



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

*“LIGADURA DE LA ARTERIA PULMONAR: EVALUACIÓN DE LA
DISTENSIBILIDAD Y DE LA ANGIOGÉNESIS INTRA- Y
EXTRAPULMONAR MEDIANTE LA EXPRESIÓN DEL FACTOR DE
CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR (VEGF), CD-31 Y
MEDICIÓN DE LOS NIVELES DE IL-6 E IL-10”*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

FARID RAMÍREZ ZAMORA



MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: AIDA NAVAS PEREZ
VOCAL: MISAEL GONZALEZ IBARRA
SECRETARIO: JAIME VILLALBA CALOCA
1er. SUPLENTE: LEON PATRICIO MARTINEZ CASTILLA
2° SUPLENTE: MARIO ADAN MORENO EUTIMIO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

UNIDAD DE TRASPLANTE PULMONAR EXPERIMENTAL DEL INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS "ISMAEL COSÍO VILLEGAS" (INER).

ASESOR DEL TEMA:

DR. JAIME VILLALBA CALOCA

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dra. AVELINA SOTRES VEGA

SUSTENTANTE:

FARID RAMÍREZ ZAMORA

Este proyecto se realizó en la Unidad de Trasplante Pulmonar Experimental del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” bajo la dirección y asesoría de los investigadores en Ciencias Médicas: Dr. Jaime Villalba-Caloca, Dra. Avelina Sotres-Vega, Dr. Alfredo Santibáñez-Salgado y Dr. Miguel Gaxiola-Gaxiola.

AGRADECIMIENTOS:

A mi mamá *María de la Luz* y mi papá *Juan Ramírez* por su paciencia, su cariño incondicional, sus consejos y sobre todo el apoyo que siempre me han brindado.

A mis hermanos *Pao, Karlita, Valery y Juan* por que siempre me motivaron para hacer esto posible.

A mis tíos *Lilia y Francisco* por el apoyo en todo momento.

A *Adriana (Azuky)* por su amor, cariño y confianza que me dio, por que los mejores años de la universidad fueron a su lado y nunca los olvidare.

A la Bandita: *Sema, Coral, Wero, Topo, Celia, Gina, Tanya y Mirria* por que hicieron los días de estudio algo más divertido y por brindarme muy buenos momentos.

A la *Dra. Avelina* y al *Dr. Villalba* por el tiempo, comprensión y enseñanzas que recibí de ellos.

A *Lulú, Dr. Santibáñez, Sergio, Marcelino, Francisco, Dr. Miguel, Erika y Lupita* por la grandísima ayuda con este trabajo.

A las Chicas: *Gabrielle, Mariel, Isa y Soe* por ser tan chéveres y no dejar de sonreír hasta en los momentos más difíciles.

A la *Dra Aida Navas* y *Q.F.B Misael González* por su tiempo brindado, sus observaciones y sus consejos.

“El aire posee cierta virtud oculta. En esa virtud se esconde el secreto de la vida”.

Hermann Boerhaave

“No pregunten si estas ideas son buenas o malas, más bien pregunten si coinciden con la realidad”.

Malpighi

“Hermoso es lo que vemos. Más hermoso es lo que sabemos. Pero mucho mas hermoso es lo que no conocemos”.

Niels Steensen

ÍNDICE

Relación de figuras-----	ix
Relación de tablas -----	xiii
Relación de gráficas -----	xiv
Abreviaturas-----	xv
RESUMEN-----	1
1. MARCO TEÓRICO-----	4
1.1 Tórax-----	4
1.2 Pared torácica-----	4
1.2.1 Esqueleto de la pared torácica-----	4
1.3 Pleura-----	5
1.4 Aparato respiratorio-----	5
1.4.1 Porción conductora-----	6
1.4.2 Porción respiratoria-----	6
1.5 Anatomía del pulmón-----	6
1.5.1 Pulmón derecho-----	6
1.5.2 Pulmón izquierdo-----	7
1.6 Histología del pulmón-----	7
1.7 Vascularización pulmonar-----	9
1.7.1 Circulación pulmonar-----	9
1.7.2 Circulación bronquial-----	11
1.8 Distensibilidad pulmonar-----	11
1.9 Angiogénesis-----	13
1.10 Factor de crecimiento del endotelio Vascular (VEGF)-----	16
1.10.1 Receptores del VEGF-----	18
1.11 Molécula de Adhesión Endotelial Plaquetaria (PECAM-1 o CD-31)-----	18
1.12 Interleucinas-----	19
1.12.1 Interleucina 6 (IL-6)-----	20

1.12.2 Interleucina 10 (IL-10)-----	21
2. JUSTIFICACIÓN-----	23
3. HIPÓTESIS-----	24
4. OBJETIVOS-----	25
4.1 Objetivo general-----	25
4.2 Objetivos específicos-----	25
5. MATERIAL Y MÉTODOS-----	26
5.1 Modelo experimental-----	26
5.1.1 Criterios de inclusión-----	26
5.1.2 Criterios de exclusión y eliminación-----	26
5.2 Diseño experimental-----	26
5.2.1 Grupos de estudio-----	26
5.2.2 Anestesia y ventilación-----	27
5.2.3 Obtención y procesamiento de muestras-----	28
5.3 Evaluaciones-----	32
5.3.1 Distensibilidad pulmonar-----	32
5.3.2 Determinación inmunohistoquímica (VEGF y CD-31)-----	33
5.3.2.1 Preparación del tejido-----	33
5.3.2.2 Exposición y recuperación del antígeno-----	33
5.3.2.3 Eliminación de la peroxidasa endógena-----	33
5.3.2.4 Bloqueo del pegado inespecífico/primer anticuerpo-----	34
5.3.2.5 Reacción streptavidina-biotina-peroxidasa-----	34
5.3.2.6 Visualización de la reacción antígeno-anticuerpo--	34
5.3.3 Determinación de la IL-6 e IL-10 mediante técnica de ELISA-----	35
5.3.3.1 Preparación de la curva estándar (IL-10, IL-6)-----	35
5.3.3.2 Reacción con biotina-----	36
5.3.3.3 Reacción con streptavidina HRP-----	36
5.3.3.4 Visualización de la reacción-----	37

5.3.4 Evaluación histológica-----	37
6. RESULTADOS-----	39
6.1 Distensibilidad pulmonar-----	39
6.2 Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF)-----	44
6.3 Molécula de adhesión celular al endotelio plaquetario (CD-31)-----	45
6.4 Interleucina 6 e Interleucina 10-----	47
6.5 Evaluación histológica-----	49
7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS-----	52
8. CONCLUSIONES-----	56
9. PERSPECTIVAS-----	57
10. REFERENCIAS-----	58

RELACIÓN DE FIGURAS.

Figura1. Radiología normal de tórax de rata (Unidad de Trasplante Pulmonar Experimental, INER).-----	4
Figura 2. Pared torácica (costillas, el esternón y las vértebras torácicas).-----	5
Figura 3. Aparato respiratorio-----	5
Figura 4. Imagen del pulmón: división seriada del bronquio principal-----	6
Figura 5. Imagen histológica de pulmón (Hematoxilina-Eosina, 65x) ³ -----	7
Figura 6. Diseño esquemático de las características estructurales de la pared alveolar y la barrera de difusión entre sangre y aire (barrera alveolo-capilar).-----	8
Figura 7. Imagen donde se muestra la circulación pulmonar, se observan las arterias pulmonares y las dos venas pulmonares de cada pulmón. -----	10
Figura 8. Angiogénesis: Formación de nuevos vasos a partir de la vasculatura pre-existente. ¹¹ -----	13
Figura 9. Diagrama del proceso de angiogénesis. A. Estado de reposo. B. tras la señal antigénica se pierden las uniones entre células endoteliales, se degrada la membrana basal, se selecciona o forma la célula guía o “tip cell” que dirige la extensión de las células endoteliales para formar los nuevos vasos sanguíneos. C. Extensión del citoplasma	

de las células endoteliales, proliferación, migración y formación del lumen. ³³ -----	16
Figura 10. Funciones de IL-6. La IL-6 es una citocina pleiotrópica con una amplia gama de actividades biológicas. ²⁰ -----	21
Figura 11. La IL-10 es una citocina pleiotrópica con funciones inmunorregulatorias importantes cuyas acciones influyen en las actividades de diferentes tipos celulares en el sistema inmunológico. Es una citocina con potentes propiedades antiinflamatorias, reprimiendo la expresión de citocinas inflamatorias como TNF α , IL-6 e IL-1 por macrófagos activados. ²¹ -----	22
Figura 12. Animal colocado sobre la tabla de cirugía en posición supina, intubado con una sonda orotraqueal conectada al ventilador marca AVEA TM .-----	27
Figura 13 (A-B). A: Toracotomía a nivel del tercer espacio intercostal. B: Ligadura de la arteria pulmonar izquierda.-----	28
Figura 14. Inclusión de tejido pulmonar y de pared costal en bloques de parafina.-----	30
Figura 15. Preparación de la curva estándar de IL-10-----	35
Figura 16. Preparación de la curva estándar de IL-6.-----	36
Figura 17. Placa de Elisa en el espectrofotómetro, absorbancia a 450nm.-----	37

Figura 18 (A-D) Tinción con hematoxilina-contratinción con aminoetilcarbazol. Expresión del VEGF en tejido pulmonar y de la pared costal. A: Tejido pulmonar sin expresión del VEGF (control negativo y muestras de pulmón derecho e izquierdo del grupo control, muestras de pulmón derecho e izquierdo del grupo II). B: Expresión positiva del VEGF en pulmón izquierdo de los grupos III-V. C: Pared costal sin expresión del VEGF (control negativo y muestras de pared costal derecha e izquierda del grupo control, muestras de pared costal derecha e izquierda del grupo II). D: Expresión positiva del VEGF en la pared costal izquierda de los grupos III-V (a partir del día 10). Fotos A, B, y C (10x), D (40x).----- 45

Figura 19. (a-d) Tinción con hematoxilina-contratinción con aminoetilcarbazol. Expresión de CD-31 en pared costal. a, b: Expresión positiva de CD-31 en pared costal izquierda de los grupos III-V. c, d: Pared costal sin expresión de CD-31 (control negativo y muestras de pared costal derecha e izquierda del grupo control, muestras de pared costal derecha e izquierda de grupo II). Fotos a, c (10x) y b, d (40x).----- 46

Figura 20. (a-d) Tinción con hematoxilina-contratinción con aminoetilcarbazol. Expresión de CD-31 en tejido pulmonar. a, b: Expresión positiva de CD-31 en el pulmón izquierdo de los grupos III-V. c, d: tejido pulmonar sin expresión de CD-31 (control negativo y muestras de pulmón derecho e izquierdo del grupo control, muestras de pulmón derecho e izquierdo del grupo II). Fotos a, c (10x) y b, d----- 47

Figura 21. Hallazgos histológicos en la pared costal. A) Formación de nuevos vasos sanguíneos en PCI post-LAPI (tricromica de Masson 10x). B) Formación de nuevos vasos sanguíneos en PCI post-LAPI (H&E 10x). C) Arteriolas engrosadas debido a la inflamación crónica en

PCI post-LAPI (H&E 10x). D) Inflamación y fibrosis en PCI post-LAPI (tricomica de Masson 10x). E) Fibrosis en PCI post-LAPI (tricomica de Masson 10x). F) Hemorragia en PCI post-LAPI (tricomica de Masson 10x). G) Pared costal grupo control, no se observan cambios en la estructura (H&E 10x). H) Pared costal derecha grupos con API ligada, no se observan cambios en la estructura (tricomica de Masson 10x).----- 50

Figura 22. (A-D) Pulmón izquierdo grupo con ligadura de API donde se observan vasos de neoformación, inflamación y hemorragia (H&E, 10x). (E-F) Pulmones grupo control y derecho de los grupos con ligadura de API donde no se observan cambios en la estructura (E: H&E 10x, F: H&E 40x).----- 51

RELACIÓN DE TABLAS

Tabla 1. Esquema de registro para distensibilidad pulmonar.-----	32
Tabla 2. Distensibilidad promedio \pm desviación estándar basal y final en el grupo control y en los grupos con ligadura de la API con base en el número de días post-ligadura (Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney: $p>0.05$).-----	42
Tabla 3. Concentración promedio de IL-6 \pm DE en suero y en los homogeneizados de pulmón derecho y de pulmón izquierdo (ANDEVA: $p<0.001$).-----	48
Tabla 4. Concentración promedio de IL-10 \pm DE obtenido en suero, pulmón derecho y pulmón izquierdo (ANDEVA: $p<0.001$).---	48

RELACIÓN DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Curva de presión-volumen: Distensibilidad pulmonar. ⁶ --	12
Gráfica 2. Distensibilidad basal y final del grupo control y del grupo con ligadura de la API con una $FiO_2=21\%$ y diferentes presiones inspiratorias. (Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney: $p>0.05$)-----	42
Gráfica 3. Distensibilidad basal y final del grupo control y del grupo con ligadura de la API con una $FiO_2=100\%$, presión inspiratoria de 14 cmH_2O con un minuto de apnea. (Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney: $p>0.05$).-----	43
Gráfica 4. Distensibilidad basal y final del grupo control y del grupo con ligadura de la API con una $FiO_2=100\%$ y diferentes presiones inspiratorias. (Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney: $p>0.05$)-----	43
Gráfica 5. Concentración promedio de IL-6 e IL-10 en suero y en homogeneizados de tejido pulmonar (derecho e izquierdo).-----	49

ABREVIATURAS

ANDEVA	Análisis de varianza
ANG-1	Angiopietina-1
EC`s	Células endoteliales
ECM	Matriz extra celular
ELISA	Ensayo por inmuno-absorción ligado a enzimas
FGF`s	Factor de crecimiento de fibroblastos
FIO ₂	Fracción inspiratoria de oxígeno (%)
H&E	Tinción Hematoxilina-Eosina
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
kDa	kilodaltones
LAPI	Ligadura de arteria pulmonar izquierda
MMP`s	Metaloproteinasas
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PECAM-1 o CD-31	Molécula de adhesión celular endotelial plaquetaria
PI	Presión inspiratoria
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
Streptavidin HRP	Streptavidin horseradish peroxidase
TBST	Triss buferred saline tween 20
TGF- β	Factor de crecimiento transformante - β
TIMP`s	Inhibidores tisulares de metaloproteinasas
TMB	Tetrametil-benzidina
TNF	Factor de necrosis tumoral
TSP-1	Trombospondina-1
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular

RESUMEN

El término angiogénesis se refiere al proceso que conduce a la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura existente y está favorecida por la presencia de reacciones inflamatorias en los tejidos. La angiogénesis tiene ventajas y desventajas. Por ejemplo en cáncer cuando hay angiogénesis es causa de metástasis, obviamente una gran desventaja, en cambio en tejidos que necesitan ser bien irrigados para obtener una buena circulación. La angiogénesis, demanda amplia investigación en diferentes campos que involucran el desarrollo de modelos experimentales en los que sea posible, una vez que el modelo sea reproducible, evaluar la participación de diferentes mediadores y la eficacia de medicamentos con la finalidad de aplicar los resultados obtenidos, en la fase clínica. Diferentes estudios en roedores al ligar la arteria pulmonar derecha o izquierda, se genera, por el propio traumatismo un proceso inflamatorio en el que intervienen diferentes citocinas. Esta suspensión de la circulación pulmonar, según diferentes autores, causa u origina: formación de nuevos vasos sanguíneos, a través, de vasos de la pared costal y disminución de la distensibilidad.

El objetivo de este estudio es 1) montar un modelo en rata de angiogénesis, 2) evaluar la angiogénesis en diferentes días post-LAPI, tanto en pulmón como en pared costal, por medio, de la histología y de expresión inmunohistoquímica de VEGF y CD-31, 3) determinar los niveles de IL-6 e IL-10 en suero y homogeneizado de tejido pulmonar (método de ELISA) y 4) estudio de la distensibilidad pulmonar pre- y post-LAPI.

Material y métodos: Se utilizaron 30 ratas Wistar con un peso de entre 200-300 gr, sanas, manejadas según la NOM-062-ZOO-1999. Los animales se dividieron al azar en cinco grupos de estudio: Grupo I (control n=6), Grupo II (8 días post-LAPI n=6), Grupo III (10 días post-LAPI n=6), Grupo IV (12 días post-LAPI n=6) y Grupo V (15 días post-LAPI n=6). Los animales del grupo I no se sometieron a ningún tipo de intervención quirúrgica, en cuanto a los animales del grupo II-V, se les realizó toracotomía izquierda para ligar la arteria pulmonar izquierda (LAPI). Todos los animales de estudio, y el grupo control, fueron anestesiados, intubados y ventilados bajo diferentes presiones y volúmenes para obtener la distensibilidad pulmonar. Concluido el registro de la distensibilidad (basal), los animales del grupo II-V se sometieron a la intervención quirúrgica, al finalizar el estudio de cada grupo se registró nuevamente la distensibilidad (final), e inmediatamente después los animales fueron sacrificados para obtener las muestras de sangre, tejido pulmonar y de pared costal que fueron procesadas para realizar evaluaciones histológica, inmunohistoquímica de la expresión del VEGF, CD-31 y de los niveles de IL-6 e IL-10 mediante la técnica de ELISA.

Resultados: 1) No se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar la distensibilidad inicial y final de los grupos II-V (U de Mann-Whitney: $p > 0.05$) y al comparar el grupo control vs los grupos II-V (Kruskal-Wallis: $p > 0.05$). 2) La expresión del VEGF y de CD-31 ocurrió a partir del grupo III y únicamente se observó en las muestras de tejido pulmonar y de pared costal correspondientes al hemitórax izquierdo (ANDEVA: $p < 0.001$). 3) La concentración de IL-10 detectada en suero y en tejido pulmonar (derecho e izquierdo) en los cinco grupos de estudio

fue significativamente mayor que la concentración de IL-6 (ANDEVA: $p < 0.001$). Contrariamente al comportamiento de la IL-10, la concentración de IL-6 en el tejido pulmonar izquierdo del grupo de ratas al que se le pinzó la arteria pulmonar izquierda disminuyó significativamente en los grupos IV-V (ANDEVA + Tukey: $p < 0.05$). 4) Los hallazgos histológicos encontrados en los pulmones y pared costal de los grupos II-V fueron significativamente mayores que los hallazgos en el pulmón y pared costal derecha de las ratas de estos mismos grupos y que los encontrados en el pulmón y pared costal derecha e izquierda del grupo control (Kruskal-Wallis: $p < 0.001$).

