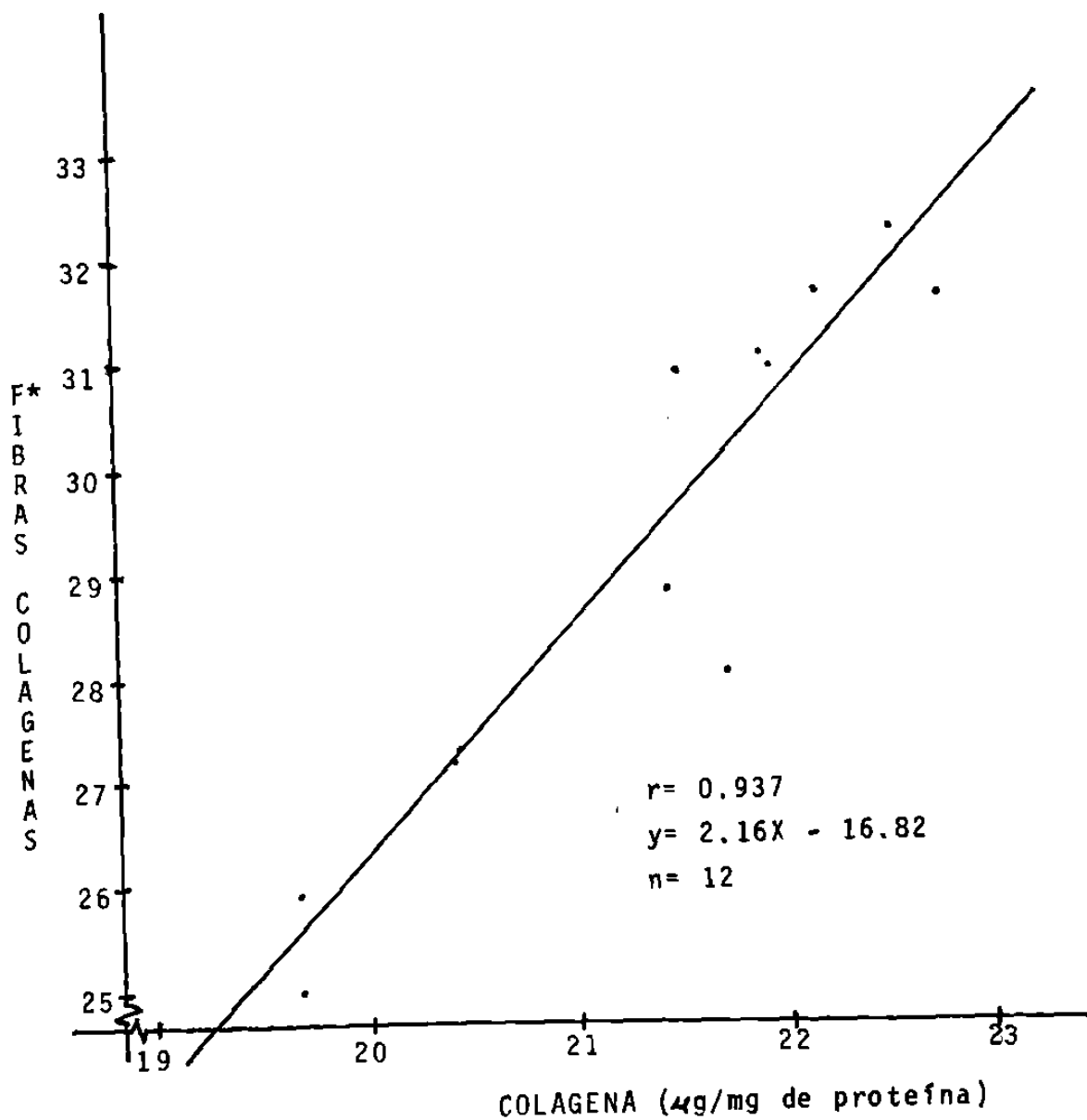


Fig. 9. Correlación entre la proteína colágena y las fibras colágenas en pulmones tratados con dexametasona. (P 0.001; $0.75 \leq p \leq 0.99$).

