

## **CAPITULO UNO**

### **INTRODUCCION**

#### **1.1 Generalidades**

El alcoholismo es un grave problema social y de salud, que ocasiona de un 15 a 30% de las admisiones en los hospitales generales<sup>1,2</sup>. El manual diagnóstico estadístico de enfermedades mentales DSMIII-R, define el alcoholismo como una dependencia patológica y compulsiva de la ingesta de alcohol, que se presenta en ambos sexos sin diferencia de clases sociales<sup>3</sup>. Actualmente el DSM-IV incluye al alcoholismo en la categoría de enfermedades causadas por uso de sustancias tóxicas y lo clasifica como un síndrome complejo que debe presentar cuando menos dos síntomas específicos dentro de un período de tiempo de un año para su correcto diagnóstico<sup>4</sup>.

#### **1.2 Metabolismo del alcohol**

El alcohol se absorbe en la mucosa del estómago, intestino y colon, su concentración en los tejidos es proporcional al

## **CAPITULO DOS**

### **MATERIAL Y METODOS.**

#### **2.1 Material Biológico**

Ratas hembras cepa *Sprague-Dawley*, adultas jóvenes (aproximadamente dos meses de edad) (Charles River Breeding Laboratories) del bioterio del Departamento de Embriología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

#### **2.2 Equipo**

Balanza granataria.

Balanza analítica.

Crióstato.

Microscopio Esteroscópico American Optical modelo 569.

Ultramicrotomo LKB BROMA ULTRATOME<sup>®</sup> modelo 2088.

Preparador de cuchillas de vidrio LKB modelo 7800 Knife Maker

Fotomicroscopio Carl-Zeiss modelo I.

Microscopio Electrónico de Transmisión, modelo Carl-Zeiss

EM 109 con aceleración de voltaje de 80 kV.

contenido de agua; el 70-80% del metabolismo es realizado en el hígado. El metabolismo hepático del alcohol es primordialmente de tipo oxidativo; en una primera fase es convertido a acetaldehído y ácido acético, posteriormente a CO<sub>2</sub> y agua. Este proceso es efectuado por acción de tres diferentes sistemas enzimáticos: el sistema de la alcohol deshidrogenasa (ADH), el sistema oxidativo microsomal para el etanol (MEOS) y el sistema de la catalasa<sup>5,6,7,8</sup>.

El otro 20 al 30% del metabolismo del alcohol ocurre en órganos como el pulmón y el riñón, por rutas oxidativas y no oxidativas. En la vía oxidativa intervienen la ADH, así como la catalasa, peroxidasa y otras oxidasas de función mixta<sup>9</sup>. Las vías no oxidativas incluyen las enzimas de la sulfotransferasa y glucoriniltransferasa. Durante la gestación, el alcohol es metabolizado en la placenta por vías oxidativas, principalmente por el sistema de la ADH.

Como parte de las rutas metabólicas no oxidativas que ocurren en el pulmón en algunas especies de mamíferos inferiores como el conejo y la rata, se ha descrito la participación de la enzima etilester sintasa de ácidos grasos; esta enzima genera ácidos grasos de etilo: el oleato de etilo, el palmitato de etilo y el estearato de etilo, como productos finales derivados de su metabolismo, estos derivados podrían alterar la composición de los lípidos en las membranas<sup>10,11</sup> (Fig.1).

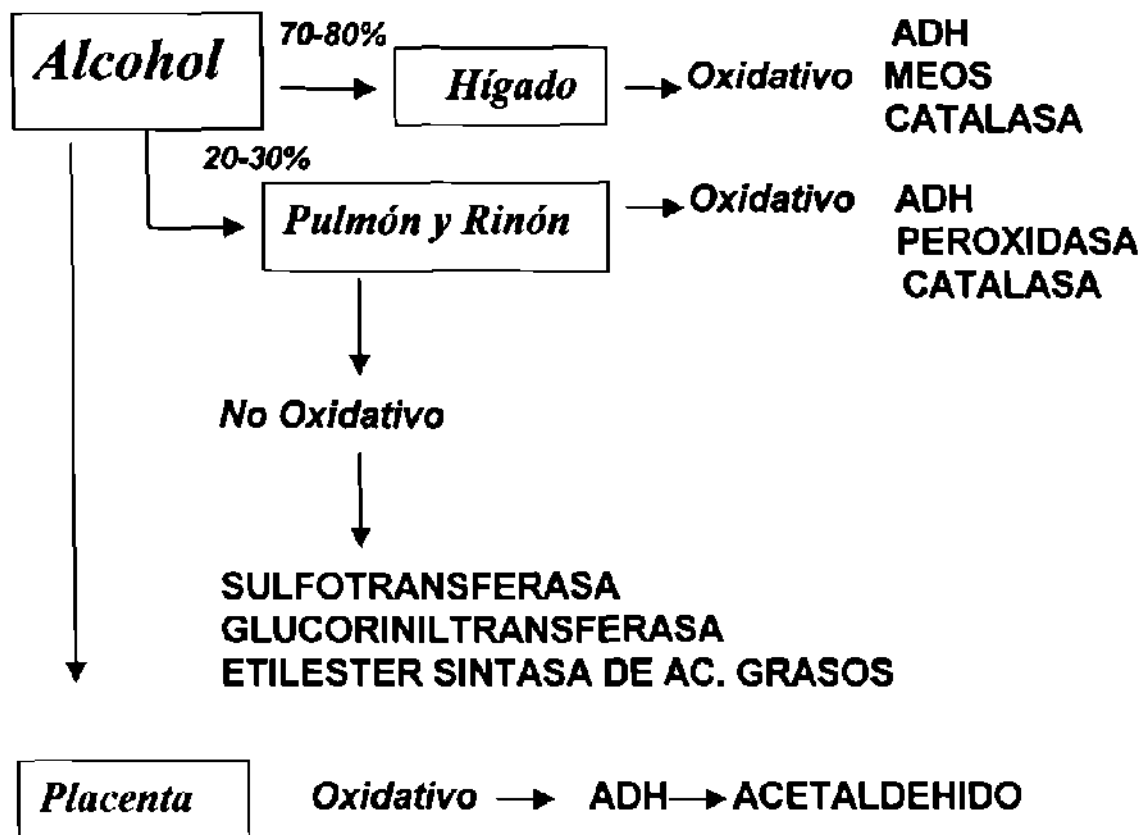


Figura 1. Vías metabólicas del alcohol.

### 1.3 Exposición durante la gestación

El abuso del alcohol durante la gestación, ocasiona un patrón de alteraciones en la morfogénesis y el crecimiento de los productos<sup>12</sup>. Existen reportes de los daños que genera: en el tubo neural se presentan diversas manifestaciones como anencefalia, microcefalia, hidrocefalia, retraso mental y mielomeningocele<sup>13</sup>.

En otros sistemas produce depresión del sistema inmune<sup>14,15,16</sup> y grados variables de alteraciones en órganos como riñón, corazón y pulmón<sup>17</sup>.

Más de dos mil reportes científicos confirman que el alcohol es el teratógeno conocido que más alteraciones causa en el sistema nervioso central. Estas alteraciones pueden ser ocasionadas directamente por el alcohol o por sus productos metabólicos como el acetaldehído en diferentes tejidos y órganos durante el desarrollo<sup>18,19,20,21</sup>.

Hasta la década de los setenta se prestó seria atención a la *relación entre la exposición prenatal al alcohol y los defectos que se presentaban en los recién nacidos y en el período postnatal.*

En 1973, Jones describió por primera vez el Síndrome Alcohol Fetal (SAF)<sup>22</sup>, en el cual los niños presentaban al nacimiento una serie de defectos físicos y mentales cuando las madres habían ingerido alcohol durante la gestación. En este síndrome se incluyen anomalías observadas prenatales y postnatales: anomalías del Sistema Nervioso Central (microcefalia y alteraciones en el comportamiento como retardo mental con disminución del coeficiente intelectual); Disfunciones craneofaciales (micrognatia), alteraciones en el crecimiento en peso, talla y músculo-esqueléticas.

De acuerdo a datos estadísticos, se considera que si durante el período de la gestación se ingiere alcohol, los productos podrían presentar en el 6% de los casos SAF. En el humano la cantidad crítica de consumo del alcohol diario para producir SAF, es aproximadamente de 3 oz o 100 ml de alcohol absoluto al día.

Es muy importante puntualizar que para que las manifestaciones floridas del síndrome se presenten, la ingestión del alcohol debe ocurrir durante el *período crítico de la gestación, que abarca desde la fase de gástrula hasta la organogénesis*. En el humano esto puede ocurrir alrededor de la segunda o tercera semana de vida intrauterina. Esta cantidad de alcohol podría ser aportada con 3 a 5 bebidas diarias en el caso del whisky. Pero la cantidad de bebidas diarias podría variar y ser mayor de acuerdo al porcentaje o grados de alcohol que contengan<sup>23</sup>.

Se ha descrito una entidad similar al SAF denominada Exposición Fetal al Alcohol (EFA). En los casos en que la ingesta del alcohol no ocurrió en el período crítico, sino en cualquier otro momento durante la gestación. En la EFA no se presentan las *anomalías craneofaciales que caracterizan al SAF, pero si van a prevalecer las alteraciones del SNC, manifestándose con grados variables de daño, desde la disminución moderada de la capacidad intelectual hasta el deterioro intelectual severo o retardo mental*<sup>24</sup>.

En Estados Unidos de Norte América uno de cada 750 nacidos vivos presentó el SAF, por lo que hay

aproximadamente de 4,000 a 5,000 niños afectados con este síndrome cada año. Se calcula que los niños que presentan alteraciones causadas por EFA son cerca de 50,000 al año. Los investigadores en educación especial consideran que del 20 a 30% de los niños que requieren tratamiento de apoyo, estuvieron expuestos a diversas dosis de alcohol en algún momento de su desarrollo intrauterino<sup>25</sup>.

El empleo de modelos animales para conocer los efectos fetales del alcohol, fue motivado por la serie de consideraciones éticas de la experimentación en humanos y en particular por las complejas interacciones asociadas con alcoholismo crónico.

Abel en 1980<sup>26</sup> realizó una exhaustiva revisión en la literatura de estos modelos, para evidenciar los efectos del alcohol, y resaltó que la rata y el ratón fueron los más utilizados. Describió que posiblemente algunas de las manifestaciones fueron ocasionadas por las deficiencias nutricionales asociadas a la ingesta de alcohol. Por este motivo puntualiza que el reproducir los efectos del alcohol durante la gestación involucra serios problemas metodológicos y que para lograr inducir daño en los tejidos se debe utilizar dietas líquidas con dosis mayores a 6 y 7% de alcohol. Esta dosificación asegura que la concentración sanguínea del alcohol será de aproximadamente 150 a 350 mg/dl; suficiente para producir daño a los tejidos.

En 1981, Sulik, Johnston y Webb fueron los primeros en producir en un modelo animal el síndrome de alcohol fetal en

ratones cepa C57BL/6J, con la aplicación de dos dosis de alcohol al 25% intraperitonealmente durante el período crítico de la gestación (desde la fase de gástrula hasta la organogénesis) con lo que obtuvieron cambios craneofaciales equiparables a las modificaciones que presentan los niños con el SAF<sup>27</sup>.

En el humano, un nivel equivalente de alcohol en sangre para producir el síndrome puede ocurrir utilizando 3 oz ó 100 ml de whisky, con un rango de 3 a 5 bebidas al día para una mujer de 60 kg o hasta 10 bebidas de acuerdo al porcentaje de alcohol que contenga.

#### **1.4 Morfología del pulmón**

Con relación a las características morfológicas e histológicas del pulmón, se han descrito más de 42 tipos celulares diferentes; pero las células de la región alveolar del pulmón son: los neumocitos I, neumocito II, neumocito III o células en cepillo en la rata adulta, la célula intersticial, macrófago alveolar y célula endotelial,<sup>28,29,30,31</sup> (Fig. 2).

La cavidad alveolar está revestida por un epitelio plano simple de neumocitos I, que son las células encargadas de formar parte de la barrera sangre-aire<sup>32</sup>. Su citoplasma cubre la mayor parte de la superficie alveolar. Los neumocitos II, son células redondeadas con abundantes organelos como mitocondrias, retículo endoplásmico rugoso, aparato de Golgi y los cuerpos lamelares (figura 3) que contienen fosfolípidos almacenados y



proteínas que contribuyen a formar parte del sistema del surfactante. La función del neumocito II es sintetizar, almacenar y secretar parte del surfactante pulmonar para evitar el colapso de la cavidad alveolar en el momento de la espiración<sup>33,34,35</sup>.

