

QUINTO CICLO  
**DIVULGACIÓN  
ACADÉMICA**



**UDEM**



**EFFECTO DE LA DIABETES  
EXPERIMENTAL EN EL  
DESARROLLO DEL PULMÓN**

**Dra. Ma. Guadalupe Treviño Alanís**

2009

---

---

---

---

---


---

---


---

**DIVULGACIÓN  
ACADÉMICA**

**EFFECTO DE LA DIABETES EXPERIMENTAL EN EL  
DESARROLLO DEL PULMÓN**




Facultad de Biología  
y Fac. Medicina Veterinaria



**40**  
**UDEM**  
40 años

Depto. de Ciencias Básicas  
División de C. de la Salud



Centro de Ciencias Básicas  
Departamento de Morfología

2

---

---

---

---

---

---

---

---

**INTRODUCCIÓN: Antecedentes**

**DIVULGACIÓN  
ACADÉMICA**

- La Diabetes mellitus es una enfermedad crónico degenerativa que incluye múltiples desórdenes y aún con atención médica desarrolla complicaciones devastadoras.
- Se caracteriza por trastornos en el metabolismo de carbohidratos, proteínas y grasas.
- Es causada por la insuficiencia completa o relativa de la secreción y/o el efecto de la insulina en las células del individuo.

*Islas-Adrade, et al . (2000)*

3

---

---

---

---

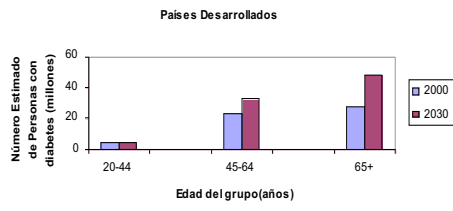
---

---

---

---

### Número Estimado de Personas con Diabetes en Países Desarrollados



Wild, et al. (2004).

4

---

---

---

---

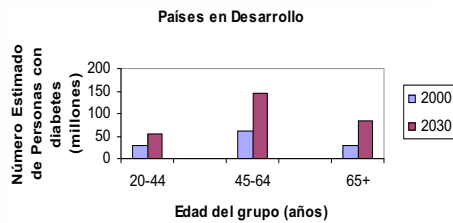
---

---

---

---

### Número Estimado de Personas con Diabetes en Países en Desarrollo



Wild, et al. (2004).

5

---

---

---

---

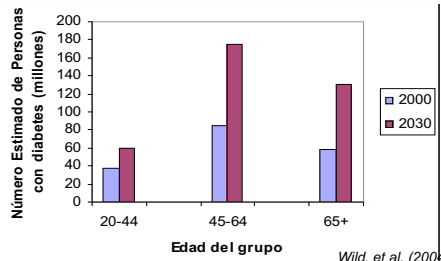
---

---

---

---

### Número Estimado de Personas con Diabetes en el Mundo



Wild, et al. (2004).

6

---

---

---

---

---

---

---

---

DIVULGACIÓN  
ACADÉMICA

**Principales causas de mortalidad en hombres.  
México, 2001.**

1	Enfermedades isquémicas del corazón
2	Diabetes mellitus
3	Cirrosis y otras enfermedades crónicas del hígado

**Principales causas de mortalidad en mujeres.  
México, 2001.**

1	Diabetes mellitus
2	Enfermedades isquémicas del corazón
3	Enfermedad cerebrovascular

Fuente: Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática/Dirección General De Información y Evaluación del Desempeño, Secretaría de Salud, México.

Salud Pública de México (2002) 44:6:565-581.