*= puntos que coincidieron con fibras, en el estudio morfométrico de pulmones teñidos con Rojo Sirio.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

En este estudio se encontró que la administración transplacentaria de dexametasona a fetos de ratón durante su desarrollo originó aumento en las fibras colágenas y elásticas del pulmón. El análisis mostró que las fibras colágenas se incrementaron en pulmones de fetos de 16 y 17 días. Las fibras elásticas se encontraron aumentadas en pulmones de fetos de 16, 17 y 18 días, en recién nacidos, y en neonatos de un día, por lo que se confirma la hipótesis propuesta.

No se han reportado trabajos que analicen el efecto de los glucocorticoides sobre las fibras del tejido conectivo en tejidos fetales o neonatales. Sin embargo, hay reportes del efecto de éstos sobre las principales proteínas componentes (colágena y elastina), aunque se han reportado resultados variables dependiendo de la especie ó del glucocorticoide empleado. En embriones de pollo la hidrocortisona y la dexametasona disminuyen la cantidad de colágena (Eichner y Rosenbloom, 1979; Oikarinen et al, 1984), pero en piel de embrión humano la hidrocortisona y la prednisona la incrementan (Harvey et al, 1974; Doherty y Saarni, 1976; Saarni y Tammi, 1978). En neonatos la dexametasona y el diacetato de triamcinolona disminuyen la colágena tipo I en piel y pulmón de pollos y ratas (Shull y Cutroneo, 1983; Sterling et al, 1983), pero en dermis de ratón la dexametasona y la cortisona no alteran la cantidad de colágena tipo I (Verbruggen y Abe, 1982). En este trabajo se analizó el efecto de la dexametasona sobre la colágena, se observó que ésta se encontraba incrementada en fetos tratados con el glucocorticoide.

Se ha reportado que los glucocorticoides aumentan la cantidad de elastina, principal componente de las fibras elásticas, en tejido embrionario (Eichner y Rosenbloom, 1979; Mecham et al, 1981; Mecham et al, 1984), por lo que

se ha sugerido un papel potencial de regulación por parte de los glucocorticoides en la elastogénesis durante el desarrollo. Los hallazgos de este trabajo mostraron que la dexametasona incrementó la cantidad de fibras elásticas de manera significativa, probablemente los glucocorticoides sean factores que determinen o modulen la síntesis de elastina durante la morfogénesis del pulmón.

Se determinó el efecto de la dexametasona sobre las fibras del tejido conectivo en pulmones de los neonatos, se encontró que las alteraciones parecen ser transitorias, ya que la apariencia histológica de los pulmones de neonatos de 2 y 3 días con y sin tratamiento con dexametasona es muy semejante, y en éstos los resultados del estudio morfométrico-bioquímico mostraron que no hay diferencia significativa en la cantidad de fibras colágenas y elásticas, ni en la cantidad de colágena.

Se ha reportado que los pulmones de fetos hembra de conejos y humanos muestran una mayor maduración histológica en comparación con pulmones de fetos machos (Naeye et al, 1974; Kotas y Avery, 1980). En este estudio no se encontró diferencia en la cantidad de fibras del tejido conectivo, ni en la cantidad de colágena, con respecto al sexo, ni por efecto del tratamiento con el glucocorticoide. En pulmones de fetos de ratón no se han reportado diferencias histológicas con respecto al sexo, posiblemente no se presenten o quizá los métodos bioquímico-morfométricos empleados en este estudio no sean lo suficientemente sensibles para detectar diferencias en la cantidad de fibras o de colágena entre los sexos.

