

Figura 21. Promedio del número de perfiles de tubos epiteliales contenidos en 100 alvéolos en la zona del centro y la en periferia del pulmón. Se comparó a los grupos control y control isocalórico con el grupo de dieta líquida de alcohol al 5%. Se marca con una estrella el grupo que presentó un aumento estadísticamente significativa un valor de  $p < 0.05$ .

En la figura 22 se muestra una gráfica que integra los valores promedio obtenidos de ambas zonas del pulmón.

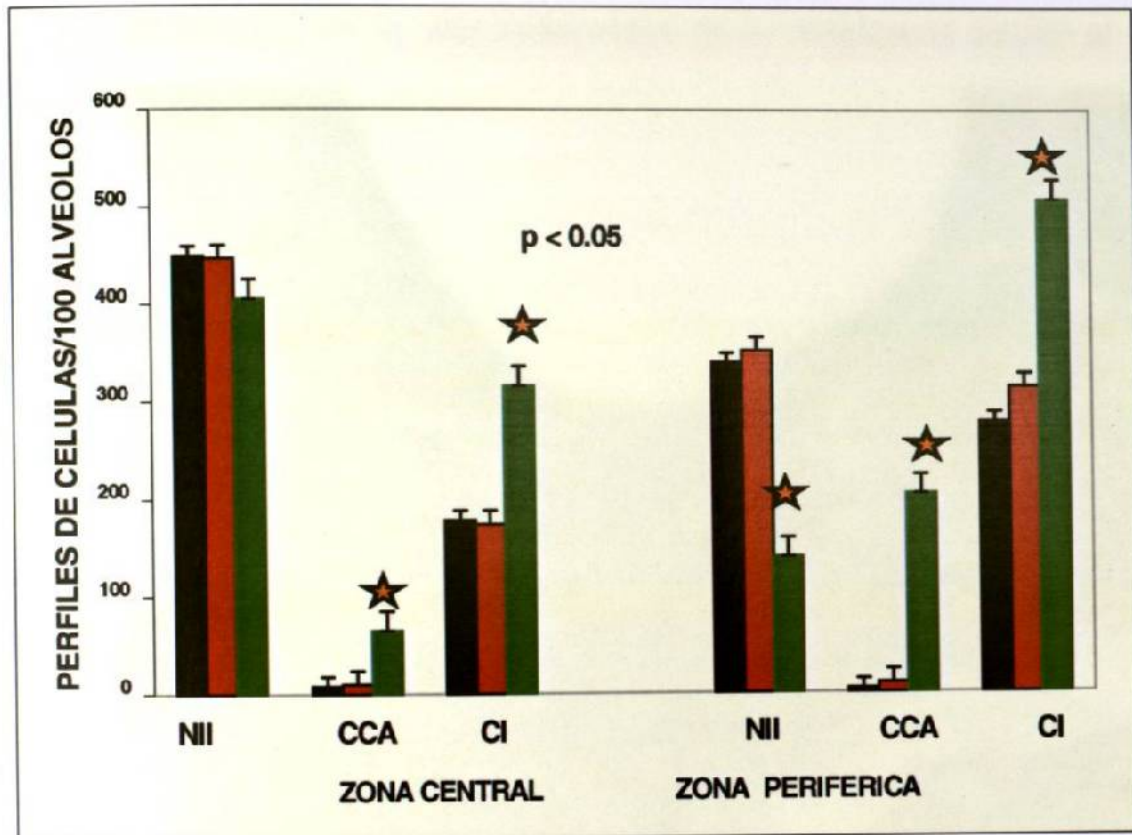


Figura 22. Se comparó a los valores promedio del número de los perfiles celulares contenidos en 100 alvéolos en la zona central y periférica del pulmón neumocitos II (NII), células claras de los alvéolos (CCA) y células intersticiales (CI) de los grupos control y control isocalórico con el grupo de dieta con alcohol al 5% con la prueba de t de Student y donde se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) se marcaron con estrellas.

### 3.9 Análisis Ultraestructural

#### 3.9.1 Neumocito II

En todos los grupos los neumocitos II presentaron diferencias en la electrodensidad de su citoplasma debido al

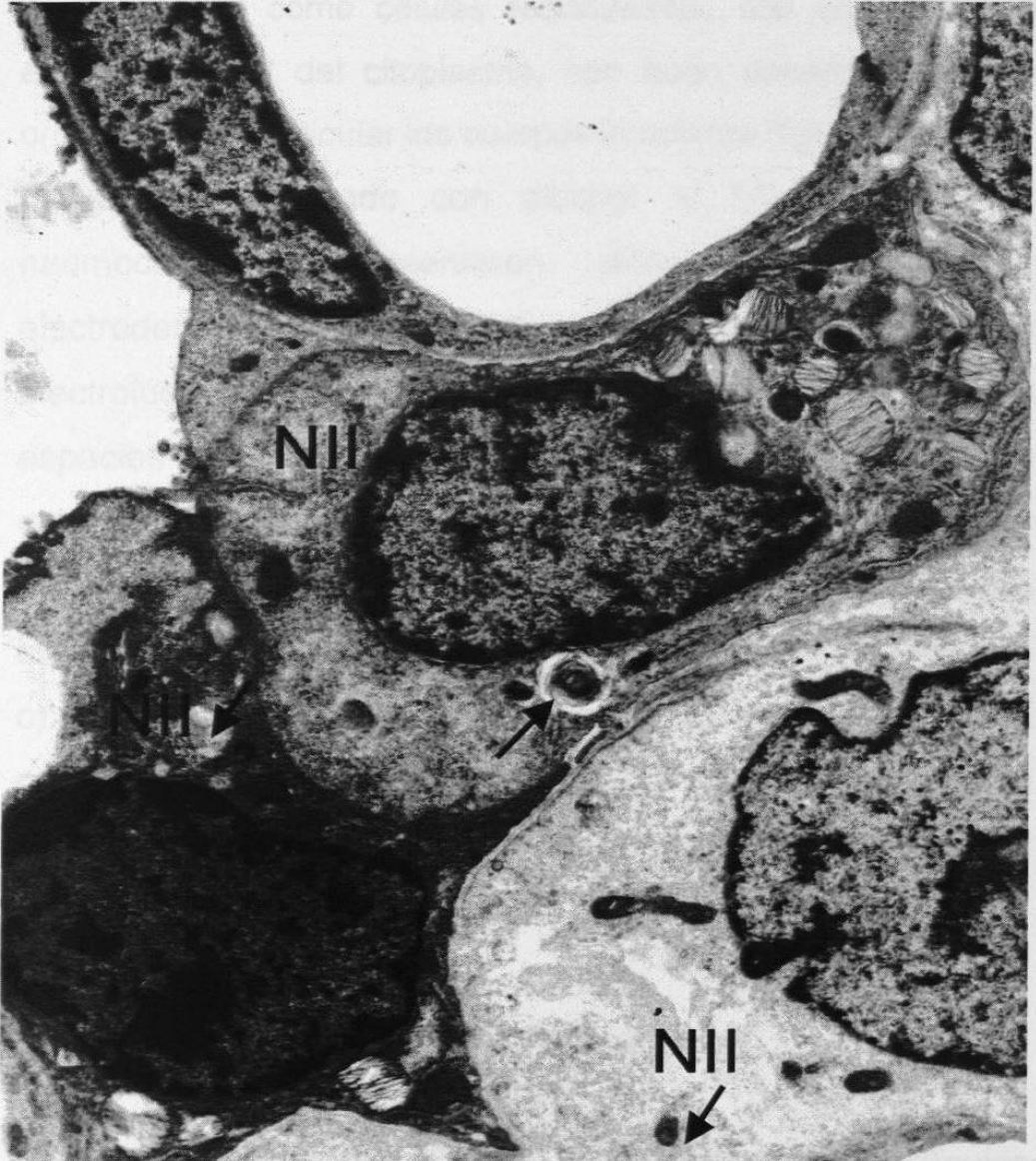


Figura 23. Micrografía electrónica de transmisión donde los neumocitos II (NII) que mostraron diferentes grados de electrodensidad de su citoplasma y diferencias en los cuerpos lamelares indicados con flechas 4,400x.

desarrollo de sus organelos, particularmente los cuerpos lamelares y las regiones del citoplasma donde estaban los depósitos de glucógeno, por lo que se fue posible distinguir diferentes aspectos en su citoplasma (Fig. 23).

En los grupos control y control isocalórico se observaron los neumocitos II como células redondeadas con una marcada electrodensidad del citoplasma, con buen desarrollo de sus organelos, en particular los cuerpos lamelares (figura 24 a y b). En el grupo tratado con alcohol al 5%, algunos los neumocitos II presentaron diferentes grados de electrodensidad evidenciado por grandes zonas electrolúcidas en el citoplasma, que correspondían a los espacios que ocupaban los depósitos de glucógeno, que se extrajeron durante en el procesamiento para M.E. Todos los organelos mostraron pobre desarrollo en particular los cuerpos lamelares que fueron pequeños y escasos. (Fig. 24 c). Las células claras de los alvéolos descritas previamente a microscopía de luz, se localizaron tanto en los alvéolos como en los tubos epiteliales y correspondieron a neumocitos II inmaduros.

#### **3.9.1.1 Organelos de los Neumocitos II**

Debido a las características de la electrodensidad disminuida de los neumocitos II en particular en el grupo tratado con alcohol al 5%, en comparación a los controles (figura 25 a y b), se realizó la revisión de los principales organelos y se observó

que se encontraron presentes e íntegros en todos los grupos, solo que en el grupo de alcohol en comparación con los controles presentaron menor desarrollo (Fig. 25c).

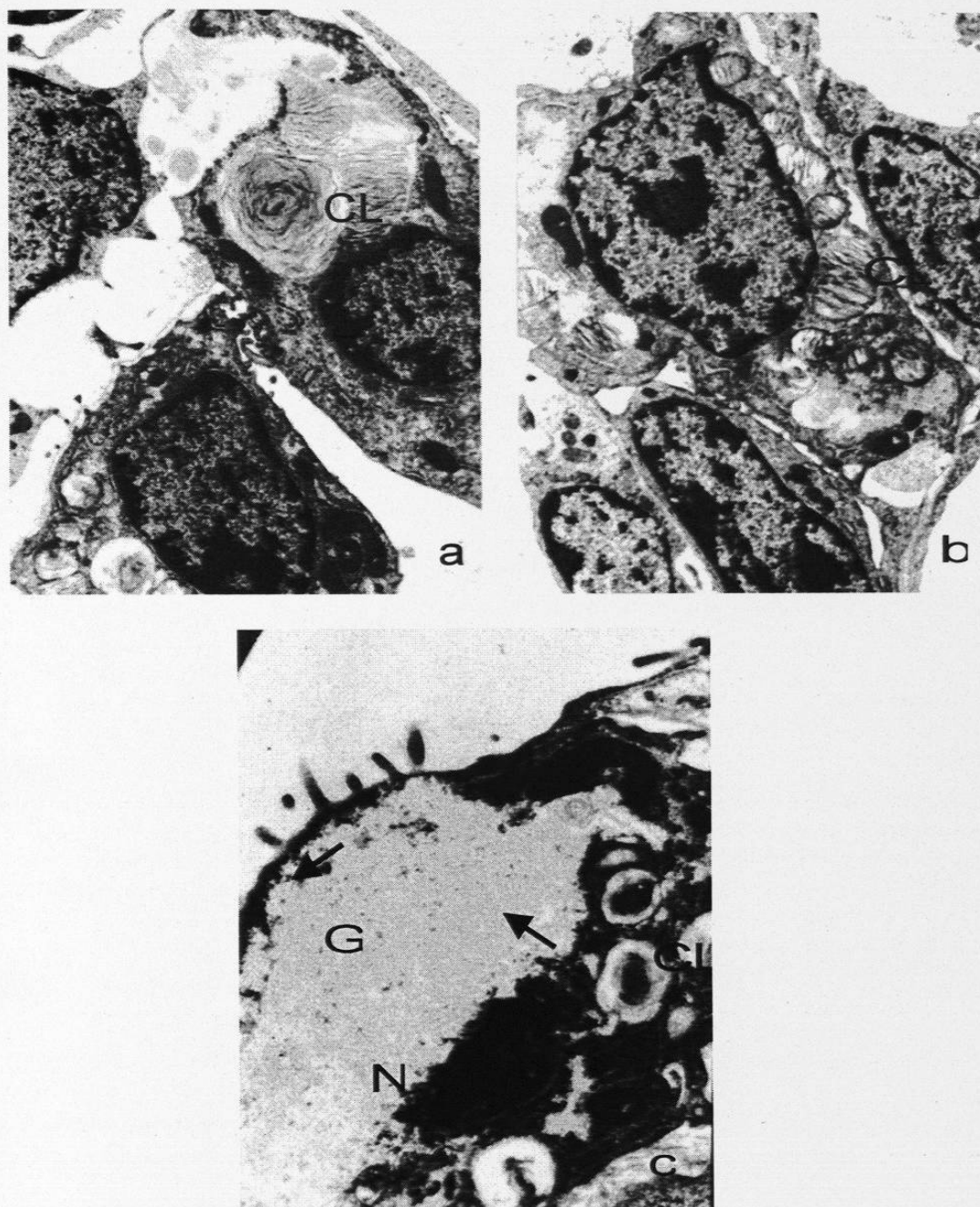


Figura 24. Micrografías electrónicas de transmisión de los neumocitos II en los grupos: a) Control y b) Control isocalórico, donde se observaron grandes cuerpos lamelares en su citoplasma indicado con CL; en el c) Dieta líquida con alcohol al 5% los cuerpos lamelares fueron escasos y pequeños, las zonas donde se localizaban los depósitos de glucógeno se marcaron con una G y con flechas, el núcleo con una N 4,400x.