7

---

---

---

---

---

---

---

---

---

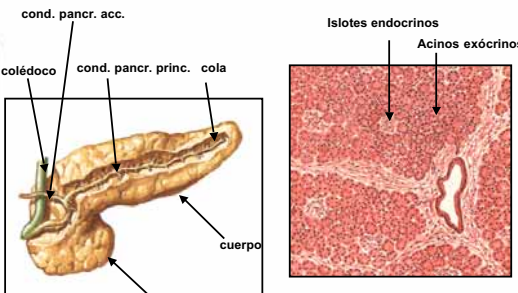
---

---

---

DIVULGACIÓN  
ACADÉMICA

**Páncreas**



Atlas: Netter, 2003

8

---

---

---

---

---

---

---

---

---

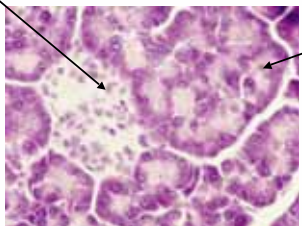
---

---

---

DIVULGACIÓN  
ACADÉMICA

**Páncreas**



Geneser, 2002

9

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

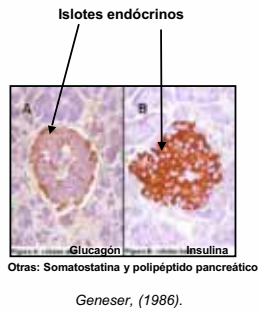
---

---

## PÁNCREAS ENDÓCRINO

UNIVERSIDAD  
DIVULGACIÓN  
ACADÉMICA

- Formado por los islotes pancreáticos (*Langerhans*).
- Son conjuntos de células entremezclados con red capilar.
- Células:
  - Alfa: glucagón.
  - Beta: Insulina.
  - Delta: somatostatina.
  - Gamma: polipéptido pancreático.



García-Porrero & Hurlé, (2005).

10

---

---

---

---

---

---

---

---

## Factores de riesgo perinatal que afectan el desarrollo del pulmón

UNIVERSIDAD  
DIVULGACIÓN  
ACADÉMICA

- Prematurez
- **Diabetes materna**
- Factores genéticos

11

---

---

---

---

---

---

---

---

## El hijo de madre diabética

UNIVERSIDAD  
DIVULGACIÓN  
ACADÉMICA

- Tiene un incremento en el riesgo de morbi-mortalidad debido a:
  - Macrosomía.
  - Dificultad respiratoria.
  - Hipoglicemia.
  - Defectos congénitos.

(Kicklinghter, 2001 y Setji, 2005)

12

---

---

---

---

---

---

---

---

Asociación  
**DIVULGACIÓN**  
ACADEMICA

**Complicaciones del prematuro que están relacionadas con la inmadurez orgánica**

- Respiratorias.
- Gastrointestinal.
- Sistema Nervioso Central.
- Renal.

*Oliveros, et al. (1986).*

13

---

---

---

---

---

---

---

---

Asociación  
**DIVULGACIÓN**  
ACADEMICA

**Introducción:  
Antecedentes con respecto al pulmón**

- La Diabetes mellitus está asociada con:
  - Retraso en la diferenciación del neumocito tipo II

*Bourbon, J. (1985).*

14

---

---

---

---

---

---

---

---

Asociación  
**DIVULGACIÓN**  
ACADEMICA

- **Alteraciones en la maduración, como disminución del espacio aéreo, incremento en el número de alvéolos, retardo en la maduración y disminución del surfactante pulmonar**  
*Oliveros, et al. (1999).*
- **Incremento en la permeabilidad de la microvasculatura**  
*Wright, et al. (1999).*

15

---

---

---

---

---

---

---

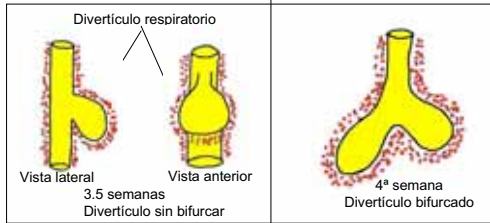
---

## Desarrollo del pulmón:

INSTITUTO  
DIVULGACIÓN  
ACADÉMICA

Inicia a nivel de la 4ª bolsa faríngea.  
En el piso del intestino faríngeo.

### MORFOGÉNESIS



Treviño, et al. (1986). Sin publicar

16

---

---

---

---

---

---

---

---

---

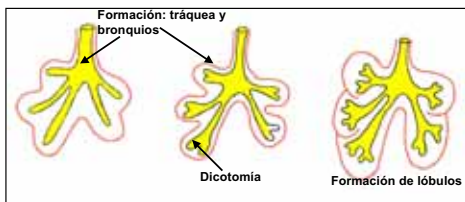
---

## Desarrollo del pulmón:

INSTITUTO  
DIVULGACIÓN  
ACADÉMICA

5ª semana, bronquios divididos en 3 derechos y 2 izq.  
Patrón lobular definitivo.  
Para el 6º mes 17 divisiones dicotómicas.

### MORFOGÉNESIS



Treviño, et al. (1986). Sin publicar

17

---

---

---

---

---

---

---

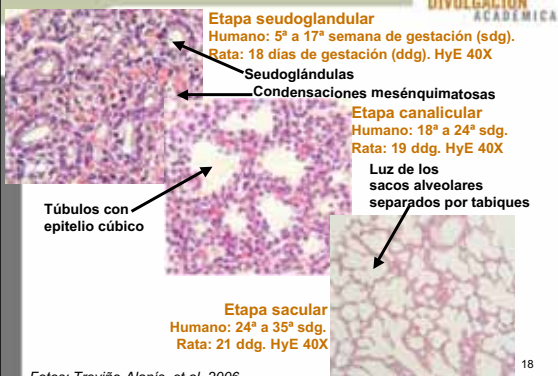
---

---

---

## HISTOGÉNESIS

INSTITUTO  
DIVULGACIÓN  
ACADÉMICA



Fotos: Treviño-Alanis, et al. 2006.