Esta ampliamente reconocido que la exposición de tejidos animales a fijadores, agentes deshidratantes, etc., que son comunmente empleados en la preparación para examen microscópico, causan ciertas alteraciones físicas y químicas y grados variantes de distorsión de los tejidos. El

pulmón, quizá mas que cualquier otro órgano, esté sujeto a estas influencias desfavorables, particularmente en etapas postnatales ya que este órgano tiende a colapsarse cuando es removido del cuerpo, por lo que cuando se realizan estudios morfométricos es necesario considerar estos factores. En el presente trabajo se trató de obtener la mayor uniformidad en el manejo técnico de tejidos tratados y controles (mismo fijador, tiempo de fijación, método de fijación, etc.), además de una gran cantidad de repeticiones en los muestreos morfométricos.

Ultraestructuralmente se observa que las fibras elásticas maduras estan constituidas de un componente amorfo, la elastina, y de un componente microfibrilar. Dentro de la elastogénesis se reconocen tres etapas: Las fibras de oxytalán que estan compuestas unicamente del componente microfibrilar; las fibras de elaunina, que ya contienen elastina, pero en menor cantidad que el componente microfibrilar; y las fibras elásticas maduras, que su principal componente es la elastina. El método de Resorcina-fucsina empleado en el presente estudio, permite identificar las fibras de elunina y las fibras elásticas (Bock y --- Stockinger, 1984).

Para determinar alteraciones en la síntesis de colágena se emplea principalmente prolina marcada radioactivamente, que es incorporada en la cadena alfa de la molécula de tropocolágena y es hidroxilada, formándose hidroxiprolina. Este aminoácido se encuentra únicamente en cantidades significativas en la colágena y en menores cantidades en la elastina. En el presente trabajo se cuantificó la hidroxiprolina para determinar alteraciones en la cantidad de colágena. Esto se realizó en los mismos pulmones, incluidos en parafina, empleados en el estudio morfológico. Los resultados encontrados en este último sobre las fibras colágenas, y en el estudio bioquímico sobre la hi-

droxiprolina mostraron una muy buena correlación.

La elastina parece ser sintetizada por células mesenquimáticas en el pulmón en desarrollo (Rucker y Dubick, 1984). Las fibras elásticas aparecen en las zonas bronquiales primitivas en la parte final de la etapa pseudoglandular de la morfogénesis pulmonar, en fetos de rata (Collet y Das Biens, 1974), de carnero (Fukuda et al, 1983), y de humano (Loosli y Potter, 1959). En este estudio se encontraron fibras elásticas en pulmones de fetos de ratón de 16 días de gestación (etapa pseudoglandular), alrededor de los bronquios primitivos.

En la etapa pseudoglandular temprana las fibrillas de colágena forman una capa gruesa alrededor de la zona bronquiolar primitiva, que en etapas posteriores se adelgaza (Fukuda et al, 1983). En este trabajo se analizaron pulmones de fetos desde los 15 días de gestación, y se encontraron fibras de colágena alrededor de los túbulos epiteliales.

Una característica prominente en el desarrollo temprano del pulmón es la gran cantidad de ramificaciones que se llevan a cabo de las yemas pulmonares primitivas y que eventualmente resultan en la formación del árbol bronquial y alveolos. Esta serie de ramificaciones ocurre por interacciones epitelio-mesénquima y por modulación de las fibras del tejido conectivo. La administración de glucocorticoides al feto acelera la diferenciación epitelial y del mesodermo en el pulmón, a expensas de una disminución o detención en la proliferación celular (Strang, 1977). En el ratón se ha reportado que la dexametasona acelera la morfogénesis pulmonar y la citodiferenciación del epitelio alveolar (Velázquez y Sepúlveda, 1982). En este estudio se encontró un desarrollo pulmonar más avanzado en fetos tratados con dexametasona, y un incremento en la cantidad de fibras colágenas y elásticas. La aceleración en la morfo-

génesis del pulmón y en diferenciación de las células mesenquimáticas quizá sea la explicación al incremento en las fibras del tejido conectivo. Sin embargo, esto no explicaría porque las fibras colágenas, en este estudio, solo se incrementaron en pulmones de fetos de 16 y 17 días, mientras las fibras elásticas se encontraron incrementadas desde el día 16 prenatal hasta el día 1 postnatal. Probablemente el efecto observado en las fibras elásticas sea ocasionado por un verdadero incremento en la síntesis de éstas, mientras en el caso de las fibras colágenas el efecto encontrado sea debido a la aceleración en la morfogénesis del pulmón. Serán necesarias investigaciones posteriores para determinar la relación entre los glucocorticoides y la producción de fibras del tejido conectivo, y así poder confirmar estas aseveraciones.