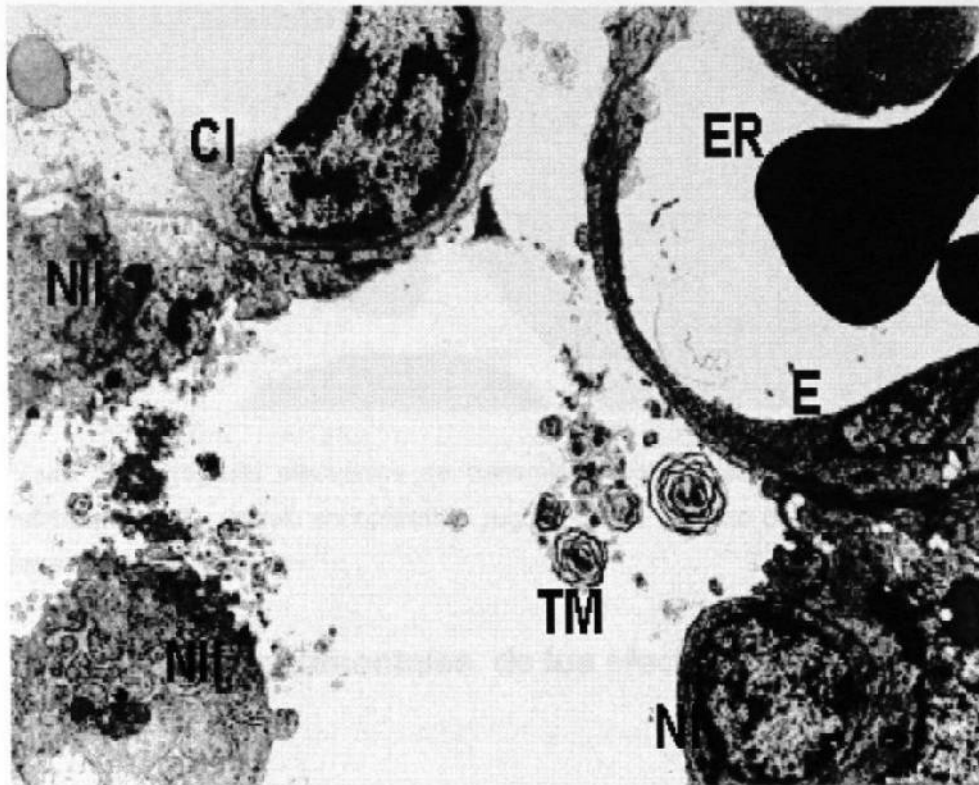


Figura 2. Micrografía electrónica de transmisión de un tabique alveolar. neumocitos I (NI), neumocito II (NII), célula intersticial (CI), célula endotelial (E), eritrocito (ER) y tubos de mielina (TM) en la luz del alvéolo 3,000x.

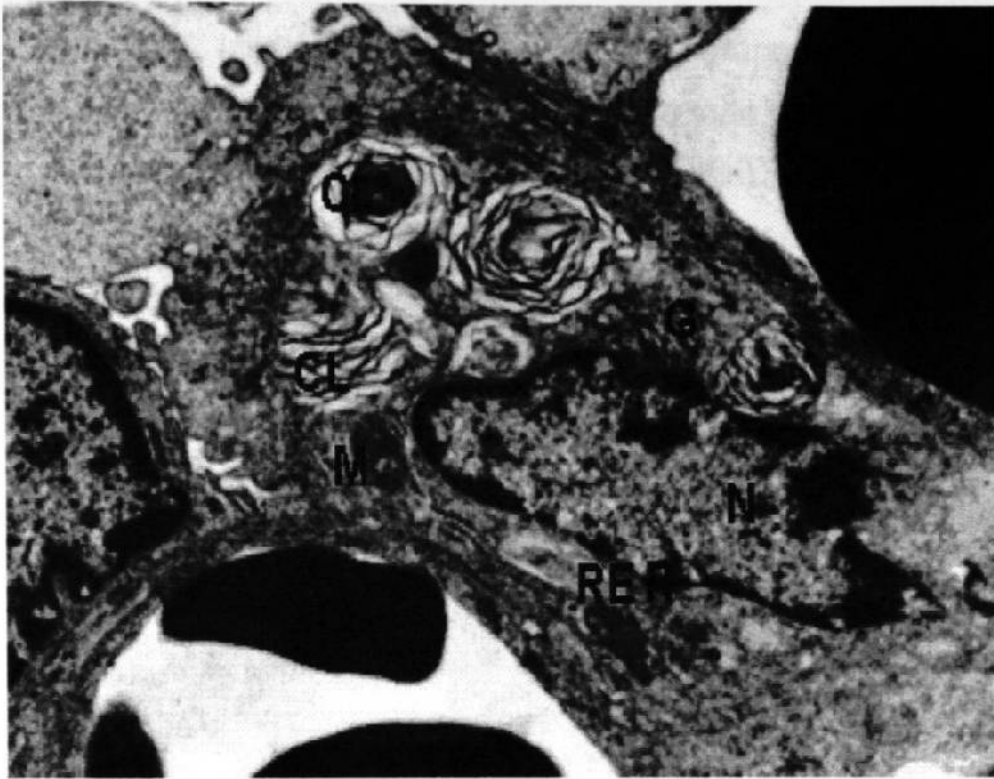


Figura 3. Micrografía electrónica de transmisión del neumocito II (NII), núcleo (N) mitocondrias (M), retículo endoplásmico rugoso (RER), aparato de Golgi (G) y cuerpos lamelares (CL). 7,000x.

### 1.5 Modelos experimentales de los efectos del alcohol en el pulmón

En 1980, Rasmussen y col. demostraron el efecto teratogénico del alcohol en ratones recién nacidos cuyas madres recibieron dieta líquida con 10-20% de alcohol durante toda la gestación. En el análisis morfológico el pulmón de los recién nacidos presentaba datos de hipoplasia, y con el microscopio estereoscópico observó bronquios con la mucosa plegada y escasas estructuras similares a alvéolos revestidas de epitelio<sup>36</sup>.

En 1985, Inselman y col. intoxicaron un grupo de ratones con una dieta líquida de alcohol al 6% durante toda la gestación (una de las dosis mas baja utilizada en los reportes). En los productos describieron una disminución del tamaño y peso del pulmón asociado con una menor cantidad de proteínas, DNA y RNA <sup>37</sup>.

En 1989, Snyder y col. realizaron un estudio donde administraron dieta líquida con alcohol al 10% a un grupo de ratas gestantes y en los productos encontraron disminución del peso corporal total y particularmente disminución del peso pulmonar<sup>38</sup>.

En 1989, Zagorul'ko intoxicó un grupo de ratas por vía intraperitoneal con una sola dosis de alcohol al 10% durante el período crítico de la gestación y reportó disminución del tamaño de los neumocitos tipo II. En 1990 utilizó una sola dosis de alcohol al 50% de nuevo por vía intraperitoneal y realizó estudios de microscopía electrónica del pulmón, observando que algunas células tipo II se observaron más oscuras que otras, pero el hallazgo de mayor relevancia fue la presencia en la luz de los alvéolos de un material electrodensso liberado por las modificaciones que ocasionó el alcohol en las células alveolares, este material lo consideró de naturaleza protéica<sup>39,40</sup>.

En 1991, O'Gorman y Bannigan reportaron un grupo de ratones en los que ocasionaron el síndrome de alcohol fetal SAF. Realizaron el estudio del pulmón con microscopía de luz y

encontraron bronquiolos de luz estrecha, mucosa bronquial plegada y un desarrollo sacular disminuido<sup>41</sup>.

En 1994, Treviño y col. utilizaron un modelo de intoxicación por vía oral en ratas con dieta líquida de alcohol al 20-30% durante la gestación y reportaron cambios en las proporciones de las células alveolares, por lo que concluyeron que a esta dosis el alcohol ocasiona alteración en la morfogénesis y citodiferenciación del pulmón<sup>42</sup>.

### **1.6 Efectos del alcohol en el pulmón humano**

En 1981 Johnson S. K.<sup>43</sup> reportó una serie de estudios clínicos que indicaban que los niños con SAF presentaron aumento en la incidencia de las enfermedades respiratorias. Diversos autores coinciden en que la exposición al alcohol favorece los procesos patológicos del pulmón<sup>44-47</sup>.

La justificación del trabajo está basada en que son escasos los reportes en modelos experimentales donde se investigan los efectos del alcohol en la citodiferenciación del pulmón; por lo que es necesario caracterizar morfológicamente los cambios que ocurren con dosis de alcohol menores a las que producen el SAF, ya que estos podrían extrapolarse a lo que sucede en los productos que desarrollan EFA.

## **1.7 Hipótesis de Trabajo y Objetivos**

### **1.7.1 Hipótesis de Trabajo**

La administración transplacentaria de alcohol al 5% causa alteraciones en el pulmón de los productos recién nacidos, que pueden evaluarse por las características histoquímicas, histológicas, morfométricas y ultraestructurales de las células del pulmón.

### **1.7.2 Objetivos específicos**

1. Seleccionar un grupo de ratas gestantes y administrarles dietas líquidas con alcohol al 5% hasta el término de la gestación.

2. Contrastar por análisis estadístico los valores de peso total, longitud craneocaudal y peso húmedo del pulmón de ratas recién nacidas, de ambos sexos, que recibieron alcohol transplacentario, con el control isocalórico y el control.

3. Evaluar las reacciones histoquímicas del pulmón de ratas recién nacidas que recibieron alcohol transplacentario, y comparar con el control isocalórico y el control.

4. Comparar las características histológicas, en cortes semifinos del pulmón en ratas recién nacidas que recibieron alcohol transplacentario con el control isocalórico y el control.

5. Caracterizar el grado de maduración pulmonar, por un análisis morfométrico con microscopía de luz, en ratas recién nacidas que recibieron alcohol transplacentario y comparar con el control isocalórico y el control.

6. Evaluar los cambios ultraestructurales que ocurren en los neumocitos II y fibroblastos de pulmones de ratas recién nacidas que recibieron alcohol transplacentario, así como en el control isocalórico y el control.

Autoclave Market Forge Sterilmatic modelo SMT-E.

Sistema Milipore desionizador y purificador de agua mili-Q, con cartuchos de intercambio iónico, de carbón y filtros de ésteres de celulosa (poro 0.22  $\mu\text{m}$ ) biológicamente inertes.

## 2.3 Reactivos

Para el desarrollo de esta tesis se utilizaron productos químicos (cloroformo y acetona) grado analítico MERCK<sup>®</sup>.

Los reactivos, material de cristalería utilizado para la preparación de las dietas y para la disección fueron preparados bajo estrictas normas de esterilidad. Las dietas<sup>48</sup> fueron reconstituidas y cambiadas diariamente a las 8:30 a.m. para evitar variaciones; para contabilizar el consumo de las dietas líquidas se utilizaron tubos alimentadores graduados que permitieron registrar el consumo diario de líquido sin probabilidad de pérdida por evaporación, en un reservorio diferente se colocó el agua.

El material y colorantes utilizados para la técnica de cortes por congelación como el entellan, portaobjetos, glicerol gelatina, bálsamo de Canadá, cubreobjetos, hematoxilina de Harris, eosina, rojo oleoso y PAS fueron de la casa Sigma Chemical Company<sup>®</sup>.

Los reactivos utilizados para la técnica de microscopía electrónica fueron: glutaraldehído 25%, paraformaldehído, ácido pícrico, tetraóxido de osmio, nitrato de uranilo, cacodilato de sodio, resinas epóxicas, colorante de azul de toluidina, acetato de uranilo, citrato de plomo, y materiales como moldes de inclusión, rejillas de cobre que se obtuvieron de Electron Microscopy Science<sup>®</sup>; la cuchilla de diamante y las barras de vidrio para preparar las cuchillas se obtuvieron de Pelco International<sup>®</sup>. Los rollos de película para el microscopio electrónico de transmisión fueron de la marca Agfa-Geevaert AG. El papel para la impresión de las micrografías en blanco y negro fue de la marca Eastman Kodak Company<sup>®</sup>.