18

---

---

---

---

---

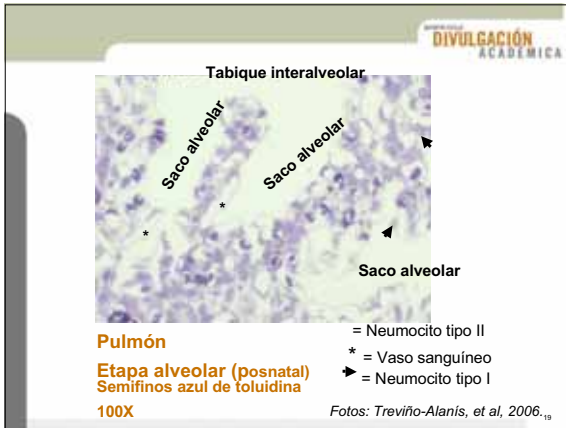
---

---

---

---

---




---

---

---

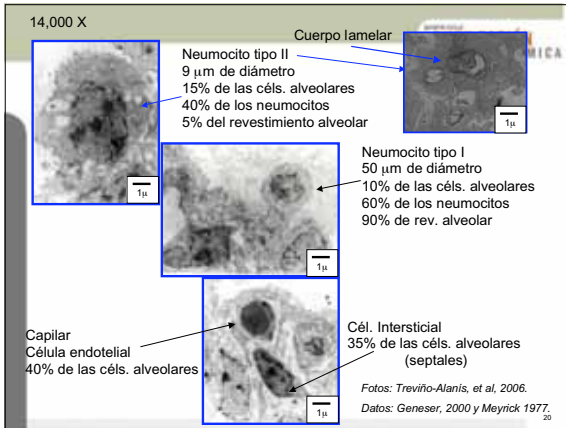
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---

**Desarrollo normal del pulmón, inicia a la 4a semana.**

Etapas	Semanas en humano	Días en la rata
Seudoglandular	5-17	18
Canalicular	18-24	19-20
Sacular	24-35	21
Alveolar	36 semana en adelante	posnatal

---

---

---

---

---

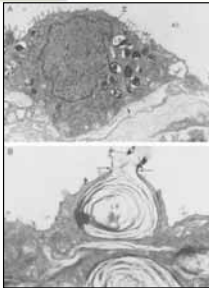
---

---

---

## Pulmón humano, MET

UNIVERSIDAD  
DIVULGACIÓN  
ACADÉMICA



A. Neumocito tipo II.  
Cuerpos lamelares (LB).  
Microvellosidades (Mv) en la superficie apical.  
Núcleo (Nu).  
Espacio aéreo (AS).  
Mitocondrias (Mi).  
Aparato de Golgi (G).

B. Región apical del Neumocito tipo II.  
Cuerpos lamelares (LB).  
250-2000 nm diámetro en pilas de 3-3.5 nm de grosor.

### DESCRIPCION DEL NEUMOCITO TIPO II (MET 10000x)

Jobe AH. Fetal lung development, tests for maturation, induction of maturation, and treatment. In Creasy RK, Resnik R (editors): Maternal-Fetal Medicine: Principles and Practice, 3rd ed. Philadelphia, WB Saunders, 1994. (Recuperado de Internet).

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## COMPOSICIÓN DEL SURFACTANTE PULMONAR

UNIVERSIDAD  
DIVULGACIÓN  
ACADÉMICA

Fosfolípidos	80-90%	Fosfatidilcolina 50-60% Fosfatidilglicerol Esfingomielina
Proteínas	10%	A: Codificada por gen del Cr # 10 Organiza la mielina tubular Regula el metabolismo del surfactante Función inmune: regula MAC alveolar y opsonización
		B: Codificada por gen del Cr # 2 Estabiliza la monocapa lipídica Componente esencial del surfactante
		C: Codificada por gen del Cr. # 8 Su función está relacionada con la proteína B
		D: Regula el metabolismo del surfactante
Lípidos neutros	escasos	Función inmune pulmonar