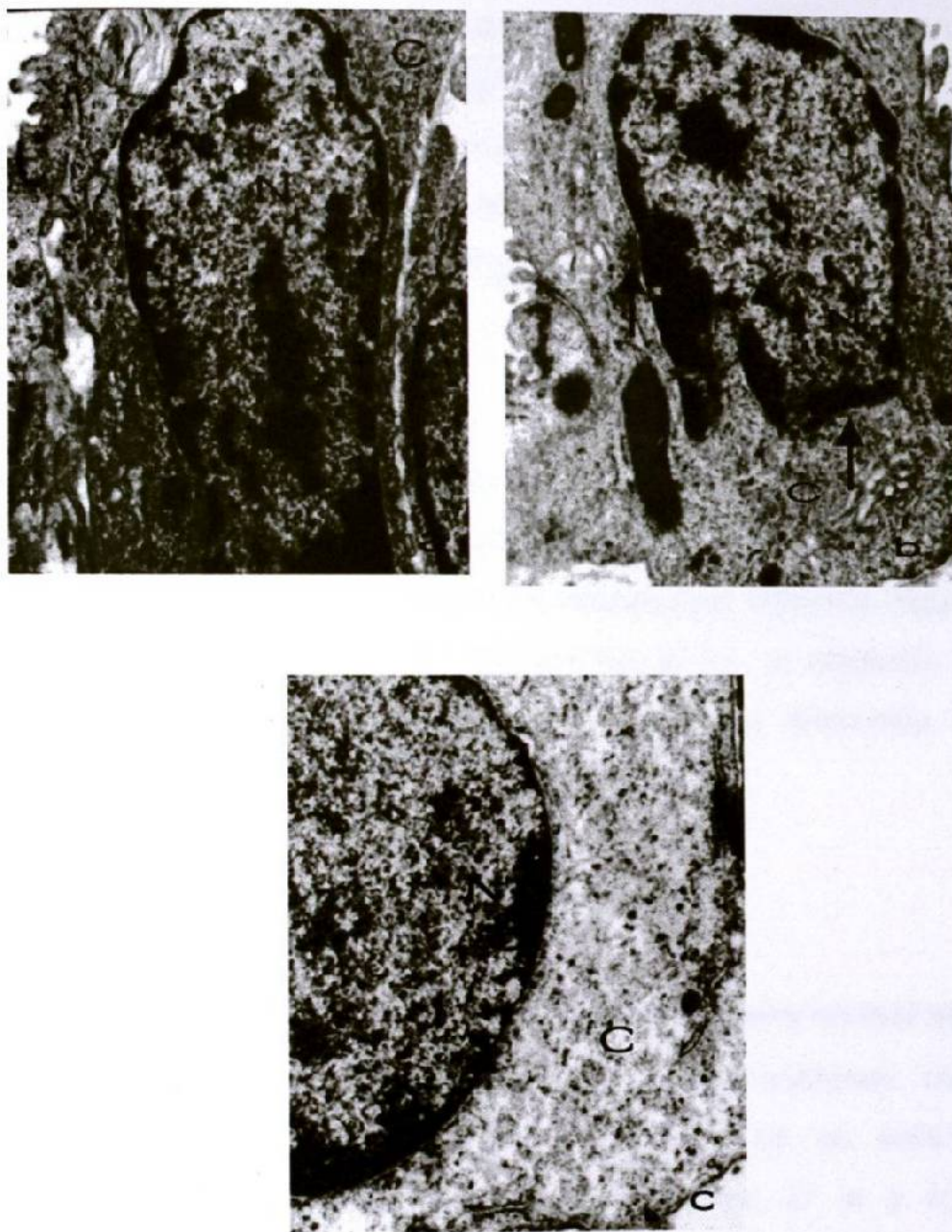


Figura 25. Micrografías electrónicas de transmisión del citoplasma de los neumocitos II en a) Grupos control; b) Grupos control isocalórico; y c) Grupos de dieta líquida con alcohol al 5%. Se observaron núcleos marcados con una N y el citoplasma marcado con una C donde se encontraron con grados variables de electrodensidad, estas diferencias fueron ocasionadas por disminución en la cantidad de organelos y por los grandes espacios donde se depositaba el glucógeno marcado con una flecha 7,400x.

### **3.9.1.1.1 Cuerpos lamelares**

De la misma forma los cuerpos lamelares en los grupos control absoluto y el grupo control isocalórico fueron voluminosos y abundantes en los neumocitos II, en el grupo tratado con alcohol al 5%, se conservaron íntegros pero fueron pequeños y pobremente desarrollados (Fig. 26).

### **3.9.1.1.2 Aparato de Golgi**

El aparato de Golgi en el grupo control absoluto y el grupo control isocalórico se localizaba en la región perinuclear y mostró pilas de cisternas aplanadas con dilataciones laterales (figura 27 a y b); en el grupo tratado con alcohol al 5% el organelo fue de menor tamaño y poco desarrollo sacular a diferencia de los controles (Fig. 27 c).

### **3.9.1.1.3 Retículo endoplásmico rugoso**

El retículo endoplásmico rugoso en los grupos control absoluto y el grupo control isocalórico presentó abundantes cisternas paralelas bien desarrolladas, tachonadas en su exterior de cuerpos electrodensos o ribosomas (figura 27 a y b). Este organelo en el grupo tratado con alcohol al 5%, presentó escasas cisternas con pocos ribosomas (Fig.27 c).

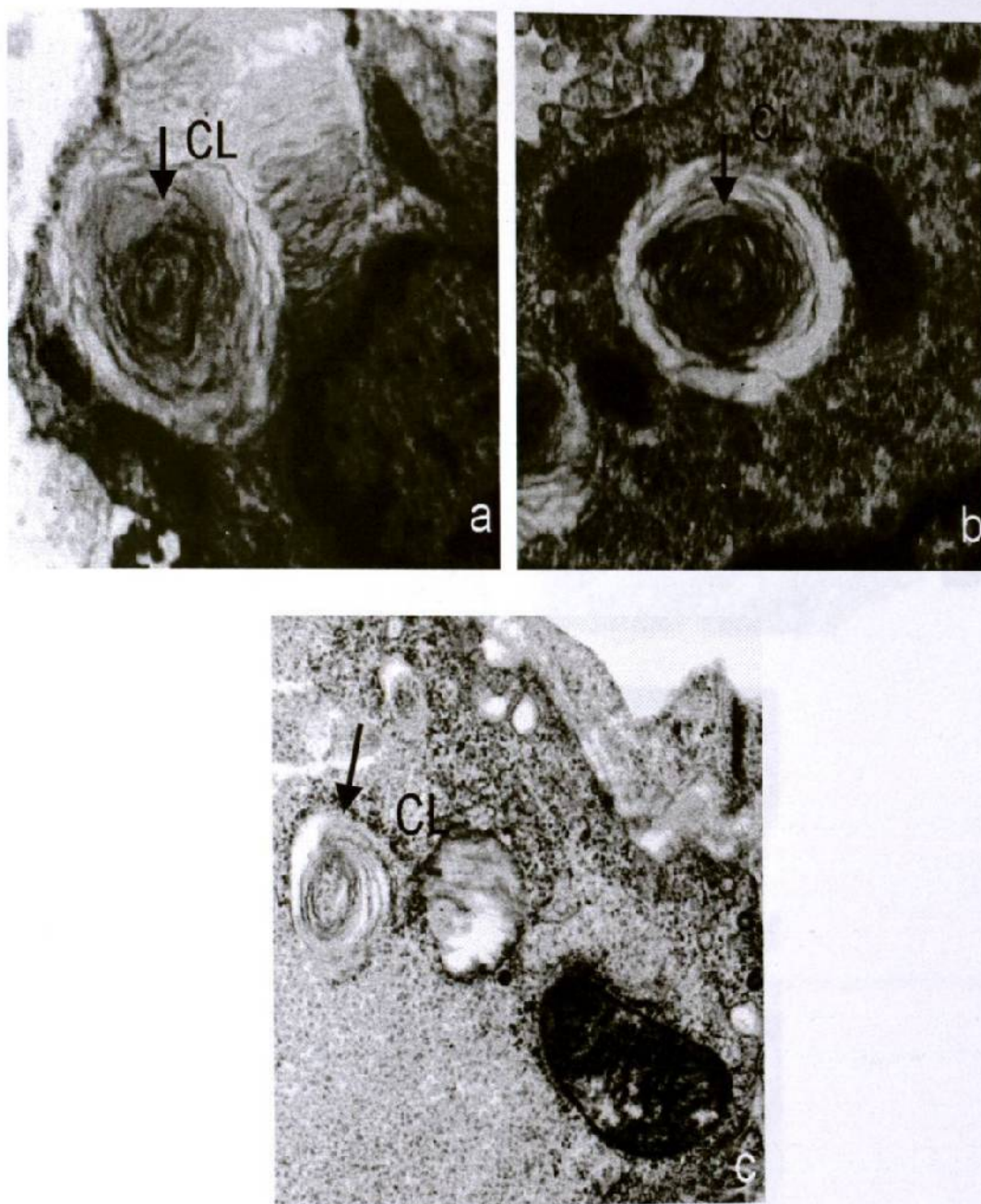


Figura 26. Micrografías electrónicas de transmisión de neumocitos II de los: a) Grupos control; b) Grupos control isocalóricos y c) Grupos con dieta líquida de alcohol al 5%, donde se observaron cuerpos lamelares marcados con CL a 12,000x.



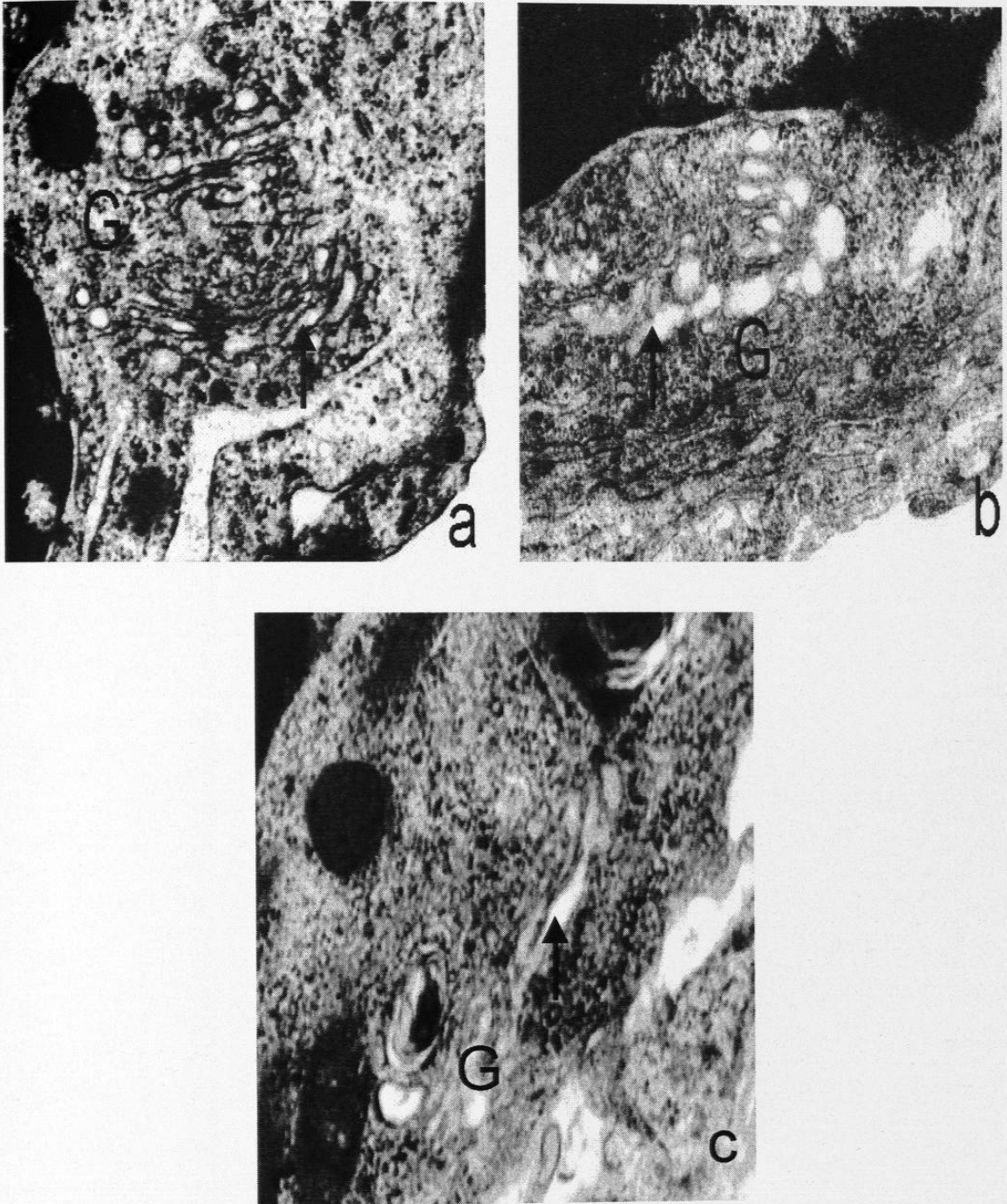


Figura 27. Micrografías electrónicas de transmisión de neumocitos tipo II en los: a) Grupos control; b) Grupos control isocalórico y c) Grupo con dieta líquida de alcohol al 5% donde se observó el Aparato de Golgi disminuido en la cantidad de cisternas en este grupo (marcado con la letra G) las cisternas fueron marcadas con una flecha 12,000x.