Conclusiones: 1) Se implementó un modelo angiogénico experimental en ratas al ligar la arteria pulmonar izquierda, 2) La obstrucción de la arteria pulmonar izquierda provocó isquemia e inflamación, lo que generó la formación de nuevos vasos en el pulmón izquierdo a partir de la pared costal izquierda (grupos III-V), mediante la expresión inmunohistoquímica del VEGF y de CD-31, pero no ocurrió lo mismo en el hemitórax derecho, 3) En los grupos II y III se observó un incremento significativo en los niveles de IL-10 en el pulmón izquierdo, seguida de una disminución estadísticamente significativa de los niveles de IL-6 en los grupos IV-V.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Tórax

El tórax comprende la región situada entre el cuello y el abdomen, incluye los órganos principales del aparato respiratorio y cardiovascular (Figura 1). El tórax esta dividido en hemitórax derecho e izquierdo y mediastino.¹



Figura1. Radiología normal de tórax de rata
(Unidad de Trasplante Pulmonar Experimental, INER).

1.2 Pared torácica

Esta formada por costillas, músculos inspiratorios y espiratorios. El diafragma, músculo, que separa a la cavidad torácica de la abdominal es el que realiza la mayor parte de la función respiratoria.¹

La forma abovedada de la caja torácica, le proporciona una rigidez notable, lo que permite proteger los órganos vitales del tórax y del abdomen, resistir las presiones negativas internas que se generan por el retroceso elástico de los pulmones y por los movimientos de inspiración, además de proporcionar inserción y sostener el peso de los miembros superiores.¹

1.2.1 Esqueleto de la pared torácica.

El esqueleto del tórax forma la caja torácica osteocartilaginosa que protege las vísceras torácicas y algunos órganos abdominales. El esqueleto del tórax incluye 12 pares de costillas y los cartílagos costales asociados, 12 vértebras

torácicas con los discos intervertebrales interpuestos entre ellas, y el esternón (Figura 2).¹

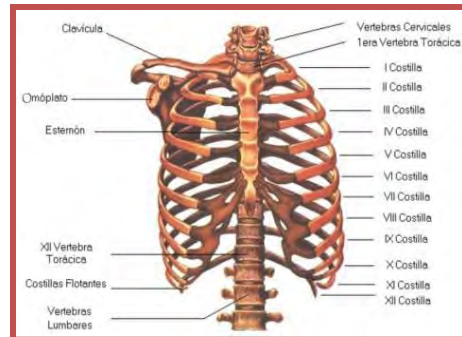


Figura 2. Pared torácica (costillas, el esternón y las vértebras torácicas).

1.3 Pleura.

La pleura envuelve a los pulmones. Una capa al pulmón (pleura visceral), que a nivel mediastinal se refleja y forma la pleura parietal. Entre la pleura parietal y visceral (espacio virtual), hay una pequeña cantidad de líquido que hace que estas hojas estén adheridas.¹

1.4 Aparato respiratorio

El aparato respiratorio, tiene como función expulsar dióxido de carbono y llevar oxígeno a todos los tejidos del organismo. Esta función se lleva a cabo en la pared alveolo-capilar por gradientes de presión: exteriorizar dióxido de carbono e interiorizar oxígeno. En consecuencia, el sistema respiratorio tiene una porción conductora y una porción respiratoria. (Figuras 3,4).¹

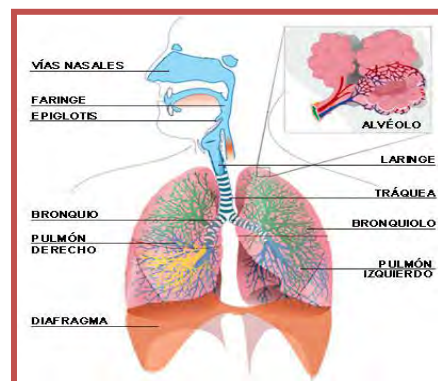


Figura 3. Aparato respiratorio

1.4.1 Porción conductora

Los componentes extrapulmonares de la porción conductora, incluyen las cavidades nasales, la faringe, la laringe, la tráquea y los bronquios primarios, mientras que los bronquiolos constituyen los componentes intrapulmonares. Esta porción, tiene como función conducir, limpiar, humedecer y calentar el aire inspirado.^{1,2}

1.4.2 Porción respiratoria.

Comienza con las ramificaciones del bronquiolo terminal, se continúan con los sacos alveolares y por ultimo los alveolos, cuyas paredes delgadas permiten el intercambio gaseoso.²

1.5 Anatomía del pulmón

Los pulmones constan de 150-250 millones de alveolos, el pulmón derecho consta de tres lóbulos y dos cisuras mientras que el pulmón izquierdo dos lóbulos y una cisura.²

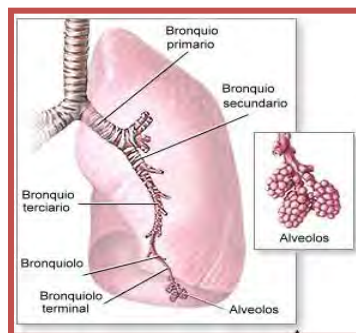


Figura 4. Imagen del pulmón: división seriada del bronquio principal

1.5.1 Pulmón derecho.

El pulmón derecho presenta dos cisuras oblicuas derechas y horizontales que lo dividen en tres lóbulos: superior, medio e inferior. El pulmón derecho es más grande y pesado que el izquierdo, aunque es más corto y ancho debido a que la cúpula derecha del diafragma es más alta, y el corazón junto con el pericardio lo

empujan hacia la izquierda. El borde anterior del pulmón derecho es relativamente recto.¹

1.5.2 Pulmón izquierdo.

El pulmón izquierdo tiene una única cisura oblicua izquierda que lo divide en dos lóbulos: superior e inferior. El borde anterior del pulmón izquierdo presenta una profunda escotadura cardiaca, una hendidura debida a la desviación hacia el lado izquierdo del vértice del corazón.¹

1.6 Histología del pulmón.

De la tráquea al alveolo existen 23 divisiones que tienen diferentes formas. Por ejemplo, después de los bronquios principales en los que se divide la tráquea continúan los bronquios segmentarios, luego los sub-segmentarios y luego de este modo llegar a los sacos alveolares y luego a los alveolos. Es de observar que en determinado número de ramificaciones disminuye la cantidad de cartílago hasta desaparecer totalmente a nivel de la última división.

Los bronquios representan las primeras siete divisiones de ramificaciones del árbol bronquial. Siempre contienen cartílago y glándulas en la pared. Los bronquios principales presentan una estructura histológica muy similar a la traqueal, pero en la zona de transición a los pulmones el cartílago adquiere una forma más irregular y la musculatura forma un anillo completo dentro del cartílago. Los cartílagos son hialinos y se mantienen unidos mediante tejido conectivo colágeno que se continúa con el pericondrio que lo rodea (Figura 5).²

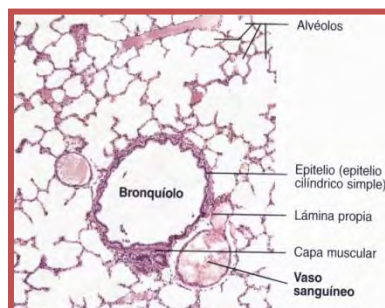


Figura 5. Imagen histológica de pulmón (Hematoxilina-Eosina, 65x)³

La estructura histológica de los bronquios se modifica en forma gradual. En los bronquiolos, el epitelio pseudoestratificado ciliado se transforma en epitelio cilíndrico, desaparecen el cartílago y las glándulas y por último se engrosa la capa muscular. Los últimos bronquiolos pertenecen al sistema conductor, es decir, que aun no contienen alveolos en sus paredes, se denominan bronquiólos terminales. Cada uno de ellos se divide en dos bronquiólos respiratorios que se diferencian del bronquiólo terminal en que cada tanto aparecen dilataciones de la pared, los alveolos, es decir, ya aparece tejido respiratorio. La pared alveolar es la delgada separación entre dos alveolos adyacentes. Se compone de una capa de tejido conectivo, revestida por epitelio en las caras orientadas hacia el espacio alveolar lleno de aire (Figura 6).³

La capa de tejido conectivo contiene fibras elásticas y de colágeno que forman un trenzado entre cuyas mallas ingresan y salen los capilares pulmonares. El tejido conectivo contiene fibroblastos, macrófagos, mastocitos, linfocitos y células plasmáticas. A menudo se comunican alveolos adyacentes mediante orificios en la pared alveolar, denominados poros alveolares, de unos 10 μm de diámetro.^{2,3}

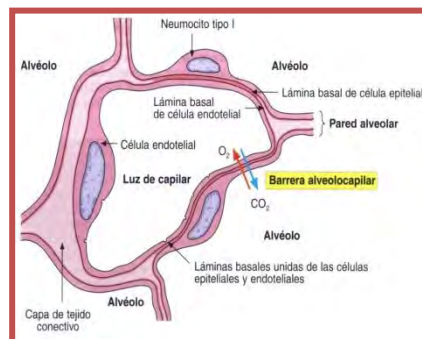


Figura 6. Diseño esquemático de las características estructurales de la pared alveolar y la barrera de difusión entre sangre y aire (barrera alveolo-capilar).

El epitelio alveolar se compone de neumocitos tipo I y tipo II. Los neumocitos tipo I tienen pequeños núcleos aplanados, que se confunden con facilidad con núcleos de capilares. La barrera de difusión entre sangre y aire esta representada por el citoplasma aplanado de las células endoteliales, las dos

laminas basales con el tejido conectivo intermedio y el citoplasma aplanado de los neumocitos tipo I.³

Los neumocitos tipo II tienen forma irregular, casi cúbica, y el núcleo es bastante grande y redondeado. Las células suelen sobresalir hacia la luz y se encuentran en mayor número que los neumocitos tipo I. Los neumocitos tipo II, elaboran el agente tensioactivo o surfactante, un complejo de fosfolípidos y proteínas encargado de reducir la tensión superficial. Una red muy extensa de capilares, irrigados por las arterias pulmonares y drenadas por las venas pulmonares.³

1.7 Vascularización Pulmonar.

En los pulmones existen tres tipos de circulación: 1) la circulación pulmonar que lleva la sangre a los pulmones para que sea oxigenada, 2) la circulación en las venas pulmonares que desembocan en la aurícula izquierda y que llevan la sangre oxigenada que va a “oxigenar” a todo el organismo y 3) la circulación nutricia que es sangre que irriga al pulmón a través de las arterias intercostales y bronquiales que son ramas de la aorta, subclavia, etc.⁴

1.7.1 Circulación pulmonar.

La circulación pulmonar es peculiar debido a que consta como ya se dijo anteriormente, de circulación funcional que tiene por objeto llevar la sangre a los pulmones para ser oxigenada, la circulación de las venas pulmonares que tienen como fin llevar la sangre oxigenada a la bomba cardiaca para enviarla al organismo y tener un metabolismo aeróbico y la circulación nutricia por medio de las arterias bronquiales y de las intercostales para alimentar al aparato respiratorio.

Cada pulmón está irrigado por una arteria pulmonar y dos venas pulmonares que drenan la sangre procedente de él. Las arterias pulmonares derecha e izquierda se originan en el tronco pulmonar a nivel del ángulo esternal y

transportan sangre venosa, pobre en oxígeno hacia los pulmones para su oxigenación.^{2,4}

Dos venas pulmonares, una vena pulmonar superior e inferior en cada lado, transportan sangre arterial, rica en oxígeno desde los correspondientes lóbulos de cada pulmón hasta la aurícula izquierda del corazón (Figura 7).²

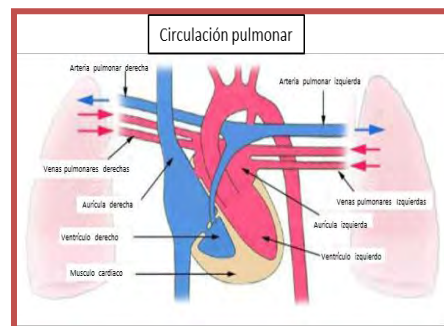


Figura 7. Imagen donde se muestra la circulación pulmonar, se observan las arterias pulmonares y las dos venas pulmonares de cada pulmón.

Contrariamente a la circulación sistémica en la que la sangre oxigenada se transporta a través de las arterias, la circulación pulmonar transporta la sangre desoxigenada desde el corazón hasta los pulmones a través de la arteria pulmonar, para luego regresarla oxigenada de vuelta al corazón. El mecanismo contrasta con la circulación sistémica que impulsa la sangre hacia el resto de los tejidos del cuerpo, excluyendo los pulmones. La función de la circulación pulmonar es asegurar la oxigenación sanguínea por la hematosis pulmonar. La sangre desoxigenada proveniente de los tejidos sale del corazón derecho por la arteria pulmonar, la cual lleva la sangre a los pulmones, donde los glóbulos rojos liberan bióxido de carbono en intercambio por oxígeno durante la respiración. La sangre así oxigenada sale de los pulmones por las venas pulmonares, las cuales regresan la sangre al corazón izquierdo, completando el ciclo. La sangre es luego distribuida por todo el cuerpo a través de la circulación sistémica antes de regresar de nuevo a la circulación pulmonar.^{2,4}

1.7.2 Circulación bronquial.

Las arterias bronquiales proporcionan sangre para nutrir las estructuras que componen la raíz de los pulmones, los tejidos de sostén de los pulmones y la pleura visceral. Las dos arterias bronquiales izquierdas se originan directamente en la aorta torácica. La única arteria bronquial derecha puede originarse también directamente de la aorta. Es más frecuente que se origine indirectamente, bien de la porción proximal de una de las arterias intercostales posteriores superiores o bien de un tronco común con la arteria bronquial superior izquierda.²

Las venas bronquiales drenan solo una parte de la sangre aportada a los pulmones por las arterias bronquiales. El resto de la sangre es drenada por las venas pulmonares. La vena bronquial derecha drena en la vena ácigos, mientras que la vena bronquial izquierda drena en la vena hemiacigos accesoria o en la vena intercostal superior izquierda.²

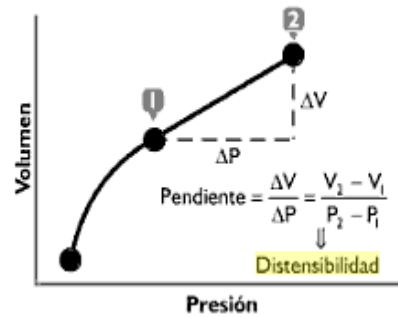
1.8 Distensibilidad pulmonar.

Para que se realice de manera satisfactoria el acto de respirar, se requiere: buena ventilación, perfusión y difusión.

En cuanto a la ventilación que consiste en la inspiración y espiración. En ésta tesis se estudio la distensibilidad (acto inspiratorio), la distensibilidad se define como la propiedad de un cuerpo de cambiar de volumen cuando se ejerce una presión.

$$D = \Delta V / \Delta P$$

Distensibilidad (D) igual al incremento de volumen (ΔV) sobre el incremento de presión (ΔP).⁶ Y se representa en una curva presión-volumen⁵ (Grafica 1) de la siguiente manera:



Grafica 1. Curva de presión-volumen:Distensibilidad pulmonar. ⁶

Es de mencionar que la elasticidad es la propiedad de un cuerpo para regresar a su forma inicial.

La distensibilidad no se refiere exclusivamente a la capacidad del pulmón para modificar su volumen en respuesta a la aplicación de presión a su alrededor. Ella involucra también la capacidad de la caja torácica para expandirse durante la fase inspiratoria. Por esto, es conveniente diferenciar diversas tipificaciones del fenómeno:

Distensibilidad estática: Es el cambio de volumen pulmonar debido a la aplicación de una unidad de presión. Se denomina estática cuando la medición se realiza en ausencia de flujo y representa la distensibilidad del pulmón exclusivamente. ⁶

Distensibilidad dinámica: es el cambio de volumen del conjunto toracopulmonar por cada unidad de presión aplicada. Representa entonces, la capacidad de adaptación tanto del pulmón como de la caja torácica en condiciones dinámicas de movimiento hasta el final de la fase inspiratoria. ⁶

Distensibilidad específica: La distensibilidad del pulmón depende de su tamaño. No es igual la distensibilidad de un recién nacido a la de un adulto. Por esto, la medición del parámetro en relación al volumen pulmonar se denomina distensibilidad específica. ⁶

1.9 Angiogénesis

La angiogénesis es un proceso que conduce a la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura ya existente (Figura 8). Se pueden distinguir dos tipos de angiogénesis, la angiogénesis fisiológica/normal y la patológica/anormal.