*(Torres, J. 2001; Flores, G. 2002)*

23

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Proteína D

UNIVERSIDAD  
DIVULGACIÓN  
ACADÉMICA

- **No contribuye en las propiedades tensoactivas del surfactante pulmonar.**
- **Actúa en defensa del organismo como opsononina, facilitando la fagocitosis por los macrófagos alveolares.**
- **Causa aglutinación de microorganismos patógenos.**
- **Es la primera línea de defensa contra una amplia variedad de patógenos potenciales.**

24

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Introducción: Antecedentes directos

- Los animales son de valiosa ayuda para realizar modelos de diabetes experimental,
- con objeto de estudiar cómo ésta patología afecta los diferentes órganos y sistemas tanto en su desarrollo como en la madurez.
- Con los modelos experimentales es posible establecer diversas líneas de investigación, por ejemplo morfológica, bioquímica, hormonal y otras.

25

---

---

---

---

---

---

---

---

## Introducción: Antecedentes directos

- Los modelos para inducir diabetes utilizan diferentes especímenes como rata, ratón, conejo.
- Este trabajo se realizó en la rata Sprague-Dawley.
- De los tóxicos para el páncreas los más usados son Aloxano y Estreptozotocina, este último fue utilizado para éste proyecto.

*Islas-Adrade, et al. (2000).*

26

---

---

---

---

---

---

---

---

## Estreptozotocina (EZT)

- Antibiótico natural de amplio espectro, producido por *Streptomyces achromogenes*.
- Potente agente antibacterial y antitumoral, clínicamente utilizado para el tratamiento de pacientes con metástasis de células  $\beta$  de los islotes del páncreas y tumores malignos carcinoides.

First listed in the Second Annual Report on Carcinogens, recuperado diciembre de 2004 de <http://ehp.niehs.nih.gov/roc/tenth/profiles/s163stre.pdf>

27

27

---

---

---

---

---

---

---

---

**SEDA**  
**DIVULGACIÓN**  
**ACADÉMICA**

- **Por su alta afinidad por las células  $\beta$  de los islotes pancreáticos se ha utilizado como inductor de diabetes mellitus.**  
*Garibay, et al. (1998) & Islas-Adrade, et al. (2000).*
- **En la solución acuosa (amortiguadora) el equilibrio de esta mezcla se alcanza a temperatura ambiente y en la oscuridad, a las 2 horas de preparada la solución, sin presentar variaciones posteriores.**  
*Garibay, et al. (1998).*

28

---

---

---

---

---

---

---

---

**Cómo actúa la EZT**

**SEDA**  
**DIVULGACIÓN**  
**ACADÉMICA**

- **Tasaku (1991) citado por Palomino, (1998) demostraron que genera peróxido de hidrógeno, fragmentando el ácido desoxirribonucleico, destruyendo las células  $\beta$  de los islotes pancreáticos, con lo que produce Diabetes mellitus.**

29

---

---

---

---

---

---

---

---

**SEDA**  
**DIVULGACIÓN**  
**ACADÉMICA**

- **Por lo tanto causa lesión celular inducida por radicales libres, teniendo estos 3 reacciones relevantes para la lesión celular:**
- **Peroxidación de los lípidos de membranas.**
- **Modificación oxidativa de las proteínas.**
- **Lesiones en el ácido desoxirribonucleico.**

*Cotran, et al. (2000).*

30

---

---

---


---

---

---

---

---



- La dosis recomendada para inducir la diabetes con EZT es variable, tiene un rango de 25 a 50 mg/kg de peso corporal en dosis única.
- En este trabajo se usó 50 mg/kg de peso corporal en dosis única.

*Amri, et al. (1985) & López-Soldado, et al. (2003).*

31

---

---

---


---

---

---

---

---



- La vía de administración puede ser intravenosa o intraperitoneal, siendo la segunda la mas usada en modelos experimentales (*Islas, et al. 2000*), y utilizada en este trabajo.
- Se administró el día 5º de la gestación (*Amri, et al. 2001 y López-Soldado, et al. 2003*).
- Diluida en 1 ml de una solución amortiguada de citratos 0.4 M a pH de 4.5 (*Amri, et al. 2001*).

32

---

---

---

---

---

---

---

---

**Justificación**

El presente trabajo contribuye con información sobre el desarrollo del pulmón y la inmadurez del órgano en el recién nacido, ocasionada por la Diabetes *mellitus* incontrolada durante la gestación.

Aporta datos que serán de gran utilidad en el área de la biomedicina (pacientes, profesionales en las ciencias de la salud así como instituciones de la salud).