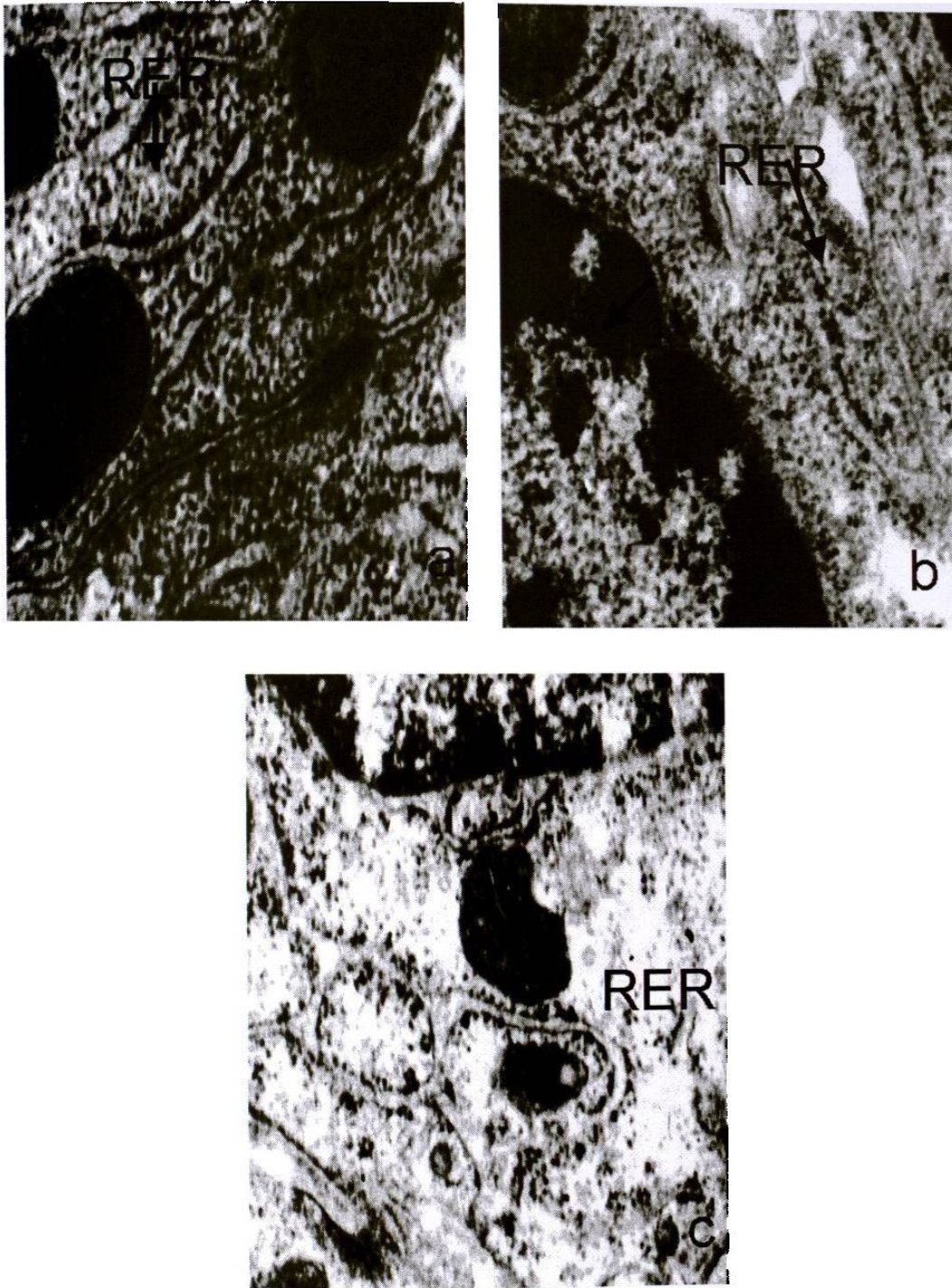


Figura 28. Micrografías electrónicas de transmisión de los neumocitos II en los: a) Grupos control; b) Grupos control isocalórico y c) Grupos con dieta líquida de alcohol al 5% donde se observó el retículo endoplásmico rugoso marcado como RER y con una flecha las cisternas 12,000x.

#### **3.9.1.1.4 Mitocondrias**

En el grupo control absoluto e isocalórico se observó las mitocondrias con crestas abundantes, gruesas y bien desarrolladas (figura 29 a y b), en el grupo de alcohol las mitocondrias en general fueron de menor tamaño (Fig. 29 c).

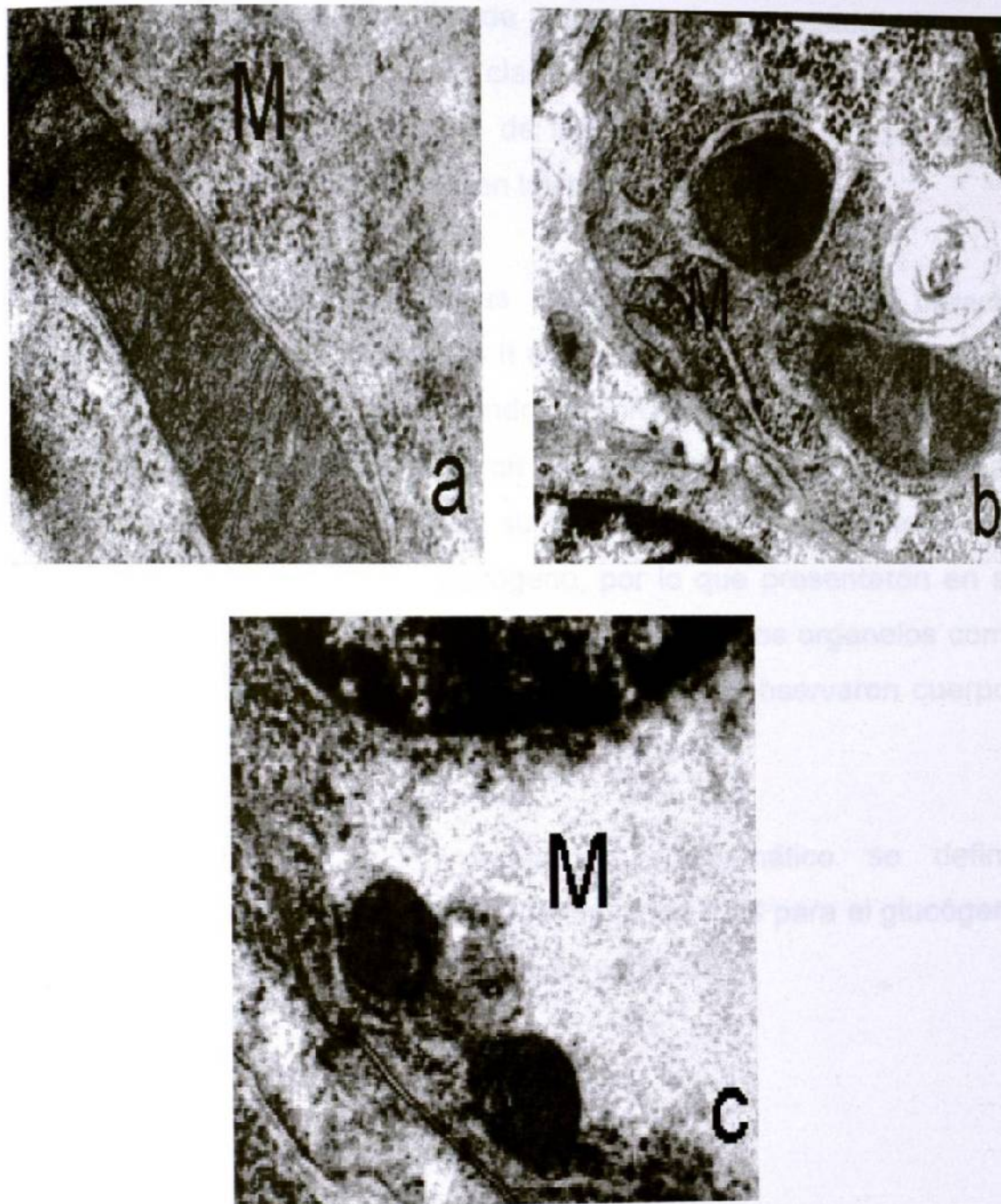


Figura 29. Micrograffas electrónicas de transmisión de neumocitos II: a) Grupos control; b) Grupos control isocalórico y c) Grupos con dieta líquida de alcohol al 5%, donde se observaron las mitocondrias (M) 12,000X.

### 3.9.2 Células Claras de los alvéolos

En la pared alveolar de los tres grupos estudiados, se observaron las células claras de los alvéolos descritas previamente a microscopía de luz, estas células se localizaron tanto en los alvéolos como en los tubos epiteliales.

En sus características ultraestructurales al parecer corresponden a neumocitos II en proceso de maduración, ya que son células poliédricas o cilíndricas con núcleo rechazado al tercio inferior, donde se observaron grandes zonas poco densas que ocupan la mayor parte de su citoplasma, que indicó los sitios donde se localizaba el glucógeno, por lo que presentaron en su citoplasma de aspecto electrolúcido con escasos organelos como mitocondrias y RER, en estas células no se observaron cuerpos lamelares (Fig. 30).

La naturaleza del contenido citoplasmático se definió claramente con la técnica histoquímica de PAS para el glucógeno mostrado previamente, que resultó positiva.

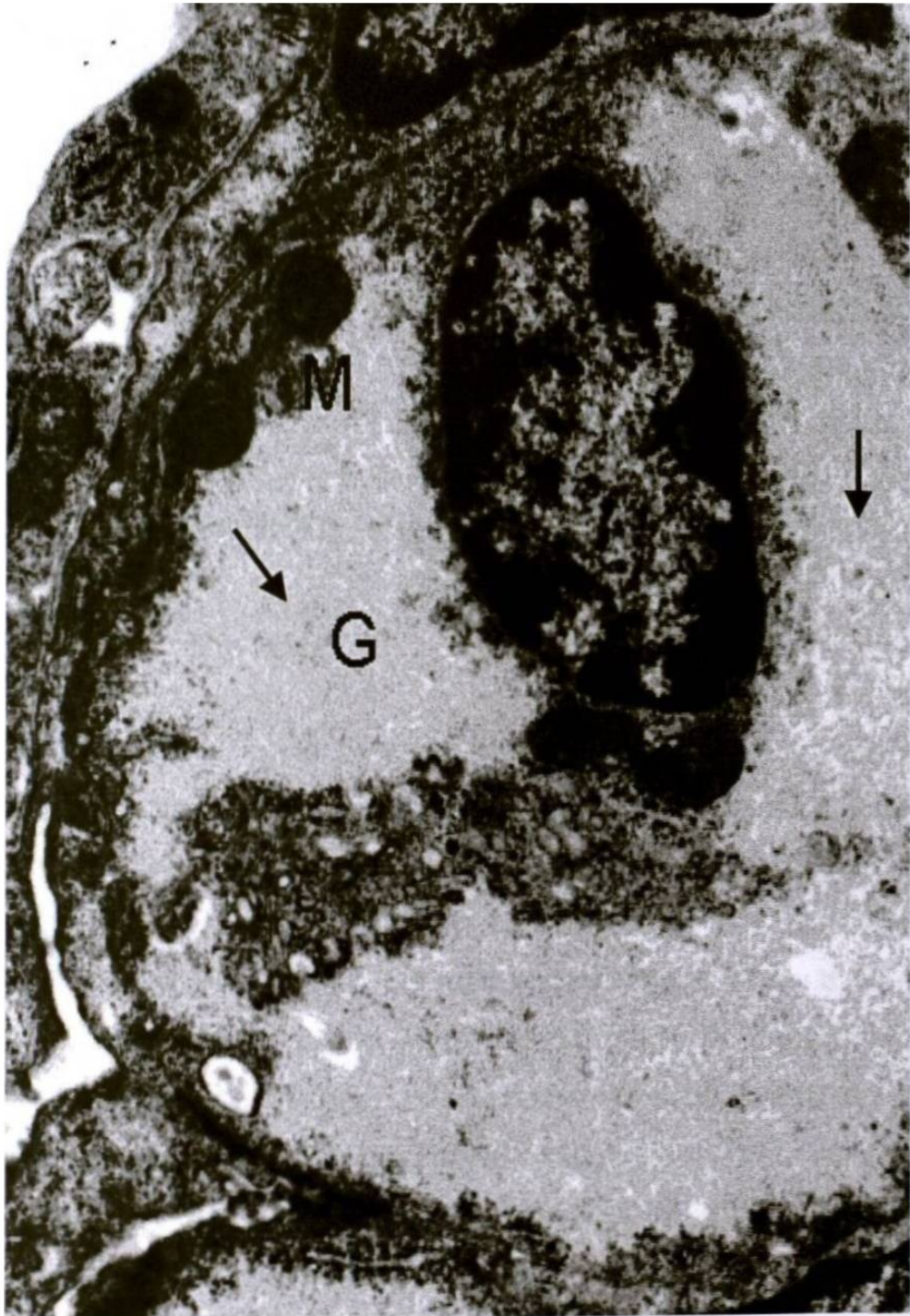


Figura 30 Micrografía electrónica de transmisión donde se observó una de las Células Claras de los Alvéolos. Las zonas del citoplasma menos densas corresponden al sitio donde se depositaba el glucógeno G (se indica con flechas) 7,400x.