La angiogénesis fisiológica o normal, es un proceso de pasos múltiples que incluye la migración y proliferación de células endoteliales (ECs), la formación y organización de grupos celulares en estructuras tubulares que eventualmente se unirán, para finalmente madurar en vasos sanguíneos estables.⁸

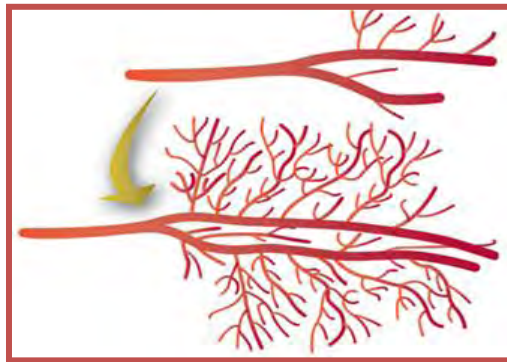


Figura 8. Angiogénesis: Formación de nuevos vasos a partir de la vasculatura pre-existente.¹¹

La angiogénesis está favorecida por la presencia de reacciones inflamatorias en los tejidos.^{8,11}

La angiogénesis es un proceso fisiológico que en etapa embrionaria es importante para la vascularización de todos los tejidos.⁹

Para que el proceso de angiogénesis se lleve a cabo de manera adecuada, debe existir un balance entre mediadores químicos que promueven la angiogénesis (llamados factores proangiogénicos) y los que la inhiben (llamados factores antiangiogénicos) dentro del microambiente tisular. Además, en el proceso de angiogénesis no solo participan esos factores, sino que se requiere de otras moléculas como proteínas de matriz extracelular, receptores a moléculas de adhesión y enzimas proteolíticas. Estas últimas participan en la degradación de la lámina basal y proteínas de matriz, facilitando que se lleve a cabo la migración de

las células endoteliales, mientras que los receptores de moléculas de adhesión participan en las uniones entre esas células.⁹

Los factores proangiogénicos (o, simplemente, angiogénicos) inician la generación de nuevos vasos sanguíneos induciendo la proliferación de células endoteliales vasculares. Pueden ser factores de crecimiento, enzimas, lípidos, citocinas, quimiocinas y algunos carbohidratos complejos. De entre ellos, los más estudiados son el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), la angiopoyetina-1 (ANG-1), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGFs), el factor de necrosis tumoral (TNF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), la proteína NOTCH (proteína con dominio transmembranal que actúa de receptor para proteínas transmembranales adyacentes, importante para la diferenciación), la citocina IL-6, la quimiocina IL-8 y metaloproteinasas (MMPs). Estas moléculas con frecuencia, son inductores de la proliferación de las células endoteliales.⁹

Por su parte, las moléculas antiangiogénicas (llamadas también factores angiostáticos) antagonizan el efecto de los factores angiogénicos. En este grupo, se encuentran la trombospondina-1 (TSP-1), el interferón- α (INF- α), el factor plaquetario 4 (PF-4), los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs), la interleucina 12 (IL-12), la angiostatina y la endostatina.⁹

En el inicio del proceso angiogénico, debe modificarse el estado de reposo de las células endoteliales, que sin activarse, forman una monocapa con una superficie aerodinámica. Las células endoteliales se mantienen unidas por moléculas de adhesión como las cadherinas y claudinas. Otras células, llamadas pericitos, envuelven a las células endoteliales e inhiben su proliferación, además, liberan señales de sobrevivencia celular como el VEGF y ANG-1. Ambos tipos celulares forman una membrana basal común a todos los tejidos. El proceso de angiogénesis se inicia en respuesta a los factores que activan a las células endoteliales que recubren los capilares existentes. Esos vasos detectan la señal angiogénica, que se manifiesta por una alteración entre las uniones estrechas de las células endoteliales que los conforman. Los pericitos se separan de la pared

de los vasos y se liberan de la membrana basal por degradación proteolítica, la cual es mediada por proteínas denominadas metaloproteinasas (MMPs).^{9,10}

Las células endoteliales pierden sus uniones y los vasos nacientes se dilatan. Factores angiogénicos como el VEGF incrementan la permeabilidad vascular de las células endoteliales, lo que causa un extravasado de proteínas del plasma y establecen una matriz extracelular (ECM) provisional. En respuesta a la señalización por integrinas, las células migran dentro de esa ECM. Existen factores angiogénicos que se encuentran almacenados en la matriz extracelular y enzimas llamadas proteasas que liberan a esos factores.^{9,10}

El movimiento de las células endoteliales hacia la señal angiogénica es ordenado, esto se debe a la selección de una célula conocida como célula punta (*tip cell*) que guiará dicho movimiento. Las células adyacentes a la célula punta o célula guía asumirán posiciones subsidiarias como células tallo, las cuales se dividirán para alargar el tallo y establecer el lumen (Figura 9).^{9,10}

Finalmente, las células endoteliales reanudan su estado quiescente y señales inducidas por moléculas como el PDGF-B, ANG-1, TGF- β , efrina B-2 y NOTCH causan que las células endoteliales sean nuevamente cubiertas por los pericitos. En esta etapa final, inhibidores de proteasas producen el depósito de una membrana basal y las uniones celulares son restablecidas para asegurar una distribución de flujo.^{9,10}

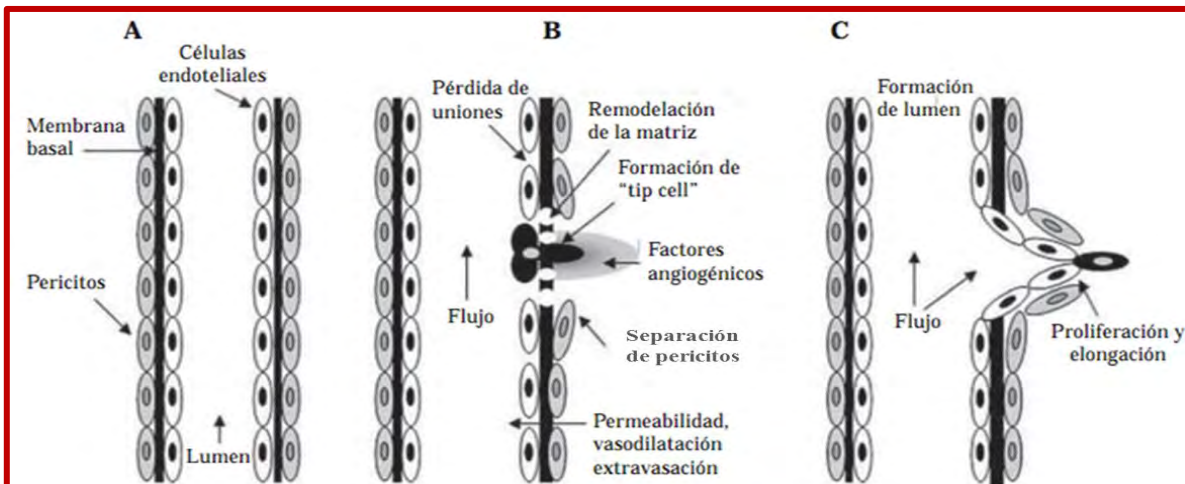


Figura 9. Diagrama del proceso de angiogénesis. A. Estado de reposo. B. tras la señal antigénica se pierden las uniones entre células endoteliales, se degrada la membrana basal, se selecciona o forma la célula guía o "tip cell" que dirige la extensión de las células endoteliales para formar los nuevos vasos sanguíneos. C. Extensión del citoplasma de las células endoteliales, proliferación, migración y formación del lumen.³³

En cuanto a la angiogénesis patológica, inicia cuando se alcanza y sobrepasa el umbral entre los estimuladores e inhibidores angiogénicos. Se pueden distinguir dos tipos de angiogénesis patológica: "angiogénesis activada" y "angiogénesis inhibida", dependiendo de los niveles dominantes de moléculas pro o anti-angiogénicas, respectivamente. Existen diversas condiciones asociadas a la "angiogénesis activada" como las enfermedades malignas, además de estar implicada en obesidad, asma, diabetes, cirrosis, esclerosis múltiple, endometriosis, SIDA, infecciones bacterianas y enfermedades auto-inmunes. Por el contrario, cuando el interruptor de la angiogénesis se encuentra apagado o es insuficiente ocurre una "angiogénesis inhibida" que esta asociada al mal funcionamiento de la ECs, a la regresión o malformación de vasos, además de prevenir la revascularización, cicatrización y regeneración.¹³

1.10 Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF).

Actualmente, se reconoce que el sistema que incluye al VEGF y sus receptores, es el principal regulador de las ECs vasculares y de la formación de vasos sanguíneos.^{11,12}

EL VEGF activo esta compuesto por dos subunidades idénticas. La unión a su receptor, está mediada por el homodímero a través de la unión del núcleo de la proteína y la modulación de la actividad del VEGF está dada por la unión a heparina. El VEGF responde a varios estímulos tales como hipoxia/isquemia principalmente mediante el factor inducible de hipoxia 1 (HIF-1), también, a distintos factores de crecimiento, a oncogenes activados, así como a distintas citocinas, p53 mutado, estrógeno y oxido nítrico (NO). Mediante estos estímulos se incrementa la expresión del VEGF resultando en la inducción de proliferación de ECs derivadas de las arterias, venas y vasos linfáticos así como en la proliferación de algunos tipos celulares no endoteliales; además, el VEGF promueve la migración celular e inhibe la apoptosis, favorece la angiogénesis y la permeabilización de los vasos sanguíneos y participa en la vasculogénesis y en la linfangiogénesis. Cuando su regulación es normal, el VEGF contribuye al remodelamiento vascular de la cicatrización y reparación, mientras que cuando es inadecuada, este factor contribuye al desarrollo de tumores solidos al promover la angiogénesis.¹³

El VEGF es un factor de crecimiento con actividad mitogénica altamente específica para las ECs; es miembro de la súper familia de genes VEGF-PDGF que incluye al VEGF-A, -B, -C, -D y -E.¹¹

El VEGF-A, es una glicoproteína homodimérica de 45KDa, que se puede unir tanto al receptor VEGFR-1 como al VEGFR-2. Hasta el momento, se han reportado seis isoformas del VEGF en seres humanos las cuales contienen 121, 145, 165, 183, 189 y 206 residuos de aminoácidos.¹¹

Las distintas isoformas del VEGF-A incrementan la permeabilidad vascular, estimulan la proliferación y migración de ECs. El VEGF-A₁₆₅ es una molécula cargada positivamente que se une a la heparina, es la isoforma mas común y estudiada, además de ser el transductor de señales mas fuerte entre los distintos tipos del VEGF, esta isoforma es principalmente secretada; sin embargo, una fracción significativa permanece unida a la superficie celular y a la matriz extracelular.¹¹

1.10.1 Receptores del VEGF.

El proceso de señalización que resulta en la angiogénesis, está mediado por uniones de alta afinidad de los factores de crecimiento del endotelio vascular con receptores específicos de actividad tirosina cinasa, localizados tanto en la superficie de las ECs vasculares y en células derivadas de la medula ósea, como en la circulación en donde se encuentra en forma soluble.¹¹

Todas las isoformas del VEGF, son capaces de unirse a alguno de estos tres receptores: VEGFR-1, VEGFR-2 o VEGFR-3; estos receptores contienen siete dominios homólogos a inmunoglobulina (Ig) en su parte extracelular, una región transmembranal, un dominio yuxtamembranal y un dominio intracelular de señalización tirosina cinasa interrumpido por un inserto de cinasa de 69 aminoácidos y la región carboxi-terminal. El segundo y tercer dominio de Ig, representa la región de unión al ligando, mientras que las regiones del cuarto al séptimo dominio de Ig son esenciales para la dimerización del receptor.¹¹

1.11. Molécula de Adhesión Celular Endotelial Plaquetaria (PECAM-1 o CD-31)

La molécula de adhesión celular endotelial plaquetaria es un tipo de glicoproteína transmembranal tipo I de 130 kDa expresada por diferentes células de la línea hematopoyética incluyendo las plaquetas, monocitos, neutrófilos y ciertos subgrupos de linfocitos. Las células endoteliales, también expresan PECAM-1, que es un componente principal de las uniones celulares en los lechos vasculares y también se ha observado que tiene un papel importante apoyando la migración transendotelial de leucocitos.^{7,14}

La ruptura de la integridad vascular provoca acumulación de plasma, proteínas y células en el espacio intersticial, y es uno de los signos principales de la respuesta inflamatoria. PECAM-1 interviene en la adhesión y señalización al receptor con lo que juega un papel recíproco durante la respuesta inflamatoria. PECAM-1, promueve la inflamación facilitando la migración transendotelial de leucocitos, pero atenúa la inflamación a través de su capacidad para: 1) inhibir la

activación celular, 2) reducir los niveles de citocina pro-inflamatoria 3) disminuir la acumulación de leucocitos en el sitio de inflamación y 4) mantener y restaurar la integridad vascular.^{7,14}

1.12. Interleucinas

La comunicación entre células inmunes e inflamatorias es mediada en gran parte por proteínas llamadas interleucinas, que promueven el crecimiento, la diferenciación y la activación celular. Estas moléculas efectoras son producidas transitoriamente y controlan localmente la amplitud y duración de la respuesta.¹⁵

Las interleucinas son proteínas solubles de bajo peso molecular, mediadoras de crecimiento celular, inflamación, inmunidad, diferenciación y reparación, entre otras actividades. Además de las células del sistema inmune, las citocinas son producidas por diferentes tipos celulares durante la activación de la inmunidad innata y adquirida. Son el principal medio de comunicación intracelular ante una invasión microbiana. Las citocinas inician la respuesta inflamatoria y definen la magnitud y naturaleza de la respuesta inmune específica. En la siguiente tabla se agrupan algunas de las citocinas en función de su actividad predominante, aunque muchas de ellas pueden tener más de una función.¹⁵

Grupos de citocinas en función de su actividad predominante		
I.	Proinflamatorias	IL-1, IL-6, TNF α , IFN α , IFN β
II.	Promotoras del crecimiento y diferenciación	IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-7 IL-12, IL-13
III.	Factores de crecimiento hematopoyético	IL-3, GM-CSF, IL-9, IL-11
IV.	Quimiocinas	(α) IL-8, (β) RANTES, (γ) Linfotacina, (δ) Fractalquina
V.	Reguladores de la actividad de los linfocitos	EGF, IFN γ , TGF β
TNF= factor de necrosis tumoral, IFN= interferón, GM-CSF= factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos, EGF= factor de crecimiento epidémico, TGF β =factor beta del crecimiento transformante		

1.12.1 Interleucina 6 (IL-6)

La interleucina 6 (IL-6), es una proteína de aproximadamente de 26 kDa, sintetizada inicialmente como un precursor de 212 aminoácidos, el cual origina la citocina madura de 184 aminoácidos que contiene una señal hidrofóbica necesaria para su secreción y cuatro residuos de cisteína.¹⁶

La IL-6 es sintetizada por fagocitos mononucleares, células endoteliales vasculares, fibroblastos y otras células en respuesta a la IL-1 y en menor proporción al TNF. La producen también algunas células T activadas y en ratones, las células T_{H2} en particular. Se ha observado que algunos linfocitos presentes en sitios que presentan inflamación pueden producir grandes cantidades de IL-6 *in situ*.¹⁶

La IL-6 funciona como un homodímero en el que cada subunidad forma un dominio globular de cuatro hélices α que caracteriza a las citocinas que se enlazan a receptores de tipo I. El receptor, consiste de una proteína de 60 kDa que se une a la citocina, y a una subunidad de 130 kDa que traduce las señales. La subunidad de enlace, contiene un dominio de inmunoglobulina y un motivo de dos cisteínas/WSXWS, característico de los receptores de citocinas de tipo I, que también muestra la subunidad encargada de la señal de transducción, aunque ésta, no enlaza a IL-6 y parece servir de señalamiento para otras citocinas.¹⁶

Los efectos mas conocidos de la IL-6 son los que ejerce sobre los hepatocitos y las células B. En los primeros, causa la síntesis de varias proteínas plasmáticas, como fibrinógeno, el cual participa en la respuesta de fase aguda, y en los linfocitos B activados, en los que actúa como factor de crecimiento durante la fase tardía de la diferenciación (Figura 10).^{17,20}

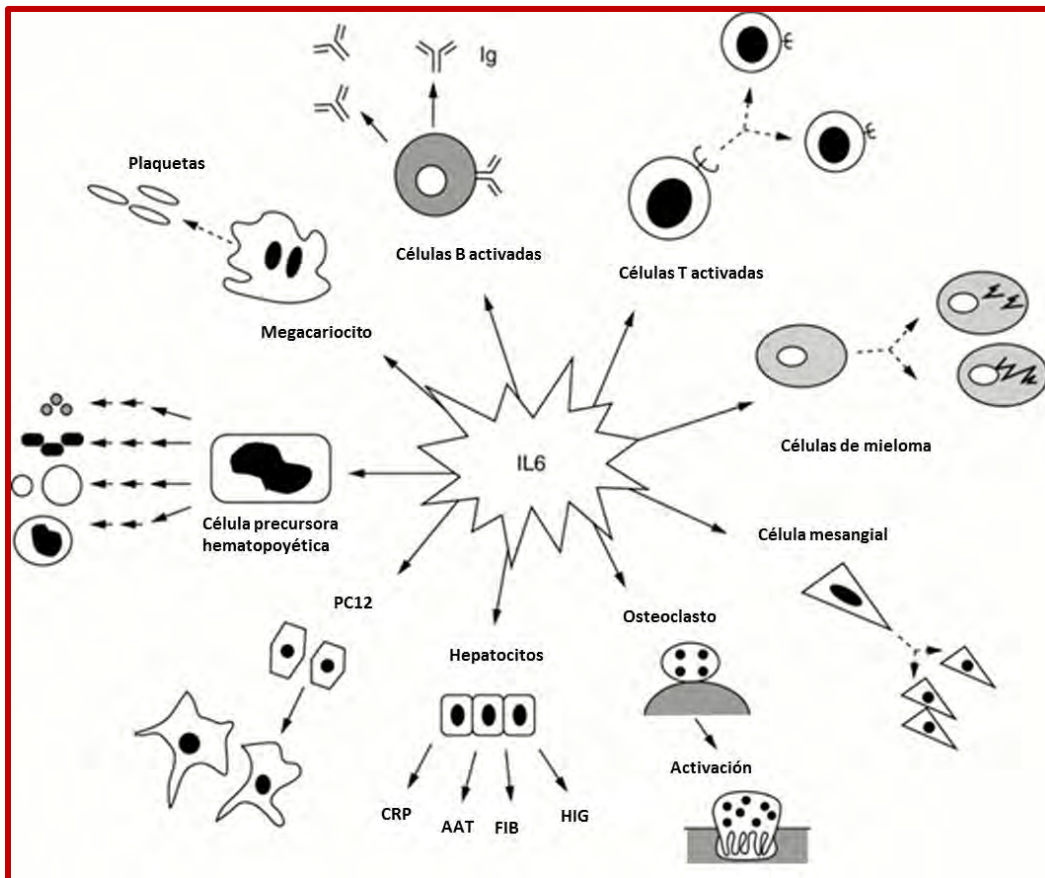


Figura 10. Funciones de IL-6. La IL-6 es una citocina pleiotrópica con una amplia gama de actividades biológicas.²⁰