## 2.4 Métodos

### 2.4.1 Grupos experimentales

Se utilizaron 267 ratas recién nacidas de ambos sexos de la cepa *Sprague-Dawley*.

Se seleccionaron 23 ratas hembras de 250 gr de peso promedio, se verificó la fase de estro por frotis vaginal<sup>49</sup> y posteriormente se aparearon con la técnica monogámica durante un período corto de 2 h<sup>50</sup>. Se identificó la aparición del tapón vaginal de moco, con lo que se determinó el día "0" de la gestación<sup>51</sup>, se aislaron en jaulas individuales para iniciar el tratamiento respectivo, manteniendo la temperatura controlada ente 22 y 24°C; con ciclos de luz oscuridad de 12 h; respectivamente. Se dividieron en 3 grupos que recibieron las siguientes dietas durante toda la gestación (Tabla I).

TABLA I

Dieta	Grupos experimentales Ratas gestantes	Ratas recién nacidas
Líquida con alcohol alta en proteínas para la gestación, LD'82 con alcohol al 5%. <sup>a</sup>	9	115
Líquida con dextrin maltosa alta en proteínas para la gestación, LD'82 <sup>b</sup>	6	76
Croquetas de purina Ratchow.	8	76

<sup>a</sup> El alcohol aportó 36% de las calorías.

<sup>b</sup> La dextrin maltosa aportó 36% de calorías control isocalórico.

En los tres grupos gestaron en promedio de 10 a 14 productos por camada.

#### **2.4.2 Características de las dietas**

Las dietas fueron balanceadas en su aporte calórico y suplementadas con vitaminas y minerales, dietas producidas y distribuidas comercialmente por Bio-Serv<sup>®</sup>, seleccionadas de los trabajos de Lieber y Decarli<sup>52</sup>. La dieta líquida alta en proteínas contiene el 100% de las calorías, con una composición de:

Proteínas	25%
Grasas	12%
Carbohidratos	63%

#### **2.4.3 Método de sacrificio de las ratas**

Al término de la gestación, a los 21 días aproximadamente, nacieron los productos por parto normal. Inmediatamente después se realizó su identificación, con el registro del número de la rata madre y secuencia de nacimiento en la camada, sexo, peso total y longitud craneocaudal. Ya identificadas, fueron anestesiadas con éter etílico<sup>53</sup> y mediante una incisión toracoabdominal, se obtuvieron los bloques cardiopulmonares, se separaron los pulmones del corazón, y se registró el peso húmedo de los pulmones.

La figura 4 muestra un diagrama que representa la estrategia experimental de este trabajo.

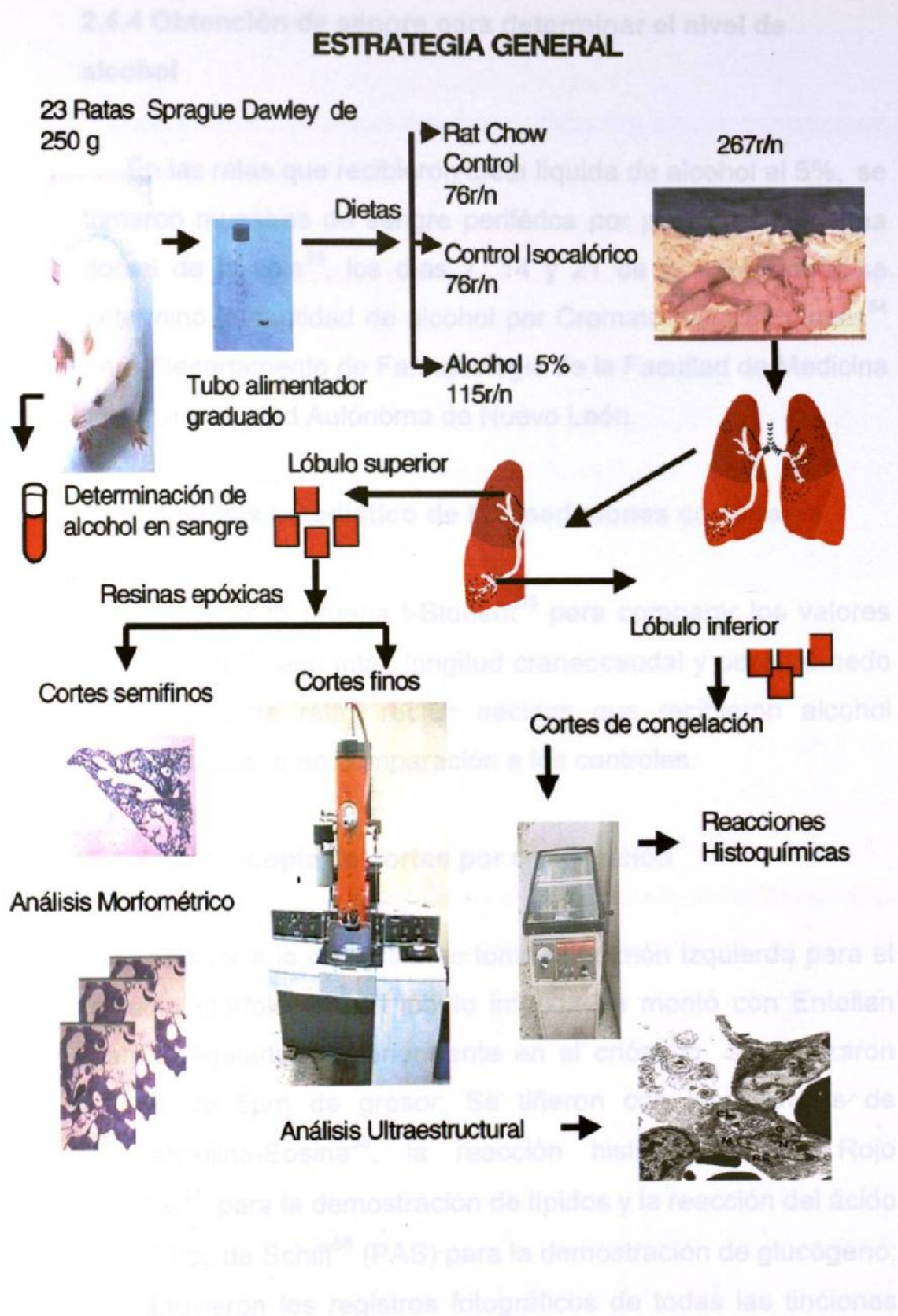


Figura 4. Resumen de la secuencia en la estrategia experimental.

#### **2.4.4 Obtención de sangre para determinar el nivel de alcohol**

En las ratas que recibieron dieta líquida de alcohol al 5%, se tomaron muestras de sangre periférica por punción de la vena dorsal de la cola<sup>53</sup>, los días 7, 14 y 21 de la gestación y se determinó la cantidad de alcohol por Cromatografía de Gases<sup>54</sup> en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

#### **2.4.5 Análisis estadístico de las mediciones corporales**

Se realizó la prueba t-Student<sup>55</sup> para comparar los valores promedio del peso total, longitud craneocaudal y peso húmedo de pulmón de ratas recién nacidas que recibieron alcohol transplacentario en comparación a los controles.

#### **2.4.6 Microscopía de cortes por congelación**

Posterior a la disección se tomó el pulmón izquierdo para el estudio morfológico. El lóbulo inferior, se montó con Entellan para congelarlo, posteriormente en el crióstato se realizaron cortes de 5µm de grosor. Se tiñeron con las técnicas de Hematoxilina-Eosina<sup>56</sup>, la reacción histoquímica de Rojo Oleoso<sup>57</sup>, para la demostración de lípidos y la reacción del ácido peryódico de Schiff<sup>58</sup> (PAS) para la demostración de glucógeno; se obtuvieron los registros fotográficos de todas las tinciones con Fotomicroscopio Zeiss.

#### **2.4.7 Inclusión en resinas epóxicas para microscopía de luz**

Del pulmón izquierdo los fragmentos del lóbulo superior se fijaron en solución de Karnovsky-Ito<sup>59</sup>, posteriormente se lavaron y se llevó a cabo la postfijación con tetraóxido de osmio acuoso al 2%. Se hizo una tinción en bloque con nitrato de uranilo al 1% y posteriormente una deshidratación gradual con diferentes concentraciones de acetona hasta la inclusión en resinas epóxicas<sup>60</sup>. Se obtuvieron en el ultramicrotomo cortes semifinos y se colorearon con la técnica de azul de toluidina<sup>61</sup>, se observaron a microscopía de luz y se obtuvo un registro fotográfico.

#### **2.4.8 Análisis Morfométrico**

Para evaluar morfológicamente la maduración del pulmón en cortes semifinos incluidos en resinas y teñidos con azul de toluidina se observaron en un microscopio Carl Zeiss a 1,250 aumentos, se contaron el número de perfiles celulares correspondientes a las células claras de los alvéolos (CCA), células intersticiales (CI) y neumocitos II (NII) contenidos en 100 alvéolos (Fig. 5). Se contabilizaron los perfiles de las células en la zona central y periférica del lobulillo pulmonar para cada condición experimental. Además se registraron la cantidad de perfiles de los tubos epiteliales en las mismas áreas. En el análisis morfométrico cada valor presentado en las tablas representa el promedio de 30 conteos realizados por duplicado, estos fueron sometidos a una contrastación estadística con la prueba de t-Student con sus controles.

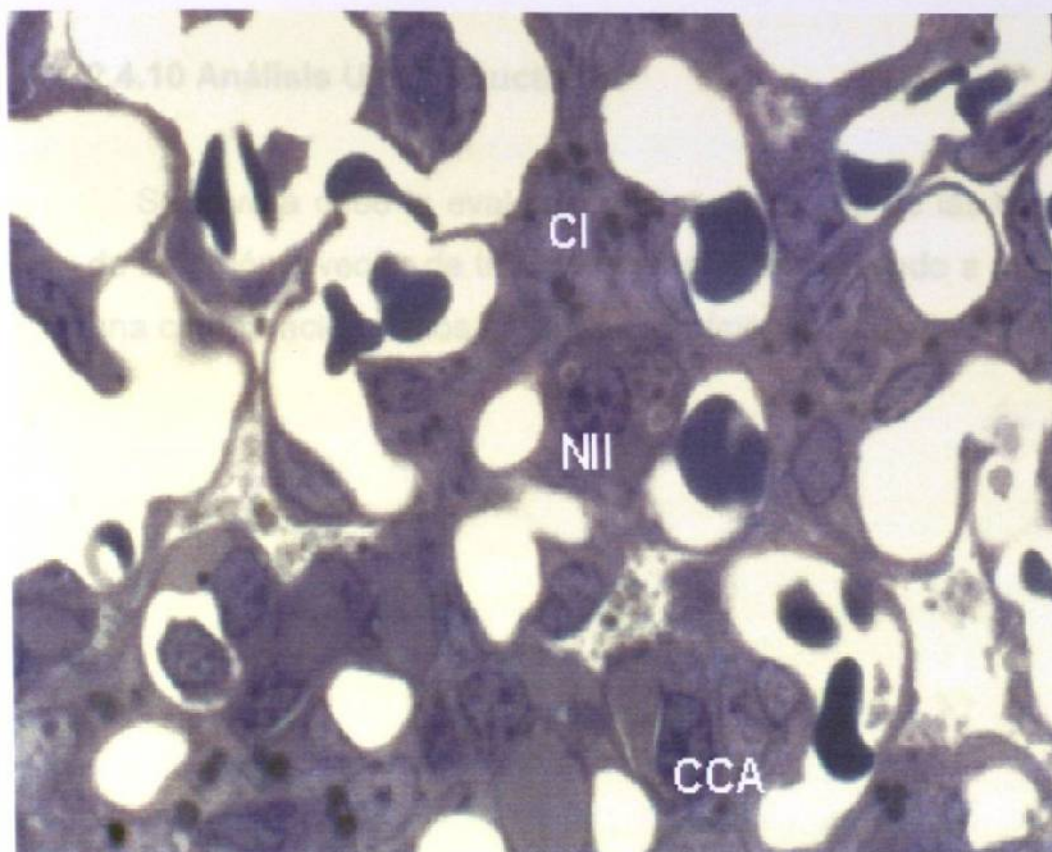


Figura 5. ANALISIS MORFOMETRICO: Pulmón de rata recién nacida que muestra los diferentes tipos de perfiles celulares que se contaron, neumocito II (NII), célula intersticial (CI) y las células claras de los alvéolos (CCA). Fotomicrografía de luz, inclusión en resinas epóxicas, corte semifino teñido con azul de toluidina 126x.