33

---

---

---

---

---

---

---

---

## Planteamiento del problema:

UNIVERSIDAD  
DIVULGACIÓN  
ACADÉMICA

### La Diabetes mellitus como causa de alteración en el desarrollo del pulmón

En México es 1ª causa de muerte en mujeres (INEGI) y en la embarazada causa problemas respiratorios en el recién nacido (30% asfixia perinatal y 20% síndrome de dificultad respiratoria), y son tratados con ventilación o surfactante, "desconociendo" que el pulmón no ha terminado su desarrollo.

Por lo anterior es importante revisar la ultraestructura del neumocito II, ya que las complicaciones pueden tener secuelas graves.

García & Rosadas, (2001); Danglot-Banck, & Gómez-Gómez, (2004); Cordero, et al. (1998); García, et al. (2001) & INEGI, (2002).

34

---

---

---

---

---

---

---

---

## Preguntas de investigación

UNIVERSIDAD  
DIVULGACIÓN  
ACADÉMICA

¿Qué cambios en el peso corporal, la longitud cráneo-caudal y el peso del pulmón presentan las crías de 21 días de gestación...?

¿Qué alteraciones en la histogénesis pulmonar presentan las crías de 18, 19 y 21 días de gestación...?

35

---

---

---

---

---

---

---

---

¿Existen cambios en la cantidad de la proteína D asociada al factor surfactante pulmonar en crías de 21 días de gestación...?

Existen cambios en la ultraestructura de los neumocitos tipo II de los pulmones de crías de 21 días de gestación ... ?

...de madres diabetizadas con EZT en relación con las crías de madres control y citrato.

36

---

---

---

---

---

---

---

---

## Hipótesis

Ha: "Las crías de ratas a las que se les indujo Diabetes *mellitus* experimental con EZT presentan diferencias en el peso corporal, longitud cráneo-caudal, peso del pulmón, en la histogénesis del pulmón, así como en la distribución de la proteína D asociada al factor surfactante pulmonar y la ultraestructura del neumocito tipo II con respecto a las crías de ratas sanas".

37

---

---

---

---

---

---

---

---

## Objetivos

### Objetivo general

Analizar la histogénesis del pulmón y la ultraestructura del neumocito tipo II en las crías de ratas a las que se les indujo Diabetes *mellitus* experimental con EZT, control y citrato.

38

---

---

---

---

---

---

---

---

## Variables

### Variable dependiente:

Histogénesis del pulmón (18, 19 y 21 dg).  
Ultraestructura del neumocito tipo II de crías de 21 dg.

### Variable independiente:

Inducción de Diabetes *mellitus* experimental.

39

39

---

---

---

---

---

---

---

---

## Materiales y métodos

- El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Ética de la UDEM y de la UAA.
- Es un trabajo experimental, transversal y de causa efecto.
- Con  $P \leq 0.05$  como nivel de significancia estadística aceptable, y recurriendo a las tablas para obtener el tamaño de la muestra considerando la proporción mayor = 1.00 y la menor = 0.50 se cruzan los datos y el resultado es 10.

Méndez, I. (1990)

40

---

---

---

---

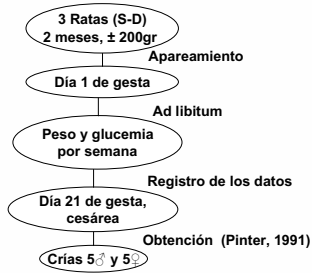
---

---

---

---

## Grupo control



3/23/09

Pinter, E. Y col. (1991) Effects of Maternal Diabetes on Fetal Rat Lung Ion Transport. *J. Clin Invest*, 87, 821,830.

41

---

---

---

---

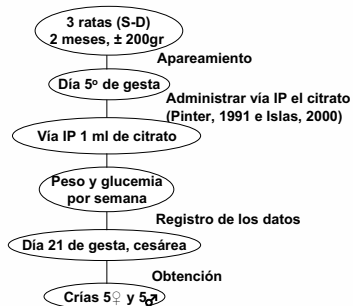
---

---

---

---

## Grupo testigo



3/23/09

42

---

---

---

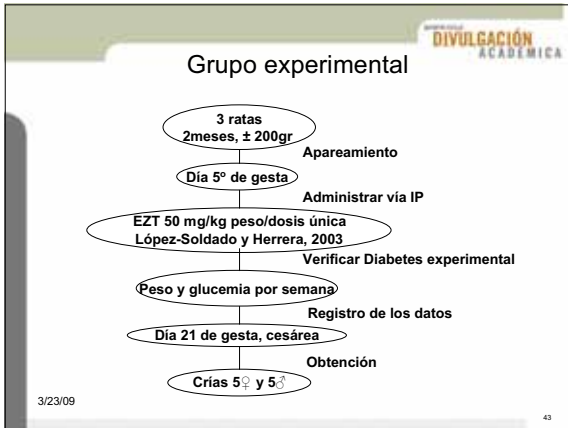
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---