1.12.2 Interleucina 10 (IL-10)

La interleucina 10 es una citocina de 18 kDa que producen los macrófagos activados, algunos linfocitos y tipos celulares no linfocíticos, como los queratinocitos.¹⁶

Es miembro de la familia de citocinas de cuatro hélices α que parece funcionar como un homodímero y que corresponde a la categoría de citocinas T_H2 . En consecuencia, puede inhibir la producción de varias citocinas, entre ellas IL-2, IL-3, IL-6, IL-1, IFN- γ y TNF.¹⁸

Las principales actividades de la IL-10 consisten en inhibir en los macrófagos, la producción de citocinas, como TNF, IL-1, IL-6 quimiocinas e IL-12, así como las funciones accesorias en la activación de células T, al reducir la

expresión de moléculas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Asimismo, inhibe la producción de IL-2, IL-3 e IFN- γ , y la proliferación de células T dependiente de monocitos, debido en parte a la disminución marcada que ejerce en la síntesis de una variedad de citocinas. El efecto neto de estas acciones es inhibir la inflamación innata e inmune mediada por células T. (Figura 11).^{16,18,21}

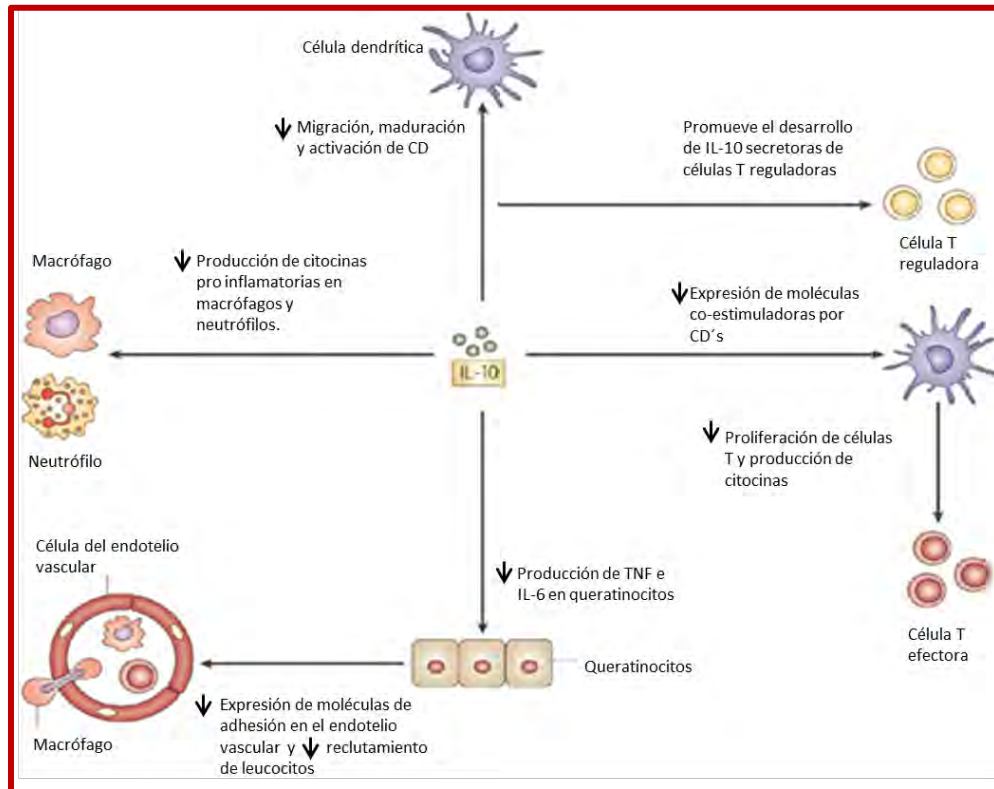


Figura 11. La IL-10 es una citocina pleiotrópica con funciones inmunorregulatorias importantes cuyas acciones influyen en las actividades de diferentes tipos celulares en el sistema inmunológico. Es una citocina con potentes propiedades antiinflamatorias, reprimiendo la expresión de citocinas inflamatorias como TNF α , IL-6 e IL-1 por macrófagos activados.²¹

2. JUSTIFICACIÓN

Una de las finalidades de estudiar la angiogénesis es por que los procesos inflamatorios incrementan la formación de vasos y suprimir la angiogénesis sería una ventaja para prevenir metástasis en cáncer.

Alteraciones pulmonares como fibrosis, asma y tromboembolia están caracterizadas por inflamación vascular crónica y su consecuencia, angiogénesis con remodelación y crecimiento de la vasculatura sistémica.^{8, 19, 31}

En la respuesta inflamatoria derivada del daño vascular, ocurre liberación e incremento de diferentes factores de crecimiento, moléculas de adhesión y citocinas que actúan sobre las células que participan en la remodelación vascular (inflamatorias, endoteliales y de músculo liso así como en la matriz extracelular).³²

Los diseños experimentales en los que se liga la arteria pulmonar izquierda para provocar obstrucción e isquemia, constituyen un modelo de obstrucción pulmonar crónica con la subsecuente generación del proceso angiogénico, lo que permite investigar mecanismos de neovascularización.^{4, 19, 30-32.}

La angiogénesis, demanda amplia investigación en diferentes campos que involucren el desarrollo de modelos experimentales en los que sea posible, una vez que el modelo sea reproducible, evaluar la participación de diferentes mediadores y la eficacia de fármacos con la finalidad de aplicar los resultados obtenidos, en el área clínica.

3. HIPÓTESIS

Al ligar la arteria pulmonar izquierda, se detiene el flujo sanguíneo al pulmón izquierdo (isquemia) desencadenando la formación de nuevos vasos a partir de la pared costal izquierda para compensar el aporte sanguíneo, entonces:

- 1) Se desarrollará un proceso inflamatorio (toracotomía y ligadura de la arteria pulmonar izquierda) que estimulará la actividad angiogénica tanto en la pared costal izquierda como en el pulmón izquierdo y será menor en el hemitórax derecho (pulmón y pared costal) con lo que se observará un incremento en la formación de nuevos vasos, en las expresiones de VEGF y CD-31 así como en los niveles circulantes de IL-10.
- 2) Durante la fase aguda de la inflamación, el incremento en las concentraciones de IL-10 que es una interleucina anti-inflamatoria provocará una disminución en los niveles de IL-6 con propiedades pro-inflamatorias.
- 3) La isquemia, la inflamación y la angiogénesis provocarán un decremento en la distensibilidad.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general:

- 1) Implementar en el laboratorio, un modelo experimental de angiogénesis. Así mismo medir distensibilidad pulmonar.

4.2 Objetivos específicos:

- 1) Implementar un modelo experimental en rata de angiogénesis pulmonar mediante la ligadura de la arteria pulmonar izquierda.
- 2) Evaluar la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y del antígeno CD-31 en tejido pulmonar y costal post- ligadura de la arteria pulmonar izquierda.
- 3) Evaluar los niveles de interleucina 6 e interleucina 10 tanto en suero como en el parénquima pulmonar en forma previa y posterior al desarrollo del proceso angiogénico.
- 4) Evaluar la distensibilidad modificando los parámetros ventilatorios de presión y volumen en forma pre- y post- ligadura de la arteria pulmonar izquierda.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Modelo Experimental

En este proyecto se utilizaron 30 ratas Wistar de cualquier sexo con un peso alrededor de 300 gramos, no relacionadas entre sí. Los animales se mantuvieron en condiciones habituales de bioterio y se manejaron con base en los lineamientos establecidos en las Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Norma Oficial Mexicana, NOM-062-ZOO-1999²² y en la Guide for Care and Use of Laboratory Animals, U.S.A.²³

5.1.1. Criterios de inclusión

Se incluyeron en el estudio, animales sin antecedentes de cualquier enfermedad, sin patología previa.

5.1.2. Criterios de exclusión y eliminación

Se excluyeron y eliminaron del estudio los animales que presentaron cualquier tipo de patología.

5.2 Diseño Experimental

5.2.1. Grupos de Estudio

Los animales fueron divididos al azar en cinco grupos de estudio:

Grupo I, (Control n=6): Las ratas no fueron sometidos a ningún tipo de intervención quirúrgica.

Grupo II (8 días post-LAPI n=6), Grupo III (10 días post-LAPI n=6), Grupo IV (12 días post-LAPI n=6) y Grupo V (15 días post-LAPI n=6). Estos animales fueron sometidos a una toracotomía izquierda y se ligó la arteria pulmonar izquierda durante el periodo de tiempo establecido.

5.2.2. Anestesia y Ventilación

Todos los animales se prepararon con 12 horas de ayuno para sólidos, 8 horas para líquidos y fueron anestesiados ketamina (0.24ml/100mg peso) y xilacina (0.012ml/100mg peso) vía intramuscular. Inmediatamente después, cada una de las ratas se colocó sobre una tabla de cirugía en posición supina, se intubó con una sonda orotraqueal y se conectó a un ventilador (Viasys Respiratory Care, AVEA™), manteniendo una frecuencia respiratoria de 90 resp/min. Se realizó tricotomía y asepsia en la región de abordaje quirúrgico (Figura 12) y se registraron las mediciones basales de distensibilidad (Capítulo 5.3.1).

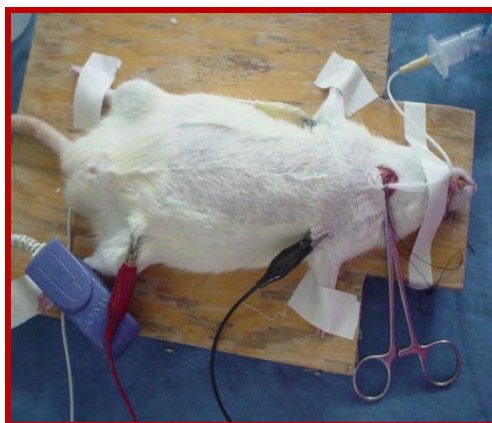


Figura 12. Animal colocado sobre la tabla de cirugía en posición supina, intubado con una sonda orotraqueal conectada al ventilador marca AVEA™.

Una vez concluidas las mediciones basales de la distensibilidad en los animales del grupo control, se procedió a la eutanasia de estos animales para la obtención y procesamiento de muestras (Capítulo 5.2.3).

Inmediatamente después de obtener las mediciones basales de distensibilidad, en los animales de los grupos II-V (LAPI), se realizó una toracotomía izquierda a nivel del tercer espacio intercostal hasta abordar la cavidad pleural. Se identificó la arteria pulmonar izquierda y se ligó con seda 6-0 en forma previa al cierre convencional del tórax (Figura 13). Se procedió a identificar cada una de las ratas con tinta indeleble, se colocaron dentro de su caja se mantuvieron bajo condiciones de bioterio durante el periodo de estudio.

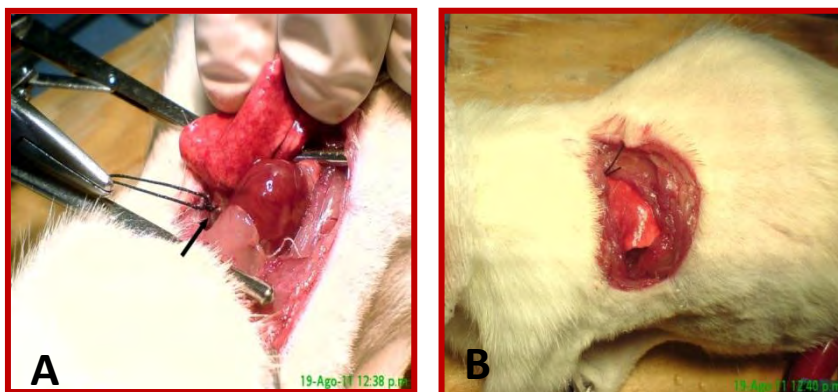


Figura 13 (A-B). A: Toracotomía a nivel del tercer espacio intercostal. B: Ligadura de la arteria pulmonar izquierda.

Concluido el tiempo de re-estancia en el bioterio, las ratas de los grupos II, III, IV y V se prepararon con 12 horas de ayuno para sólidos y 8 horas para líquidos, fueron anestesiados con una dosis de ketamina (0.24ml/100mg peso) con xilacina (0.012ml/100mg peso) vía intramuscular. Inmediatamente después, cada una de las ratas se colocó sobre una tabla de cirugía en posición supina, se intubó con sonda orotraqueal y se conectó a un ventilador (Viasys Respiratory Care, AVEA™), manteniendo una frecuencia respiratoria de 90 resp/min. Se realizó tricotomía y asepsia en la región de abordaje quirúrgico (hemotórax izquierdo) y se registraron las mediciones de distensibilidad (final) de forma previa al fin de estudio (Capítulo 5.3). Una vez obtenido el registro de la distensibilidad “final”, se procedió a la toma de muestras de sangre y tejidos pulmonar y costal (Capítulo 5.2.3).

5.2.3 Obtención y procesamiento de muestras

Concluido el registro de distensibilidad y antes de la eutanasia se obtuvo una muestra de sangre del ventrículo izquierdo. Inmediatamente después, las ratas fueron sometidas a eutanasia mediante una sobredosis de anestésico. Se disecaron ambos pulmones y la pared costal.

Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 2500 rpm, 4°C durante 15 minutos. Se separó el suero y se almacenó a -35° C hasta el momento de realizar las determinaciones de las interleucinas 6 y 10.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las muestras de tejido pulmonar y de pared costal se procesaron para realizar las evaluaciones histológicas, inmunohistoquímicas (VEGF y CD-31) y las concentraciones de las interleucinas 6 y 10 mediante la técnica de ELISA.

Para la evaluación histológica e inmunohistoquímica se tomó un segmento del pulmón derecho, un segmento del pulmón izquierdo, un segmento de la pared costal derecha y un segmento de la pared costal izquierda en formol al 10%, manteniéndolas durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, las muestras se procesaron para su inclusión en bloques de parafina (Figura 14). Con ayuda de un microtomo se obtuvieron cortes de 2 μ m y 4 μ m. Los cortes de 2 μ m se montaron sobre laminillas silanizadas que fueron utilizados para las determinaciones inmunohistoquímicas de la expresión de VEGF y CD-31. Los cortes de 4 μ m fueron teñidos con hematoxilina-eosina y tricrómica de Masson para realizar la evaluación histológica.

Una vez que se tomaron las biopsias de tejido pulmonar para la realización de las evaluaciones inmunohistoquímica e histológica, se tomó una muestra de pulmón derecho y otra de pulmón izquierdo de 200 mg cada una. Estas muestras de tejido pulmonar, se lavaron con solución fisiológica y posteriormente, se homogeneizaron con ayuda de un Polytron (WERKE, IKA[®]) utilizando 300 μ l de la misma solución. Los homogeneizados de pulmón derecho y de pulmón izquierdo así obtenidos fueron centrifugados a 2500 rpm durante 15 minutos manteniendo una temperatura de 4°C (Beckman, Centrifuge GS-6R). Concluido el tiempo de centrifugación, se separó el sobrenadante que se mantuvo almacenado a -35°C hasta el momento de realizar las determinaciones de las interleucinas 6 y 10.



Figura 14. Inclusión de tejido pulmonar y de pared costal en bloques de parafina.

En el siguiente diagrama de flujo, se resumen los procedimientos experimentales abordados en el estudio:

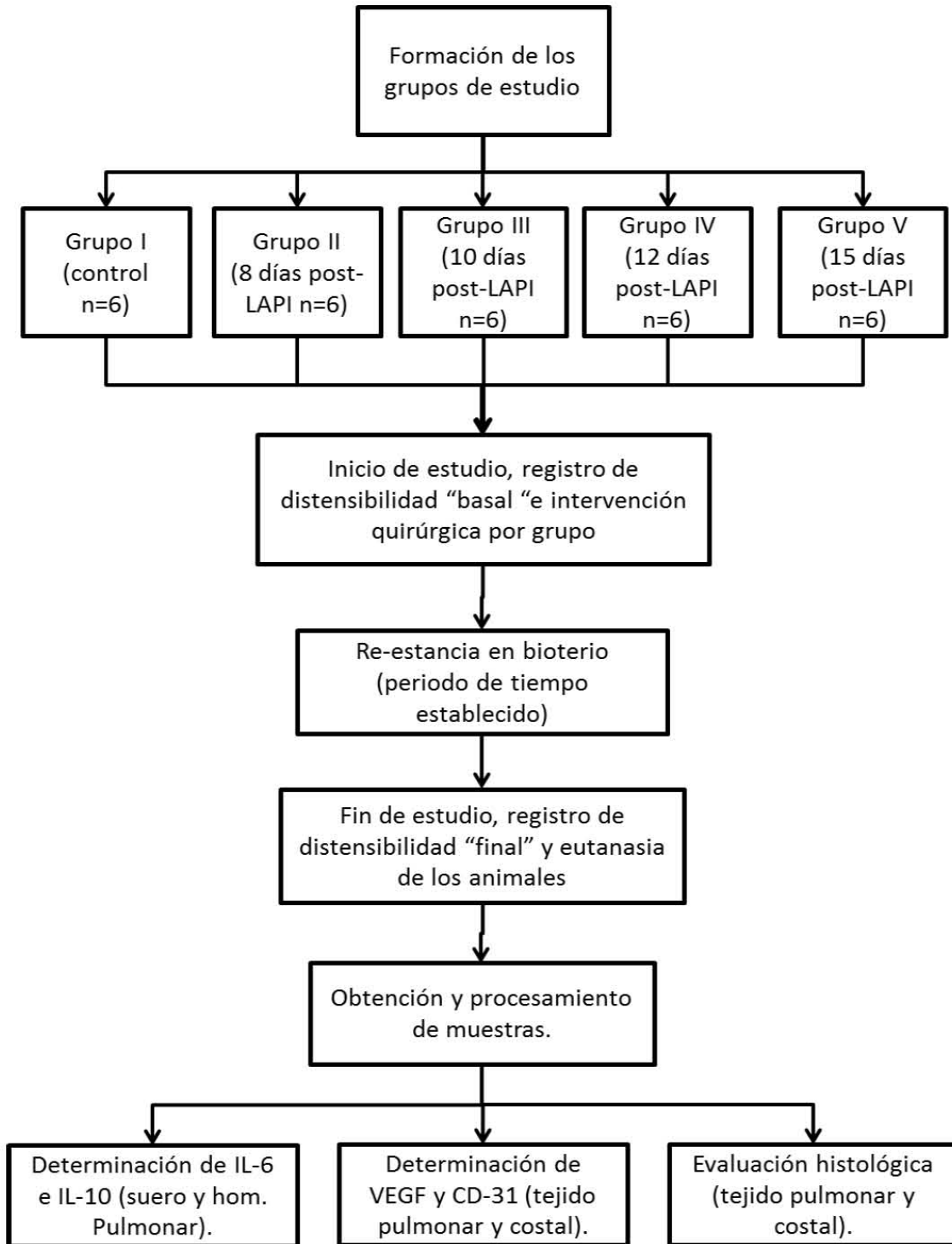


Diagrama de flujo del diseño experimental.