El empleo de un modelo de células mesenquimáticas o de fibroblastos fetales aislados podría dar mayor información para la comprensión del efecto de los glucocorticoides. Aunque, en el caso de la colágena, la experiencia ha demostrado que los glucocorticoides tienen varios niveles distintos en donde interfieren con la biosíntesis o degradación de esta proteína (Dikarinen et al, 1986). Se conoce que en el pulmón fetal los glucocorticoides entran a las células pulmonares donde se unen a un receptor citoplásmatico. Este complejo glucocorticoide-receptor subsecuentemente se une a sitios aceptores nucleares (Shields y Resnik, 1979). Si las células mesenquimáticas o, posteriormente, los fibroblastos fetales tienen receptores a glucocorticoides. ¿activará este complejo a los genes de la colágena y elastina en estas células?, ¿tendrá diferente acción sobre estos genes?, ¿a que nivel de la biosíntesis se efectuará la regulación o modulación de los glucocorticoides sobre estas fibras?.

No hay duda de que los glucocorticoides aceleran la

madurez pulmonar fetal, reducen la frecuencia de aparición del SSR, y disminuyen el número de muertes causadas por inmadurez pulmonar, por lo que el uso de este tratamiento parece estar justificado en el momento actual. En relación a las fibras del tejido conectivo, los hallazgos del presente estudio muestran que los efectos de los glucocorticoides parecen ser transitorios sobre las fibras colágenas y elásticas, y sobre la proteína colágena, no obstante será necesario un estudio morfométrico sobre las células y otras estructuras del pulmón, además de estudios fisiológicos, para poder establecer claramente cuales son los efectos a largo plazo del tratamiento fetal con glucocorticoides, si es que se presentan algunos, que afecten el funcionamiento adecuado del pulmón en etapas posteriores.

RESUMEN

La dexametasona, entre otros glucocorticoides, se emplea en terapéutica para prevenir el síndrome de sufrimiento respiratorio, administrándola a la madre con riesgo de parto prematuro. Sin embargo, el papel farmacológico de los glucocorticoides sobre los diferentes aspectos de la organogénesis pulmonar aún no se encuentra totalmente caracterizado.

En este trabajo se determinó, por métodos morfométrico-bioquímicos, el efecto de la dexametasona sobre las fibras colágenas y elásticas del pulmón, durante el desarrollo fetal del ratón albino. Se administró el glucocorticoide a hembras preñadas a partir del día 14 y hasta el día 18 de gestación. Se analizaron pulmones de fetos de 15 a 18 días, recién nacidos, y neonatos de 1 a 3 días.

Se tiñeron las fibras colágenas con los métodos de Van Gieson y con Rojo Sirio (Microscopía de polarización). Las fibras elásticas se tiñeron por el método de Resorcina fucsina.

Debido a la heterogeneidad en la distribución de las fibras colágenas, los pulmones de fetos de 15 y 16 días no fue posible analizarlos en el estudio morfométrico, las fibras solo se encontraron alrededor de los bronquios primitivos. Los pulmones de fetos tratados con dexametasona mostraron un desarrollo más avanzado en comparación con pulmones de fetos control, y mayor cantidad de fibras colágenas. Las fibras elásticas empezaron a aparecer en pulmones de fetos de 16 días, alrededor de los bronquios primitivos.