#### 2.4.9 Microscopía electrónica

Se obtuvieron cortes finos con un ultramicrotomo LKB Broma Ultratome<sup>®</sup> modelo 2088, posteriormente fueron montados en rejillas de cobre y contrastados con acetato de uranilo y nitrato de plomo con la técnica de Vewable and Coggeshall<sup>62,63</sup> y observados con el Microscopio Electrónico de Transmisión Carl-Zeiss EM-109.

#### **2.4.10 Análisis Ultraestructural**

Se llevó a cabo la evaluación ultraestructural de las células de la región alveolar de todos los grupos procediendo a realizar una comparación de los hallazgos morfológicos observados.

## **CAPITULO TRES**

### **RESULTADOS**

#### **3.1 Distribución de los grupos de trabajo**

La cantidad total de ratas recién nacidas con las que se trabajó fue de 267, provenientes de 23 camadas. Cada camada presentó de 10 a 14 productos en promedio en los tres grupos.

Para obtener el porcentaje de óbitos y de anomalías externas de los recién nacidos del experimento, se agregaron a los 267 nacidos vivos 2 productos que nacieron muertos obteniendo 269 productos como el 100%; un óbito se presentó en el grupo control y uno en el grupo de dieta líquida con alcohol al 5% correspondiendo al 0.74% del total de los productos. Con relación a las anomalías externas sólo un producto presentó ano pequeño y pertenecía al grupo tratado con alcohol por lo que la incidencia de anomalías externas en la población estudiada fue de 0.37% Tabla II.



### 3.3 Mediciones de peso total, longitud craneocaudal y peso húmedo del pulmón de recién nacidas

**TABLA II**

Distribución de los grupos de trabajo					
Dieta	Ratas	Recién nacidas	Obitos	Total	Anormalidades Externas
Control	8	76	1	77	0
Isocalórico.	6	76	0	76	0
Alcohol 5%	9	115	1	116	1**
	23 camadas	267	2*		269

\* 0.74% de los productos nacieron muertos

\*\* 0.37% La frecuencia de anomalías en toda la población de estudio

### 3.2 Niveles de alcohol en sangre

Los valores de los niveles de alcohol en sangre fueron cuantificados por cromatografía de gases. Las muestras se tomaron del grupo que recibió dieta líquida con alcohol al 5%, y se evaluaron los niveles a los 7, 14 y 21 días de gestación, los valores fueron en promedio de 50.37, 58.25 y 77.87 mg/dl respectivamente (Tabla III).

**TABLA III**

Valores de nivel de alcohol en sangre (mg/dl) durante la gestación detectados por cromatografía de gases

Días	Media	±	D. S
7 n=5	50.37	±	16.79
14 n=5	58.25	±	18.59
21 n=5	77.87	±	8.06

### 3.3 Mediciones de peso total, longitud craneocaudal y peso húmedo del pulmón de ratas recién nacidas

#### 3.3.1 Promedio de Peso Total

En las pruebas estadísticas de los valores del peso total corporal ninguno de los grupos mostró diferencia estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ ) entre los sexos de los recién nacidos, esto permitió tomarlos como un solo grupo y compararlos solo con las diferentes dietas (Fig. 6).

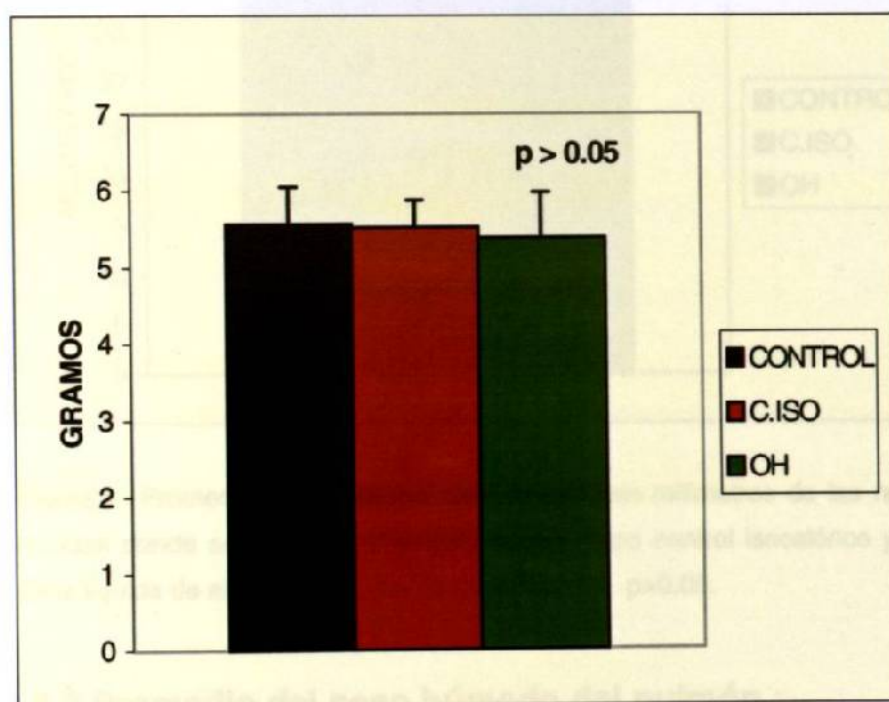


Figura 6. Promedio del peso total en gramos de las ratas recién nacidas donde se comparó el grupo control; grupo control isocalórico y grupo de dieta líquida de alcohol al 5%,  $n=(76-115)$  con una  $p > 0.05$ .

### 3.3.2 Promedio de la longitud craneocaudal

En ninguno de los grupos los valores de la longitud craneocaudal se observó diferencia estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ ) entre el grupo tratado con alcohol en comparación a los controles (Fig. 7).

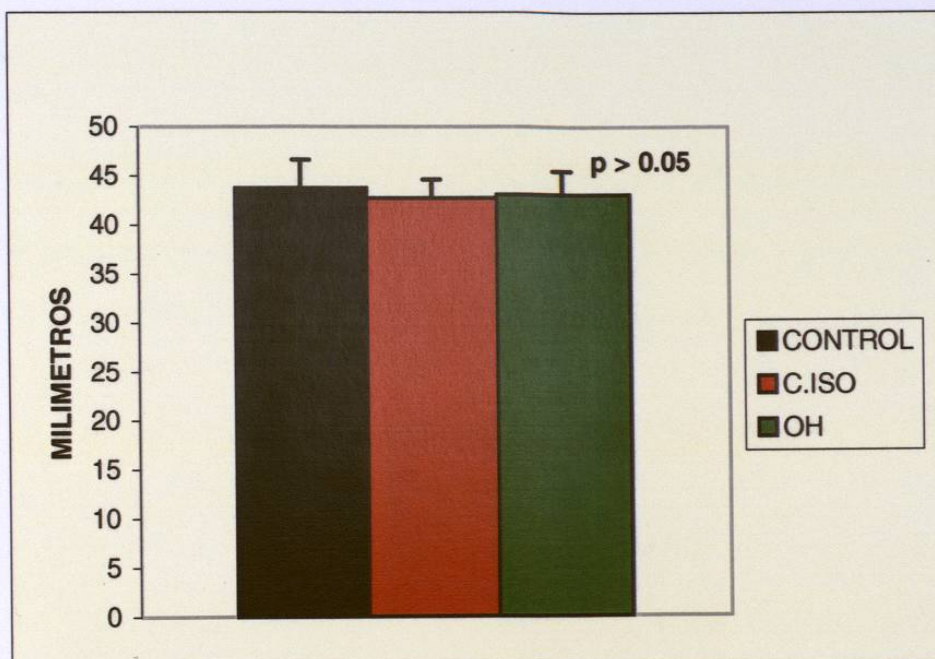


Figura 7. Promedio de la longitud craneocaudal en milímetros de las ratas recién nacidas donde se comparó el grupo control, grupo control isocalórico y grupo de dieta líquida de alcohol al 5%,  $n=(76-115)$  con una  $p > 0.05$ .

### 3.3.3 Promedio del peso húmedo del pulmón

En el grupo de dieta líquida de alcohol al 5% los valores promedio del peso húmedo de pulmón, presentaron una disminución estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) respecto a los grupos controles al analizarlos con la prueba de t de Student

los valores promedio fueron los siguientes: En el grupo tratado con alcohol se presentó 0.062 g de tejido húmedo en comparación a los valores de 0.107 g y 0.090 g de los controles absoluto e isocalórico respectivamente (Tabla IV, Fig.8).

**TABLA IV**

Promedio de peso húmedo del pulmón de ratas recién nacidas	
Grupos	Media (g) $\pm$ D. S.
Control	0.107 $\pm$ 0.01
Control isocalórico	0.090 $\pm$ 0.25
Alcohol al 5%	0.062 $\pm$ 0.06

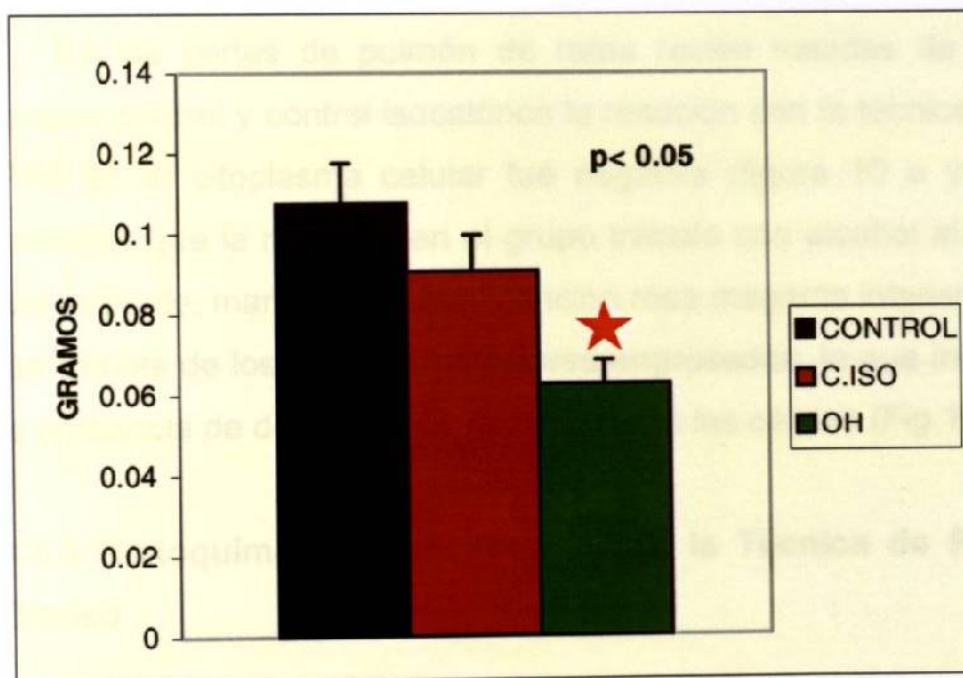


Figura 8. Valores promedio del peso húmedo de pulmón donde se comparó el grupo control, control isocalórico con el grupo de dieta líquida de alcohol al 5% que presenta diferencia estadística marcada con una estrella.  $n=(76-115)$  y  $p < 0.05$ .

### **3.4 Análisis morfológico a microscopía de luz**

#### **3.4.1 Cortes teñidos con Hematoxilina y Eosina**

En los cortes teñidos con hematoxilina y eosina los controles presentaron cavidades alveolares normales amplias y los tabiques alveolares bien delimitados y delgados (figura 9 a y b), mientras que en el grupo tratado con alcohol al 5%, se observaron cambios caracterizados por disminución de los espacios aéreos, ocasionada por el engrosamiento de los tabiques alveolares (Fig. 9c).

#### **3.4.2 Histoquímica no enzimática con la Técnica de PAS**

En los cortes de pulmón de ratas recién nacidas de los grupos control y control isocalórico la reacción con la técnica de PAS en el citoplasma celular fué negativa (figura 10 a y b), mientras que la reacción en el grupo tratado con alcohol al 5% fue evidente, manifestada por la tinción rosa magenta intenso en las células de los tabiques alveolares engrosados, lo que indica la presencia de depósitos de glucógeno en las células (Fig.10c).