### **3.9.3 Células Intersticiales**

El intersticio de los tabiques alveolares de los grupos controles y control isocalórico se observó a presencia de CI que mostraron características de células de tipo fibroblasto con depósitos escasos de material osmiofílico de naturaleza lipídica, (figura 31 a y b). Los hallazgos más relevantes fueron en el grupo tratado con alcohol, donde las células intersticiales presentaron abundantes depósitos de un material osmiofílico de naturaleza lipídica, desprovisto de membrana, por lo que pudieron ser reconocidas como lipofibroblastos (Fig. 31 c).

### **3.9.4 Tubos epiteliales**

En los tubos epiteliales de los grupos control y control isocalórico se encontró que las células de citoplasma claro similares a las CCA fueron escasas y estaban mezcladas con los neumocitos II, ellas presentaron abundantes figuras de mielina que se liberaron hacia a luz del tubo epitelial figura 32 a y b. En la ultraestructura de los tubos epiteliales del grupo de dieta líquida de alcohol 5%, se observó que estaban revestidos casi en su totalidad por células con abundante citoplasma claro, escasos organelos y no presentaron cuerpos lamelares, por lo que son muy similares a las CCA, previamente descritas, al parecer estas células son neumocitos II inmaduros (Fig. 32 c).

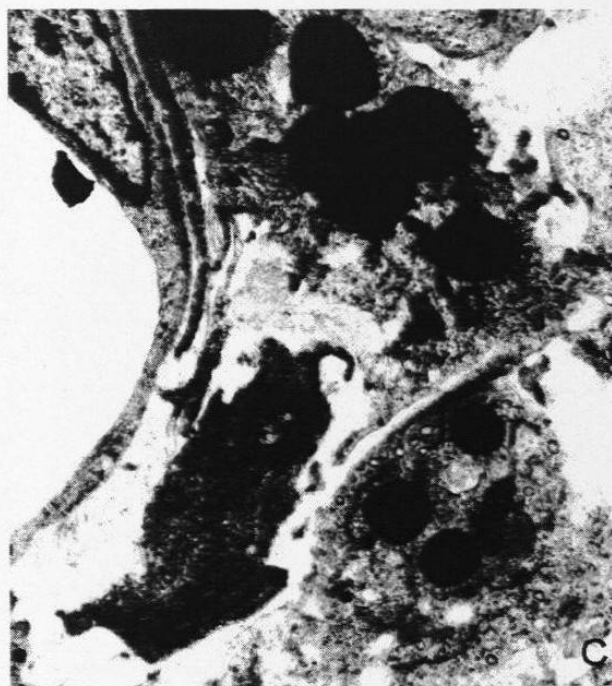
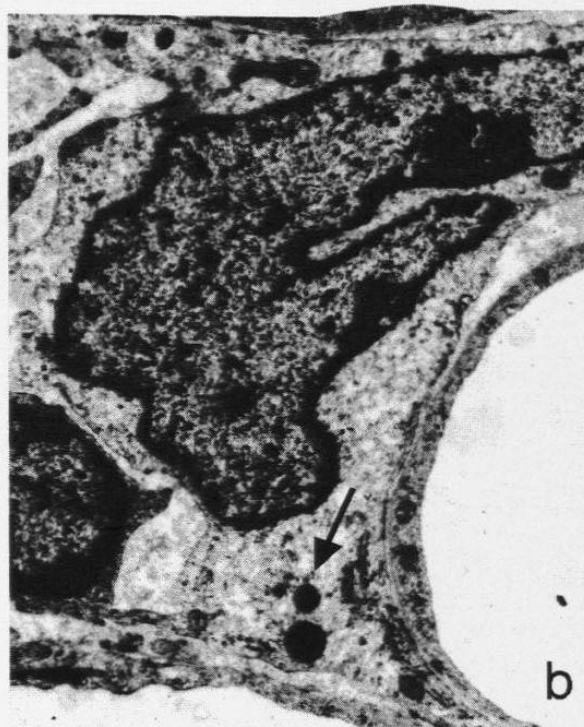
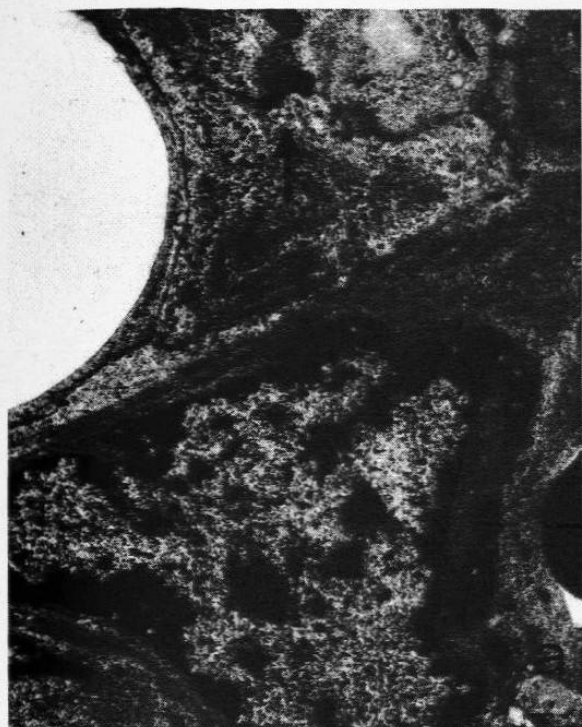


Figura 31. Micrografías electrónicas de transmisión, donde se observaron células intersticiales que correspondieron a lipofibroblastos: a) Grupo control; b) Grupo control isocalórico y c) Grupo tratado con alcohol al 5%. Los depósitos osmiofílicos se marcaron con flechas 4,000x.



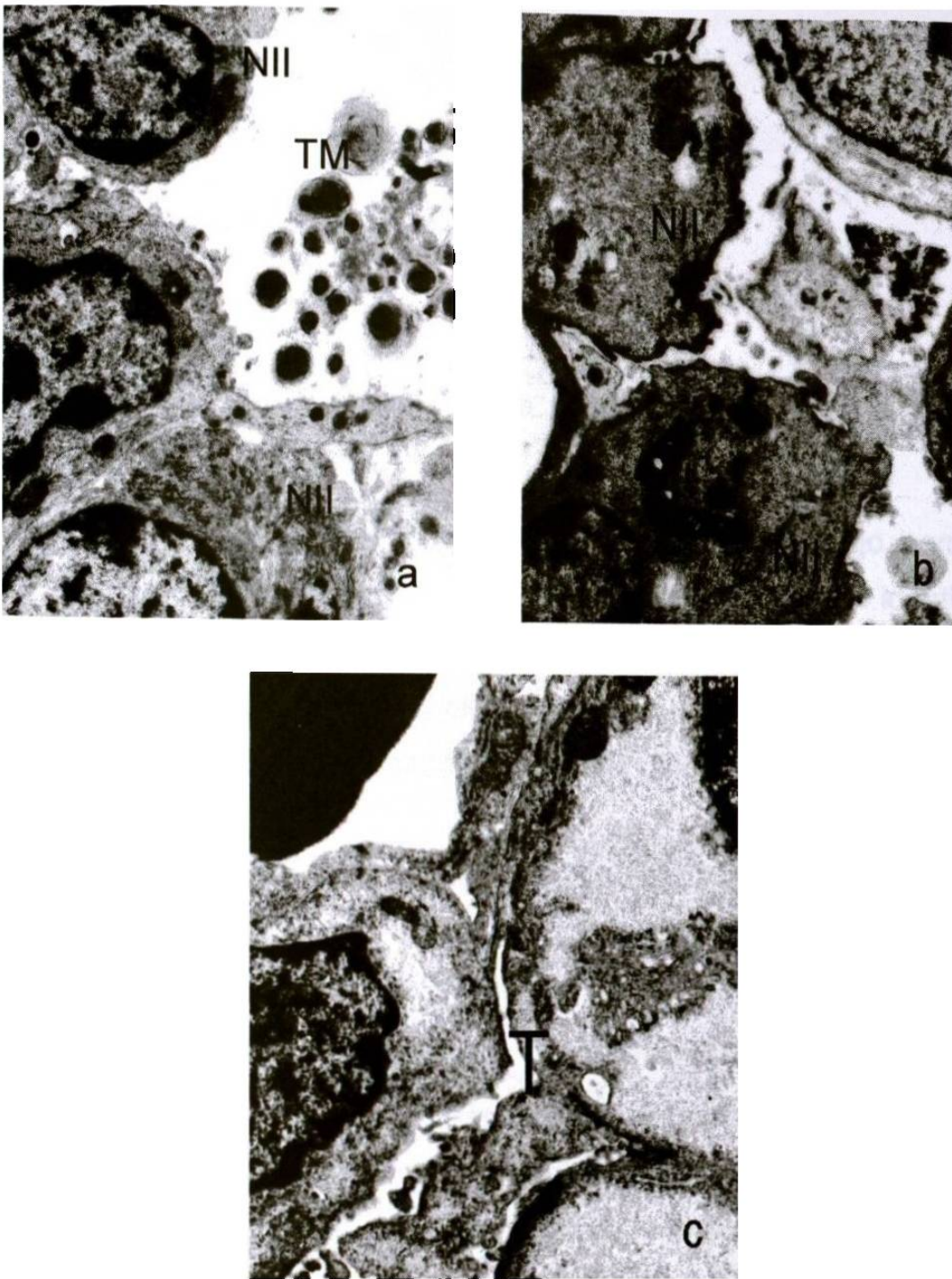


Figura 32 Micrografías electrónicas de transmisión, de tubos epiteliales marcados con una T, donde se observó en a) y b) neumocitos II (NII) cuerpos lamelares (CL) y figuras de mielina (TM) en la luz del tubo y en la c) se observó que los tubos epiteliales en el grupo tratado con alcohol al 5% presentaron abundantes células claras de los alvéolos (CCA) marcadas con flechas 4,400x.

## **CAPITULO CUATRO**

### **DISCUSION**

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten aceptar la hipótesis propuesta, ya que se lograron identificar, los cambios en las características de las células del pulmón evaluadas por histología, histoquímica, morfometría y ultraestructura utilizando la dosis de alcohol al 5%.

La cantidad de productos por camada (10-14) fue similar en los tres grupos de estudio, dato que coincide con lo reportado en la literatura donde se observó que el alcohol no interfiere con la cantidad de producto por camada<sup>64</sup>. Al analizar el porcentaje de productos que nacieron muertos durante el experimento, observamos que pertenecieron a los controles lo que coincide con lo reportado por Endo<sup>65</sup>, sobre la incidencia de muertes en estos grupos, por lo que podemos interpretar los resultados de los grupos control como parte del comportamiento biológico de la especie.

La única anormalidad macroscópica externa que observamos fue ano pequeño, en un producto del grupo de dieta líquida de alcohol al 5%, por lo que el porcentaje de malformaciones del experimento fue de 0.37% y concuerda con los resultados de Weinberg 1985 quién reportó que en un solo producto del grupo de dieta de alcohol al 5.5% encontró atresia del canal anal, que correspondió al 0.45% de malformaciones del experimento. El defecto en la región anogenital que observamos en el producto del grupo tratado con alcohol, nos permite confirmar que aun a dosis bajas, el alcohol podría causar efectos teratogénicos.

La cuantificación de los niveles de alcohol en sangre permitió asegurar que los productos estuvieron expuestos al alcohol durante toda la gestación y que los cambios observados se relacionan con la presencia de dicha sustancia. Las concentraciones en sangre se elevaron paulatinamente durante la gestación, lo que coincide con los reportes Allan 1997.

El hecho de que no observamos diferencias en los parámetros de peso total de los productos y la longitud craneocaudal en los grupos, puede ser debido a que las dietas que se utilizaron fueron enriquecidas en proteínas para aportar los requerimientos extra que son necesarios para la gestación y la lactancia coincidiendo con los trabajos de William 1989, que indican que al utilizar dietas enriquecidas con proteínas se protege a los productos de la disminución del peso total y talla ocasionados por el efecto del alcohol.

La disminución de los valores del peso húmedo del pulmón del grupo tratado con alcohol coincide con lo reportado por Inselman 1985, confirmando que el pulmón es un órgano particularmente susceptible al efecto de alcohol

Con nuestros resultados se puede asegurar que a dosis menores, a las reportadas en otros estudios, el peso húmedo del pulmón, es blanco para el efecto del alcohol.

La histología de los cortes de congelación con la falta de expansión de los espacios aéreos y la compactación en general de los tabiques nos permiten afirmar que aun a dosis menores de alcohol a las reportadas por Zagorul'ko 1990 se presenta la disminución del desarrollo alveolar.

Los resultados positivos con la técnica histoquímica de PAS que evidencian los depósitos de glucógeno en el grupo tratado con alcohol aportaron el primer indicio de retardo en la maduración celular, ya que esta reacción a la técnica no debe observarse cuando las células están maduras, como se demostró en los grupos control y control isocalórico. En el contexto de la maduración celular, el glucógeno disminuye paulatinamente al aportar la energía para el ensamble de todos los organelos, en particular los cuerpos lamelares de los neumocitos tipo II durante su maduración Williams 1993 y Strang 1977.

Los resultados positivos para la técnica histoquímica del rojo Oleoso fue el segundo parámetro para evidenciar el retraso de

la citodiferenciación de los lipofibroblastos, ya que esta reacción nos permitió demostrar, sin lugar a duda la naturaleza lípida de las inclusiones localizadas en los tabiques interalveolares. En las células en desarrollo los lípidos neutros son materiales de reserva que sirven como fuente de energía para los procesos de diferenciación terminal (Lan 1984 y Torday 1984).

Los resultados obtenidos con ambas técnicas histoquímicas, nos indican retardo en la maduración y citodiferenciación por efecto del alcohol al 5%.