El análisis morfométrico se llevó a cabo en pulmones de fetos de 17 y 18 días, recién nacidos, y neonatos de 1 a 3 días. Se encontró que en fetos con tratamiento las fibras colágenas estaban incrementadas en pulmones de fetos

de 17 días. Las fibras elásticas se incrementaron en fetos de 17 y 18 días, recién nacidos, y neonatos de un día. No se encontraron diferencias por efecto del tratamiento en la cantidad de fibras colágenas, ni en la cantidad de fibra elástica, con respecto al sexo.

En el estudio bioquímico se determinó la cantidad de hidroxiprolina, como una medida de la colágena. Se analizaron pulmones de fetos de 15 días de gestación y hasta el tercer día postparto. Se encontró se hubo un incremento en la cantidad de colágena en pulmones de fetos de 16 y 17 días tratados con el glucocorticoide. No se observaron diferencias por efecto del tratamiento en la cantidad de colágena entre los sexos.

El efecto de la dexametasona sobre las fibras parece ser transitorio, ya que no se encontraron alteraciones en la cantidad de fibras colágenas y elásticas, ni en la cantidad de colágena, en pulmones de neonatos de 2 y 3 días. Además, la apariencia histológica en los pulmones controles y tratados de estos neonatos fue muy semejante entre sí.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Alescio,T. Effect of a proline analogue acetidine-2-carboxylic acid on the morphogenesis in vitro of mouse embryonic lung. J. Embryol. Exp. Morph. 29:439-451. (1973). Citado en: Strang,L.B. Neonatal Respiration Physiological and Clinical Studies. Ed. Blackwell Scientific Publications. pag. 1-19. (1977).
- 2.- Amy,R.W.M., Bowes,D., Burri,P.H., Haines,J., and Thurlbeck,W.M. Postnatal growth of the mouse lung J. Anat. 124:131-151. (1977).
- 3.- Bishop,E.H. Aceleration of pulmonar fetal maturation. Obstet. Gynecol. 58:485. (1981).
- 4.- Bock,P. and Strockinger,L. Light and electron microscopic identification of elastic, elaunin and oxytalan fibers in human tracheal and bronchial mucosa. Anat. Embryol. 170:145-153. (1984).
- 5.- Booth,B.A., Tan,E.M.L., Oikarinen,A., and Uitto,J. Steroid-induced dermal atrophy. Int. J. Dermatol. 21:333-337. (1982).
- 6.- Bradley,K.H., Mc Connell,S.D., and Crystal,R.G. Lung collagen composition and synthesis. Characterization and changes with age. J. Biol. Chem. 249:2674-2683. (1974).
- 7.- Burri,P.H. and Weibel,E.R. Ultrastructure and morphometry of the developing lung. En: Hodson, W.A. Development of the Lung. Lung Biology in Health and Disease. Ed. Marcel Dekker, Inc, New York. Vol.6 pag. 215-268. (1977).

- 8.- Collet,A.J. and Des Biens,G. Fine structure of myogenesis and elastogenesis in the developing rat lung. Anat. Rec. 179:343-360. (1974).
- 9.- Cutroneo,K.R., Rokowski,R. and Counts,D.F. Glucocorticoids and collagen synthesis: Comparison of in vivo and cell culture studies. Collagen Rel. Res. 1:557-568. (1981).
- 10.- De Lemos,R.A., Shermata,D.W., Knelson,J.H., Kotas,R., and Avery, M.E. Acceleration of appearance of pulmonary surfactant in the fetal lamb by administration of corticosteroids. Am. Rev. Respir. Dis. 102:459-461. (1970).
- 11.- De Lemos,R.A. and Mc Laughlin,G.W. Induction of the pulmonary surfactant in the fetal primate by the intrauterine administration of corticosteroids. Pediatr. Res. 7:425. (1973).
- 12.- Doherty,N.D. and Saarni,H. Stimulation by hydrocortisone of rate of collagen synthesis in cultured fibroblasts. J. Pharm. Pharmacol. 28:656. (1976). Cited in: Booth,B.A., Tan,E.M.L., Oikarinen,A. and Uitto,J. Steroid-induced Dermal Atrophy. Int. J. Dermatol. 21:333-337. (1982).
- 13.- Eichner,R. and Rosenbloom,J. Collagen and elastin synthesis in the developing chick aorta. Arch. Biochem. Biophys. 198:414-423. (1979).
- 14.- Emery,J.L. The postnatal development of the human lung and its implications for lung pathology. Respiration 27:41-50. (1970).