DIVULGACIÓN ACADÉMICA

### Materiales y métodos, continuación

- ML**
- 10 muestra biológica de pulmón (MBP) 18, 19 y 21 dg
- Se realizaron 20 cortes
- Se seleccionaron 3 cortes: el primero, intermedio y último
- Se analizaron 5 campos a 40X

- MET**
- 10 MBP de 21 dg
- Se realizaron 20-30 cortes
- Selección 10 neumocitos tipo II
- 14000 X

- MET e ICQ**
- 10 MBP de 21 dg
- Se realizaron 20-30 cortes y se procesaron con Ac
- Selección de 6 neumocitos tipo II, 14000 X
- Se cuantificó las marcas de oro en todo el campo fotografiado (intracelular y extracelular) con el sistema procesador de imágenes Image Pro Plus .

44

---

---

---

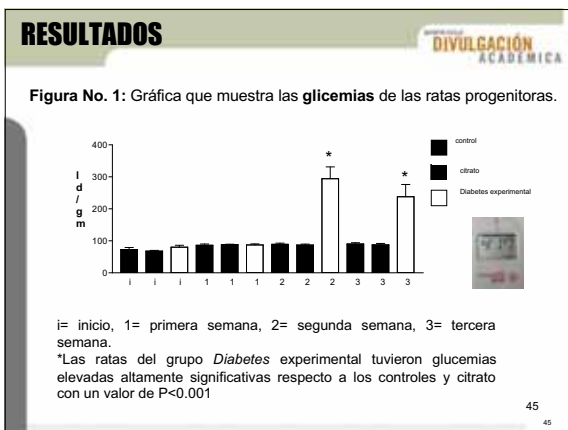
---

---

---

---

---




---

---

---

---

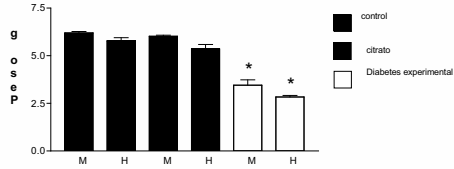
---

---

---

---

**Figura No. 2:** Gráfica que muestra los pesos corporales de las crías.



M= macho, H= hembra.  
\*Al comparar por grupo hay disminución altamente significativa en el peso de machos y hembras del grupo Diabetes experimental con un valor de  $P < 0.001$

46

---

---

---

---

---

---

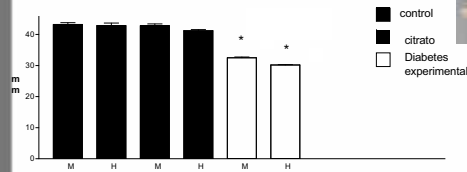
---

---

---

---

**Figura No. 3:** Gráfica que muestra la longitud cráneo-caudal de las crías.



M= macho, H= hembra  
\*Al comparar la longitud cráneo-caudal por grupo hay disminución altamente significativa en el grupo Diabetes experimental con valor de  $P < 0.001$

47

---

---

---

---

---

---

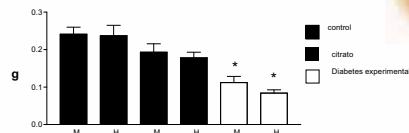
---

---

---

---

**Figura No. 4:** Gráfica que muestra el peso del pulmón de las crías.



M= macho, H= hembra  
\*Al comparar por grupo hay disminución altamente significativa en el grupo Diabetes experimental con valor de  $P < 0.001$