Es importante mencionar que las características morfológicas de los neumocitos I no se vieron modificadas en el estudio de microscopía de luz en ninguno de los grupos. En particular en el grupo tratado con alcohol al 5%, este no ocasionó cambios en la morfología de las células posiblemente debido a que los neumocitos I no presentan mitosis, ya que se diferencian de una población de neumocitos II maduros aproximadamente el día 19 de la gestación, si llega a dañarse por efecto de algún tóxico como lo reporta Kauffman 1980, podrían ser regenerados por los neumocitos II como un mecanismo que intenta reparar el daño.

Las modificaciones ocasionadas por el alcohol al 5% no ocurrieron en todas las células, a pesar de que estuvieron expuestas de igual forma durante toda la gestación al alcohol; observamos que se afectan más algunos neumocitos II de la

zona periférica del pulmón. La maduración del pulmón ocurre del centro hacia fuera y esto puede estar relacionado con las observaciones. Por lo que se propone que estas células presentan grados de susceptibilidad al efecto tóxico del alcohol, manifestado como diversos grados de respuesta posiblemente debido a la baja dosis de alcohol que utilizamos.

Otra explicación del daño selectivo de los neumocitos II, puede considerarse si analizamos los trabajos de Kauffman 1980, quién realizó estudios de cinética de poblaciones celulares y reporta que, un porcentaje de neumocitos II maduros permanecieron en fase  $G_0$  pudiendo reingresar al ciclo celular, dividirse y adquirir nuevas propiedades de resistencia a diversos tóxicos Mikami 1997 y Taraschi 1985.

En los cortes semifinos de los grupos control y control isocalórico se observaron escasas CCA, al parecer éstas son células que coinciden por sus características morfológicas con las células inmaduras descritas por Ten Have 1981, están mezcladas entre los neumocitos I y II maduros. La abundancia de estas células, en el grupo tratado con alcohol al 5% parece corresponder a neumocitos II en proceso de maduración terminal con la persistencia del glucógeno. Estos resultados nos permiten interpretar que el alcohol al 5% llega a retrasar la maduración terminal de las CCA hacia neumocito II maduro.

El alcohol al 5% claramente ocasionó el retraso en la utilización de los lípidos en las células intersticiales de los

tabiques alveolares, con lo que se demostró el retraso en la citodiferenciación del lipofibroblasto a fibroblasto ya que al momento del nacimiento estas células no deben encontrarse en el intersticio Torday 1995 y McGowan 1997.

Por lo que los datos morfológicos indicaron que el alcohol al 5% ocasionó en los Nil, como en las CCA, el retraso de procesos necesarios para su maduración final.

Las diferencias observadas en el análisis morfométrico en la cantidad de perfiles de neumocitos tipo II en la región central del pulmón en los grupos, no fueron estadísticamente significativas y concuerda con el comportamiento normal de esta zona cuyo desarrollo centrífugo es reportado por Burri 1992. Aunque no encontramos reportes de estudios con las condiciones que utilizamos en este trabajo, donde se realicen análisis morfométricos de ambas zonas del pulmón para poder contrastar nuestros resultados, consideramos que el aumento en los perfiles de las células con características inmaduras de acuerdo a los trabajos de Bertalanffy 1999, como son las células claras de los alvéolos e intersticiales representan una clara evidencia de inmadurez celular. Estos hallazgos encontrados solamente en el grupo tratado con alcohol al 5% sugieren el efecto tóxico del alcohol en la maduración y citodiferenciación celular.

La alteración más importante del grupo tratado con alcohol al 5% se observó en la zona periférica, donde la marcada

disminución de los neumocitos II maduros es compensada por un aumento en las células claras de los alvéolos, que posiblemente correspondan a células que van a diferenciarse a neumocitos II maduros. Los resultados morfométricos demuestran que el retardo en la maduración de los neumocitos II por efecto del alcohol al 5% es más evidente en la zona periférica del pulmón.

En el grupo tratado con alcohol al 5% se observó que en la zona periférica del pulmón existía un aumento significativo de las células intersticiales, las cuales por su morfología corresponden a lipofibroblastos. Estas células casi no deben de observarse al nacimiento en la rata a los 21 o 22 días de gestación, debido a que pierden paulatinamente los lípidos Nuñez 1995. La abundancia de los perfiles de estas células marca el retraso en la citodiferenciación ocasionada por el alcohol.

Solo el grupo tratado con alcohol al 5% presentó aumento de las estructuras tubulares revestidas de células claras de los alvéolos en la zona periférica del pulmón, que indica retraso en el proceso de alveolización y concuerda con los trabajos de Singletary 1992, quién utilizando el índice de marcaje radioactivo reportó aumento de los tubos epiteliales y retraso en la alveolización con dosis de alcohol al 3% en la glándula mamaria durante el último período de gestación.



El aumento en el número de los tubos epiteliales no llegó a ocasionar signos respiratorios, posiblemente porque los alvéolos existentes mantienen la funcionalidad del pulmón. La maduración final de estos tubos posiblemente se realice por el proceso habitual de alveolización en el período postnatal como lo explica Burri 1992.

No podemos asegurar que esta dosis de alcohol no fue suficiente para producir signos de insuficiencia respiratoria en las ratas recién nacidas como (cianosis, tiros intercostales, aleteo nasal etc.) ya que no se investigaron éstos eventos debido a que inmediatamente después de nacer se anestesiaron con éter y se sacrificaron. El monitoreo de estos datos nos podría ayudar a explicar porque a bajas dosis de alcohol, como la del 5% o menores para ocasionar SAF, no se acompañan de signos clínicos de daño respiratorio. De tal manera que si conserva una proporción de células que puedan ser resistentes a los tóxicos como lo reportó Kaufman 1980, posiblemente estas le permitan al pulmón mantener su funcionalidad.

Esta dosis de alcohol fue suficiente para ocasionar alteraciones en la maduración y en la citodiferenciación del pulmón, esta claro que existen suficientes células neumocitos II maduras en la zona central del pulmón para compensar el retardo en la maduración de algunas células de la zona periférica. Por lo que las diferencias que observamos en la morfometría, sustenta los resultados morfológicos y podemos

interpretarlos como un esfuerzo del pulmón para ser funcional al momento del nacimiento.

Si bien no realizamos ningún tipo de marcaje molecular para evidenciar la ontogenia del neumocito II, los hallazgos de las características ultraestructurales en todos los grupos, nos mostraron que los neumocitos II, presentan diferentes estadios de maduración, que en el grupo tratado con alcohol al 5% se ve particularmente retrasada.

Las diferencias morfológicas en los resultados ultraestructurales sugieren la existencia de subpoblaciones de neumocitos II, que podría apoyarse con los hallazgos de Preers 1990, quien identificó con estudios bioquímicos dos poblaciones de neumocitos tipo II fisiológicamente diferentes en pulmón de rata.

Las características ultraestructurales de los neumocitos II en proceso de maduración fue en grados variables, y son evidenciados por un citoplasma con apariencia clara, el cual indica los sitios donde se acumuló el glucógeno en las células.

La naturaleza de estas inclusiones citoplasmáticas había sido determinada previamente con la técnica histoquímica de PAS.

En el resto del citoplasma se observó el pobre desarrollo de los organelos. El aumento de las CCA con estas características

permite asegurar que el alcohol al 5% ocasiona retardo en la maduración de éstas células hacia NII.

La presencia de las abundantes CCA corresponden a células en un proceso muy temprano de maduración hacia Neumocito II

El alcohol a una dosis de 5% provocó el retardo de la utilización del glucógeno por las células CCA, y en algunos neumocitos II aunque no alteró la morfología de los organelos, sí ocasionó un pobre desarrollo de los cuerpos lamelares, el aparato de Golgi, RER y las mitocondrias; no alteró la morfología de los organelos. Estos resultados difieren a los reportados por otros autores como Sylslak 1994, quién encontró alargamiento en las mitocondrias de los miocitos cardiacos de rata adulta tratada con una dosis 5.5% de alcohol en dieta líquida. Ruela 1994, reportó aumento en el volumen del aparato de Golgi y retículo endoplásmico rugoso de las neuronas de los núcleos supraópticos utilizando una dieta líquida. La discrepancia con nuestros resultados, se puede explicar considerando que utilizamos una dieta líquida de alcohol enriquecida con proteínas, que permite observar claramente el efecto del alcohol sin la interferencia que puede ocasionar una dieta no suplementada como indica William 1989 ya que si bien los organelos fueron poco desarrollados, su morfología coincide con las características que presentan los organelos de células inmaduras, Las discrepancias podrían obedecer también, al hecho de que son tipos celulares diferentes.

El retraso en la citodiferenciación por efecto del alcohol al 5% se observó en las células intersticiales, ya que ultraestructuralmente se pueden identificar como lipofibroblastos, la naturaleza del material osmiofílico de estas células, había sido previamente demostrado con la técnica histoquímica del rojo oleoso. La presencia de estas células se puede explicar con base a los trabajos de Torday 1995, quien reporta que estos lípidos sirven de materia prima de reserva, para que por contiguidad al neumocito II, éste los capta y pueda sintetizar eficientemente el surfactante, en un fenómeno de regulación hormonal que permite la maduración pulmonar, por lo que para el día 21 o 22 días de la gestación los lipofibroblastos no deben encontrarse en el intersticio.

Es importante enfatizar que la presencia de los lipofibroblastos del tabique interalveolar evidenciados por la técnica histoquímica en el modelo de dieta líquida con alcohol al 5%, es un dato que no se ha encontrado hasta este momento en la literatura.

El evidente aumento de los tubos revestidos de epitelio en la periferia del pulmón, concuerda con los trabajos de Villaró 1989, quién reportó el aumento de los tubos epiteliales y disminución de los alvéolos mamarios en ratas intoxicadas con alcohol durante la gestación ya que a pesar de no ser el mismo tejido, puede ser comparable a nuestros resultados, si consideramos que a pesar de ser un tejido adulto, el epitelio mamario

presentó los procesos de proliferación y diferenciación que por efecto del alcohol se encontraron retardados.

Por lo tanto la dosis de alcohol al 5% es suficiente para retrasar el proceso de la alveolización en la periferia del pulmón.

## **CAPITULO CINCO**

### **CONCLUSIONES, PERSPECTIVAS Y CONTRIBUCIONES**

#### **5.1 Conclusiones**

1. El alcohol a una dosis de 5% ocasiona disminución del peso húmedo del pulmón en ratas recién nacidas que recibieron alcohol transplacentario durante toda la gestación .

2. La dieta líquida de alcohol al 5%, produce inmadurez de los neumocitos II ocasionando que permanezcan como las CCA, células con abundantes depósitos de glucógeno en el citoplasma evidenciados por la técnica PAS en los pulmones de ratas recién nacidas que recibieron alcohol transplacentario durante toda la gestación .

3. Por efecto del alcohol al 5% se produce retardo en la citodiferenciación de los lipofibroblastos a fibroblastos, demostrado por la naturaleza lipídica de los depósitos positivos

al colorante rojo oleoso y confirmado ultraestructuralmente en los pulmones de ratas recién nacidas que recibieron alcohol transplacentario durante toda la gestación .

4. El alcohol al 5% ocasiona retardo en la alveolización del pulmón caracterizado por la presencia de los tubos epiteliales en los pulmones de ratas recién nacidas que recibieron alcohol transplacentario durante toda la gestación .

## **5.2 Perspectivas**

Con la finalidad de complementar los resultados morfológicos y obtener mayor información del comportamiento celular bajo el efecto del alcohol a esta dosis se propone la realización de:

1. Valorar las características bioquímicas del surfactante en los grupos de alcohol a las dosis y bajo el esquema experimental estudiado en éste trabajo en comparación a los controles.

2. Cuantificar los componentes del surfactante en los grupos de alcohol a las dosis y bajo el esquema experimental estudiado en éste trabajo en comparación a los controles.

### 5.3 Contribuciones

1. La disminución del número de neumocitos II y la presencia de células inmaduras como las CCA fueron fuertes indicativos, suficientes para aseverar que una dieta de alcohol al 5% ocasiona retraso en el proceso de maduración del pulmón de ratas recién nacidas que recibieron alcohol transplacentario durante toda la gestación.

2. La presencia de los abundantes depósitos de lípidos en los fibroblastos evidencian el retraso en la citodiferenciación del pulmón, que se produce por efecto de la dieta de alcohol al 5% en ratas recién nacidas que recibieron alcohol transplacentario durante toda la gestación. *Esta es una aportación relevante del trabajo ya que éste dato no se ha reportado en la literatura.*

3. El aumento en el número de los tubos epiteliales evidencia la disminución de la maduración pulmonar que se produce por efecto de la dieta de alcohol al 5% en ratas recién nacidas que recibieron alcohol transplacentario durante toda la gestación.