- 15.- Farrel,P.M. and Avery,M.E. Hyaline membrane disease. Am. Rev. Resp. Dis. 111:657-688. (1975).
- 16.- Fukuda,Y., Ferrans,V.J. and Crystal,R.G. The development of alveolar septa in fetal sheep lung. An ultrastructural and immunohistochemical study. Am. J. Anat. 167:405-439. (1983).
- 17.- Gluck,L., Kulovich,M.V., Borer,R.C., Brenner,P.H., Anderson,G.G. and Spellacy,W.N. Diagnosis of the respiratory distress syndrome by amniocentesis. Am. J. Obstet. Gynecol. 109:440-445. (1971).
- 18.- Gluck,L. and Kulovich,M.V. Fetal lung development. Pediatr. Clin. North. Am. 20:367-379. (1973).
- 19.- Goldberg,B. and Rabinovitch,M. Connective tissue. En: Weiss,L. Histology. Cell and Tissue Biology. Elsevier Biomedical. New York. pag. 139-177. (1983).
- 20.- Guzelian,P.S., Lindblad,W.J. and Diegelmann,R.F. Glucocorticoids suppress formation of collagen by the hepatocyte. Gastroenterology 86:897-904. (1984).
- 21.- Harvey,W., Grahame,F. and Panayi,G.S. Effects of steroid hormone on human fibroblasts in vitro. Ann. Rheum. Dis. 33:437. (1974). Citado en: Booth,B.A., Tan,E.M.L., Oikarinen,A. and Uitto,J. Steroid-induced Dermal Atrophy. Int. J. Dermatol. 21:333-337. (1982).
- 22.- Hirs,C.H.W. Methods of Enzymology. Vol.XI New York and London: Academic Press. pag.325-329. (1967).
- 23.- Hernandez,M.R., Weinstein,B.I., Dunn,M.W., Gordon,G.G. and Southern,A.L. The effect of dexamethasone on the

- synthesis of collagen in normal human trabecular meshwork explants. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 26:1784-1788. (1985).
- 24.- Honig,L.S., Smith,B.T., Slavkin,H.C. and Donahue,H.G. Influence of the major histocompatibility complex (H-2) on glucocorticoid-stimulated pulmonary surfactant synthesis in two congenic mouse strains. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 176:419-425. (1984).
- 25.- Huszar,G., Maiocco,J. and Naftolin,F. Monitoring of collagen and collagen fragments in chromatography of protein mixtures. *Anal. Biochem.* 105:424-429. (1980).
- 26.- Jefferson,D.M., Reid,L.M., Giambrone,M., Shafritz,D.A. and Zern,M.A. Effects of dexamethasone on albumin and collagen gene expression in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Hepatology.* 5:14-20. (1985).
- 27.- John,R. and Thomas,J. Localization and chemical composition of elastin in ox lung. *Biochem. J.* 118: 58. (1970).
- 28.- Johnson,J.W.C., Mitzner,W., London,W.T., Palmer,A.E., Scott,R. and Kearney,K. Glucocorticoids and the rhesus fetal lung. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 130:905-916. (1978).
- 29.- Junqueira,L.C.U., Cossermelli,W. and Brentani,R. Differential staining of collagens type I, II and III by sirius red and polarization microscopy. *Arch. Histol. Jap.* 41:267-274. (1978).
- 30.- Kauffman,S.L. Kinetics of pulmonary epithelial proliferation during prenatal growth of the mouse lung.

Anat. Rec. 183:393-404. (1975).

