



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EXPRESIÓN DE LAS METALOPROTEINASAS 1, 7 Y 13 EN LA REMODELACIÓN
DE LA MATRIZ EXTRACELULAR PULMONAR POR EFECTO DE LA
ANGIOGÉNESIS Y SU CONSECUENCIA SOBRE LA DISTENSIBILIDAD
PULMONAR**

TESIS

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

ISABEL GUADARRAMA SÁNCHEZ

**Tutores principales
Dr. Jaime Villalba Caloca
Dra. Avelina Sotres Vega**



Ciudad Universitaria, CD. MX, 2017



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: M en C. Aída Navas Pérez

VOCAL: Dra. Carmen Adriana Mendoza Rodríguez

SECRETARIO: Dr. Jaime Villalba Caloca

1° SUPLENTE: Dr. Ignacio Camacho Arroyo

2° SUPLENTE: Dr. Mario Adán 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:
Isabel Guadarrama Sánchez

ÍNDICE

1. Marco Teórico	1
1.1 Sistema Respiratorio	1
1.1.1 <i>Estructura del Sistema Respiratorio</i>	1
1.2 Pulmones	2
1.2.1 <i>Anatomía</i>	2
1.2.2 <i>Histología</i>	3
1.2.3 <i>Fisiología</i>	4
1.2.4 <i>Circulación pulmonar</i>	4
1.2.5 <i>Ventilación pulmonar</i>	5
1.2.6 <i>Distensibilidad</i>	6
1.3 Angiogénesis	7
1.3.1 <i>Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF)</i>	8
1.3.2 <i>Molécula de Adhesión Celular Endotelial Plaquetaria (PCAM-1 o CD-31)</i>	9
1.4 Matriz Extracelular	9
1.4.1 <i>Metaloproteinasas de la Matriz Extracelular (MMP)</i>	11
1.4.1.1 <i>Metaloproteinasas y Pulmón</i>	14
1.4.1.2 <i>Metaloproteinasa de la Matriz Extracelular 1 (MMP1)</i>	14
1.4.1.3 <i>Metaloproteinasa de la Matriz Extracelular 7 (MMP7)</i>	15
1.4.1.4 <i>Metaloproteinasa de la Matriz Extracelular 13 (MMP13)</i>	15
1.5 Remodelación pulmonar (Interacción Angiogénesis-Matriz Extracelular)	16
1.6 Muerte celular	17
1.6.1 <i>Apoptosis</i>	17
1.6.1.2 <i>Características bioquímicas</i>	18
1.6.1.1 <i>Características morfológicas</i>	18
1.6.1.3 <i>Vías de ejecución y caspasa-3</i>	19

1.6.1.4 <i>Anti-apoptosis y Survivina</i>	22
2. Justificación	23
3. Hipótesis	25
4. Objetivos	26
5. Material y Métodos	27
5.1 Diseño experimental	27
5.1.1 <i>Grupos de Estudio</i>	27
5.1.1 <i>Anestesia</i>	28
5.1.2 <i>Intubación, ventilación y técnica quirúrgica</i>	28
5.2 Registro de la distensibilidad pulmonar	28
5.3 Obtención de las muestras.	31
5.4 Procesamiento de las muestras.	31
5.5 Evaluaciones	32
5.5.1 Evaluación Histológica	32
5.5.2 Evaluación Inmunohistoquímica	32
5.5.2.1 <i>Preparación del tejido</i>	33
5.5.2.2 <i>Exposición y recuperación del antígeno</i>	33
5.5.2.3 <i>Eliminación de la peroxidasa endógena.</i>	34
5.5.2.4 <i>Bloqueo del pegado inespecífico</i>	34
5.5.2.5 <i>Primer anticuerpo</i>	34
5.5.2.6 <i>Reacción streptavidina-biotina-peroxidasa.</i>	34
5.5.2.7 <i>Revelado de la reacción antígeno-anticuerpo</i>	35
6. Resultados	37
6.1 Evaluaciones	37
6.1 .1 Evaluación histológica	37
6.1.1.1 <i>Hallazgos en pulmón</i>	37
6.1.1.2 <i>Tipo de colágena</i>	38
6.1.2 Evaluación inmunohistoquímica	41
6.1.2.1 <i>Metaloproteinasas de matriz extracelular- 1,-7 y -13 (MMP-1, MMP-7, MMP-13)</i>	41