#### **3.4.3 Histoquímica no enzimática con la Técnica de Rojo Oleoso**

En los cortes teñidos con la técnica de Rojo Oleoso de los controles absoluto y control isocalórico, se observaron algunas células aisladas positivas a la reacción, que mostraron un color rojo intenso (figura 11a y b). En contraste en el grupo de dieta

con alcohol al 5%, los abundantes depósitos de color rojo intenso en las células de los tabiques indican la interacción del colorante Rojo Oleoso con grasas neutras (Fig. 11c).

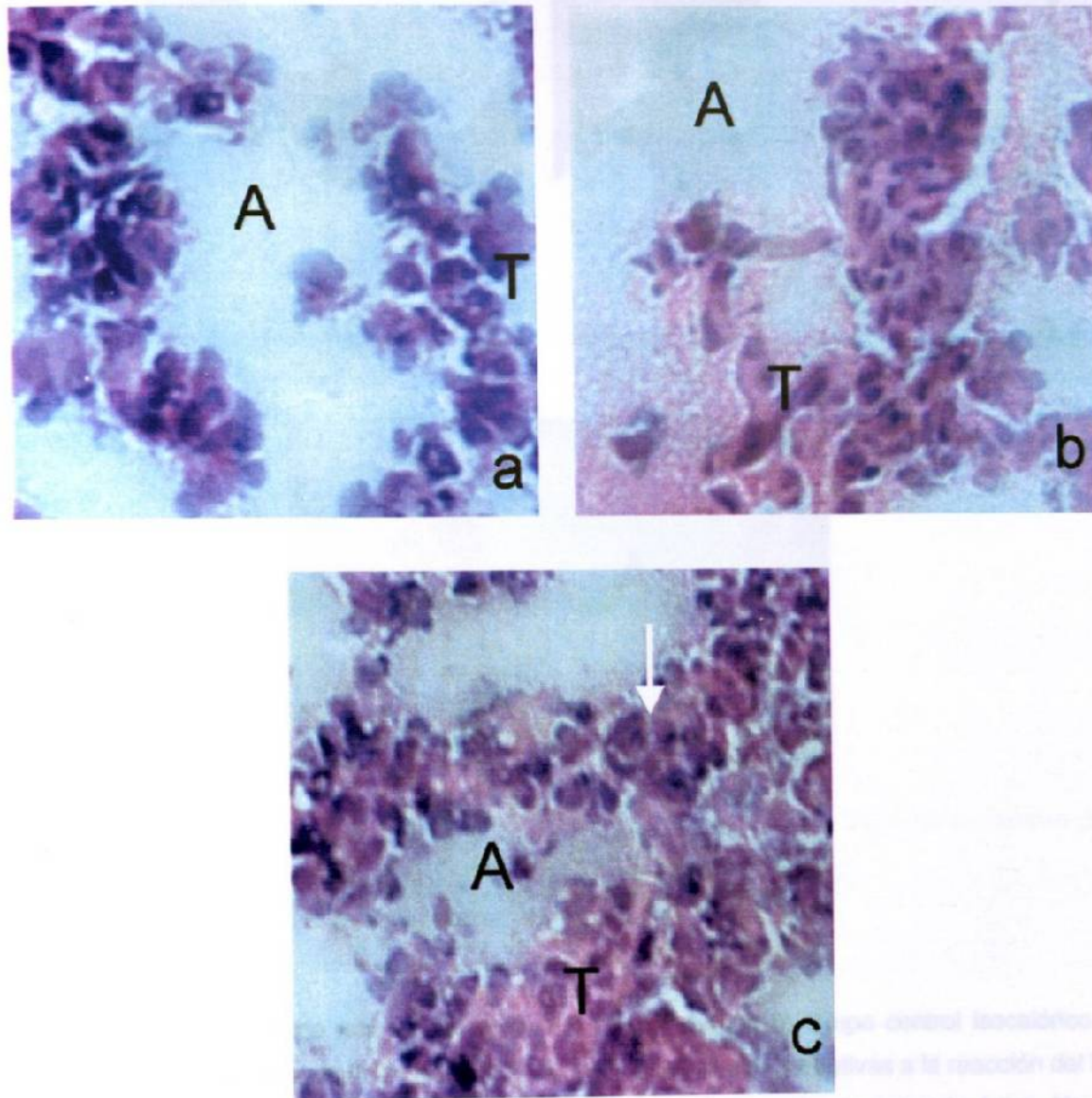


Figura 9. Pulmón de rata recién nacida. a) Grupo control; b) Grupo control isocalórico. Se observó a los espacios alveolares distendidos (marcados con la letra A) y los tabiques delgados (marcados con la letra T) en comparación al c) Grupo tratado con alcohol al 5%, con tabiques alveolares engrosados (flecha) y alvéolos reducidos. Fotomicrografía de luz de cortes de congelación  $7\mu\text{m}$  teñidos con Hematoxilina y Eosina 360.8x.

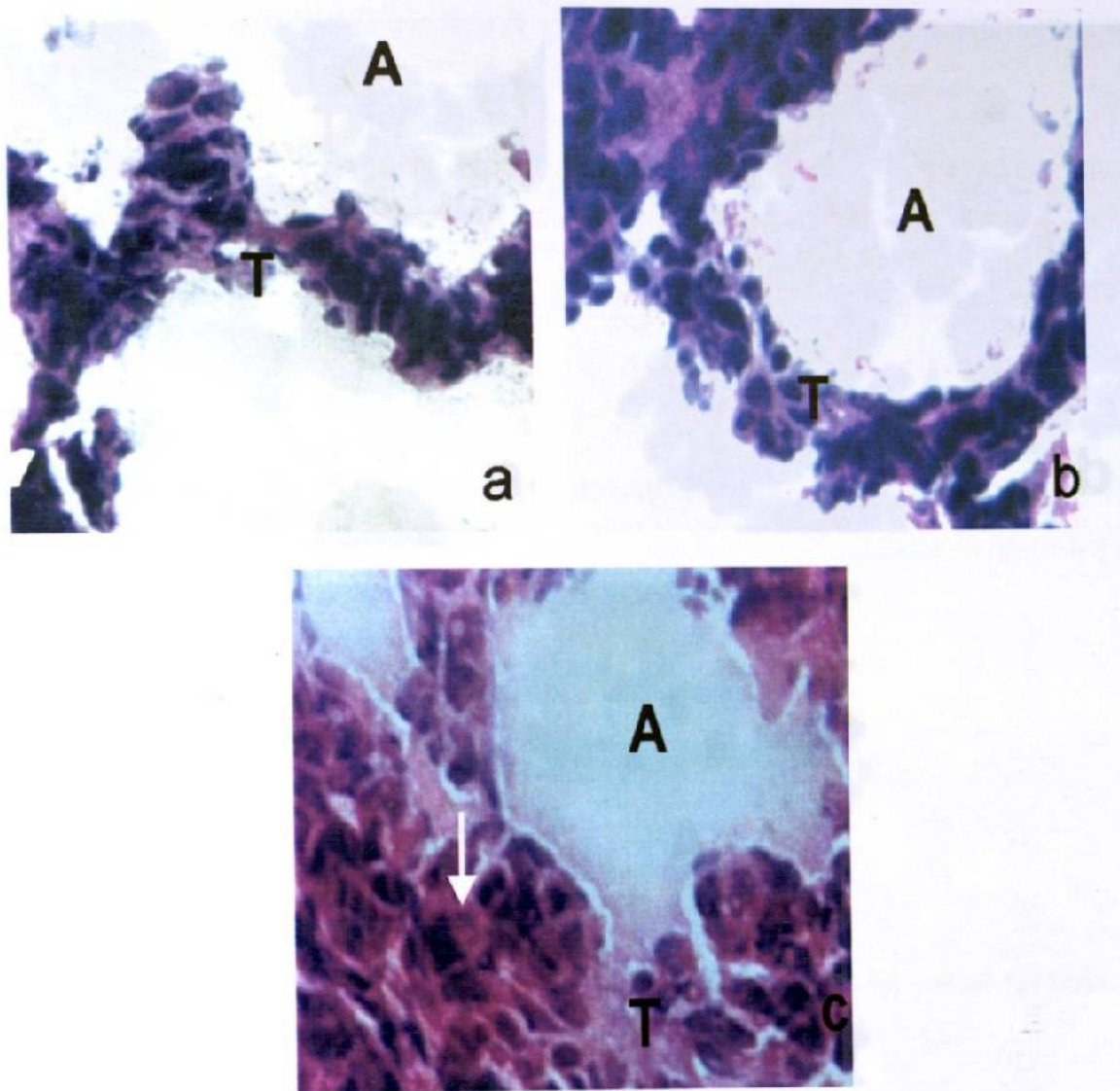


Figura 10. Pulmón de rata recién nacida. a) Grupo control; b) Grupo control isocalórico. Se observó en los tabiques (marcados con la letra T) a las células negativas a la reacción del PAS y los espacios alveolares se encontraron distendidos (marcados con la letra A); en comparación con el c) Grupo tratado con alcohol al 5%, presentó los tabiques alveolares engrosados y positivos a la reacción de PAS, una coloración magenta (marcado con una flecha). Fotomicrografía de luz de cortes de congelación 7µm teñidos. 360.8x.

... (marcado con una flecha). Fotomicrografía de luz, de cortes de  
... con Rojo Orceño 360.8x.

## 3.5 Análisis de la histología del pulmón

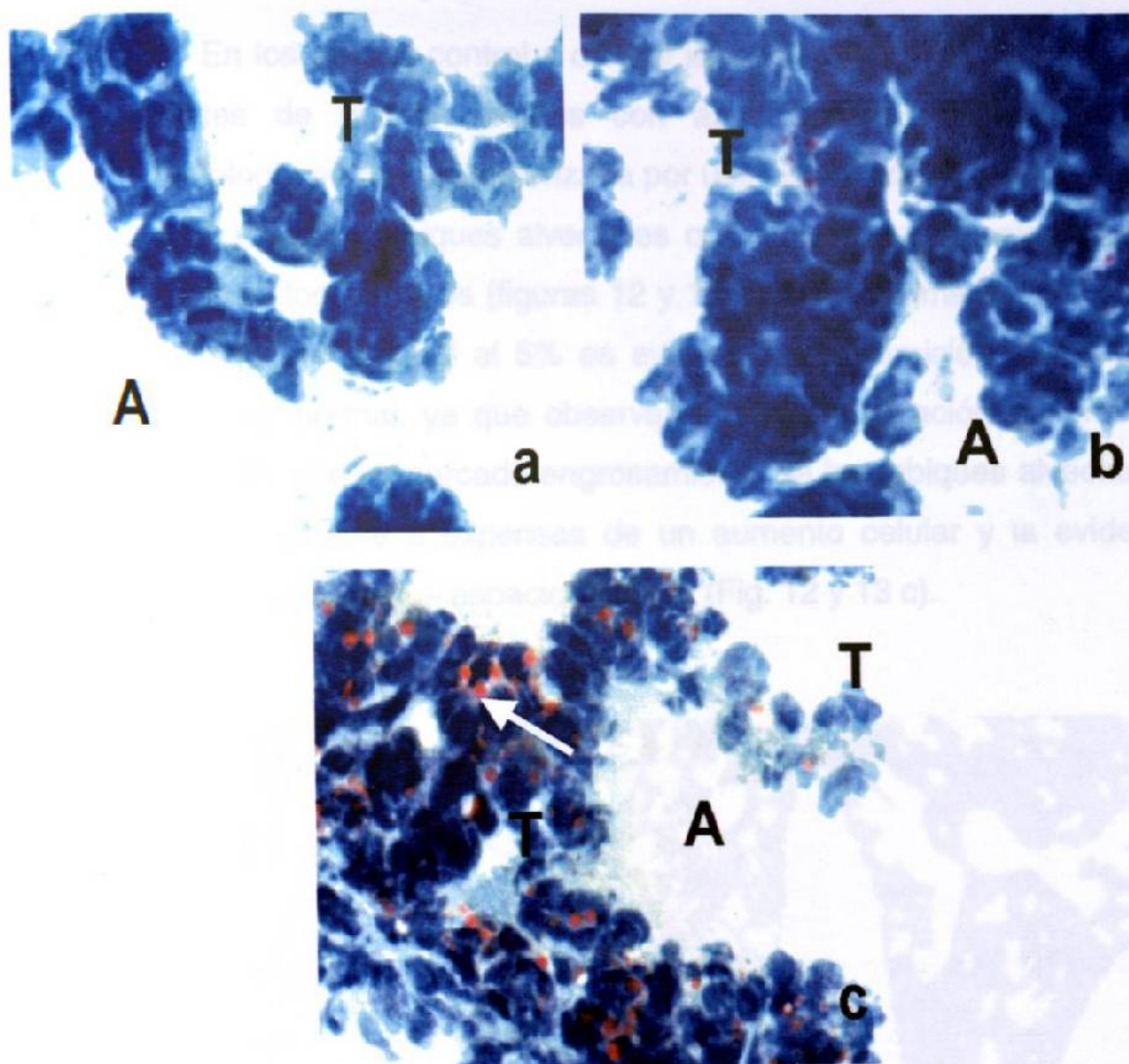


Figura 11. Pulmón de rata recién nacida a) Grupo control; b) Grupo control isocalórico. Se observó a las escasas y aisladas células positivas a la reacción del Rojo Oleoso en los tabiques alveolares (marcados con la letra T) y alvéolos distendidos (marcados con la letra A) en comparación al grupo c) tratado con alcohol al 5% donde los tabiques alveolares engrosados que mostraron abundantes depósitos de color rojo intenso que evidenció la positividad al colorante Rojo Oleoso (marcado con una flecha). Fotomicrografía de luz, de cortes de congelación  $7\mu\text{m}$  teñidos con Rojo Oleoso  $360.8\times$ .