- 31.- Kerepesi, T. and Aranyi, P. Low levels of glucocorticoid binding sites in circulating lymphocytes of premature infants suffering from hyaline membrane disease. J. Steroid. Biochem. 22:151-154. (1985).
- 32.- Kotas, R.V. and Avery, M.E. Accelerated appearance of pulmonary surfactant in the fetal rabbit. J. Appl. Physiol. 20:358-361. (1971).
- 33.- Kotas, R.V. and Avery, M.E. The influence of sex on fetal rabbit lung maturation and on the response to glucocorticoid. Am. Rev. Resp. Dis. 121:377-381. (1980).
- 34.- Liggins, G.C. Premature delivery of fetal lambs infused with glucocorticoids. J. Endocrinol. 45:515-523. (1969).
- 35.- Liggins, G.C. and Howie, R.N. A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants. Pediatrics 50:515-525. (1972).
- 36.- Loosli, C.G. and Potter, E.L. Pre- and postnatal development of the respiratory portion of human lung. Am. Rev. Respir. Dis. 80:5-23. (1959).
- 37.- Mc Coy, B.J., Diegelmann, R.F. and Cohen, J.K. In vitro inhibition of cell growth, collagen synthesis and prolyl hydroxylase activity by triamcinolone acetonide. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 163:216. (1980). Cited in: Booth, B.A., Tan, E.M.L., Oikarinen, A. and Uitto, J. Steroid-induced Dermal Atrophy. Int. J. Dermatol.

21:333-337. (1982).

- 38.- Mc Nelis,B. and Cutroneo,K.R. A selective decrease of collagen peptide synthesis by dermal polysomes isolated from glucocorticoid-treated newborn rats. *Mol. Pharmacol.* 14:1167-1175. (1978).
- 39.- Mecham,R.P., Lange,G., Madaras,J. and Starcher,B. Elastin synthesis by ligamentum nuchae fibroblasts: Effects of culture conditions and extracellular matrix on elastin production. *J. Cell. Biol.* 90:332-338. (1981).
- 40.- Mecham,R.P., Morris,S.L., Levy,B.D. and Wrenn,D.S. Glucocorticoids stimulated elastin production in differentiated bovine ligament fibroblasts but do not induce elastin synthesis in undifferentiated cells. *J. Biol. Chem.* 259:12414-12418. (1984).
- 41.- Naeye,R.L., Freeman,R.K. and Blanc,W.A. Nutrition, sex, and fetal lung maturation. *Pediatr. Res.* 8:200-204. (1974).
- 42.- Oikarinen,A.I., Zaragoza,E.J., Palotie,A., Chu,M-L. and Uitto,J. Receptor-mediated inhibition of procollagen gene expression by dexamethasone is accompanied by reduced type I procollagen mRNA levels in chick embryo fibroblasts. *Clin. Res.* 32:73A. (1984).
- 43.- Oikarinen,A.I., Uitto,J. and Oikarinen,J. Glucocorticoid action on connective tissue: From molecular mechanisms to clinical practice. *Med. Biol.* 64:221-230. (1986).
- 44.- Priestley,G.C. Effects of corticosteroids on the

- growth and metabolism of fibroblasts cultured from human skin. *Br. J. Dermatol.* 99:253. (1978).
- 45.- Putt, F.A. *Manual of Histopathological Staining Methods*. A Wiley-Interscience Publication. New York. pag. 111-113. (1972).
- 46.- Rucker, R.B. and Dubick, M.A. Elastin metabolism and chemistry: Potential roles in lung development and structure. *Environmental Health Perspectives* 55:179-191. (1984).
- 47.- Russell, J.D., Russell, S.B. and Trupin, K.M. Differential effects of hydrocortisone on both growth and collagen metabolism of human fibroblasts from normal and keloid tissue. *J. Cell Physiol.* 97:221. (1978).
En: Booth, B.A., Tan, E.M.L., Oikarinen, A. and Uitto, J. Steroid-induced Dermal Atrophy. *Int. J. Dermal.* 21: 333-337. (1982).
- 48.- Salomon, D.S., Liotta, L.A. and Kidwell, W.R. Differential response to growth factor by rat mammary epithelium plated on different collagen substrata in serum-free medium. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78:382-386. (1981).
- 49.- Saarni, H. and Tammi, M. Time and concentration dependence of the action of cortisol on fibroblasts in vitro. *Biochem. Biophys. Acta* 540:117. (1978).
Citado en: Booth, B.A., Tan, E.M.L., Oikarinen, A. and Uitto, J. Steroid-induced Dermal Atrophy. *Int. J. Dermal.* 21:333-337. (1982).
- 50.- Schwartz, D.E., Yooney, Ch., Sandell, L.J. and Hanson, W.R. Quantitative analysis of collagen, protein and DNA in fixed, parafin-embedded and sectioned tissue. *Histochem. J.* 17:655-663. (1985).