6.1.2.2	<i>Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF)</i>	51
6.1.2.3	<i>Molécula de Adhesión Celular al Endotelio Plaquetario</i>	52
6.1.2.4	<i>Caspasa-3, Fragmentación del DNA (Método de TUNEL) y Survivina</i>	53
6.2	Distensibilidad pulmonar	57
6.2.1	<i>Distensibilidad basal con fracción inspirada de oxígeno al 21% (FiO₂, 21%)</i>	57
6.2.2	<i>Distensibilidad final con fracción inspirada de oxígeno al 21% (FiO₂, 21%)</i>	58
6.2.3	<i>Distensibilidad basal con fracción inspirada de oxígeno al 100%, (FiO₂, 100%)</i>	61
6.2.4	<i>Distensibilidad final pulmonar con fracción inspirada de oxígeno al 100%, (FiO₂, 100%)</i>	62
7	Discusión	66
8	Conclusiones	71
9	Referencias	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sistema Respiratorio: a) Zona conductora, b) Zona respiratoria, c) Intercambio de gases.*.....	1
Figura 2. Anatomía de los pulmones.*	2
Figura 3. Imagen histológica del pulmón.*	4
Figura 4. Curva de presión-volumen.*	6
Figura 5. Angiogénesis.*	8
Figura 6. Matriz extracelular.*	10
Figura 7. Estructura de las fibras de colágeno.*	11
Figura 8. Clasificación y estructuras de las metaloproteinasas.*	13
Figura 9. Angiogénesis e inflamación.*	17
Figura 10. Cambios morfológicos de las células durante la apoptosis.*.....	19
Figura 11. Vías de activación de la apoptosis.*	21
Figura 12. Procedimiento representativo de los pasos a realizar para la determinación inmunohistoquímica de los diferentes antígenos.	36
Figura 13. Tinción hematoxilina-eosina H-E (10x Y 2.5X).....	37
Figura 14. (A-L) Tinción Rojo Sirio. (40X)..	40
Figura 15. (A-K) Determinación inmunohistoquímica de MMP-1 en tejido pulmonar (10X y 40X)..	44
Figura 16. (A-K) Determinación inmunohistoquímica de MMP7 en tejido pulmonar (10X y 40X).....	47
Figura 17.(A-K) Determinación inmunohistoquímica de MMP-13 en tejido pulmonar (10X y 40X).	50
Figura 18. Determinación inmunohistoquímica de VEGF en tejido pulmonar (10X).	51
Figura 19. Determinación inmunohistoquímica de CD-31 en tejido pulmonar (10).	52
Figura 20. (A-D) Determinación inmunohistoquímica en tejido pulmonar (40X). Imágenes representativas: A) Control negativo, tejido pulmonar sin anticuerpo (B): Expresión de Caspasa-3, (C) TUNEL positivo en el pulmón izquierdo de una rata	