48

---

---

---

---

---

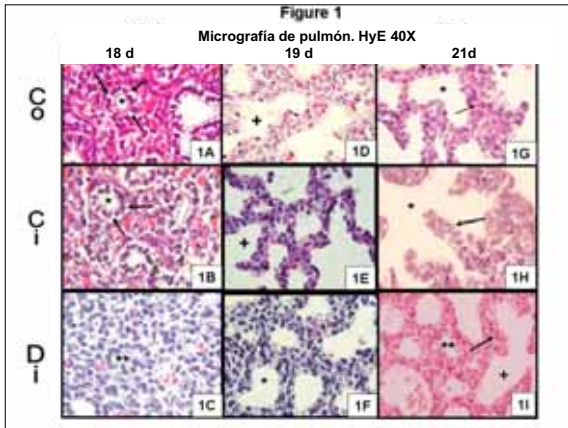
---

---

---

---

---




---

---

---

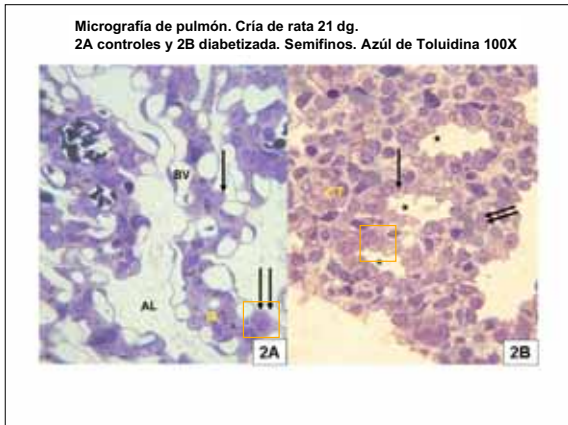
---

---

---

---

---




---

---

---

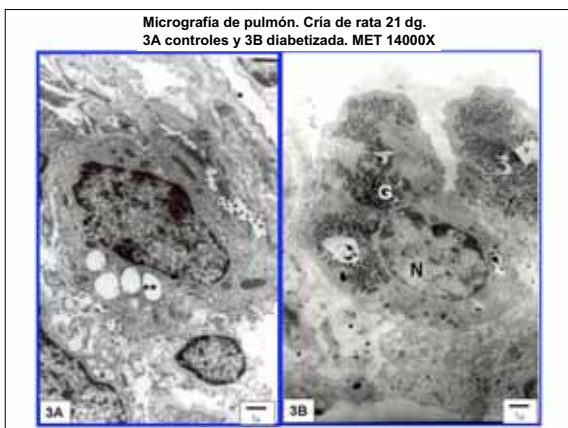
---

---

---

---

---




---

---

---

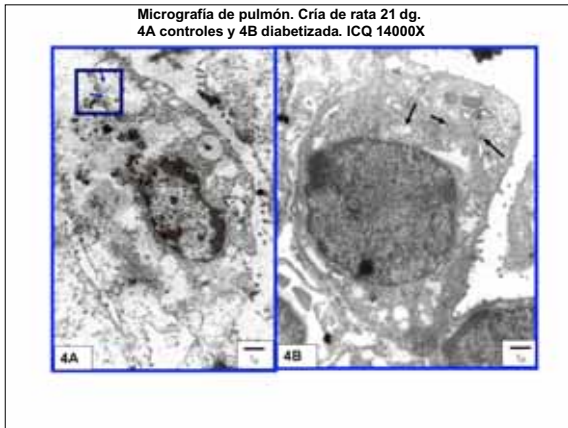
---

---

---

---

---




---

---

---

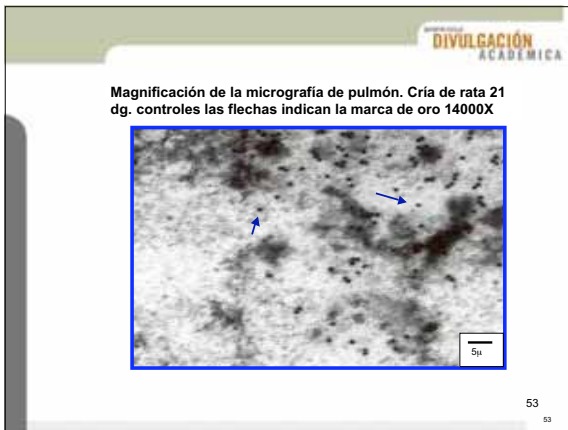
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---




---

---

---

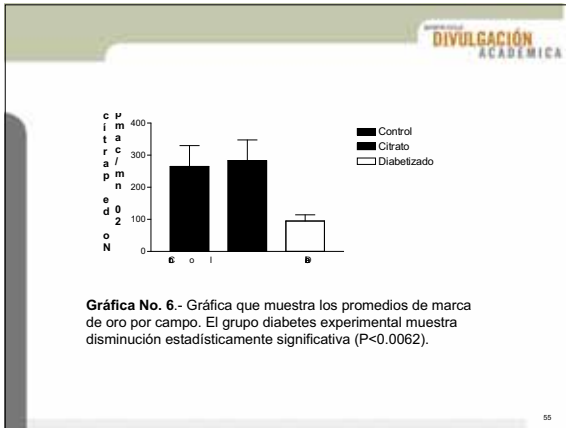
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---

### Discusión

- Los resultados del presente trabajo permiten aceptar la hipótesis propuesta ya que las crías de las madres diabetizadas presentaron bajo peso corporal, disminución en la longitud cráneo caudal y bajo peso del pulmón en comparación con los grupos controles.
- Indicando inmadurez corporal y del órgano como está reportado en la literatura, Pinter (1991) menciona que es el resultado de la hiperglucemia materna que conlleva a hiperglucemia fetal.