### 3.5 Análisis de la histología del pulmón

En los grupos control y control isocalórico (figuras 12 y 13), los cortes de pulmón teñidos con azul de toluidina presentaron histología normal, caracterizada por una estructura reticular formada por delgados tabiques alveolares que limitan los espacios aéreos distendidos, alvéolos (figuras 12 y 13 a, b). En la imagen del grupo tratado con alcohol al 5% es evidente la disminución del patrón reticular normal, ya que observamos la compactación general del pulmón, con el marcado engrosamiento de los tabiques alveolares, aparentemente a expensas de un aumento celular y la evidente disminución de los espacios aéreos (Fig. 12 y 13 c).

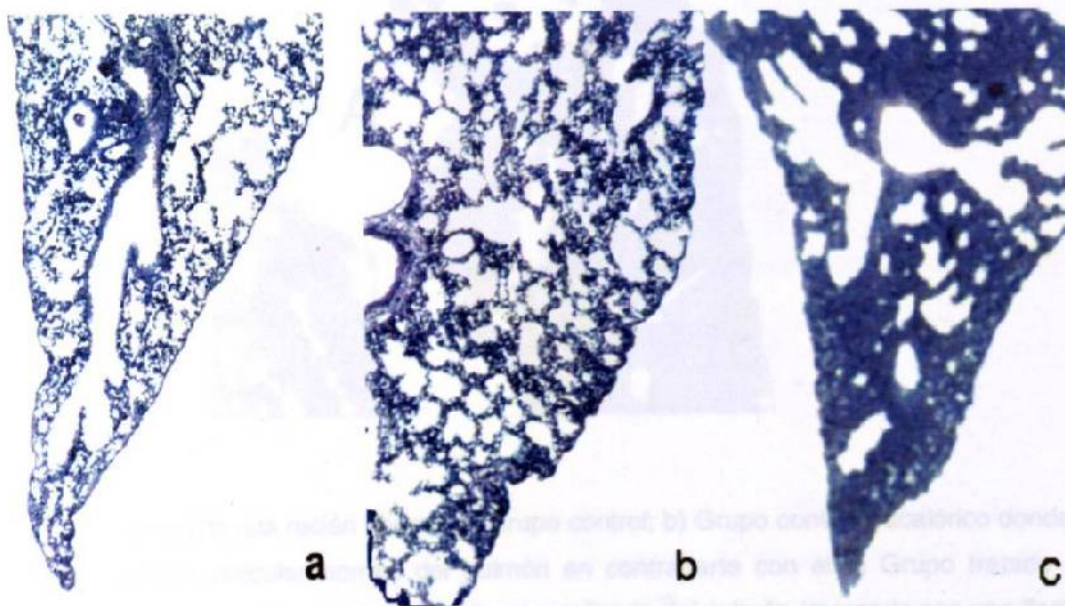


Figura 12. Pulmón de rata recién nacida: a) Grupo control; b) Grupo control isocalórico, donde se observó el patrón reticular normal del pulmón en comparación al c) Grupo tratado con alcohol al 5% con una compactación generalizada del pulmón. Cortes incluidos en resinas, epóxicas, teñidos con azul de toluidina 12.5x.

## 3.5.1 Neumocitos I

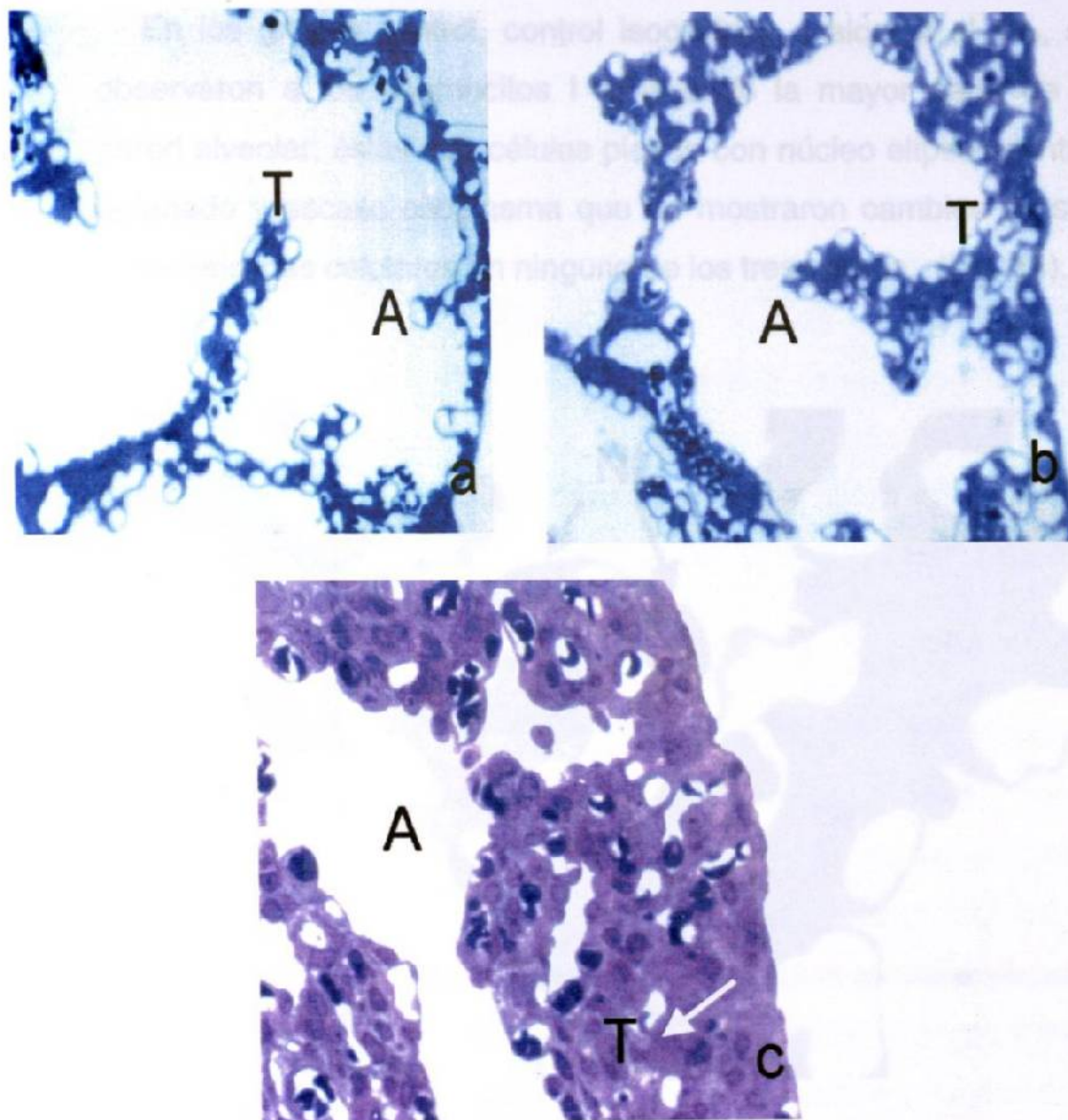


Figura 13. Pulmón de rata recién nacida: a) Grupo control; b) Grupo control isocalórico donde se observó el patrón reticular normal del pulmón en contraparte con el c) Grupo tratado con alcohol al 5% que mostró la compactación generalizada del pulmón (marcada con una flecha). Cortes incluidos en resinas epóxicas, teñidos con azul de toluidina 25.6x.

### 3.5.1 Neumocitos I

#### 3.5.2 Neumocitos II

En los grupos control, control isocalórico y alcohol al 5%, se observaron a los neumocitos I revistiendo la mayor parte de la pared alveolar; éstas son células planas con núcleo elíptico central aplanado y escaso citoplasma que no mostraron cambios en sus características celulares en ninguno de los tres grupos (Fig. 14).

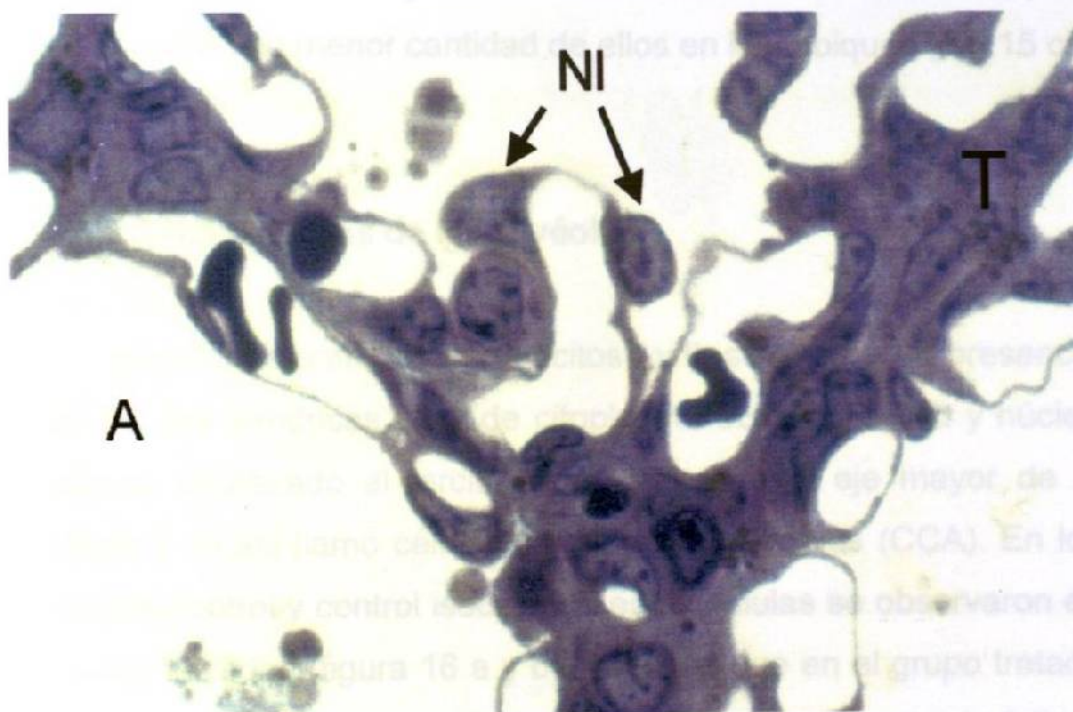


Figura 14. Pulmón de rata recién nacida del grupo control donde se observan neumocitos I (NI) marcados con una flecha. Estos presentaron la misma morfología en todos los grupos. Fotomicrografía de luz de cortes incluidos en resinas epóxicas, teñidos con azul de toluidina 75x.

### **3.5.2 Neumocitos II**

Los neumocitos II maduros en los grupos control y control isocalórico son células redondeadas que revisten parte de la pared, presentan abundantes cuerpos lamelares en su citoplasma, esto permitió identificar las células inequívocamente a microscopía de luz (figura 15 a y b). En el grupo tratado con alcohol las características morfológicas del neumocito II no se alteraron, pero se observó una menor cantidad de ellos en los tabiques (Fig.15 c).