del grupo VI, 15 días post-ligadura de la arteria pulmonar y (D) expresión de survivina en el tejido pulmonar de una rata del grupo IV. Barra= 80 μ m, n=6/ grupo de estudio.....	53
Figura 21. Distensibilidad pulmonar basal (Pre-LAPI) y final (Post-LAPI) promedio \pm EE de los grupos control (I y II) y de los grupos con ligadura de la arteria pulmonar izquierda (III-VI), con una FiO ₂ al 21% y una presión inspiratoria de 14 cm H ₂ O.....	60
Figura 22. Distensibilidad pulmonar basal (Pre-LAPI) y final (Post-LAPI) promedio \pm EE de los grupos control (I y II) y de los grupos con ligadura de la arteria pulmonar izquierda (III-VI), con una FiO ₂ al 21% y una presión inspiratoria de 16 cm H ₂ O.....	60
Figura 23. Distensibilidad pulmonar basal (Pre-LAPI) y final (Post-LAPI) promedio \pm EE de los grupos control (I y II) y de los grupos con ligadura de la arteria pulmonar izquierda (III-VI), con una FiO ₂ al 21% y una presión inspiratoria de 18 cm H ₂ O.....	61
Figura 24. Distensibilidad pulmonar basal (Pre-LAPI) y final (Post-LAPI) promedio \pm EE de los grupos control (I y II) y de los grupos con ligadura de la arteria pulmonar izquierda (III-VI), con una FiO ₂ al 100% y una presión inspiratoria de 14 cm H ₂ O con un minuto de apnea.	64
Figura 25. Distensibilidad pulmonar basal (Pre-LAPI) y final (Post-LAPI) promedio \pm EE de los grupos control (I y II) y de los grupos con ligadura de la arteria pulmonar izquierda (III-VI), con una FiO ₂ al 100 % y una presión inspiratoria de 14 cm H ₂ O.....	64
Figura 26. Distensibilidad pulmonar basal (Pre-LAPI) y final (Post-LAPI) promedio \pm EE de los grupos control (I y II) y de los grupos con LAPI (III-VI), con una FiO ₂ al 100 % y una presión inspiratoria de 16 cm H ₂ O.....	65
Figura 27. Distensibilidad pulmonar basal (Pre-LAPI) y final (Post-LAPI) promedio \pm EE de los grupos control (I y II) y de los grupos con ligadura de la arteria pulmonar izquierda (III-VI), con una FiO ₂ al 100 % y una presión inspiratoria de 18 cm H ₂ O.....	65

*Imágenes traducidas al español y/ó modificadas.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las metaloproteinasas.	12
Tabla 2. Expresión de la metaloproteinasa-1, en epitelio bronquial y endotelio vascular del pulmón.	42
Tabla 3. Expresión de la metaloproteinasa-7, en epitelio bronquial y endotelio vascular del pulmón.	45
Tabla 4. Expresión de la metaloproteinasa -13, en epitelio bronquial y endotelio vascular del pulmón.....	48
Tabla 5. Expresión de Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) en tejido pulmonar.....	52
Tabla 6. Expresión de CD-31 en tejido pulmonar.....	53
Tabla 7. Porcentaje promedio \pm DE de 10 campos (40X) de células apoptóticas determinada por el método inmunohistoquímica por expresión de Caspasa-3	54
Tabla 8. Porcentaje promedio \pm DE de 3 campos (40X) de células apoptóticas determinadas por el método de TUNEL.....	56
Tabla 9. Expresión de Survivin en tejido pulmonar en 10 campos en el tejido pulmonar	57
Tabla 10. Valores promedio de la distensibilidad pulmonar (cm H ₂ O) basal (pre-LAPI) y final (Post-LAPI) \pm Error Estándar (EE) expresadas en cm H ₂ O de los grupos de estudio I al VI, FiO ₂ al 21% y presiones inspiratorias de 14, 16,18 cm H ₂ O.....	59
Tabla 11. Valores promedio de la distensibilidad pulmonar (cm H ₂ O) basal (pre-LAPI) y final (Post-LAPI) promedio \pm Error Estándar (EE) expresadas en cm H ₂ O de los grupos de estudio I al VI, obtenidos con FiO ₂ al al 100 % y presiones inspiratorias de 14,16,18 cm H ₂ O además de 14 cm H ₂ O con un minuto de apnea inducida.	63

Abreviaturas

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica.

FiO₂: Fracción inspirada de oxígeno.

IAPs: Proteínas Inhibidoras de Apoptosis.

IGF-1: Factor de Crecimiento Insulínico tipo 1.

KGF: Factor de Crecimiento Derivado de Queratinocitos.

LAPI: Ligadura de la Arteria Pulmonar Izquierda.

ME: Matriz Extracelular.

MMP: Metaloproteinasa de la Matriz Extracelular.

MT-MMP: Metaloproteinasas de Membrana.

PDGF: Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas.

PECAM o CD31: Molécula de Adhesión Plaquetarias.

PIGF: Factor de Crecimiento de Placenta.

ROS: Especies Reactivas del Oxígeno.

VEGF: Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular.