**BIBLIOGRAFIA**

1. Greke P., Hapke U., Rumpf H. Alcohol related diseases in general hospital patients. *Alcohol & Alcoholism*, Vol. 32, No.2, pp.179-184;1997.
2. Anderasson S., Brandt L. Mortality and morbidity related to alcohol. *Alcohol & Alcoholism*, Vol. 32, No.2, pp.173-178;1997.
3. Grant B., Pickering R. DSM-III alcohol and alcoholism. *Alcohol. Health & Res. World*, Vol. 20, No.1, pp.67-72;1996.
4. Pickering R. DSM-IV alcohol and drug use disorders. *Alcohol Health & Res. World*, No.1, pp.1-172;1999.
5. Teschke R., Matsuazaki S., Ohnishi K. Metabolism of alcohol at high concentrations: role and biochemical nature of the hepatic microsomal ethanol oxidizing system. *Ann. Exp. Med. Biol.* Vol. 85, pp. 257-270;1997.
6. Wall T., Garcia-Andrade C., Thomason H., Carr L., Ehlers C. Alcohol dehydrogenase polymorphism in native americans identification of the ADH2\*3 allele. *Alcohol & Alcoholism*, Vol. 32, No.2 pp.129-132;1997.
7. Gary P., Carlson M., Olson C. Comparison of the metabolism of alcohol by rat hepatic and pulmonary alcohol dehydrogenase. *Biochem. Mol. Biol. Inter.* Vol. 37, No.1 pp.65-71;1995.
8. Zearilli D., Amet Y., Beauge F., Volant H., Floch H., Berthou F., Menez F. Cytochrome p-450 2e1 in rat liver, kidney and lung microsomes after chronic administration of ethanol either orally or by inhalation. *Alcohol & Alcoholism*. Vol. 30, No.3, pp.357-365;1995.

9. Breinsten J. The role of lung in the metabolism of ethanol. *Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol.* Vol. 38, No.1, pp.43-56;1982.
10. Manautou J.E., Carlson G.P. Ethanol-induced fatty acid ethyl ester formation in vivo and vitro in rat lung. *Toxicol.* Vol. 70, No.3, pp. 303-312;1991.
11. Carlson G., Chaney A., Feng J. Comparison of the induction of rat glutathion-s-transferase and fatty acid ethyl ester synthase activities. *Toxicol.* Vol. 96, pp.127-132;1995.
12. Warner H.R., Rosett H.L. The effects of drinking on offspring. *J. Stud. on Alcohol*, Vol. 36. No.11, pp.1395-1420;1975.
13. Clarren S.K., Ellsworth C., Alvord S., Sumi Ma., Streissguth A., Smith W.D. Malformations related to prenatal exposure to ethanol. *J. Pediatr.* Vol. 92. No.1, pp64-67;1978.
14. Kolls J., Xie J. Lei D., Greenberg S., Summer W., Nelson S.A., Anderasson S. Differential effects of in vivo ethanol on LPS-induced TNF and nitric oxide production in the lung. *Amer. J. Physi.* Vol. 268. No. 12 pp.L991-L998;1995.
15. Hyung R., Larry C., Seeling L. Preliminary study of how consumption during pregnancy affects immune components in breast milk and blood of postpartum women. *Alcohol & Alcoholism.* Vol. 32, No.5 pp.581-589;1997.
16. Gyongyi S. Alcohol's contribution to compromised immunity. *Alcohol Health & Rese. World*, Vol. 21, No.1, pp.30-41;1997.
17. Hanson J.W., Streissguth P., Smith D.W. The effect of moderate alcohol consumption during pregnancy on fetal growth and morphogenesis. *J. Pediatr.*, Vol. 92, No.3, pp.455-460;1978.

18. Hanson J.M., Jones K.L., Smith D.W. Fetal alcohol syndrome. experience with 41 patients. JAMA, Vol. 235, No.14, pp.1458-1460;1976.
19. Kaufman M.H. The teratogenic effects of alcohol following exposure during pregnancy, and its influence on chromosome constitution of the pre-ovulatory egg. Alcohol & Alcoholism, Vol. 32, No. 2 pp.113-128;1997.
20. Streissguth A.P., Landersman-Dwyer S., Martin J.C., Smith D.W. Teratogenic effects of alcohol in humans and laboratory animals. Scien. No. 209, pp.353-361;1980.
21. Miller R.R., Ugiolini A.M., Nothdorf K.J, Spidle D.L. Ethanol alters brain phospholipid levels witch correlate with altered brain morphology. Comp Biochemist Physiology & Biochem. Mol. Biol., Vol. 116, No.4, pp.407-417;1997.
22. Jones K.L. Smith D.W. Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy. Lancet, pp. 999-1001;1973.
23. Clarren S.K., Smith W.D. The fetal alcohol syndrome . N. Engl. J. Med., Vol. 298, No.19, pp. 1063-1067;1978.
24. Streissguth A.P., Aase. J.M. Clarren S., Randels S., LaDueRobin. A., Smith D.F. Fetal Alcohol Syndrome in Adolescents and Adults. JAMA, 256, pp.1961-1067;1991.
25. Streissguth A.P., Barr H.M., Kogan J. Bokstein F.L. Understanding the occurrence of secondary disabilities in clients with fetal alcohol syndrome and fetal alcohol Final Report Center for Disease Control and Prevention CDC August. 1996, Seattle University of Washington Fetal Alcohol and Drug Unit Tech. Rep., pp 96-106;1996.
26. Abel E.L. Fetal Alcohol Syndrome. Behavioral. Teratol. Physiol. Bull., Vol.87, No.1, pp. 29-50;1980.
27. Sulik K.K., Johnston M.C., Webb M.A. Fetal Alcohol Syndrome: embriogenesis in a mouse model. Scien. Vol.214, pp. 936-938;1981.

28. Burri P.H., Dbaly J., Weibel E.R. Postnatal growth of the rat lung morphology. *Anat. Rec.*, Vol. 180, pp. 711-739;1974.
29. Jeffery P. K. Morphologic features of airway surface epithelial cell and glands *Am. Rev. Respir. Dis.*, Vol. 128, pp. S14-S20;1983.
30. Amy W.M.R., Browse D., Burri P.H., Haines J., Thornback W.M. Postnatal growth of the mouse lung. *Anat. Rec.* Vol.124, pp.131-151;1977.
31. Meyeric B., Reid L. The alveolar wall. *Brit. J. Dis. Chest.*, Vol. 64, pp.121-140;1970.
32. Breezer R. Truk M. Cellular structure function and organization in the lower respiratory tract. *Environm. Health Persp.* Vol. 55, pp 3-24;1984
33. Kresch M.J., Lima D.M., Hsienwie Lu. Developmental regulation of phospholipid secretion by fetal type II pneumocytes. *Biochem. Biophys. Acta*, Vol.1299, pp.39-46;1996.
34. Slomiany A., Grabska M., Piotrowski E., Sengupta S.H., Maasanori M. Intracellular processes associated with vesicular transport from endoplasmic reticulum to Golgi and exocytosis ethanol induced changes in membrane biogenesis. *Arch. Biochem. Biophys.*, Vol. 310 No.1, pp. 247-255;1994.
35. Gomori T., Kimura A., Higashi K., Tsuchiya H., Sasa S., Kishi K. Structural Analysis of fetal rat lung development. *Acta Anat.* Vol. 141, pp. 294-301;1991.
36. Rasmussen B.B., Christensen N. Teratogenic effect of maternal alcohol consumption on mouse fetus. *Acta Phatol. Microbiol. Scand.*, Vol. 88, pp. 285-289;1980.
37. Inselman L.S., Fisher S.E., Spencer H. Effect of intrauterine ethanol exposure on fetal lung growth. *Ped. Res.*, Vol. 19, No.1, pp.12-14;1985.

38. Synder A.K., Singh S.P., Pullen G.L. Effects on maternal ethanol ingestion on the uptake of alpha-aminoisobutyric acid by fetal rat liver, lung and brain. *Biol. Neonate.*, Vol. 56, pp. 277-282;1989.
39. Zagorul'ko A.K., Brinkum A.A., Matvienko P.P., The surface activity of pulmonary surfactant in experimental acute and chronic ethanol poisoning. *Varch Delo, USSR.* Vol. 9, pp.48-49;1989.
40. Zagorul'ko A.K., Fisik E.E., Tikus E. Effect of alcohol poisoning during pregnancy on the lung surfactant system of newborn rat. *Byull. Eksperimental'. Biol. Med.* Vol. 110, No.8, pp.142-144;1990.
41. O'Gorman S., Banning J. The lung in mouse fetal alcohol syndrome. *European. Teratol. Abstracts.* Vol. 44, No.3, pp.15-16;1991.
42. Treviño M.G. Efecto de la ingesta materna de etanol sobre la celularidad de la región alveolar del pulmón de la rata recién nacida. *Tesis de Doctorado en Medicina Universidad Autónoma de Nuevo León.* Monterrey Nuevo León;1994.
43. Johnson S. Kinig R., Marmer D.J., Steele R.W. Immune deficiency in fetal alcohol syndrome. *Ped. Resh.*, Vol. 15, pp. 908-911;1981.
44. Standford J.T., Danforth J.M. Ethanol feeding inhibits proinflammatory cytokine expression from murine alveolar macrophages ex vivo. *Alcohol Clin. Exp. Resp.*, Vol. 21, No.7, pp. 1212-1217;1997.
45. Jareo P. W., Preheim L.C., Lister P. D., Gentry M.J. The effect of ethanol ingestion on killing of streptococcus pneumonia, staphylococcus epidermis by rat neutrophils. *Alcohol Alcoholism*, Vol. 30, No.3, pp. 311-318;1995.

46. Saric M., Lucic-Paraic S., Horton R.M.J. Chronic nonspecific lung disease and alcohol consumption. *Environment Research*, Vol. 14, pp. 14-21;1977.
47. Wallaert B., Aerts C., Colombel J.F., Cry V. Human alveolar macrophage antibacterial activity in the alcoholic lung. *Am Rev Respire Dis*, Vol. 144, pp. 278-283;1991.
48. Lieber C.S., DeCarli L.M., Experimental methods of ethanol administration. *Hepatology*. Vol.10, No.45, pp.501-519;1989.
49. Baker DEJ: Reproduction and breeding. In: Baker H.J, Imnsey J.R., Weisbroth S.H. *The laboratory rat*. Academic Press. New York, Vol. I, pp. 12-16;1980.
50. Baker DEJ: Embriology and Teratology In: Baker H.J, Imnsey J.R.,Weisbroth S.H. *The laboratory rat*. Academic Press, New York, Vol. II, pp. 76-89;1980.
51. Watanabe T., Endo A. Digit development and embryonic and weight in mice: analysis of sex related time difference and mating period-related interlitter variability. *Teratol*. Vol 38, pp 156-157;1988.
52. Lieber C.H.S Biochemical and molecular basis of alcohol-induced injury to liver and other tissues. *N. Engl. J. Med*. Vol.319.,No.25,pp1639-1650;1982.
53. Baker DEJ: Research Metodology In: Baker H.J, Imnsey J.R.,Weisbroth S.H. *The laboratory rat*. Academic. Press. New York vol.1, pp, 16-19;1979.
54. Eipsten C,Argilés JM. The use of thiourea in determination of tissue ethanol and acetaldehyde concentrations *IRCS Med. Sci.*, No.12, pp 625-630 ;1984.
55. Dawson-Saunders B., Trapp G. R *Bioestadística Médica Manual Moderno* 2ed. Editorial Manual Moderno Mex. D.F.;1998.

56. Bancroft J.D., and Stevens A. Theory and practice of histology techniques. Edited Churchill Livingstone Edinburgh London Melbourne and New York cap.3 pp.60-70;1982
57. Estrada E., Peralta L., Rivas P. Manual de Técnicas Histológicas A.G.T. Editor S. A. Mexico D.F. cap.4, pp.73-75;1982.
58. Bancroft J.D., and Stevens A. Theory and practice of histology techniques. Ed. Churchill Livingstone Edinburgh London Melbourne and New York cap.12 pp.217-225;1982
59. Ito & Karnovsky M. Formaldehyde-glutaraldehyde fixative containing trinitro compounds. J. Cell. Biol. Vol. 39, pp.168;1968.
60. Luft J., Improvement in epoxy resin-embedding methods. J. Biophys. Biochem. Cytol. Vol. 9, pp. 409-414;1961.
61. Trum B.F., Smuckler E.A., Benditt E.P. A method for staining epoxy sections for light microscopy. J. Ultrastruct. Res. Vol. 5, pp. 343-348;1961.
62. Venable J.H. and Coggesall R. A Simplified lead and citrate stain for use in electron microscopy. J. Cell. Biol. Vol. 25, pp. 407-408;1958.
63. Watson M.I., Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals II. Applications of solution containing lead and barium J. Biophys. Biochem. Cytol, Vol. 4, 447 pp. 720-730;1958.
64. Abel E. L., Reddy P.P. Prenatal high saturated fat diets modifies behavioral effects of prenatal alcohol exposure in rats. Alcohol Vol.14, No.1, pp.25-29;1997.
65. Endo A., Watanabe R. Interlitter variability in fetal body weight in mouse offspring from continuous, overnight and short-periods matings. Teratol. No. 37, pp.63-67;1988.

66. Weinberg J. Effect of ethanol and maternal nutritional status on fetal development .Alcoholism Clinical and Experimental Research. Vol.9, No.1, pp. 49-55;1985.
67. Allan A. M. Weeber E.J., Daniel D., Cadwell S., Cadwell K.K. Effect of prenatal of ethanol exposure on Phospholipase C- $\beta$ 1 AND phospholipase A2 in hipocampus and medial frontal cortex of adult rat offspring. Alcoholism Clinical and Experimental Research, Vol. 21, No.8, pp.1534-1541;1997.
68. William S., Bulloch B., Seelig L.L. A morphometric study of effect of ethanol consumption on lactating mammary glands of rats.Vol.13, No.2;1989.
69. Strang L.B. Growth and development of lung fetal and postnatal. Ann. Rev. Physical, Vol. 39, pp.253-256;1977.
70. Torday S.J. The sex difference in type II cell surfactant synthesis originaes in fibroblast in vitro. Experimental Lung Research.Vol.7, pp187-194;1984.
71. Inselman L.S., Mellins R.B. Growth and development of the lung. The Journal of Pediatrics, Vol. 98, No.1, pp.1-15;1981.
72. Williams J.B. Nature, origin and fates of membranous lamellae in the lung of the neonate rat. Tissue and Cell, Vol. 23, No.24, pp.481-493;1993.
73. Ian Y., Adamson R., King G.M. Sex differences morphology of epithelial mesenchymal interactions. United States–Canadian Division of the Inter. Academ. Pathol. Vol.50, No.4, pp.461-468;1984.
74. Kauffman S.L. Cell proliferation in the mammalian lung. Inter. Rev. Exper. Pathol. Vol. 22, pp.131-191;1980.
75. Mikami K., Haseba T., Ohno Y. Ethanol induce trasient arrest of cell division (G2 + M block): Dose effects of short –and longer term ethanol exposure on cell cycle and cell functions. Alcohol & Alcoholism, Vol. 32, No.2, pp.145-152;1997.