---

---

---

---

---

---

---

---

### Discusión

- El desarrollo del pulmón en los grupos controles mostró características histológicas bien definidas (Bishop, 2004; Mason, 2006), mientras que los de madres diabetizadas mostraron retraso en la diferenciación con traslape de las etapas del desarrollo. Sosenko y Frank (1986) describieron un retraso en la alveolización de los pulmones de crías de madres diabetizadas.

---

---

---

---

---

---

---

---

## Discusión

Los grupos controles presentaron neumocitos tipo II con ultraestructura normal, mientras que el grupo diabetizado mostró células en proceso de diferenciación:

- Ausencia de microvellosidades.
- Escasos organelos citoplasmáticos:
  - Cuerpos lamelares escasos y pequeños.
- Acúmulo de glucógeno.

*Observado también por Gewolb (1995), Piper (1993), Ridsdale (2004)*

58

---

---

---

---

---

---

---

---

## Discusión

- La proteína D, asociada al factor surfactante pulmonar con la técnica de ICQ, estuvo presente en los grupos controles, en cantidades adecuadas (Voorhout, 1992). Mientras que en el grupo experimental se observó disminución de dicha proteína, lo que se asocia con la susceptibilidad del pulmón a las infecciones siendo estas la complicación asociada a la inmadurez pulmonar.
- Otros autores han encontrado disminución de proteínas A, B y C (Guttentag, 1992) pero sobre la proteína D no hay reportes.

59

---

---

---

---

---

---

---

---

## Conclusión

Los fetos del grupo diabetizado presentaron:

- Disminución en el peso corporal, y en la longitud cráneo caudal de las crías; y, disminución en el peso del pulmón.
- Retraso en la histogénesis de pulmón
- Retraso en la diferenciación del neumocito tipo II
- Disminución en la proteína D asociada al factor surfactante pulmonar

60

---

---

---

---

---

---

---

---



---

---

---

---

---

---

---

---



---

---

---

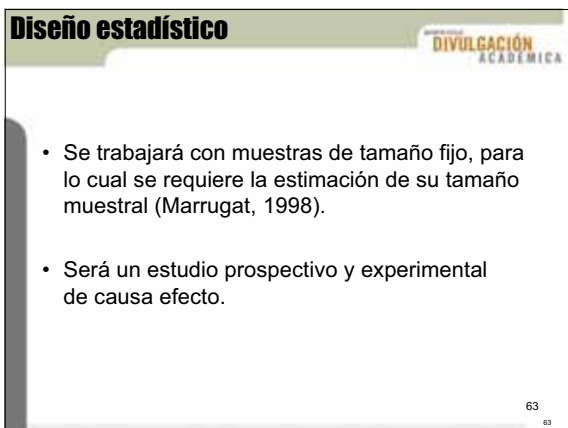
---

---

---

---

---



---

---

---

---

---

---

---

---

- La probabilidad de cometer error tipo I será fijada en un valor  $\alpha$  de 0.05 nivel de significancia.
- Méndez (1998), sugiere que el investigador fije una situación de alejamiento mínimo de la hipótesis de nulidad llamándola  $\delta$ ; si además se conocen a priori las varianzas de las poblaciones iguales entre sí e iguales a  $\sigma^2$  se calcula:

$$d = \delta / \sqrt{2} \sigma^2$$

64

---

---

---

---

---

---

---

---

Se recurrirá a la tabla: tamaño de la muestra para comparar dos proporciones con  $\alpha = 0.05$  (Tabla A.5 pág 126 de Méndez, 1998);

Considerando la proporción mayor = 1.00 y la proporción menor = 0.50 se cruzarán los datos y nos dará el tamaño de la muestra para el grupo control y el grupo experimental **10 ratas** para cada uno.

65

---

---

---

---

---

---

---

---

Utilizando la siguiente formula para muestras finitas:

$$n = \frac{N Z_{\alpha/2}^2 \hat{p}(1-\hat{p})}{\hat{p}(1-\hat{p}) Z_{\alpha/2}^2 + (N-1) E^2}$$

se **necesitan 20 crías** (10 hembras y 10 machos) tanto del grupo control como del grupo experimental.

66

---

---

---

---

---

---

---

---