5.3 Evaluaciones

5.3.1 Distensibilidad pulmonar

Se obtuvo un registro de la distensibilidad pulmonar al inicio y antes de finalizar el estudio de la siguiente manera: en forma inmediata posterior a la intubación orotraqueal y una vez que los animales fueron conectados al ventilador con una fracción inspirada de oxígeno (FiO₂) del 21% y una presión inspiratoria (PI) de 14 cmH₂O, se registró la distensibilidad, obtenido este registro, se incrementó la presión inspiratoria a 16 cmH₂O, se registró la distensibilidad y posteriormente se obtuvo un nuevo registro a 18 cmH₂O. Concluidos los tres registros de distensibilidad (14, 16 y 18 cmH₂O) con una FiO₂ del 21%, se incrementó la FiO₂ al 100% y se ajustó una presión inspiratoria de 14 cmH₂O, estas condiciones se mantuvieron durante 5 minutos, transcurrido este tiempo, se pinzó la sonda orotraqueal durante 1 minuto (esto, indujo periodo de apnea en donde la distensibilidad llegó a cero) y se despinzó la sonda orotraqueal para registrar la distensibilidad. Acto seguido, se registró la distensibilidad pulmonar incrementando la presión inspiratoria a 14 cmH₂O, 16 cmH₂O y 18 cmH₂O. El esquema de medición de la distensibilidad bajo estos parámetros se ilustra en la Tabla 1.

<i>Parámetros para la obtención de la distensibilidad al inicio y fin de estudio.</i>							
<i>Inicio de estudio (tórax cerrado)</i>	<i>FiO₂= 21 % PI= 14 cmH₂O</i>	<i>FiO₂= 21 % PI= 16 cmH₂O</i>	<i>FiO₂= 21 % PI= 18 cmH₂O</i>	<i>5min FiO₂=100 % PI= 14 cmH₂O + 1 min de apnea.</i>	<i>FiO₂=100 % PI= 14 cmH₂O</i>	<i>FiO₂=100 % PI= 16 cmH₂O</i>	<i>FiO₂=100 % PI= 18 cmH₂O</i>
<i>Fin de estudio (tórax cerrado)</i>	<i>FiO₂= 21 % PI= 14 cmH₂O</i>	<i>FiO₂= 21 % PI= 14 cmH₂O</i>	<i>FiO₂= 21 % PI= 14 cmH₂O</i>	<i>5 min FiO₂=100 % PI= 14 cmH₂O + 1 min de apnea.</i>	<i>FiO₂=100 % PI= 14 cmH₂O</i>	<i>FiO₂=100 % PI= 16 cmH₂O</i>	<i>FiO₂=100 % PI= 18 cmH₂O</i>

Tabla 1. Esquema de registro para distensibilidad pulmonar.

5.3.2 Determinación inmunohistoquímica (VEGF y CD-31)

Se evaluó la expresión del VEGF y de CD-31 en el pulmón derecho, en el pulmón izquierdo, en la pared costal derecha y en la pared costal izquierda mediante la técnica inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo (Rat VEGF Antibody, R&D Systems, AF564 para la determinación del VEGF y CD-31 Antibody Rabbit Polyclonal, Abbiotec, 250590 para la determinación de CD-31), el sistema estreptavidina-biotina-peroxidasa, tinción con hematoxilina y contratinción con aminoetilcarbazol de acuerdo con la siguiente técnica:

5.3.2.1 Preparación del tejido

Los cortes de tejido se colocaron en canastillas y se incubaron durante 20 minutos dentro de una estufa (Técnica Científica, IC1437B2) mantenida a una temperatura 56°C para desparafinar. Inmediatamente después el tejido se rehidrató y clarificó mediante una inmersión seriada en xilol (Golden Bell Reactivos, 09101363) (10 minutos), etanol absoluto (Golden Bell Reactivos, 09101363) (2 minutos), etanol al 90% (2 minutos), etanol al 70% (2 minutos), agua (10 minutos) y TBST (Tris Buffered Saline Tween 20) (10 minutos).^{24, 25}

5.3.2.2 Exposición y recuperación del antígeno

Concluida la preparación del tejido, las laminillas se colocaron en una caja de Coplin sumergidas en una solución amortiguadora de citratos (pH: 6.0). La recuperación del antígeno se realizó colocando la caja de Coplin en el horno de microondas máximo nivel durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo, la caja de Coplin se retiró del horno y se mantuvo a temperatura ambiente para su enfriamiento.^{24,25}

5.3.2.3 Eliminación de la peroxidasa endógena

Una vez alcanzada la temperatura ambiente, las laminillas se sometieron a tres lavados seriados de cinco minutos con solución TBST. Con ayuda de un marcador (Mini Pap-Pen, Invitrogen) y con la finalidad de concentrar el área de reacción antígeno-anticuerpo se delimitó el tejido pulmonar y costal.

Las laminillas se escurrieron sobre papel absorbente, se colocaron dentro de una cámara de incubación húmeda mantenida a temperatura ambiente, se adicionaron 100µL de una solución de peróxido de hidrógeno al 3% y transcurridos 15 minutos se realizaron tres lavados seriados de cinco minutos cada uno con solución TBST.^{24,25}

5.3.2.4 Bloqueo del pegado inespecífico / Primer anticuerpo

Las laminillas se escurrieron sobre papel absorbente y se adicionaron 100µL de suero bloqueador y después de una incubación de 15 minutos a temperatura ambiente, se realizaron tres lavados seriados de cinco minutos cada uno con solución TBST.^{24,25}

Las laminillas se escurrieron sobre papel absorbente y se adicionaron 100µL del primer anticuerpo (anti-VEGF y anti-CD-31 respectivamente, dilución 1:100 en TBST) complementado con suero bloqueador. Las laminillas se incubaron durante 24 horas a una temperatura de 4°C.^{24,25}

5.3.2.5 Reacción streptavidina-biotina-peroxidasa

Transcurrido el tiempo de incubación a 4°C se realizaron tres lavados seriados de cinco minutos cada uno con solución TBST. Las laminillas se escurrieron sobre papel absorbente, se adicionaron 100µL del anticuerpo “biotilnado” y después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente se realizaron tres lavados seriados de cinco minutos cada uno con solución TBST en forma previa a la adición de 100µL del conjugado streptavidina-biotina-peroxidasa. Transcurridos 15 minutos se realizaron tres lavados seriados de cinco minutos cada uno con solución TBST y las laminillas se escurrieron sobre papel absorbente.^{24,25}

5.3.2.6 Visualización de la reacción antígeno-anticuerpo

Se adicionaron 100µL de una solución acuosa de amino-etil-carbazol diluido en peróxido de hidrógeno y después de cinco minutos de incubación a temperatura ambiente las laminillas se enjuagaron en agua corriente en forma

previa a la adición de una gota de una solución de hematoxilina. Después de treinta segundos, las laminillas se enjuagaron con agua corriente en forma previa a la incorporación de 100µL de una solución saturada de carbonato de litio y al montaje en medio acuoso.^{24,25}

5.3.3 Determinación de las Interleucinas 6 y 10 mediante la técnica de ELISA

Para la determinación de las concentraciones de las interleucinas 6 y 10 en suero y en homogenizados de tejido pulmonar, se utilizó un Kit comercial (Human IL-10 ELISA, Bioscience, BMS215/2 y Human IL-6 ELISA, Bioscience, BMS213/2) y el método de Elisa. La técnica se realizó de la siguiente forma:

5.3.3.1 Preparación de la curva estándar

IL-10

Se preparó una curva estándar incluyendo cada uno de los estándares por duplicado. A partir de un estándar liofilizado con concentración 400 pg/ml de IL-10 que se reconstituyó con agua destilada de acuerdo con las instrucciones del fabricante, se prepararon los estándares de IL-10 con concentraciones de 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.3 y 3.1 pg/ml. Se consideró un par de pozos “blanco” que únicamente contenían el buffer de ensayo (control negativo). (Figura 15).²⁶

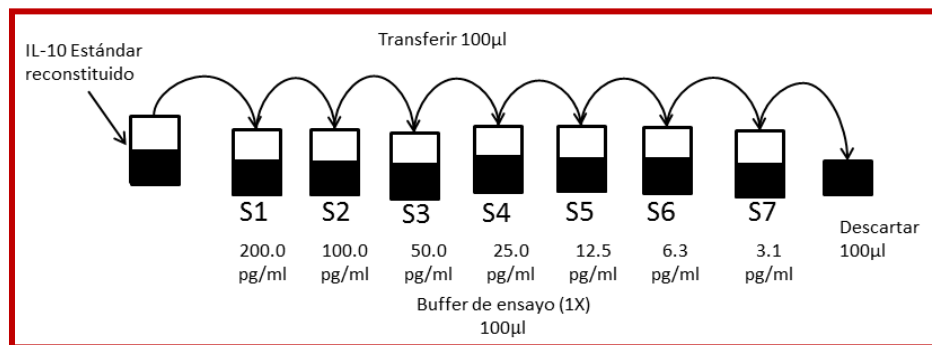


Figura 15. Preparación de la curva estándar de IL-10.

IL-6

Se preparó una curva estándar incluyendo cada uno de los estándares por duplicado. A partir de un estándar liofilizado con concentración 200 pg/ml de IL-6

que se reconstituyó con agua destilada de acuerdo con las instrucciones del fabricante, se prepararon los estándares de IL-6 con concentraciones de 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13 y 1.56 pg/ml. Se consideró un par de pozos “blanco” que únicamente contenían el buffer de ensayo (control negativo). (Figura 16).²⁷

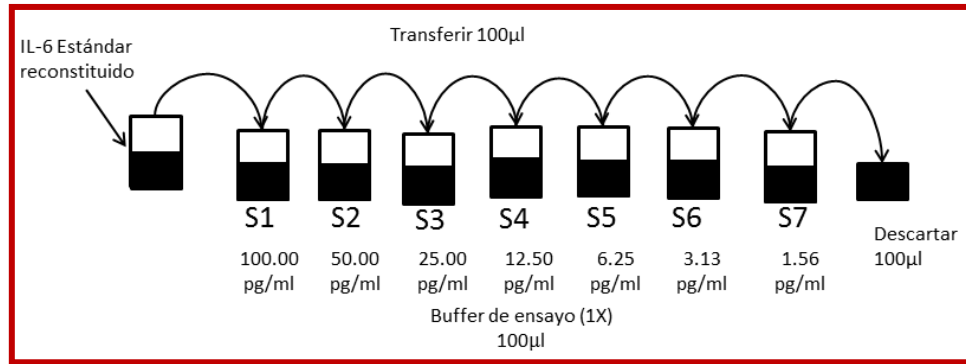


Figura 16. Preparación de la curva estándar de IL-6.

Muestras problema

Cada una de las muestras de suero y de homogeneizados de tejido pulmonar (derecho e izquierdo) se incluyeron por duplicado en el ensayo de ambas interleucinas.

5.3.3.2 Reacción con biotina.

A todos los pozos (blanco, estándares y muestras) se les adicionó buffer de ensayo y el conjugado de biotina. La placa se incubó a una temperatura de 25°C manteniendo una agitación de 100 rpm durante 2 horas. Terminado el tiempo de incubación, se realizaron tres lavados seriados con el buffer de lavado. Removiendo así el anticuerpo y el conjugado de biotina no ligado.^{26,27}

5.3.3.3 Reacción con streptavidina HRP. (Streptavidin horseradish peroxidase)

Se añadieron 100µl de streptavidina HRP a todos los pozos. La placa se incubó a una temperatura de 25°C con agitación de 200rpm durante 1 hora. Al término de este tiempo se realizaron tres lavados seriados con buffer de lavado. Removiendo la streptavidina HRP no unida.^{26,27}

5.3.3.4 Visualización de la reacción.

Después de los lavados, se colocó la solución sustrato TMB (Tetrametilbenzidina) y la placa se incubó a una temperatura de 25°C durante 10 minutos sin exposición a la luz intensa, transcurrido el tiempo de incubación, la reacción se detuvo adicionando la “solución stop”. La concentración de ambas interleucinas es directamente proporcional a la intensidad de la reacción colorida. Finalmente, las placas de ambas interleucinas fueron leídas a una absorbancia de 450nm y se calcularon las concentraciones (Figura 17).^{26,27}



Figura 17. Placa de Elisa en el espectrofotómetro, absorbancia a 450nm.

5.3.4 Evaluación histológica.

Utilizando un microscopio (OLYMPUS optical, CH30), se realizó una evaluación histológica del tejido pulmonar (derecho e izquierdo) y de la pared costal (derecha e izquierda). Esta evaluación incluyó un registro de: a) formación de nuevos vasos, presencia de inflamación, hemorragia, edema y fibrosis utilizando las laminillas teñidas con hematoxilina-eosina y con tricrómica de Masson. Para evaluar estos parámetros se estableció una escala subjetiva en donde: 0 corresponde a una muestra de tejido pulmonar o de pared costal sin alteraciones, 1 corresponde a una muestra con un ligero grado de alteraciones, 2 corresponde a una muestra con un grado moderado de trastornos y 3 corresponde a una muestra con un grave grado de alteraciones.

Las laminillas de tejido pulmonar y de pared costal fueron sumergidas en xilol durante 30 minutos, concluido este tiempo, los tejidos se rehidrataron colocándolos durante 3 minutos en alcohol absoluto seguido de 3 minutos en alcohol al 96% y de 3 minutos en alcohol al 70%. Se enjuagaron en agua destilada y se procesaron para su tinción con henatoxilina-eosina y tricrómica de Masson de la siguiente manera²⁸:

Tinción Hematoxilina-Eosina: Las laminillas se colocaron en el colorante hematoxilina de Harris durante 15 minutos, se lavaron con agua y se enjuagaron con agua destilada. Inmediatamente después se sumergieron en una solución saturada de carbonato de litio hasta observar un cambio en el color del colorante, se lavaron con agua corriente y agua destilada y se colocaron en eosina durante 2 minutos, se repitió el lavado con agua corriente y agua destilada y se deshidrataron los tejidos colocándolos de manera seriada en alcohol al 70%, alcohol al 96% y finalmente en alcohol absoluto. Se aclaró el tejido con xilol y se fijó con resina.²⁸

Tinción Tricrómica de Masson: Las laminillas se colocaron en el colorante hematoxilina férrica durante 10 minutos, se lavaron con agua corriente y se enjuagaron con agua destilada. Después se sumergieron en la solución de escarlata-fucsina acida durante 5 minutos, se lavaron con agua corriente y se enjuagaron con agua destilada, inmediatamente después se les colocó ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico durante 15 minutos y después el colorante azul de anilina durante 15 minutos, se repitió el lavado con agua corriente y agua destilada, se les colocó ácido acético al 1% para diferenciar y se deshidrataron los tejidos colocándolos de manera seriada en alcohol al 70%, alcohol al 96% y finalmente en alcohol absoluto. Se aclaró con xilol y se fijó con resina.^{28, 29}

6. RESULTADOS

6.1 Distensibilidad pulmonar

Distensibilidad pulmonar basal con una fracción inspirada de oxígeno al 21% ($FiO_2=21\%$).

Los resultados de distensibilidad expresada en (cmH₂O) basal promedio \pm desviación estándar obtenidos con una FiO_2 de 21% y una presión inspiratoria de 14 cmH₂O fueron 1.1129 \pm 0.02430 en el grupo control, 1.0950 \pm 0.00707 en grupo II, 1.1100 \pm 0.14142 en grupo III, 1.1000 \pm 0.01414 en grupo IV y 1.1000 \pm 0.14142 grupo V. Al incrementar la presión inspiratoria a 16 cmH₂O, la distensibilidad basal promedio del grupo control fue 1.0871 \pm 0.01976 y 1.0950 \pm 0.06364 en grupo II, 1.1400 \pm 0.12728 en grupo III, 1.1200 \pm 0.01414 en grupo IV y 1.0500 \pm 0.07071 en grupo V. Cuando se incrementó la presión inspiratoria a 18 cmH₂O, la distensibilidad basal promedio del grupo control fue 1.1029 \pm 0.03147, mientras que, 1.1250 \pm 0.04950 en grupo II, 1.1750 \pm 0.10607 en grupo III, 1.1400 \pm 0.02828 en grupo IV y 1.1050 \pm 0.06364 en grupo V. Estos resultados se muestran en la tabla 2 se ilustran en la gráfica 2.

Distensibilidad pulmonar basal con una fracción inspirada de oxígeno al 100% ($FiO_2=100\%$) y presión inspiratoria de 14 cmH₂O manteniendo 1 minuto de apnea.

Al aumentar la FiO_2 al 100% con una presión inspiratoria de 14 cmH₂O los animales fueron sometidos a un minuto de apnea obteniendo los siguientes resultados de distensibilidad basal. 1.0386 \pm 0.11364 en grupo control, 0.8550 \pm 0.00707 en grupo II, 0.7200 \pm 0.01414 en grupo III, 0.9550 \pm 0.00707 en grupo IV y 0.8850 \pm 0.02121 en grupo V. Estos resultados se muestran en la tabla 2 y se ilustran en la gráfica 3.