RESUMEN

Las metaloproteinasas intervienen en diversos procesos fisiológicos y patológicos del organismo regulando las vías de señalización que controlan procesos como el crecimiento celular, la inflamación, la remodelación y la angiogénesis, característicos de patologías como fibrosis quística, asma y tromboembolia, en los que prevalece la inflamación crónica.¹ La remodelación de la matriz extracelular y la regresión vascular contribuyen a la resolución de la respuesta inflamatoria y facilitan la reparación, aunque, por otro lado, la expresión incesante de las proteínas de la matriz extracelular aunada al incremento en la angiogénesis sostiene la progresión de padecimientos neoplásicos.²

El daño pulmonar, altera el programa de homeostasis celular, activando mecanismos para reparar y regenerar el epitelio que pueden, continuar hacia una remodelación aberrante con procesos de diferenciación inadecuados o interacciones defectuosas entre el epitelio y el mesénquima generando enfermedades crónicas del parénquima pulmonar como bronquiolitis obliterante, fibrosis y enfisema que pueden involucrar padecimientos vasculares pulmonares.¹

Existen diseños experimentales de angiogénesis pulmonar en roedores en los que se genera la producción de nuevos vasos a partir de las arterias intercostales como consecuencia de la obstrucción del flujo pulmonar al pinzar la arteria pulmonar correspondiente.³⁻⁵ Como hipótesis planteada es que la ligadura de la arteria pulmonar izquierda provocará isquemia e inflamación en el pulmón izquierdo generando la compensación de la irrigación sanguínea mediante la formación de nuevos vasos sanguíneos en el pulmón, ocasionando cambios en la homeostasis celular y cambios en la matriz extracelular por lo que: Mientras mayor sea el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos mayor será la expresión de VEGF, CD31 y la degradación de colágena y por lo tanto una sobreexpresión de las metaloproteinasas 1, 7 y 13 en la matriz extracelular y existirá una

disminución de la distensibilidad ocasionada por el daño pulmonar post-ligadura de la arteria pulmonar izquierda (LAPI). Por lo que el objetivo, fue utilizar un modelo experimental en ratas a las que se les ligó la arteria pulmonar izquierda (LAPI) para provocar la formación de nuevos vasos a partir de la vasculatura pre-existente. Se estudiaron los cambios que ocurren en la remodelación de la matriz extracelular mediante la expresión de las metaloproteinasas 1, 7 y 13 por efecto de la angiogénesis y su consecuencia sobre la distensibilidad pulmonar, evaluando, además la remodelación tisular a través de: 1) formación de nuevos vasos sanguíneos (expresión de VEGF y CD-31), 2) muerte celular por apoptosis (expresión de caspasa-3 y fragmentación de DNA), 3) expresión de survivin (proteína inhibidora de la apoptosis) y 4) evaluación histológica.

Se utilizaron 36 ratas Wistar de cualquier sexo, edad variable, con un peso entre 200 y 300 gramos, mantenidas en condiciones de bioterio y manejadas con base en los lineamientos establecidos en la NOM-062-ZOO-1999,⁶⁻⁷ sin antecedentes de cualquier enfermedad y libres de patología general y de pulmón que se dividieron al azar en 6 grupos de estudio. Grupo I: control sin toracotomía (n=6), Grupo II: control con toracotomía (n=6), Grupo III: post-Ligadura de la Arteria Pulmonar Izquierda (LAPI) de 1 a 3 días (n=6), Grupo IV: post-LAPI de 4 a 6 días (n=6), Grupo V: post-LAPI de 7 a 12 días (n=6), Grupo VI: post- VEGF: Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular de 13 a 15 días (n=6). Se hicieron mediciones de la distensibilidad pulmonar (basal y final) y se tomaron biopsias de ambos pulmones para efectuar determinaciones histológicas e inmunohistoquímicas de metaloproteinasas (1, 7 y 13), VEGF, CD31, Caspasa-3, marcaje de fragmentación de DNA (método de TUNEL) y Survivina. El análisis estadístico consideró valores significativos de $p < 0.05$ y se realizaron las pruebas de Análisis de Varianza ANDEVA + TUKEY. Los resultados obtenidos, sugieren que: La metaloproteinasa 1, se expresa en ambos pulmones (derecho e izquierdo) 8 días post-LAPI y únicamente en el pulmón izquierdo entre 13 y 15 días post-LAPI. La metaloproteinasa 7, se expresa 3 días después de haber pinzado la arteria pulmonar. La metaloproteinasa 13, no se modifica por LAPI. La expresión del

factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y la identificación de las fibras de colágena tipo I, se observan a partir del día 3 post-LAPI únicamente en el pulmón en el que se ligó la arteria y es más evidente, entre los días 4-6 y 13-15 post-LAPI. La distensibilidad pulmonar no se modificó significativamente ni por efecto de la ligadura de la arteria pulmonar, ni por efecto del tiempo que se mantuvo ligada la arteria pulmonar, aunque se observa una disminución en la distensibilidad pulmonar en todos los grupos de estudio en los que se mantuvo ligada la arteria con valores de recuperación a los 13-15 días post-LAPI, concluyendo que las metaloproteinasas de la matriz extracelular desempeñan un papel central en los procesos: isquemia, inflamación, proliferación, migración, diferenciación, angiogénesis y apoptosis que mantienen la distensibilidad pulmonar.

1. Marco Teórico

1.1 Sistema Respiratorio

El sistema respiratorio comprende los pulmones y una zona de conducción que comunica el parénquima pulmonar con el medio externo. Su función principal es proporcionar oxígeno y eliminar dióxido de carbono de las células del cuerpo mediante un proceso involuntario y automático.⁸⁻⁹

1.1.1 Estructura del Sistema Respiratorio

El aparato respiratorio consta de una parte conductora, que comprende las fosas nasales, la nasofaringe, la laringe, la tráquea, los bronquios y los bronquiolos y, una parte respiratoria formada por las promociones terminales del árbol bronquial y que contiene los alveolos, donde tiene lugar el intercambio de gases (Figura 1).⁸

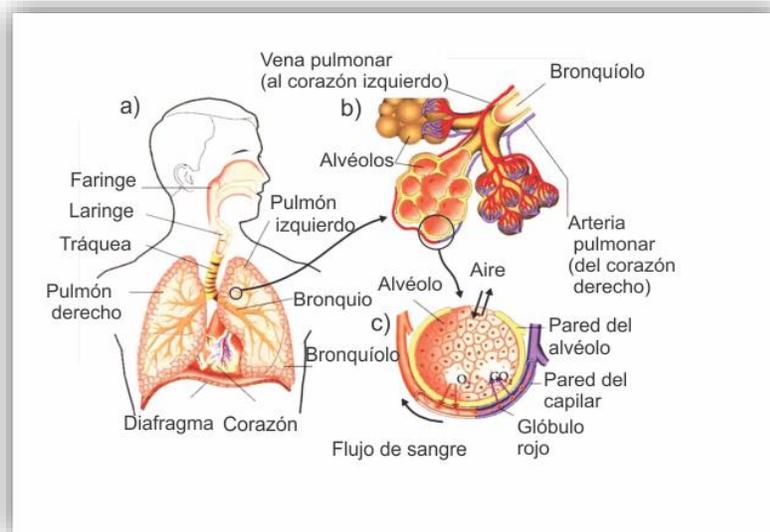


Figura 1. Sistema Respiratorio. a) Zona conductora: El aire ingresa por la nariz o por la boca y pasa a la faringe, luego a la laringe y desciende finalmente por la tráquea, los bronquios y los bronquiolos hasta los alveolos pulmonares. b) Zona respiratoria: El intercambio gaseoso se produce en los aproximadamente 300 millones de alveolos del par de pulmones. c) Intercambio de gases: El O₂ y CO₂ se difunden a través de la pared de los alveolos y de los capilares sanguíneos.¹⁰