76. Taraschi, T. F., Rubin E. Biology of Disease: Effect of ethanol on the chemical and structural properties of biologic membranes. *Laboratory Investigation*, Vol.52, pp. 120-13; 1985.
77. Ten Have, Opbroek A. The development of the lung in mammals: an analysis of concepts and finding. *Am. J. Anat.* Vol.162, pp. 201-219;1981.
78. Torday J., Hua J., Slavin R. Metabolism and fate of neutral lipids of fetal lung fibroblast origin. *Biochem. Biophys. Acta*, Vol. 1254, pp.198-206;1995.
79. McGrowan S.E., Torday J.S. The pulmonary lipofibroblast (lip interstitial cell) and its contributions to alveolar development. *Annu. Rev Physiol.* Vol.59, pp.43-62;1997.
80. Burri P.H, Moschopoulos M. Structural analysis of fetal rat lung development. *Anat. Rec.* Vol. 234, PP.399-418;1992.
81. Bertalanffy F.D., Leblond C.P. The continuous renewal of the types of alveolar cells in the lung of rat. *Am. Assoc. Anatom. (Bertalanffy 50)* pp. 511-545;1999.
82. Nuñez J.S., Torday S.J. The developing rat lung fibroblast and alveolar type II cell actively recruit surfactant phospholipid substrate<sup>1,2</sup>. *Am. Ins. Nut.(supplement)* pp.1639s-p1644s;1995.
83. Singletary W.K., McNary M.Q. Effect moderate ethanol consumption on mammary gland structural development and synthesis in female rat. *Alcohol* Vol.9, pp.95-101;1992.
84. Peers C. Kemp P. J. Whole cell K<sup>+</sup> currents in type pneumocytes II freshly isolated from rat lung: pharmacological evidence for two subpopulations of cell. *Biochem. and Biophys. Acta.* No. 1052. Pp.113-118;1990.

85. Syslak P.H., Nathaniel E.J.H., Novak C. Burton L. Fetal alcohol effects on the postnatal development of rat myocardium: An ultrastructural morphometric analysis,. *Exper. Mol. Vol.60. pp. 158-172;1994*
86. Ruela C., Sousa N. Madeira M.D., Paula-Barbosa M.M. Stereological study of the ultrastructural changes induced by chronic alcohol consumption and dehydration in the supraoptic nucleus of the rat hypothalamus. *J. Neurocytol. Vol.23. pp. 410-421;1994.*
87. Villaró S., Viñas O., Remesar X. Altered Ultrastructure of lactating rat mammary epithelial cell induced by chronic ethanol ingestion. *Metabolism. Clin. Exp. Res.Vol.13, pp.128-137;1989.*

## APENDICE A

### TABLAS

#### TABLA I

Promedio de peso total de ratas recién nacidas	
Grupos	Media g $\pm$ D. S.
Control	5.5 $\pm$ 0.49
Control isocalórico	5.5 $\pm$ 0.35
Alcohol al 5%	5.3 $\pm$ 0.61

#### TABLA II

Promedio de longitud craneocaudal de ratas recién nacidas	
Grupos	Media mm $\pm$ D. S.
Control	43.7 $\pm$ 2.9
Control isocalórico	42.7 $\pm$ 1.9
Alcohol al 5%	43.0 $\pm$ 2.4

#### TABLA III

Valores promedio del número de perfiles celulares por 100 alvéolos en la zona central del pulmón de ratas recién nacidas						
	NII		CCA		CI	
	MED	$\pm$ DS	MED	$\pm$ DS	MED	$\pm$ DS
Control	450	$\pm$ 24	8	$\pm$ 2.0	178	$\pm$ 20
Control isocalórico	447	$\pm$ 30	10	$\pm$ 2.6	174	$\pm$ 21
Alcohol 5%	406	$\pm$ 45	65	$\pm$ 21	316	$\pm$ 35

**TABLA IV**

<b>Valores promedio del número de perfiles celulares por 100 alvéolos en la zona periférica del pulmón de ratas recién nacidas</b>			
	<b>NII</b>	<b>CCA</b>	<b>CI</b>
	<b>MED ± DS</b>	<b>MED ± DS</b>	<b>MED ± DS</b>
<b>Control</b>	340 ± 25	4 ± 1	279 ± 20
<b>Control Isocalórico</b>	352 ± 29	10 ± 3	315 ± 18
<b>Alcohol 5%</b>	140 ± 10	205 ± 25	508 ± 38

**TABLA V**

<b>Valores promedio del número de perfiles de tubos en 100 alvéolos del pulmón de ratas recién nacidas</b>			
	<b>CENTRAL</b>	<b>PERIFÉRICA</b>	
	<b>MED</b>	<b>MED ±</b>	<b>DS</b>
<b>Control</b>	0	8.5 ±	0.7
<b>Control Isocalórico</b>	0	10.8 ±	1.4
<b>Alcohol al 5%</b>	0	44 ±	1.4

## APENDICE B

### Preparación del material biológico y dietas.

Lista de material y reactivos.

Ratas *Sprague-Dawley* (Charles River Breeding Laboratories).

Jaulas de policarbonato con rejilla de acero inoxidable.

Dietas líquidas distribuidas por Bio-Serv:

- a) Líquida alta en proteínas para la gestación, LD'82 con alcohol al 5%.
- b) Líquida alta en proteínas para la gestación, LD'82 control isocalórico con dextrin maltosa.

Dieta con croquetas de purina Ratchow.

Tubos alimentadores graduados.

Biberones para agua.

Viruta.

Papel de estraza.

Cinta testigo.

Autoclave.

Tubos recolectores de sangre.

Jeringas.

Agujas.

Cloroformo MERCK®.

Cámaras para anestesia.

Equipo de disección.

Portaobjetos.

Cristalería para la preparación de la dieta.

## **Procedimiento para la preparación de las dietas.**

Toda la cristalería para la preparación de las dietas, así como los recipientes para la administración fueron lavados con etanol y enjuagados en tres ocasiones con agua destilada, posteriormente se esterilizaron. Se prepararon las dietas diariamente, ya que están en polvo y se procedió a reconstituirlas con agua esterilizada.

## **Administración de las dietas**

Se utilizaron tubos alimentadores graduados para la administración del alcohol en la dieta líquida. Esto permitió registrar el consumo diario de la dieta. En un reservorio diferente, se colocó agua y se registró de igual manera la ingesta. La dieta se cambió diariamente a una misma hora (8:30 am).

## **Procedimiento de toma de muestras**

Se tomaron muestras de sangre periférica, por punción de la vena dorsal de la cola, de 5 ratas gestantes del grupo con dieta líquida de alcohol al 5%. Las muestras se obtuvieron a los 7,14,21 días de la gestación siempre a las 9:00 am, éstas se colectaron en tubos especiales, se transportaron al Departamento Farmacología de la Facultad de Medicina de la UANL donde se analizaron los niveles de alcohol en sangre por cromatografía de gases.

### **Método de sacrificio.**

Posterior a la identificación de las ratas recién nacidas se les anestesió con éter etílico. Mediante una incisión toracoabdominal, se obtuvieron los bloques cardiopulmonares, se separó el corazón de los pulmones para registrar el peso húmedo del pulmón.

### **Lista de material para los estudios histoquímico, histológico morfométrico y ultraestructural**

Balanza Granataria.

Hojas de bisturi.

Crióstato.

Acido Peryódico.

Reactivo de Schiff.

Hematoxilina de Harris.

Rojo Oleoso.

Cristalería para reactivos .

Carbonato de litio.

Portaobjetos.

Cubreobjetos.

Xilol.

Entellan.

Bálsamo de Canada.

Rollos fotográficos.  
Fotomicroscopio Zeiss.  
Aceite de inmersión.  
Formaldehído.  
Acido Pícrico.  
Glutaraldehído.  
Agua ultrapura.  
Acido Cacodílico.  
Tetraóxido de osmio.  
Nitrato de uranilo.  
Alcohol metílico.  
Acetona MERCK  
Estufa desparafinizadora.  
Pipetas Pasteur.  
Microscopio Óptico Zeiss K7.  
Papel de lentes.  
Balanza analítica.  
Epón 812.  
Cápsulas de plástico.  
Medio de montaje Tissue Teck.  
Gasas.  
Ultramicrotomo V LKV.  
Knife-Maker.  
Barras de vidrio.  
Cinta metálica.  
Portaobjetos.  
Azul de toluidina.



Platina caliente.  
Diferenciador.  
Rejillas de cobre.  
Rejillas de níquel.  
Cajas de Petri.  
Papel parafilm.  
Tubos Ependoff.  
Agua Tridestilada .  
M.E.T. Zeiss E.M. # 109.  
Rollos agfa 120.  
Papel para impresiones.  
Ampliadora.  
Revelador dektol.  
Fijador.  
Dimetilformamida.  
Nitrato de Plomo.  
Acetato de Uranilo.  
Hidróxido de sodio.  
Eosina.  
Aceite de inmersión.  
Solución Alcohol Acetona.

## APENDICE C

### Técnica de Hematoxilina y Eosina para cortes de congelación

#### SOLUCIONES

##### 1. Hematoxilina de Harris

Hematoxilina	1.0 g
Oxido rojo de mercurio	0.5 g
Sulfato de aluminio	20.0 g
Amonio o potasio	10.0 ml
Alcohol absoluto	10.0 ml
Agua destilada	200.0 ml

##### 2. Eosina alcohólica

Eosina amarillenta	3.0 g
Alcohol absoluto	100.0 ml

#### PROCEDIMIENTO

##### 1. Hidratar

2. Hematoxilina de Harris	1 min
3. Enjuagar	
4. Eosina Alcohólica 3%	2 min
5. Deshidratar	3 min
6. Acetona	5 min
7. Xilol	5 min

## **Técnica del Acido Peryódico de Schiff**

### **SOLUCIONES**

#### **1. Solución A: Ácido Peryódico**

Ácido peryódico	1 g
Agua destilada	200 ml

#### **2. Solución B: Reactivo de Schiff**

Fucshina básica	1 g
Agua destilada caliente	200 ml
Metabisulfito de potasio	2 g
Ac. clorhídrico concentrado	1 ml
Carbón activado	2 ml

**NOTA.-**Se filtró antes de usarse y almacenó a 4°C

### **PROCEDIMIENTO**

**Cortes por congelación:**

1. Hidratar
2. Solución A 5 min
3. Reactivo de Schiff 15 min
4. Enjuagar 15 min
5. Hematoxilina de Harri's 5 min
6. Enjuagar
7. Alcohol 5 min
8. Xilol 5 min
9. Montar con bálsamo de Canadá

## **Técnica del rojo Oleoso.**

### **SOLUCIONES**

#### **1. Solución A: Rojo Oleoso**

<b>Rojo Oleoso</b>	<b>2 g</b>
<b>Alcohol isopropílico</b>	<b>50 ml</b>
<b>Acetona</b>	<b>50 ml</b>

#### **2. Solución B Alcohol Isopropílico**

<b>Alcohol Isopropílico</b>	<b>70 ml</b>
<b>Agua destilada</b>	<b>30 ml</b>

#### **3. Solución C: Carbonato de Litio al 0.05%**

<b>Carbonato de Litio</b>	<b>0.05 g</b>
<b>Agua destilada</b>	<b>100.00 ml</b>

### **PROCEDIMIENTO**

- 1. Solución B** 1 min
- 2. Solución A** 5 min
- 3. Solución B hasta que suelte el color rojo**
- 4. Lavar**
- 5. Hematoxilina de Harris** 4 min
- 6. Lavar**
- 7. Virar en la solución C** 2 h
- 8. Lavar**
- 9. Montar en glicerol-gelatina.**

## Técnica de inclusión en resinas epóxicas

### SOLUCIONES

#### 1. Fijador de Karnovsky-Ito

Paraformaldehído	4.0 g
Acido picrico	0.04 mg
Glutaraldehido al 25%	8.00 ml

que sé aforó a 100 ml con agua ultrapura

#### 2. Tetraóxido de Osmio 2%

Tetraóxido de osmio	2.00 g
Agua destilada	100.00 ml

#### 3. Buffer de cacodilatos al 0.1M ph 7.5

Acido cacodílico	0.1 g
Agua destilada	100.0 ml.