Distensibilidad pulmonar basal con una fracción inspirada de oxígeno al 100% ($FiO_2=100\%$).

Los resultados de distensibilidad basal promedio \pm desviación estándar obtenidos con una FiO_2 de 100% y una presión inspiratoria de 14 cmH₂O en el grupo control fue 1.1600 ± 0.03830 , 1.1150 ± 0.10607 en grupo II, 1.0200 ± 0.05657 en grupo III, 1.0900 ± 0.01414 en grupo IV y 1.1000 ± 0.15556 en grupo V. Al incrementar la presión inspiratoria a 16 cmH₂O, la distensibilidad basal promedio en el grupo control fue 1.0657 ± 0.03409 , 1.0000 ± 0.09899 en grupo II, 1.0350 ± 0.06364 en grupo III, 1.0950 ± 0.00707 en grupo IV y 1.0300 ± 0.01414 en grupo V. Cuando se incrementó de nuevo la presión inspiratoria a 18 cmH₂O, la distensibilidad basal promedio en el grupo control fue 1.1200 ± 0.08246 , 1.0100 ± 0.11314 en grupo II, 1.0300 ± 0.07071 en grupo III, 1.0950 ± 0.00707 en grupo IV y 1.0300 ± 0.04243 en grupo V. Estos resultados se muestran en la tabla 2 y se ilustran en la gráfica 4.

Distensibilidad pulmonar al final del estudio correspondientes al grupo con ligadura de la arteria pulmonar izquierda, con una fracción inspirada de oxígeno al 21% ($FiO_2=21\%$).

Los resultados de distensibilidad (cmH₂O) promedio \pm desviación estándar obtenidos al finalizar el estudio, con una FiO_2 de 21% y una presión inspiratoria de 14 cmH₂O fueron 1.0500 ± 0.04243 en grupo II, 1.0800 ± 0.01414 en grupo III, 1.0850 ± 0.00707 en grupo IV y 1.1450 ± 0.04950 en grupo V. Al incrementar la presión inspiratoria a 16 cmH₂O, la distensibilidad final promedio fue 0.9750 ± 0.02121 en grupo II, 1.0750 ± 0.03536 en grupo III, 1.0900 ± 0.04243 en grupo IV y 1.1200 ± 0.02828 V. Cuando se incrementó la presión inspiratoria a 18 cmH₂O, la distensibilidad final promedio fue 0.9900 ± 0.01414 en grupo II, 1.1050 ± 0.03536 en grupo III, 1.1100 ± 0.05657 en grupo IV y 1.1400 ± 0.02828 en grupo V. Estos resultados se muestran en la tabla 2 y se ilustran en la gráfica 2.

Distensibilidad pulmonar final correspondientes al grupo con ligadura de la arteria pulmonar izquierda, con una fracción inspirada de oxígeno al 100% ($FiO_2=100\%$) y presión inspiratoria de 14 cmH₂O manteniendo 1 minuto de apnea.

Al aumentar la FiO_2 al 100% con una presión inspiratoria de 14 cmH₂O los animales fueron sometidos a un minuto de apnea obteniendo los siguientes resultados de distensibilidad final: 0.8950 ± 0.00707 en grupo II, 0.9350 ± 0.07778 en grupo III, 0.8400 ± 0.22627 en grupo IV y 1.0550 ± 0.09192 en grupo V. Estos resultados se muestran en la tabla 2 y en la gráfica 3.

Distensibilidad pulmonar final con una fracción inspirada de oxígeno al 100% ($FiO_2=100\%$).

Los resultados de distensibilidad final promedio \pm desviación estándar obtenidos con una FiO_2 del 100% y una presión inspiratoria de 14 cmH₂O fueron 1.0350 ± 0.09192 en grupo II, 1.1400 ± 0.04243 en grupo III, 1.0500 ± 0.01414 en grupo IV y 1.1250 ± 0.00707 en grupo V. Al incrementar la presión inspiratoria a 16 cmH₂O, la distensibilidad final promedio fue 0.9550 ± 0.04950 en grupo II, 1.0750 ± 0.06364 en grupo III, 1.0300 ± 0.02828 en grupo IV y 1.0850 ± 0.02121 en grupo V. Cuando se incrementó la presión inspiratoria a 18 cmH₂O, la distensibilidad final promedio fue 0.9700 ± 0.01414 en grupo II, 1.1350 ± 0.00707 en grupo III, 1.0500 ± 0.04243 en grupo IV y 1.1300 ± 0.02828 en grupo V. Estos resultados se muestran en la tabla 2 y se ilustran en la gráfica 4.

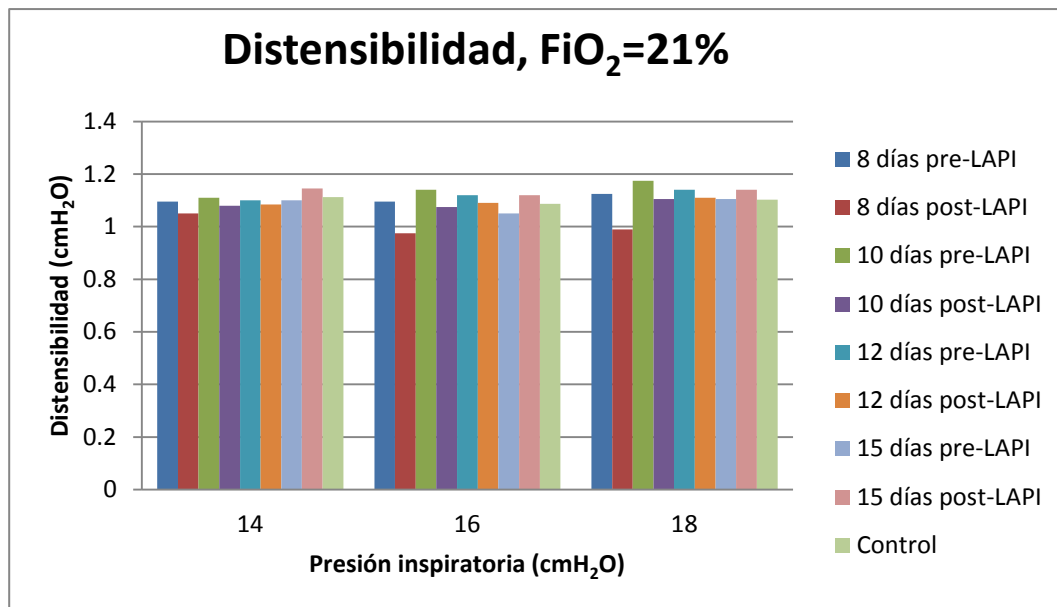
No se encontraron diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon los promedios de distensibilidad basal entre los grupos de estudio (grupo I vs grupos II-V) y tampoco en la distensibilidad final entre los grupos (Kruskal-Wallis: $p>0.05$).

Al realizar la comparación entre los promedios de las distensibilidades inicial y final, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los grupos de estudio (grupo II-V) (U de Mann-Whitney: $p>0.05$).

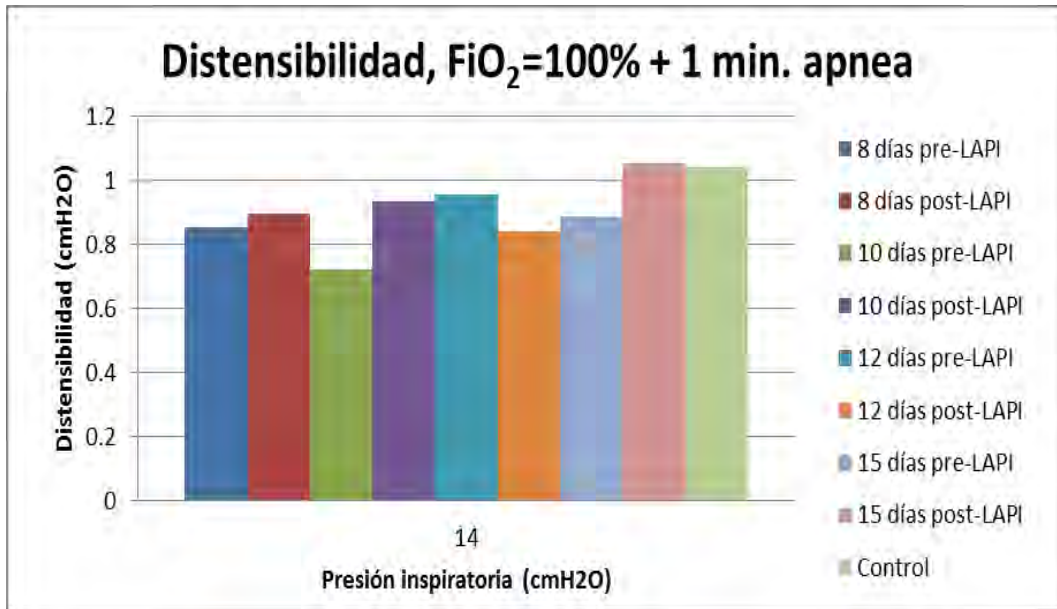
RESULTADOS

FiO ₂	21%			100% + 1 min apnea	100%		
	14	16	18	14	14	16	18
P.I. (cmH ₂ O)							
8 días pre-LAPI	1.0950±0.00707	1.0950±0.06364	1.1250±0.04950	0.8550±0.00707	1.1150±0.10607	1.0000±0.09899	1.0100±0.11314
8 días post-LAPI	1.0500±0.04243	0.9750±0.02121	0.9900±0.01414	0.8950±0.00707	1.0350±0.09192	0.9550±0.04950	0.9700±0.01414
10 días pre-LAPI	1.1100±0.14142	1.1400±0.12728	1.1750±0.10607	0.7200±0.01414	1.0200±0.05657	1.0350±0.06364	1.0300±0.07071
10 días post-LAPI	1.0800±0.01414	1.0750±0.03536	1.1050±0.03536	0.9350±0.07778	1.1400±0.04243	1.0750±0.06364	1.1350±0.00707
12 días pre-LAPI	1.1000±0.01414	1.1200±0.01414	1.1400±0.02828	0.9550±0.00707	1.0900±0.01414	1.0950±0.00707	1.0950±0.00707
12 días post-LAPI	1.0850±0.00707	1.0900±0.04243	1.1100±0.05657	0.8400±0.22627	1.0500±0.01414	1.0300±0.02828	1.0500±0.04243
15 días pre-LAPI	1.1000±0.14142	1.0500±0.07071	1.1050±0.06364	0.8850±0.02121	1.1000±0.15556	1.0300±0.01414	1.0300±0.04243
15 días post-LAPI	1.1450±0.04950	1.1200±0.02828	1.1400±0.02828	1.0550±0.09192	1.1250±0.00707	1.0850±0.02121	1.1300±0.02828
Control	1.1129±0.02430	1.0871±0.01976	1.1029±0.03147	1.0386±0.11364	1.1600±0.03830	1.0657±0.03409	1.1200±0.08246

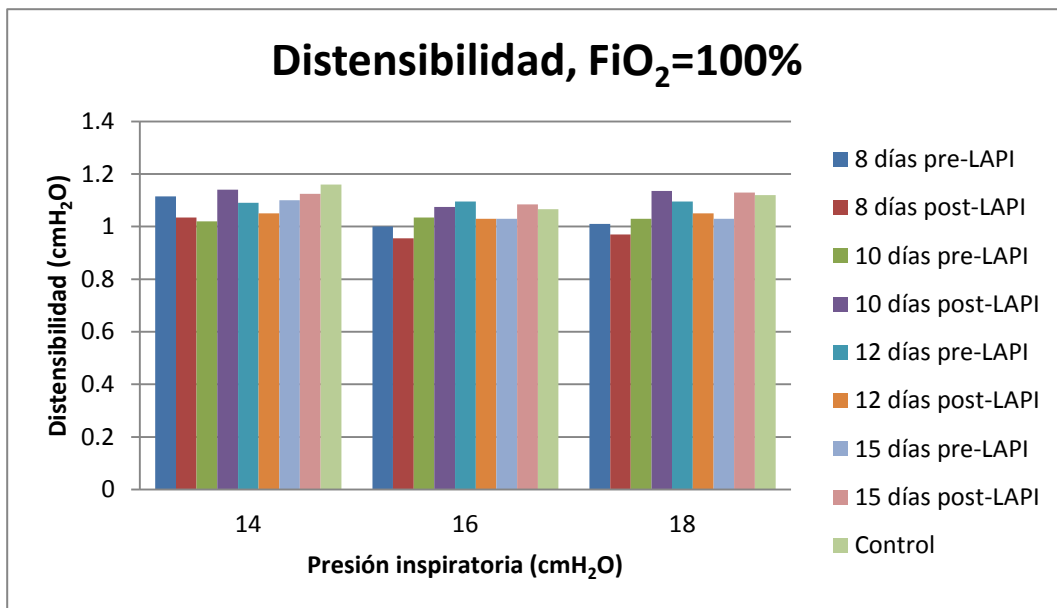
Tabla 2. Distensibilidad promedio ± desviación estándar basal y final en el grupo control y en el grupo con ligadura de la API con base en el número de días post-ligadura (Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney: p>0.05).



Gráfica 2. Distensibilidad basal y final del grupo control y del grupo con ligadura de la API con una FiO₂=21% y diferentes presiones inspiratorias. (Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney: p>0.05).



Gráfica 3. Distensibilidad basal y final del grupo control y del grupo con ligadura de la API con una $FiO_2=100\%$, presión inspiratoria de 14 cmH₂O con un minuto de apnea. (Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney: $p>0.05$).



Gráfica 4. Distensibilidad basal y final del grupo control y del grupo con ligadura de la API con una $FiO_2=100\%$ y diferentes presiones inspiratorias. (Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney: $p>0.05$).

6.2 Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)

No se observó expresión del VEGF en ninguna de las muestras de pulmón (derecho e izquierdo) y de pared costal (derecha e izquierda) del grupo control (Grupo I).

Tampoco en las muestras de pulmón derecho y de pared costal derecha del grupo de animales a los que se les ligó la arteria pulmonar izquierda (Grupos II, III, IV y V) ni en las muestras de pulmón izquierdo y de pared costal izquierda obtenidas en el grupo II (8 días post-LAPI). La expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) ocurrió a partir del grupo III (10 días post-LAPI) y únicamente se observó en las muestras de tejido pulmonar y de pared costal correspondientes al hemitórax izquierdo (ANDEVA: $p < 0.001$). Por lo tanto, este nivel de significancia, nos indica que la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) depende del tiempo de la ligadura de la arteria pulmonar. En la figura 18 se ilustra la expresión positiva del VEGF (tinción marrón) en el pulmón izquierdo y en la pared costal izquierda del grupo de las ratas a las que se les ligó la arteria pulmonar izquierda y el control negativo utilizado en cada uno de los ensayos en ambos tejidos.

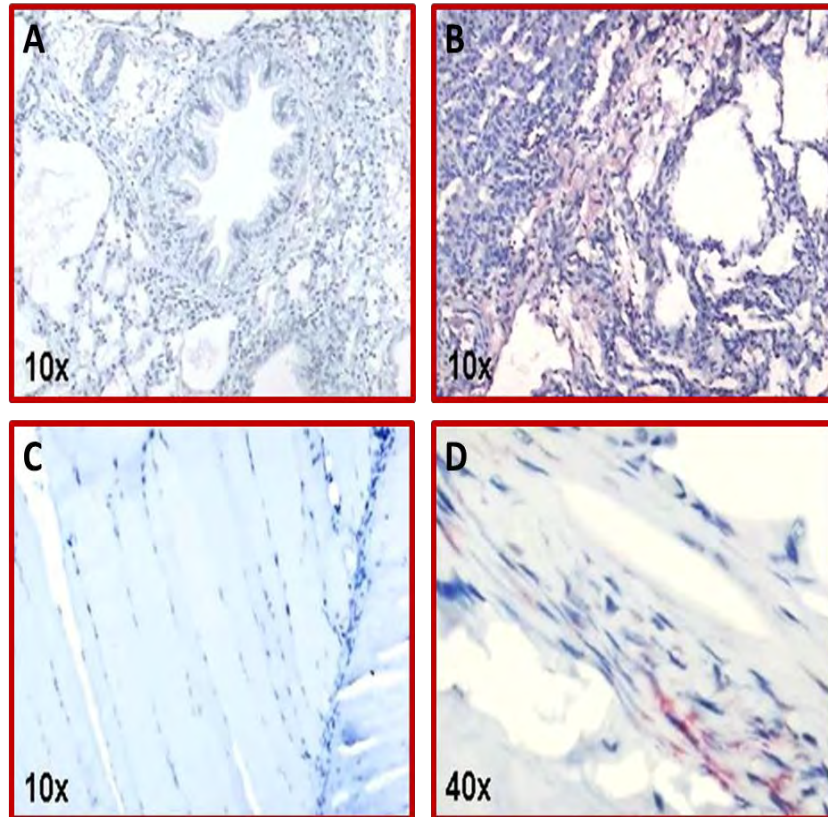


Figura 18 (A-D) Tinción con hematoxilina-contratinción con aminoetilcarbazol. Expresión del VEGF en tejido pulmonar y de la pared costal. A: Tejido pulmonar sin expresión del VEGF (control negativo y muestras de pulmón derecho e izquierdo del grupo control, muestras de pulmón derecho e izquierdo del grupo II). B: Expresión positiva del VEGF en pulmón izquierdo de los grupos III-V. C: Pared costal sin expresión del VEGF (control negativo y muestras de pared costal derecha e izquierda del grupo control, muestras de pared costal derecha e izquierda del grupo II). D: Expresión positiva del VEGF en la pared costal izquierda de los grupos III-V (a partir del día 10). Fotos A, B, y C (10x), D (40x).

6.3. Molécula de adhesión celular al endotelio plaquetario. (PECAM-1 o CD-31).

No se observó expresión de CD-31 en ninguna de las muestras de pulmón (derecho e izquierdo) y de pared costal (derecha e izquierda) del grupo control (Grupo I).