### **3.5.3 Células Claras de los Alvéolos**

Mezcladas entre los neumocitos I y II, se observó la presencia de células cilíndricas altas de citoplasma acidófilo pálido y núcleo elíptico rechazado al tercio basal, siguiendo el eje mayor de la célula y se les llamo células claras de los alvéolos (CCA). En los grupos control y control isocalórico estas células se observaron en menor cantidad (figura 16 a y b), mientras que en el grupo tratado con alcohol al 5% se presentaron con las mismas características morfológicas que en los controles sólo que en este grupo fueron más abundantes en los alvéolos (Fig. 16 c).

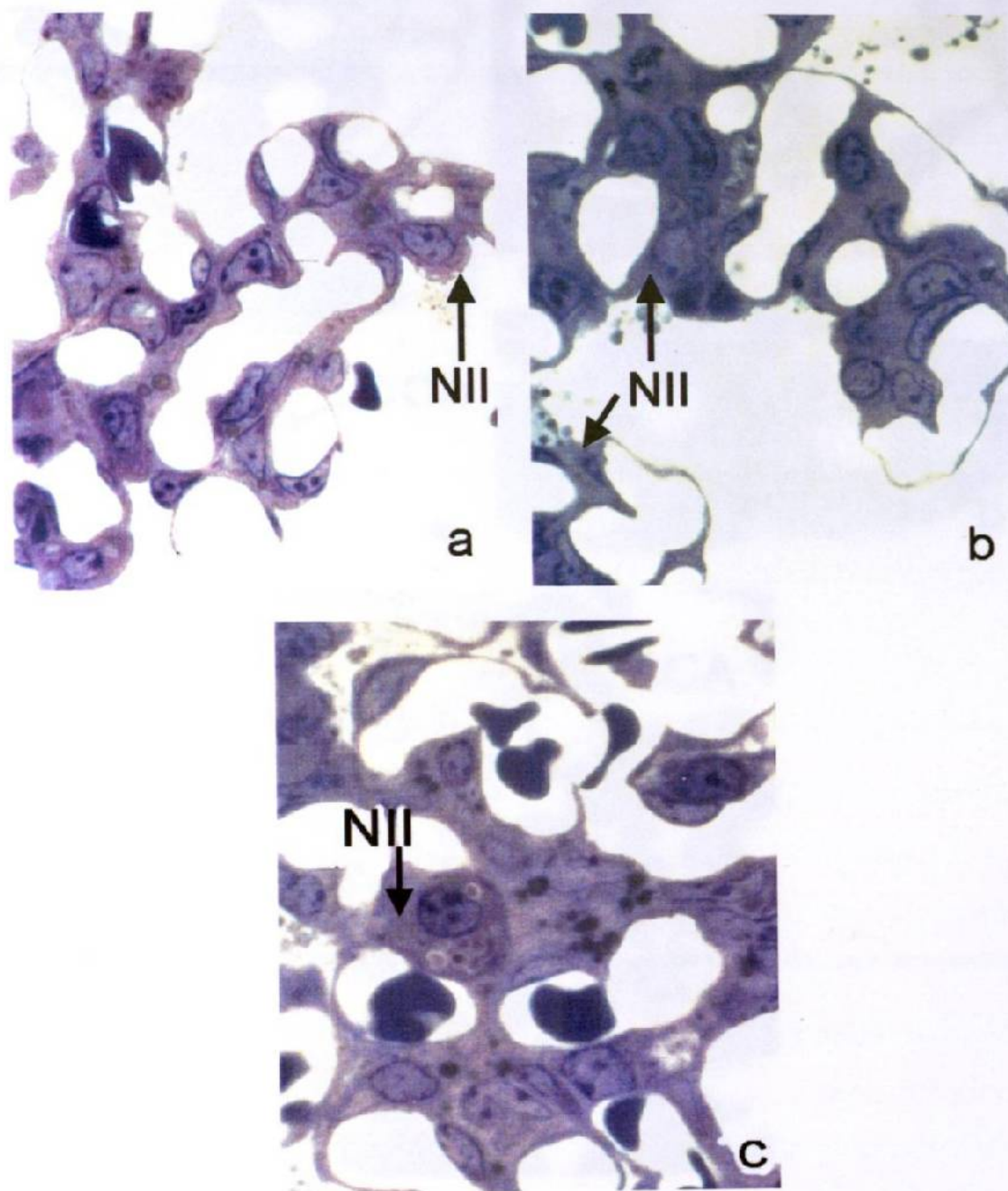


Figura 15. Pulmón de rata recién nacida. a) Grupo control; b) Grupo control isocalórico y c) Grupo tratado con alcohol 5% en todos los grupos se observó a los neumocitos II (NII). Fotomicrografía de luz cortes incluidos en resinas epóxicas, teñidos con azul de toluidina 75x.

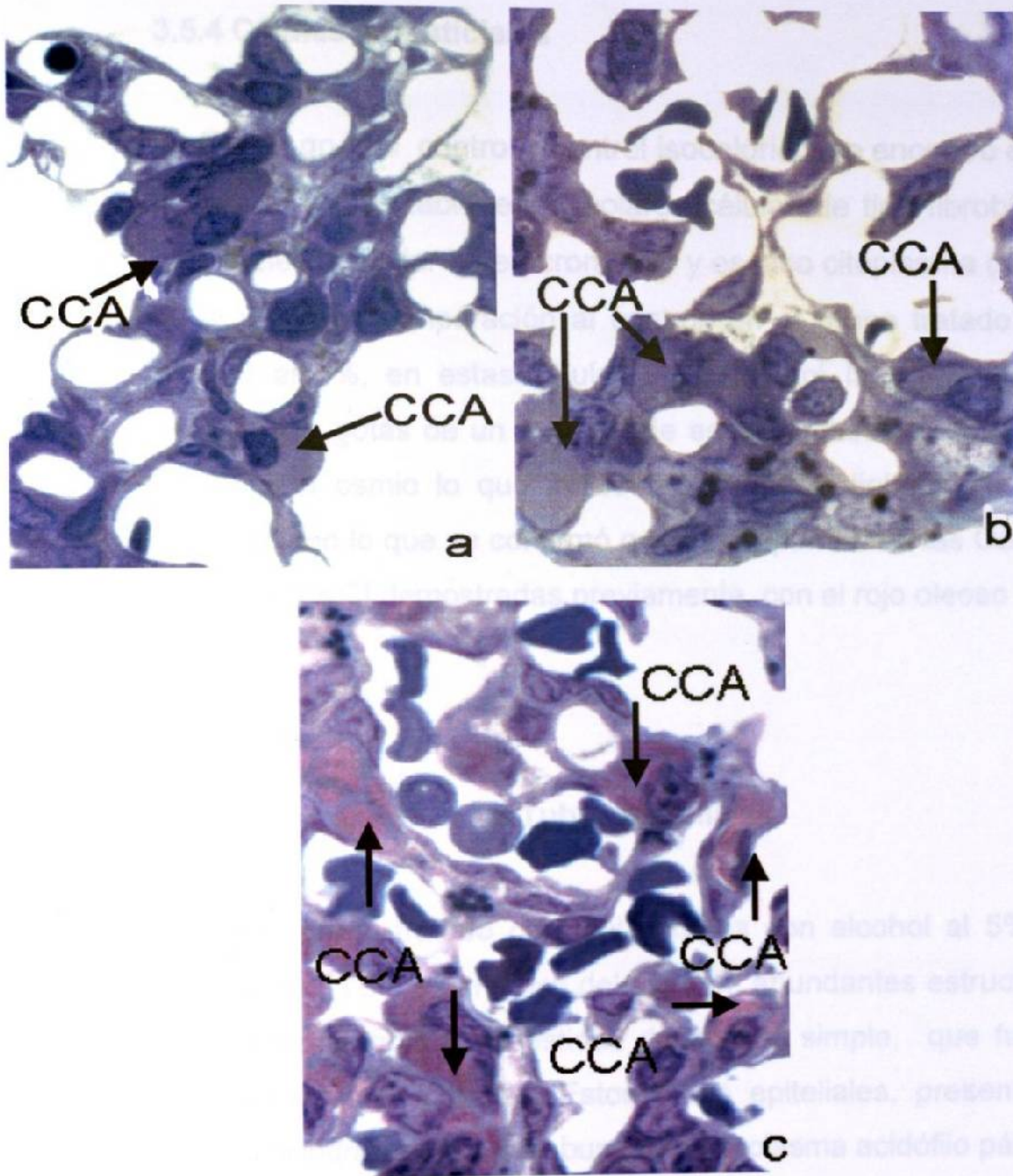


Figura 16. Pulmón de rata recién nacida. a) Grupo control; b) Grupo control isocalórico y c) Grupo tratado con alcohol 5%, en todos los grupos se observó a las células claras de los alvéolos (CCA). Fotomicrografía de luz cortes incluidos en resinas epóxicas, teñidos con azul de toluidina 75x.

### **3.5.4 Células Intersticiales**

En los grupos control y control isocalórico, se encontró en el intersticio de los tabiques alveolares células de tipo fibroblasto con núcleo irregular heterocromático y escaso citoplasma (figura 17 a y b). En comparación al control, en el grupo tratado con alcohol al 5%, en estas células se demostró la presencia de abundantes gotas de un material de aspecto oscuro, donde se depositó el osmio lo que indicó la naturaleza lipídica de este material, con lo que se confirmó que correspondían a las Células intersticiales CI demostradas previamente con el rojo oleoso (Fig. 17c).

### **3.6 Tubos epiteliales**

En el grupo tratado con dieta líquida con alcohol al 5% Se observó en la zona periférica del pulmón, abundantes estructuras de apariencia tubular revestidas de epitelio simple, que fueron escasos en los controles. Estos tubos epiteliales, presentaron células cilíndricas altas, de abundante citoplasma acidófilo pálido y núcleo elíptico rechazado al tercio basal, siguiendo el eje mayor de la célula, de apariencia muy similar a las CCA previamente descritas (Fig. 18).

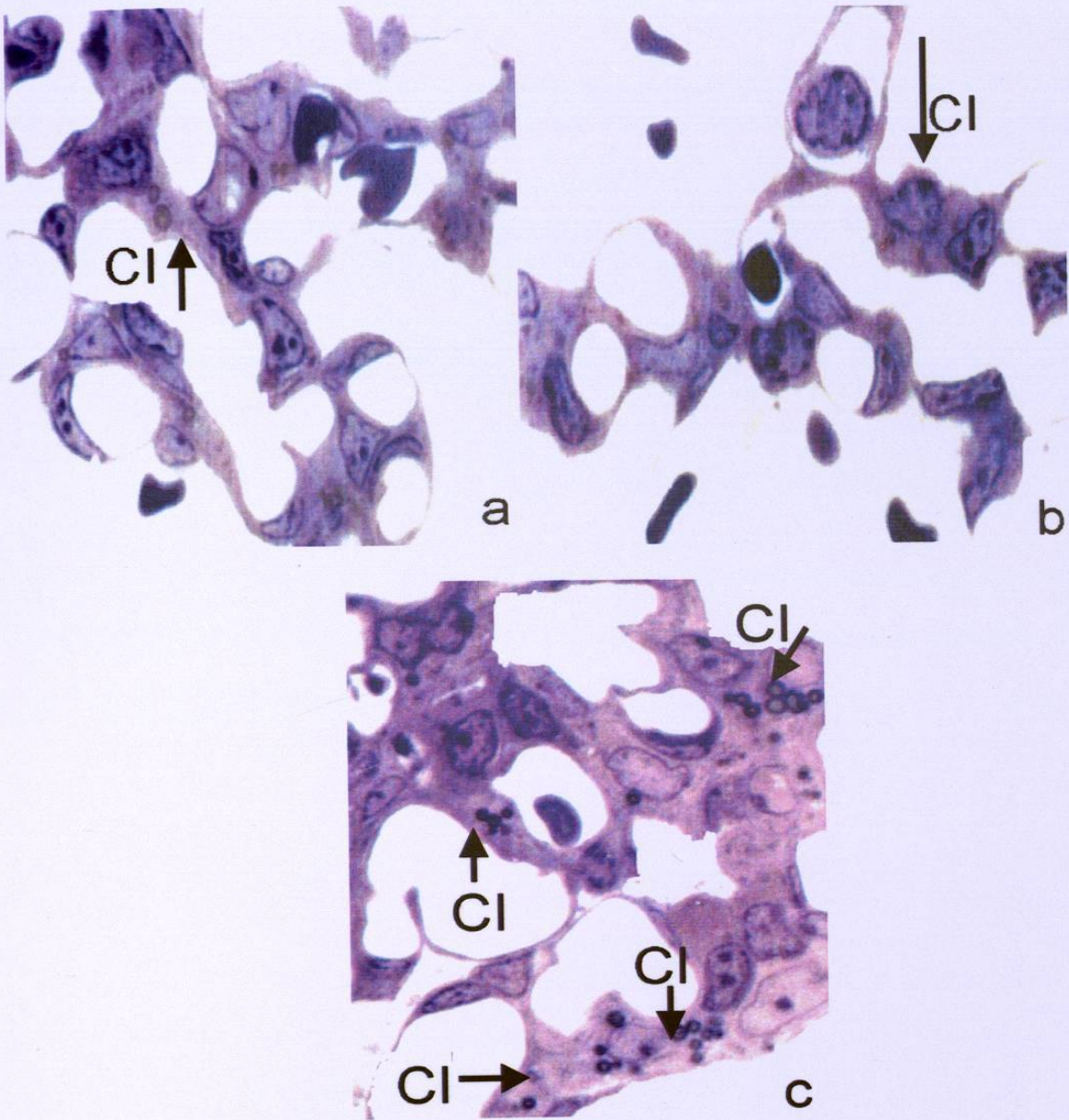


Figura 17. Pulmón de rata recién nacida de la región alveolar. a) Grupo control; b) Grupo control isocalórico. Se observó en las CI on escasas inclusiones osmiofílicas, en contraste al c) Grupo tratado con alcohol 5% los depósitos fueron muy abundantes marcados por las flechas. Cortes semifinos incluidos en resinas epóxicas, teñidos con azul de toluidina 75x.