#### 4. Nitrato de uranilo alcohólico al 1%

Nitrato de uranilo	1.00 g
Alcohol absoluto	100.00 ml

### PROCEDIMIENTO

1. Solución de Karnovsky-Ito	1.00 h
2. Buffer de cacodilatos	5 min (3 veces )
3. Tetraóxido de osmio acuoso al 2%	30 min
4. Lavar con buffer de cacodilatos	5 min (3 veces)
5. Nitrato de uranilo alcohólico al 1%	30 min

6. Lavar con buffer de cacodilatos	5 min (3 veces)
7. Acetona 30%, 50%, 70% y 90%	5 min
8. Se aclararon con acetona al 100%	5 min (3cambios)
9. Acetona-resinas epóxicas 1:1 (v/v)	1.00 h
10. Polimeriza a 60°C	12.00- 36.00 h

### **Ultramicrotomía de cortes semifinos**

Una vez que se alcanzó la dureza ideal de la resina en el proceso de polimerización, los bloques de las piezas se rebajaron con una navaja, utilizando un microscopio estereoscópico hasta que se formó una pirámide en el extremo superior del bloque, se utilizaron cuchillas de vidrio preparadas en el aparato cortador de cuchillas LKB; para la microtomía se utilizó un ultramicrotomo Ultratome V LKB, y se obtuvieron cortes semifinos (0.5-1 $\mu$  de grosor). Los cortes se montaron por calor en portaobjetos y se tiñeron con azul de toluidina.

### **Técnica de azul de toluidina**

#### **SOLUCIONES**

Azul de toluidina	1 g
Alcohol 96°	200 ml
Agua destilada	80 ml
Ac.acético	1 ml

## PROCEDIMIENTO

1. Se adhieren al portaobjetos por calor
2. Sobre la platina caliente se tiñen con azul de toluidina 1 min
3. Se seca por calor la gota de colorante
4. Se enjuaga

## APENDICE D

### APENDICE ESTADISTICO

#### Análisis del peso total, longitud craneocaudal y peso húmedo del pulmón.

PESO TOTAL  
PRUEBA DE T  
AD/DM 0.6599  
NO HAY DIFERENCIAS

LONGITUD  
CRANEOCAUDAL  
PRUEBA DE T  
AD/DM 0.479  
NO HAY DIFERENCIAS

PESO HUMEDO  
DEL PULMON  
PRUEBA DE T  
AD/DM 0.236  
NO HAY DIFERENCIAS

PESO TOTAL  
ADLIBITUM/OH  
PRUEBA DE T  
AD/OH 0.0659  
NO HAY DIFERENCIAS

PRUEBA DE T  
AD/OH 0.113  
NO HAY DIFERENCIAS

PRUEBA DE T  
AD/OH 0.0369  
SI HAY DIFERENCIA

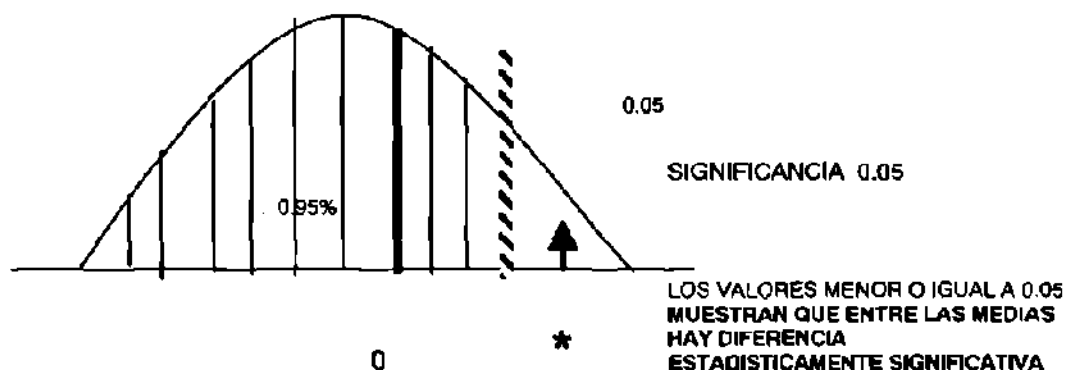
PRUEBA DE T  
DM/OH 0.1019  
NO DIFERENCIAS

PRUEBA DE T  
DM/OH 0.4789  
NO HAY DIFERENCIAS

PRUEBA DE T  
DM/OH 2E-09= .000000002  
SI HAY DIFERENCIA

VALORES DE P =0.05

	AD/DM	AD/OH	DM/OH
PESO TOTAL	0.6599	0.0658	0.1019
LONGITUD CRANEOCAUDAL	0.4789	0.113	0.4789
PESO HUMEDO DEL PULMON	0.2364	<u>0.0369</u>	<u>2E-09</u>



VALORES MAYORES 0.05 MUESTRAN QUE ENTRE LAS MEDIAS **NO HAY DIFERENCIA** ESTADISTICAMENTE SIGNIFICATIVA

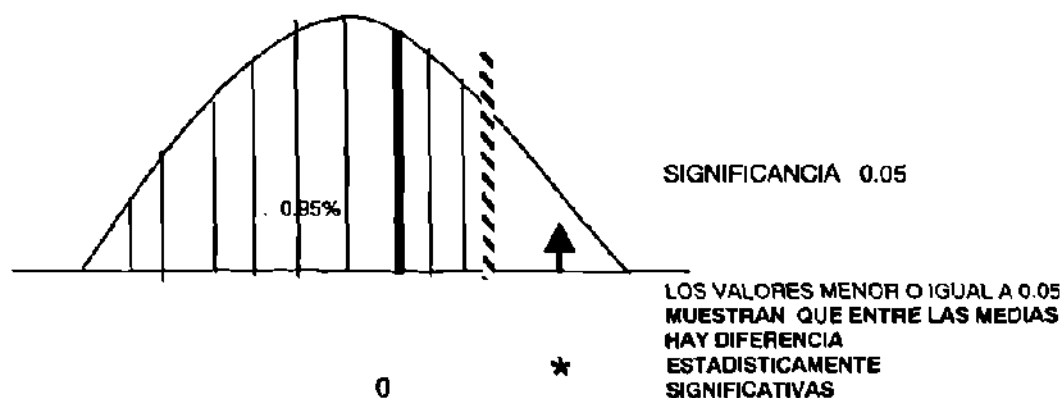


## Análisis morfométrico de los perfiles de las células contenidas en 100 alvéolos en la zona central del pulmón

NEUMOCITO II	CELULA CLARA DE LOS ALVEOLOS	CELULA INTERSTICIAL
PRUEBA DE T AD/DM 0.8314	PRUEBA DE T AD/DM 0.133	PRUEBA DE T AD/DM 0.063
NO HAY DIFERENCIAS	NO HAY DIFERENCIAS	NO HAY DIFERENCIAS
NEUMOCITO II ADLBITUM/OH	CELULA CLARA DE LOS ALVEOLOS	CELULA INTERSTICIAL
PRUEBA DE T AD/OH 0.0659	PRUEBA DE T AD/OH .0048	PRUEBA DE T AD/OH 5.3692E-05
NO HAY DIFERENCIAS	<u>SI HAY DIFERENCIAS</u>	<u>SI HAY DIFERENCIA</u>
NEUMOCITO II	CELULA CLARA DE LOS ALVEOLOS	CELULA INTERSTICIAL
PRUEBA DE T DM/OH 0.06	PRUEBA DE T	PRUEBA DE T
NO DIFERENCIAS	DM/OH 0.00473	DM/OH 4.628E-05
	<u>SI HAY DIFERENCIAS</u>	<u>SI HAY DIFERENCIA</u>

VALORES DE P =0.05

	AD/DM	AD/OH	DM/OH
NEUMOCITO II	0.8314	0.0659	0.06
C. CLARA DE LOS ALVEOLOS	0.1335	0.0048	0.4736
CELULA INTERSTICIAL	0.06	5.36E-05	4.62E-05



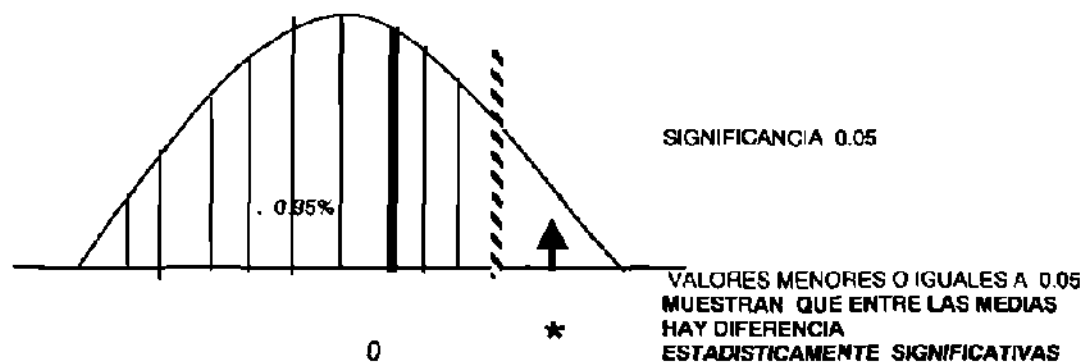
VALORES MAYORES A 0.05 MUESTRAN QUE ENTRE LAS MEDIAS NO HAY DIFERENCIA ESTADISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS

## Análisis morfométrico de los perfiles de células contenidas en 100 alvéolos en la zona periférica del pulmón.

NEUMOCITO II	CELULA CLARA DE LOS ALVEOLOS	CELULA INTERSTICIAL
PRUEBA DE T AD/DM 0.0642	PRUEBA DE T AD/DM 0.3213	PRUEBA DE T AD/DM 0.07319
NO HAY DIFERENCIAS	NO HAY DIFERENCIAS	NO HAY DIFERENCIAS
NEUMOCITO II ADLBITUM/OH	CELULA CLARA DE LOS ALVEOLOS	CELULA INTERSTICIAL
PRUEBA DE T AD/OH 3.7727-E.7	PRUEBA DE T AD/OH 0.00014	PRUEBA DE T AD/OH 8.3189E-05
SI HAY DIFERENCIAS	<u>SI HAY DIFERENCIAS</u>	<u>SI HAY DIFERENCIA</u>
NEUMOCITO II PRUEBA DE T	CELULA CLARA DE LOS ALVEOLOS	CELULA INTERSTICIAL
DM/OH 6.1099E-07	PRUEBA DE T	PRUEBA DE T
<u>SI HAY DIFERENCIA</u>	DM/OH 0.000446	DM/OH 8.7277E-06
	<u>SI HAY DIFERENCIAS</u>	<u>SI HAY DIFERENCIA</u>

VALORES DE P =0.05

	AD/DM	AD/OH	DM/OH
NEUMOCITO II	0.65424	3.77E-07	6.109E-07
C. CLARA DE LOS ALVEOLOS	0.32134	0.00014	0.0004461
CELULA INTERSTICIAL	0.073194	8.31E-05	8.727E-06



VALORES MAYORES A 0.05 MUESTRAN QUE ENTRE LAS MEDIAS NO HAY DIFERENCIAS ESTADISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS

## APENDICE E

Los resultados obtenidos en las diferentes técnicas utilizadas en este trabajo de tesis doctoral se presentaron en cinco congresos cuatro y uno Internacional.

1. **IXX Congreso Nacional de Histología "EFECTO TRANSPACENTARIO DEL ETANOL ESTUDIO HISTOQUIMICO"**  
México D.F. Octubre de 1994.

2. **XX Congreso Nacional de Histología y la Universidad de Chapingo "ESTUDIO HISTOQUÍMICO DE PULMON DE RATA RECIEN NACIDAS EXPUESTAS A ETANOL TRANSPACENTARIO "**  
Montecillo Edo de México 26 Septiembre de 1996.

3. **XVII Congreso Nacionl de Investigación Biomédica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León "EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN TRANSPACENTARIAS DEL ETANOL EN EL DESARROLLO DEL PULMÓN "** en Monterrey Nuevo León 18 Octubre de 1999.

4. **XXIII Congreso Nacional de Histología "EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN TRANSPACENTARIAS DEL ETANOL EN LA MORFOGENESIS DEL PULMÓN"** Organizado en la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Nuevo León 6 Octubre de 1998.

5. **Memorias International Symposium of Morfogenetic and Genetic Analysis of Vertebrate Development "EFFEC OF TRANSPACENTRAL ADMINISTRATION OF ETHANOL ON LUNG "** Organizado por la Universidad Complutense en Madrid /España 27 de Noviembre 1998 **Publicado en *European Journal of Anatomy* Vol.2 No.3 pp188, Diciembre 1998.**

## **RESUMEN AUTOBIOGRAFICO**

**María Guadalupe Moreno Treviño**

**Candidato para el Grado de**

**Doctor en Ciencias con Especialidad en Morfología**

**Título de la Tesis: EFECTO DE LA ADMINISTRACION TRANSPLACENTARIA DE ALCOHOL EN EL DESARROLLO DEL PULMON DE RATA**

**Campo de Estudio: Morfología**

### **Biografía:**

**Datos Personales:** Nacida en Monterrey Nuevo León, el 19 de Mayo de 1963, hijo del Dr. Gerardo Moreno Torres y Sra. María Guadalupe Treviño Tamez.

**Educación:** Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Grado Obtenido: Médico Cirujano y Partero en 1986.

Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Grado Obtenido: Maestría en Ciencias con especialidad en Morfología 1994.

**Experiencia Profesional:** Becario de pregrado del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León desde 1983-1988.

Personal Profesional no docente de tiempo completo adscrito al Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León participando como maestro de Histología teoría y laboratorio 1990-2000.

Maestro participante en el curso de Histología de postgrado de la Facultad de Medicina de la de la Universidad Autónoma de Nuevo León 1994-2000. Estudiante distinguido de la maestría en Ciencias con especialidad en Morfología en 1994.

Un artículo publicado en revista con arbitraje Internacional. Miembro de la Sociedad Mexicana de Histología, Miembro de la Sociedad Anatómica Española.

Maestro por horas de la materia de Histología de teoría y laboratorio de la carrera de Médico Cirujano Partero de la División de Estudios Generales de la Universidad de Monterrey UDEM de 1996-2002.

Participación y asistencia a 30 congresos.



Small white rectangular label or piece of paper in the bottom right corner, containing illegible text.