Tampoco en las muestras de pulmón derecho y de pared costal derecha del grupo de animales a los que se les ligó la arteria pulmonar izquierda (Grupo II-V) ni en las muestras de pulmón izquierdo y de pared costal izquierda obtenida en el grupo II. La expresión de CD-31 ocurrió a partir del grupo III y únicamente se observó en las muestras de tejido pulmonar y de pared costal correspondientes al

hemitórax izquierdo (ANDEVA: $p < 0.001$). Por lo tanto, este nivel de significancia, nos indica que la expresión de CD-31 depende del tiempo de la ligadura de la arteria pulmonar. En la figura 19 se ilustra la expresión positiva de CD-31 (tinción marrón) en la pared costal izquierda del grupo de ratas a las que se les ligó la arteria pulmonar izquierda y en la figura 20 se observa la expresión positiva (tinción marrón) en el pulmón izquierdo de los animales con la arteria pulmonar ligada.

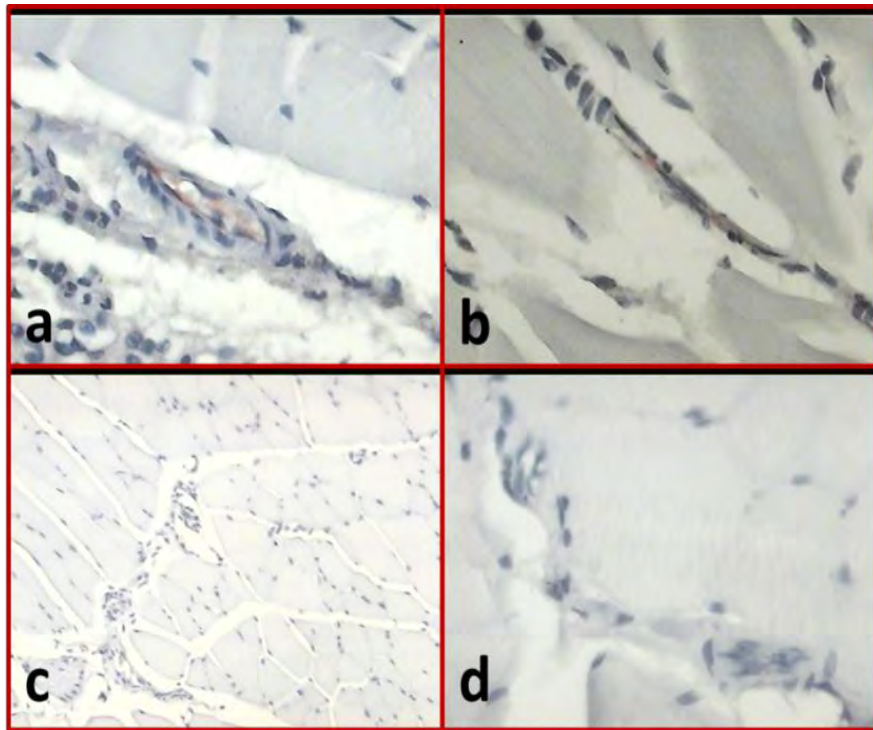


Figura 19. (a-d) Tinción con hematoxilina-contratinción con aminoetilcarbazol. Expresión de CD-31 en pared costal. a, b: Expresión positiva de CD-31 en pared costal izquierda de los grupos III-V. c, d: Pared costal sin expresión de CD-31 (control negativo y muestras de pared costal derecha e izquierda del grupo control, muestras de pared costal derecha e izquierda de grupo II). Fotos c (10x); a, b y d (40x).

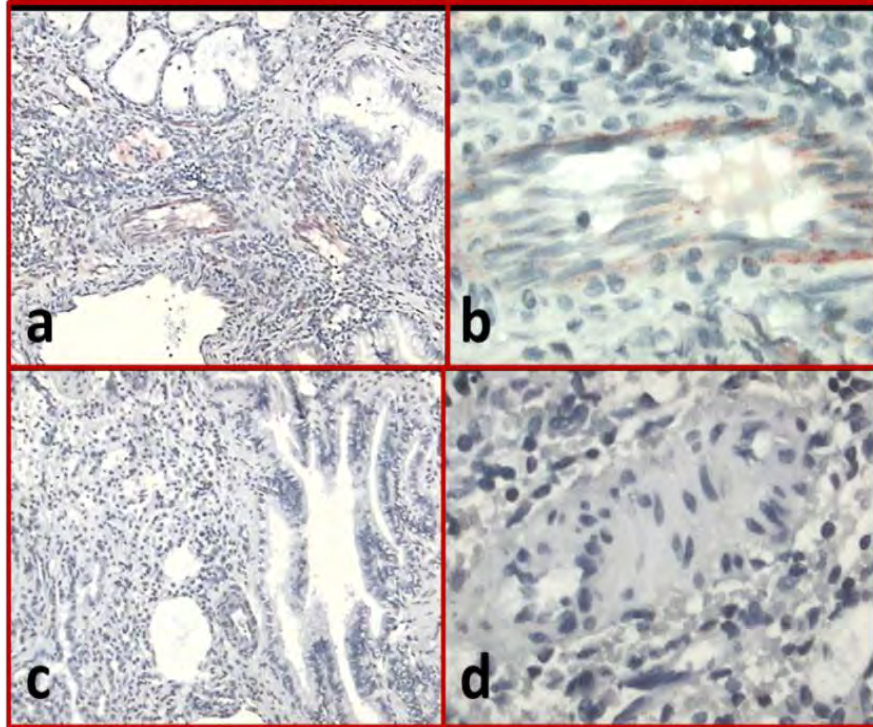


Figura 20. (a-d) Tinción con hematoxilina-contratinción con aminoetilcarbazol. Expresión de CD-31 en tejido pulmonar. a, b: Expresión positiva de CD-31 en el pulmón izquierdo de los grupos III-V. c, d: Tejido pulmonar sin expresión de CD-31 (control negativo y muestras de pulmón derecho e izquierdo del grupo control, muestras de pulmón derecho e izquierdo del grupo II. Fotos a, c (10x) y b, d (40x).

6.4. Interleucina 6 e Interleucina 10

Los resultados de la concentración promedio de IL-6 en suero (pg/ml) \pm desviación estándar obtenidos en el grupo control (grupo I) fue de 0.133 ± 0.01 y en los homogeneizados de tejido pulmonar fueron 5.05 ± 3.12 en el pulmón derecho y 9.18 ± 1.86 en el pulmón izquierdo.

Los resultados de la concentración promedio de IL-6 en suero \pm desviación estándar después de 8 a 10 días post ligadura de la arteria (grupos II y III) fue 0.017 ± 0.01 , y en los homogeneizados de tejido pulmonar fue 4.12 ± 1.95 en el pulmón derecho y 9.03 ± 3.60 en el pulmón izquierdo, mientras que después de 12 a 15 post-LAPI (grupos IV y V) fueron: 0.005 ± 0.01 en suero, 7.06 ± 3.21 en el homogeneizado de pulmón derecho y 3.28 ± 1.39 en el homogeneizado de pulmón izquierdo. Estos resultados se muestran en la tabla 3 y se ilustran en la grafica 5.

Niveles de IL-6 (pg/ml)			
	Suero	Pulmón derecho	Pulmón izquierdo
Control	0.133±0.01	5.05±3.12	9.18±1.86
8-10 días	0.017±0.01	4.12±1.95	9.03±3.60
12-15 días	0.005±0.01	7.06±3.21	3.28±1.39*

Tabla 3. Concentración promedio de IL-6 ± DE en suero y en los homogeneizados de pulmón derecho y de pulmón izquierdo (ANDEVA: p<0.001).

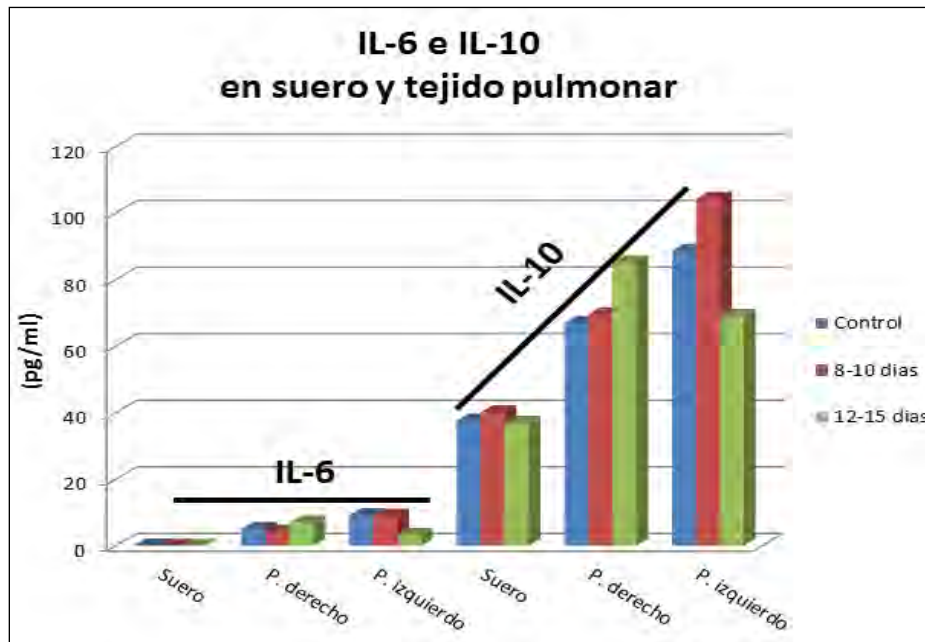
En cuanto a la concentración promedio de IL-10 (pg/ml) ± desviación estándar obtenida en el grupo control (grupo I) fueron de: 37.61±0.57 en suero, 66.93±17.16 en pulmón derecho y 88.57±7.70 en pulmón izquierdo. Los resultados de la concentración promedio de IL-10 ± desviación estándar en los 8-10 días post ligadura de la arteria (grupos II y III) fueron de: 40.12±19.19 en suero, 69.55±9.02 en pulmón derecho y 104.20±18.04 en pulmón izquierdo, mientras que en los días 12-15 post-LAPI (grupos IV y V) fueron de: 36.92±0.05 en suero, 85.10±2.41 en pulmón derecho y 69.08±10.52 en pulmón izquierdo. Estos resultados se muestran en la tabla 4 y en la grafica 5.

Niveles de IL-10 (pg/ml)			
	Suero	Pulmón derecho	Pulmón izquierdo
Control	37.61±0.57	66.93±17.16	88.57±7.70
8-10 días	40.12±19.19	69.55±9.02	104.20±18.04*
12-15 días	36.92±0.05	85.10±2.41	69.08±10.52

Tabla 4. Concentración promedio de IL-10 ± DE obtenido en suero, pulmón derecho y pulmón izquierdo (ANDEVA: p<0.001).

En los cinco grupos de estudio, los niveles de interleucina-6 e interleucina-10 detectados en las muestras de suero fueron significativamente menores a los encontrados en las muestras de homogeneizados de tejido pulmonar (derecho e izquierdo) (ANDEVA: p<0.001). La concentración de interleucina-10 fue significativamente mayor en las muestras de homogeneizado de pulmón izquierdo en los días 8-10 post-ligadura de la API (grupos II y III) que la concentración detectada en los días 12-15 post-ligadura API (grupos IV y V) (ANDEVA + Tukey: p<0.02) y que la concentración encontrada en los pulmones izquierdos y derechos de los grupos control. La concentración de esta interleucina detectada en suero y en tejido pulmonar (derecho e izquierdo), en los cinco grupos de estudio, fue significativamente mayor que la concentración de interleucina-6 detectada en

suero y en tejido pulmonar (derecho e izquierdo) (ANDEVA: $p < 0.001$). Contrariamente al comportamiento de la IL-10, la concentración de interleucina-6 en el tejido pulmonar izquierdo disminuyó significativamente en los días 12-15 post-pinzamiento de la API (grupos IV y V) (ANDEVA + Tukey: $p < 0.05$).



Gráfica 5. Concentración promedio de IL-6 e IL-10 en suero y en homogeneizados de tejido pulmonar (derecho e izquierdo).

6.5. Evaluación histológica

La formación de nuevos vasos, la presencia de inflamación, hemorragia, fibrosis y reacción fibroblástica en la pared costal izquierda de los grupos de animales a los que se les ligó la arteria pulmonar izquierda fue significativamente mayor que los hallazgos histológicos en la pared costal derecha de las ratas de estos mismos grupos y que los encontrados en las pared costal derecha e izquierda de los animales de los grupos control (Kruskas-Wallis: $p < 0.001$). Estos resultados se ilustran en la figura 21.

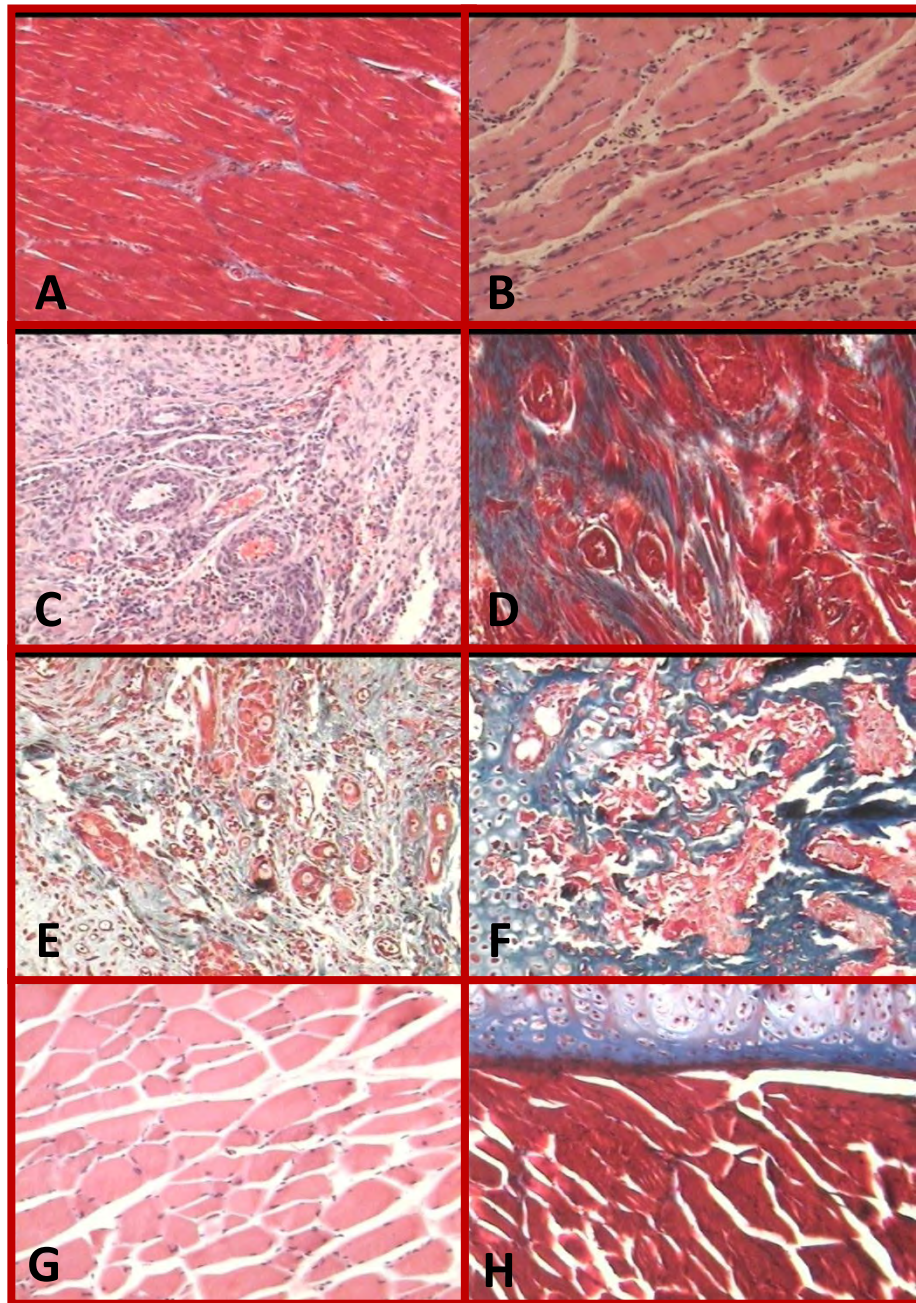


Figura 21. Hallazgos histológicos en la pared costal. A) Formación de nuevos vasos sanguíneos en PCI post-LAPI (tricómica de Masson 10x). B) Formación de nuevos vasos sanguíneos en PCI post-LAPI (H&E 10x). C) Arteriolas engrosadas debido a la inflamación crónica en PCI post-LAPI (H&E 10x). D) Inflamación y fibrosis en PCI post-LAPI (tricómica de Masson 10x). E) Fibrosis en PCI post-LAPI (tricómica de Masson 10x). F) Hemorragia en PCI post-LAPI (tricómica de Masson 10x). G) Pared costal grupo control, no se observan cambios en la estructura (H&E 10x). H) Pared costal derecha grupos con API ligada, no se observan cambios en la estructura (tricómica de Masson 10x).

Los hallazgos histológicos encontrados en los pulmones como la formación de nuevos vasos, la presencia de inflamación, hemorragia, fibrosis y reacción fibroblástica de los grupos de animales a los que se les pinzó la arteria pulmonar izquierda fue significativamente mayor que los hallazgos en el pulmón derecho de las ratas de éstos grupos y que los encontrados en el pulmón derecho e izquierdo de los animales del grupo control (Kruskas-Wallis: $p < 0.001$). Estos resultados se ilustran en la figura 22.