- 51.- Sheehan,D.C. and Hrapchak,B.B.. Theory and Practice of Histotechnology. 2^a Edition. The C.V. Mosby Company. St. Louis. pag. 188-189. (1980).
- 52.- Shields,J.R. and Resnick,R. Fetal lung maturation and the antenatal use of glucocorticoids to prevent the respiratory distress syndrome. Obstet. Gynecol. Survey 34:343-363. (1979).
- 53.- Shull,S. and Cutroneo,K.R. Glucocorticoids coordinately regulate procollagens type I and type III synthesis. J. Biol. Chem. 258:3364-3369. (1983).
- 54.- Smith,D.M., Shelley,S.A. and Balis,J.V. The maturation of the rabbit fetal lung following maternal administration of pilocarpine. Am. J. Anat. 154:163-178. (1979).
- 55.- Sterling,K.M.Jr., Harris,N.J., Mitchell,J.J., DiPetrillo, T.A., Delaney,G.L. and Cutroneo,K.R. Dexamethasone decreases the amounts of type I procollagen mRNAs in vivo and in fibroblast cell cultures. J. Biol. Chem. 258:7644-7647. (1983).
- 56.- Strang,L.B. Neonatal Respiration Physiological and Clinical Studies. Ed. Blackwell Scientific Publications. pag. 1-9. (1977).
- 57.- Sweat,F., Puchtler,H. and Rosenthal,S.I. Sirius red F3BA as a stain for connective tissue. Arch. Pathol. 78:69-72. (1964).
- 58.- Ten Have-Opbroek,A.A.W. The development of the lung in mammals: An analysis of concepts and findings. Am. J. Anat. 162:201-219. (1981).

- 59.- Torday,J.S., Nielsen,H.C., FencI,M. and Avery,M.E. Sex differences in fetal lung maturation. Am. Rev. Respir. Dis. 123:205-208. (1981).
- 60.- Velázquez,B.J. and Sepúlveda,J. Influence of trans-placental NA-872 and dexamethasone therapy on fetal and newborn mouse lung. Respiration 43:389-400. (1982).
- 61.- Verbruggen,L.A. and Abe,S. Glucocorticoids alter the ratio of type III/type I collagen synthesis by mouse dermal fibroblasts. Biochem. Pharmac. 31:1711-1715. (1982).
- 62.- Weibel,E.R., Kistler,G.S. and Scherle,W.F. Practical stereological methods for morphometric cytology. J. Cell Biol. 30:23-38. (1966).
- 63.- Wessells,N.K. and Cohen,J.H. Effect of collagenase on developing epithelia in vitro. Lung, uretric bud, and pancreas. Develop. Biol. 18:294-309. (1968). Citado en: Stang,L.B. Neonatal Respiration Physiological and Clinical Studies. Ed. Blackwell Scientific Publications. pag. 1-19. (1977).
- 64.- Wessells,N.K. Mammalian lung development: Interactions in formation and morphogenesis of tracheal buds. J. Exp. Zool. 175:455-466. (1970).
- 65.- Young,S.L. and Silbajoris,R. Dexamethasone increases adult rat lung surfactant lipids. J. Appl. Physiol. 60:1665-1672. (1986).