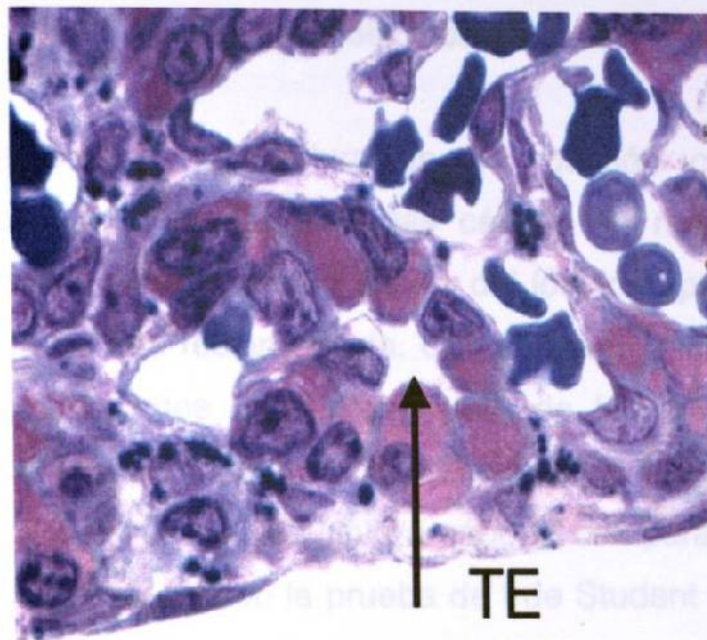


Figura 18. Pulmón de rata recién nacida tratado con alcohol 5%. Se observó en la región alveolar de la zona periférica abundantes tubos epiteliales (TE). Cortes semifinos incluidos en resinas epóxicas, teñidos con azul de toluidina 75x.

### **3.7 Análisis morfométrico**

Para evaluar la maduración del pulmón con base a la identificación morfológica de las células se realizó un análisis morfométrico a microscopía de luz del lóbulo superior del pulmón izquierdo de rata recién nacida. Contabilizamos los perfiles de las células neumocitos II, células claras de los alvéolos y células intersticiales contenidas en 100 alvéolos de las zonas central y periférica del pulmón. Se llevó a cabo la comparación estadística entre ambos sexos con la prueba de t de Student ( $p > 0.05$ ) y al no mostrar diferencia significativa entre ellos, se tomaron los valores como un solo grupo y se comparó con las distintas modalidades de dietas.

#### **3.7.1 Análisis morfométrico de la zona central del pulmón en los grupos control, control Isocalórico y de dieta líquida de alcohol al 5%**

Se analizó el número de perfiles de las células NII, CCA y CI contenidos en cien alvéolos en la zona central del pulmón. La cantidad de los NII entre los grupos no mostró diferencias estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ ). En cambio el valor que presentaron las CCA para el grupo tratado con alcohol al 5% evidenció un aumento estadísticamente significativo en

comparación a los controles con la prueba de t de Student ( $p < 0.05$ ). De igual forma el número de las CI en el grupo tratado con alcohol al 5% presentó un aumento significativo en comparación a los controles con la prueba de t de Student ( $p < 0.05$ ) (Fig.19) tabla III, apéndice A.

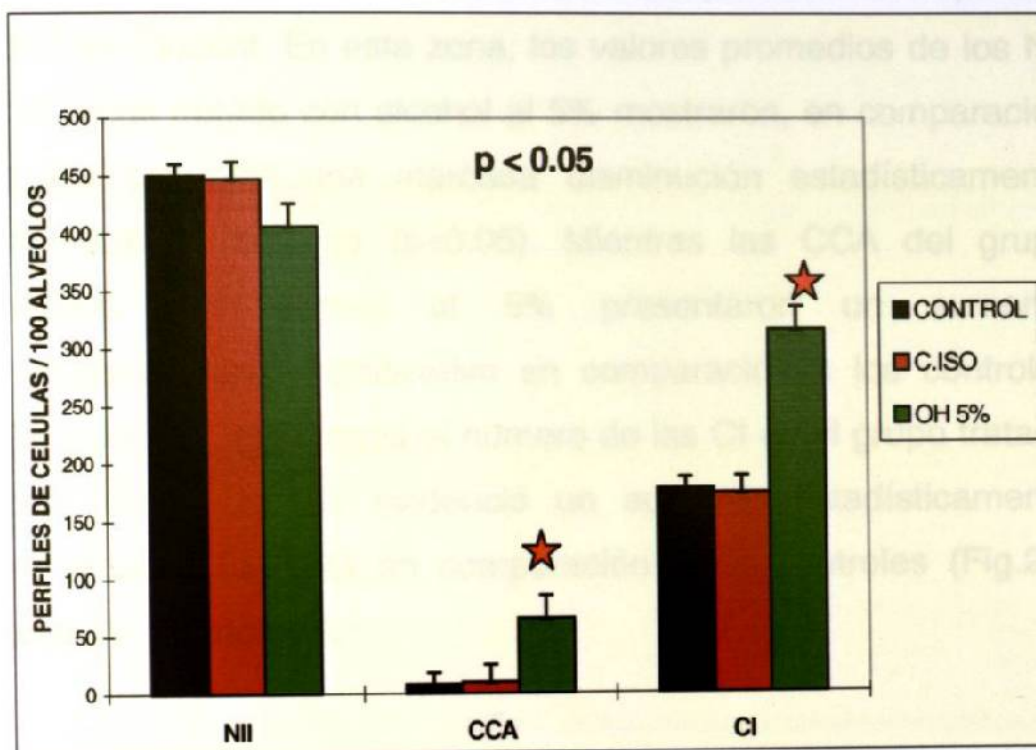


Figura 19. Promedio de perfiles de neumocitos II (NII), células claras de los alvéolos (CCA) y células intersticiales (CI) por cien alvéolos en la zona central del pulmón, donde se comparó el grupo control y control isocalórico con el grupo de dieta líquida con alcohol al 5% mostrando con una estrella donde existieron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

### **3.7.2 Análisis morfométrico de la zona periférica del pulmón en los grupos control, control isocalórico y de dieta líquida de alcohol al 5%**

Se analizó el número de perfiles de NII, CCA y CI contenidos en cien alvéolos en la zona periférica del pulmón con la prueba de t de Student. En esta zona, los valores promedios de los NII del grupo tratado con alcohol al 5% mostraron, en comparación a los controles una marcada disminución estadísticamente significativa con una ( $p < 0.05$ ). Mientras las CCA del grupo tratado con alcohol al 5% presentaron un aumento estadísticamente significativo en comparación a los controles ( $p < 0.05$ ). De igual forma el número de las CI en el grupo tratado con alcohol al 5% evidenció un aumento estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) en comparación a los controles (Fig.20) tabla IV, apéndice A.

### 3.5 Análisis morfológico de los tubos epiteliales

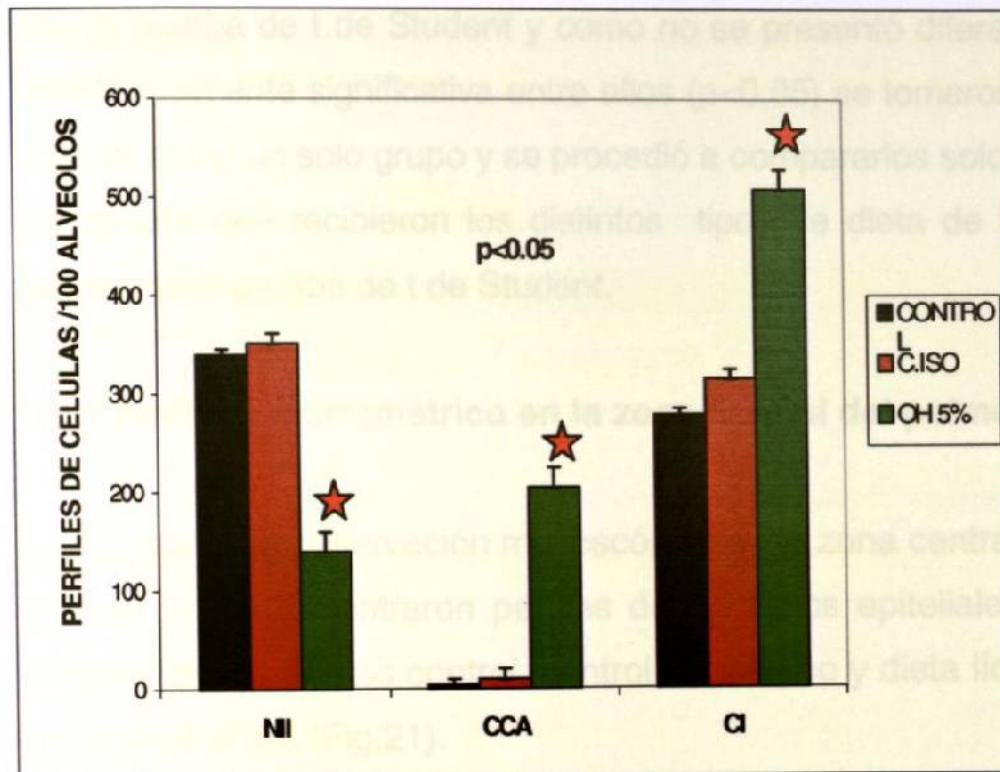


Figura 20. Promedio de perfiles de neumocitos II (NII), células claras de los alvéolos (CCA) y células intersticiales (CI) por cien alvéolos en la zona periférica del pulmón. Se comparó a los grupos control y control isocalórico con el grupo de dieta líquida con alcohol al 5%, se marca con estrellas las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

### **3.8 Análisis morfométrico de los tubos epiteliales**

Inicialmente y al igual que en los otros conteos del análisis se hizo la comparación entre los tubos epiteliales para cada sexo con la prueba de t de Student y como no se presentó diferencia estadísticamente significativa entre ellos ( $p < 0.05$ ) se tomaron los valores como un solo grupo y se procedió a compararlos solo con los grupos que recibieron los distintos tipos de dieta de igual forma con la prueba de t de Student.

#### **3.8.1 Análisis morfométrico en la zona central del pulmón**

Al realizar la observación microscópica de la zona central del pulmón no se encontraron perfiles de los tubos epiteliales en ninguno de los grupos control, control isocalórico y dieta líquida de alcohol al 5% (Fig.21).

#### **3.8.2 Análisis morfométrico en la zona periférica del pulmón de los grupos control, control isocalórico y grupo tratado con alcohol 5%**

Al contabilizar los perfiles de los tubos epiteliales de grupo tratado con alcohol al 5% se encontró un aumento en el número de perfiles, estadísticamente significativo al compararlo con los grupos control y control isocalórico utilizando la prueba de t de Student. ( $p < 0.05$ ) ( Fig. 21) Tabla V en apéndice A .