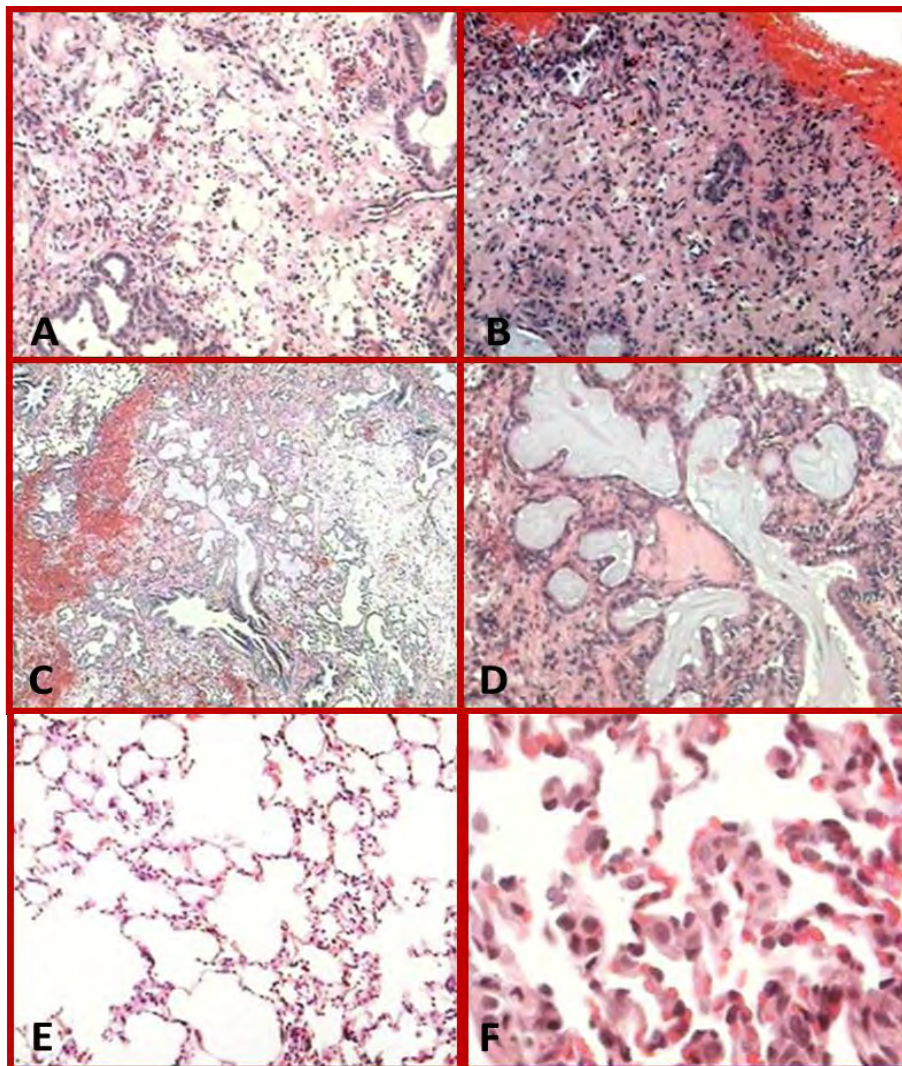


Figura 22. (A-D) Pulmón izquierdo grupo con ligadura de API donde se observan vasos de neoformación, inflamación y hemorragia (H&E, 10x). (E-F) Pulmones grupo control y derecho de los grupos con ligadura de API donde no se observan cambios en la estructura (E: H&E 10x, F: H&E 40x).

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

El objetivo de este trabajo de tesis radicó en implementar un modelo de angiogénesis extrapulmonar en ratas a partir de la ligadura de la arteria pulmonar izquierda, provocar obstrucción del flujo sanguíneo y estimular la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la pared costal izquierda como un mecanismo compensatorio de la isquemia, evaluando el proceso angiogénico durante diferentes días (contados a partir del ligamiento de la arteria pulmonar) en muestras de tejido pulmonar y de pared costal mediante histología y a través de la expresión inmunohistoquímica de VEGF y CD-31 así como determinar los niveles de IL-6 e IL-10 en suero y homogeneizado de tejido pulmonar y de evaluar los cambios en la distensibilidad bajo diferentes condiciones de presión y volumen; proponiendo como hipótesis, que si al ligar la arteria pulmonar izquierda, se detiene el flujo sanguíneo hacia el pulmón izquierdo y la isquemia y el traumatismo desencadenan la formación de nuevos vasos a partir de la pared costal izquierda para compensar el aporte sanguíneo entonces se desarrollará un proceso inflamatorio que estimulará la actividad angiogénica tanto en la pared costal izquierda como en el pulmón izquierdo y será menor o nula en el hemitórax derecho (pulmón y pared costal) con lo que se observará un incremento en la formación de nuevos vasos, en las expresiones de VEGF y CD-31 así como en los niveles circulantes de IL-10, interleucina anti-inflamatoria que provocará una disminución en los niveles de IL-6 de carácter pro-inflamatorio con lo que se espera que los procesos isquémico, inflamatorio y angiogénico provocarán un decremento en la distensibilidad pulmonar.

El término angiogénesis, se refiere al proceso que conduce a la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura pre-existente y está favorecido por la presencia de reacciones inflamatorias en los tejidos. La angiogénesis es esencial en numerosas patologías como el cáncer por ejemplo, en la que es necesario, inhibir la formación de nuevos vasos que se generan a partir de los tumores mediante interacciones células cancerosas + células endoteliales + factores del crecimiento + mediadores proangiogénicos. La

angiogénesis, demanda amplia investigación en diferentes campos que involucran el desarrollo de modelos experimentales en los que sea posible, una vez que el modelo sea reproducible, evaluar la participación de diferentes mediadores y la eficacia de medicamentos con la finalidad de aplicar los resultados obtenidos, en la fase clínica. Es importante mencionar que el pulmón es un órgano muy vascularizado que está involucrado, a través del gasto cardiaco, directamente con el proceso metastático.

Con respecto al pulmón está bien establecido que diferentes alteraciones como fibrosis, asma y tromboembolia, se caracterizan por inflamación vascular crónica, angiogénesis, remodelación de la vasculatura sistémica y daño vascular que generan en conjunto, un incremento en la expresión y niveles de factores de crecimiento, moléculas de adhesión y citocinas capaces de actuar sobre las células que participan en la remodelación vascular (inflamatorias, endoteliales y de músculo liso así como en la matriz extracelular) y que la isquemia pulmonar resultante de una tromboembolia u otras formas de obstrucción de la arteria pulmonar favorece la proliferación de la circulación sistémica dentro y alrededor del pulmón.

Los diseños experimentales en los que se liga la arteria pulmonar izquierda para provocar obstrucción e isquemia, constituyen un modelo único de obstrucción pulmonar crónica con la subsecuente generación del proceso angiogénico, lo que permite investigar mecanismos de neovascularización. Diferentes estudios en roedores demuestran que cuando se mantiene ligada la arteria pulmonar, se genera un proceso inflamatorio en el que participan diferentes citocinas acompañado de alteraciones en la distensibilidad y angiogénesis intra y extrapulmonar a partir de las arterias intercostales. Utilizando un modelo experimental en ovejas, Nirmal y col., evaluaron la angiogénesis en el sistema circulatorio bronquial después de la obstrucción de la arteria pulmonar. Después de ligar la arteria pulmonar izquierda, en los animales recién nacidos, observaron un incremento en el flujo sanguíneo bronquial a las tres semanas post-ligadura de la arteria y tres años después del procedimiento, la angiogénesis fue capaz de realizar las funciones de intercambio gaseoso.³⁰

Mitzner W. y col. observaron que al ligar la arteria pulmonar izquierda en ratones se crea un modelo angiogénico en donde los vasos sanguíneos que ingresan al pulmón se desarrollan entre las pleura visceral y parietal y están suministrados por diversas arterias intercostales a partir del día 5-6 post-ligadura de la arteria pulmonar izquierda. Este modelo de angiogénesis se produce en ausencia de cualquier estímulo hipóxico e imita a la fuente vascular de muchos tumores de pulmón.³²

En este trabajo, se implementó el modelo experimental de angiogénesis intra y extrapulmonar en ratas provocando una obstrucción del flujo sanguíneo al ligar la arteria pulmonar izquierda.

Inmediatamente después de ligar la arteria pulmonar, las ratas se mantuvieron bajo condiciones de bioterio durante un periodo de tiempo que fluctuó entre 8 y 15 días, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los registros de distensibilidad basal (antes de ligar la API) y distensibilidad final (después de ligar la API) ni con respecto al grupo control, aún considerando el número días con pinzamiento de la arteria pulmonar izquierda (Kruskal-Wallis, U de Mann-Whitney: $p > 0.05$). Fields MJ. y col. investigaron como la isquemia pulmonar después de la ligadura de la arteria pulmonar izquierda podía alterar las propiedades mecánicas y morfológicas del pulmón, utilizando un modelo angiogénico de ratón, encontrando que la distensibilidad disminuye al tercer día después de la ligadura de la arteria pulmonar y resolviéndose al día 14, además de no observar cambios en la morfología del pulmón.¹⁹

En los cinco grupos de estudio, los niveles de interleucina-6 e interleucina-10 detectados en las muestras de suero fueron significativamente menores a los encontrados en las muestras de homogeneizados de tejido pulmonar (ANDEVA: $p < 0.001$).

En el pulmón izquierdo del grupo II y III (8 y 10 días post-LAPI respectivamente), la concentración de interleucina-10 fue significativamente mayor que la concentración detectada en los grupos IV y V (12 y 15 post-LAPI) y que en el grupo control (ANDEVA + Tukey: $p < 0.02$). En suero y en el tejido pulmonar (sin

importar si correspondía al pulmón derecho o al pulmón izquierdo), la concentración de interleucina-10 en ambos grupos de estudio fue significativamente mayor que la concentración de interleucina-6 (ANDEVA: $p < 0.001$), contrariamente al comportamiento de esta citocina y únicamente en el grupo de animales con pinzamiento de la arteria pulmonar, la concentración de interleucina-6 en el pulmón izquierdo disminuyó significativamente en los grupos IV y V (12 y 15 días post-L API) (ANDEVA + Tukey: $p < 0.05$). Wagner EM. y col. ligaron la arteria pulmonar izquierda de ratones y cuantificaron los niveles de IL-6 en homogeneizados de tejido pulmonar derecho (sin ligadura de la arteria) e izquierdo encontrando que entre 4 y 24 horas después de la ligadura, ocurre un incremento significativo en la concentración de IL-6 en el pulmón izquierdo ³¹

Tanto la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) como la de CD-31 ocurrió a partir del grupo III (10 días post-LAPI) y solamente se observó en las muestras de tejido pulmonar y de pared costal correspondientes al hemitórax izquierdo (ANDEVA: $p < 0.001$).

En la evaluación histológica, los resultados indican que la formación de nuevos vasos, la presencia de inflamación, hemorragia, fibrosis y reacción fibroblástica en la pared costal izquierda de los grupos de animales a los que se les pinzó la arteria pulmonar izquierda fue significativamente mayor que los hallazgos histológicos en la pared costal derecha de las ratas de estos mismos grupos y que los encontrados en las pared costal derecha e izquierda de los animales del grupo control (Kruskas-Wallis: $p < 0.001$).

8. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones experimentales establecidas en este proyecto y con base en los resultados obtenidos:

1.- Se implementó un modelo angiogénico experimental en ratas al ligar la arteria pulmonar izquierda,

2.- La obstrucción de la arteria pulmonar izquierda provocó isquemia e inflamación, lo que generó la formación de nuevos vasos en el pulmón izquierdo a partir de la pared costal izquierda y del día 10 post-ligadura de la arteria pulmonar, estos procesos se evidenciaron mediante histología, a través de la formación de nuevos vasos y mediante la expresión inmunohistoquímica del factor de crecimiento del endotelio vascular y de CD-31 pero no ocurrió lo mismo en el hemitórax derecho,

3.- En el grupo de animales a los que se les ligó la arteria pulmonar izquierda se observó un incremento significativo en los niveles de IL-10 en el pulmón izquierdo entre 8 y 10 días post-pinzamiento de la arteria seguida de una disminución estadísticamente significativa de los niveles de IL-6 en los días 12-15 post-pinzamiento,

4.- Contrariamente a la hipótesis planteada, la distensibilidad se mantuvo sin cambios entre los grupos de estudio sin importar el número de días que transcurrieron después de ligar la arteria pulmonar izquierda. Esto se debe a que la distensibilidad se restablece por efecto de la nueva vasculatura,

5.- Este modelo, permitirá evaluar todo tipo de investigaciones relacionadas con un incremento, disminución o inhibición del proceso angiogénico en diferentes patologías pulmonares.

9. PERSPECTIVAS

Con base en los resultados reportados por diferentes autores¹⁹, así como los obtenidos en este proyecto no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la distensibilidad, por lo tanto, se sugiere que en futuros experimentos se reduzcan los periodos de tiempo del estudio, para este modelo en particular, y de este modo evaluar los cambios en la distensibilidad.

Es necesario también ampliar periodos de tiempo de la ligadura de la arteria pulmonar, para evaluar hasta cuanto tiempo después se sigue dando la expresión de VEGF y CD-31, y por tanto la formación de nuevos vasos sanguíneos.

Una vez que se profundice en el estudio de la angiogénesis en este modelo, se podrá evaluar la participación de diferentes mediadores para suprimir éste proceso y evitar la metástasis en caso de cáncer.

10. REFERENCIAS

1. Moore K.L. Anatomía con orientación clínica, 6^a Edición. Editorial Lippincott Williams And Wilkins, México, 2009. Pp. 72-74, 106-113.
2. Gartner, Hiatt. Atlas en Color de Histología. 5^a Edición. Editorial Médica Panamericana. México, 2011. Pp. 247-251.
3. Geneser F. Histología sobre bases biomoleculares. 3^a Edición. Editorial Medica panamericana. México, 2000. P.p. 535-552.
4. Mitzner W, Wagner E.M. Vascular remodeling in the circulations of the lung. Journal of applied physiology 2004, 97: 1999-2004.
5. Gal, B., Bases de la Fisiología. 2a Edición. Editorial Tébar. Madrid, 2007. Pp. 233-235.
6. Cristancho GW, Fisiología Respiratoria lo esencial en la practica clínica. 2^a Edición. Editorial El manual moderno. Bogotá, 2008. Pp. 6-10.
7. DeLisser, Christofidou-Solomidou. Involvement of Endothelial PECAM-1/CD31 in Angiogenesis. American Journal of Pathology 1997, 151 (3):671-677.
8. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. Nature 2005, 438: 932-936.
9. Ribatti D. Transgenic mouse models of angiogenesis and lymphangiogenesis. Int Rev Cell Mol Biol 2008; 266: 1-35.
10. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. Nature 2011; 473(7347): 298-307

11. Carmeliet P, Collen D: Role of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptors in vascular development. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999, 237: 133-158
12. Veikkola T, Karkkainen M, Cleasson-Welsh L, Alitalo K: Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res* 2000, 60: 203-212
13. Ferrara N: Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin Oncol* 2002, 29: 10-14
14. Privratsky JR, Paddock CM, Florey O, Debra K. Newman, William A. Muller: Relative contribution of PECAM-1 adhesion and signaling to the maintenance of vascular integrity. *Journal of Cell Science* 2011, 124: 1477-1485
15. Miguel A. Hernández-Urzúa, Anabell Alvarado-Navarro: Revisión Interleucinas e inmunidad innata. *Revista Biomédica* 2001, 12: 272-280
16. Sergio Zambrano Villa, *Inmunología básica y clínica*, Editorial Mc Graw Hill, México 2007. Pp.94-95.
17. Peter C. Heinrich, Iris Behrmann, Gerhard Müller-Newen, Fred Schaper: Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochemical Journal* 1998, 334: 297-314.
18. Donnelly RP, Dickensheets H, Finbloom DS: The interleukin-10 signal transduction pathway and regulation of gene expression in mononuclear phagocytes. *Journal of interferon & cytokine research* 1999, 19: 563-573.

19. Fields MJ, Bisahi JM, Mitzner W, Wagner EM. Effects of pulmonary ischemia on lung morphology. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007, 293: L254-L258.
20. Nishimotoa N, Kishimoto T, Yoshizakia K. Anti-interleukin 6 receptor antibody treatment in rheumatic disease. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2000, 59: i21-i27.
21. Galli S.J, Grimaldeston. Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity. *Nature Reviews Immunology* 2008, 8: 478-486.
22. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Diario Oficial de la Federación 1999. Diciembre. Estados Unidos Mexicanos. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.
23. Guide for care and use of laboratory animals. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. National Institutes of Health 1996. July. Washington, EE UU.
24. Manual de instrucciones técnicas de inmunohistoquímica e hibridación *in situ*. Instituto Nacional de Pediatría. Departamento de Anatomía Patológica. Laboratorio de Patología Molecular. México D.F.
25. Vector Laboratories. Vectastain universal quick kit. Catalog No. PK-8800. Instructions for rapid immunohistochemical staining. California. EE UU 2011.
26. Human IL-10 Platinum ELISA. Catalog No. BMS215/2. Enzyme-linked Immunosorbent Assay for quantitative detection of human IL-10. EE UU, 2010.
27. Human IL-6 Platinum ELISA. Catalog No. BMS213/2. Enzyme-linked Immunosorbent Assay for quantitative detection of human IL-6. EE UU, 2010.

28. Manual de técnicas Histológicas para el apoyo en ciencias biológicas y de la salud. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Departamento de Producción Agrícola y Animal. México D.F. 2005.
29. Masson P. J. Some histological methods. Trichrome stainings and their preliminary technique. *J Techn Methods*. 1929; 12: 75-90.
30. Nirmal B., Charan, and Paula Carvalho. Angiogenesis in bronchial circulatory system after unilateral pulmonary artery obstruction. *J Appl Physiol* 1997; 82:284-291.
31. Wagner EM, Sánchez J, McClintock JY, Jenkins J, Moldobaeva A. Inflammation and ischemia-induced lung angiogenesis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008; 294: L351–L357.
32. Mitzner W, Lee W, Georgakopoulos D, Wagner E. Angiogenesis in the Mouse Lung. *American Journal of Pathology* 2000; 157: 93-101.
33. Jiménez-Andrade G., González-Espinosa C. Inflamación y angiogénesis: el papel facilitador de las células cebadas en el desarrollo del melanoma. *El residente* 2011; Vol. 6, núm. 2: 113.