1.2 Pulmones

1.2.1 Anatomía

Los pulmones son órganos pares, de forma cónica, suspendidos cada uno, en su mitad torácica y están cubiertos por una membrana protectora llamada pleura pulmonar. Los separan el corazón y otras estructuras del mediastino, que le divide la cavidad torácica en dos partes anatómicamente distintas. Ambos pulmones están divididos en lóbulos, de los cuales, el pulmón derecho tiene tres, mientras que el pulmón izquierdo posee dos (Figura 2). En cada pulmón, las ramificaciones de la arteria pulmonar, las ramas de las arterias bronquiales, las vías linfáticas y los nervios, siguen el recorrido de las ramas bronquiales hasta la sección respiratoria, en donde los vasos se dividen en capilares.^{8, 11,12}

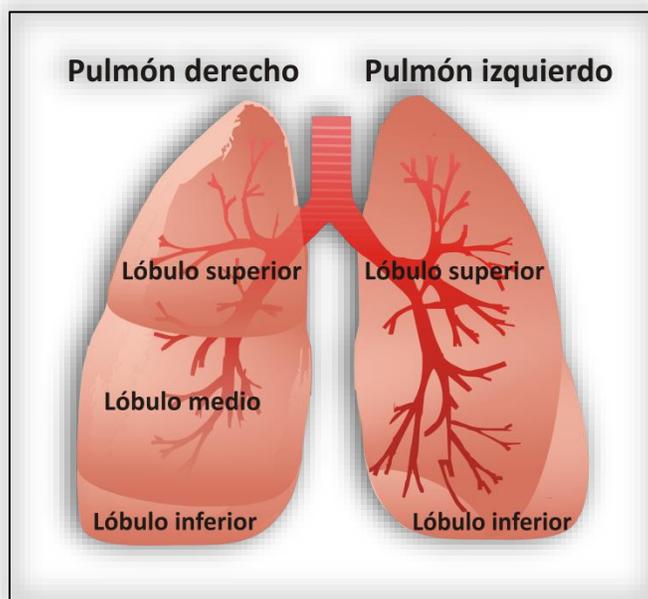


Figura 2. Anatomía de los pulmones. Cada pulmón, compuesto de dos lóbulos el de la izquierda y de tres el de la derecha, se hayan en su propio lado de la cavidad torácica y está rodeado por la pleura visceral.¹³

1.2.2 Histología

La tráquea (órgano en forma tubular y flexible que mide unos 2.5 cm de diámetro y más o menos 10 cm de longitud) permite el paso del aire y su pared contribuye al acondicionamiento del aire inspirado. Se extiende desde la faringe hasta la mitad del tórax, donde se divide en dos bronquios principales (primarios) y el resto de vías aéreas en las que se subdivide sucesivamente y de manera seriada.¹⁴ Los bronquios, representan las primeras siete divisiones de las 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.¹⁵⁻¹⁶

Los bronquiolos, son vías respiratorias distales a los bronquios, están localizadas entre los bronquios de la pared cartilaginosa y el lugar donde cesa el epitelio ciliado. Los bronquiolos, se van ramificando y según lo van haciendo, se va reduciendo el tamaño de su luz. La estructura de los bronquiolos se modifica de forma gradual, el epitelio pseudoestratificado ciliado se transforma en epitelio cilíndrico, desaparece el cartílago y las glándulas, y por último se engrosa la capa muscular.¹⁵⁻¹⁶

Los alveolos, tienen forma poliédrica y se agrupan en “panel de abeja”. El epitelio alveolar se compone de dos tipos de células alveolares (neumocitos); Los neumocitos tipo I y los tipo II. Los tipo I son células planas con grandes extensiones citoplasmáticas, son las principales células de recubrimiento de los alveolos (representan más del 90% del revestimiento superficial) y conforman una separación completa entre el tejido conectivo muy vascularizado y el aire alveolar. Los neumocitos tipo II, tienen forma irregular, casi cúbica, el núcleo es bastante grande y redondeado. Estas células sobresalen hacia la luz, y se encuentran en mayor número que los neumocitos tipo I. Su función principal es, secretar factor surfactante, pero también intervienen en la reparación alveolar (Figura 3).¹⁵⁻¹⁶

Cabe mencionar que con el epitelio también se encuentran macrófagos alveolares que se desplazan sobre la superficie del epitelio.¹⁶

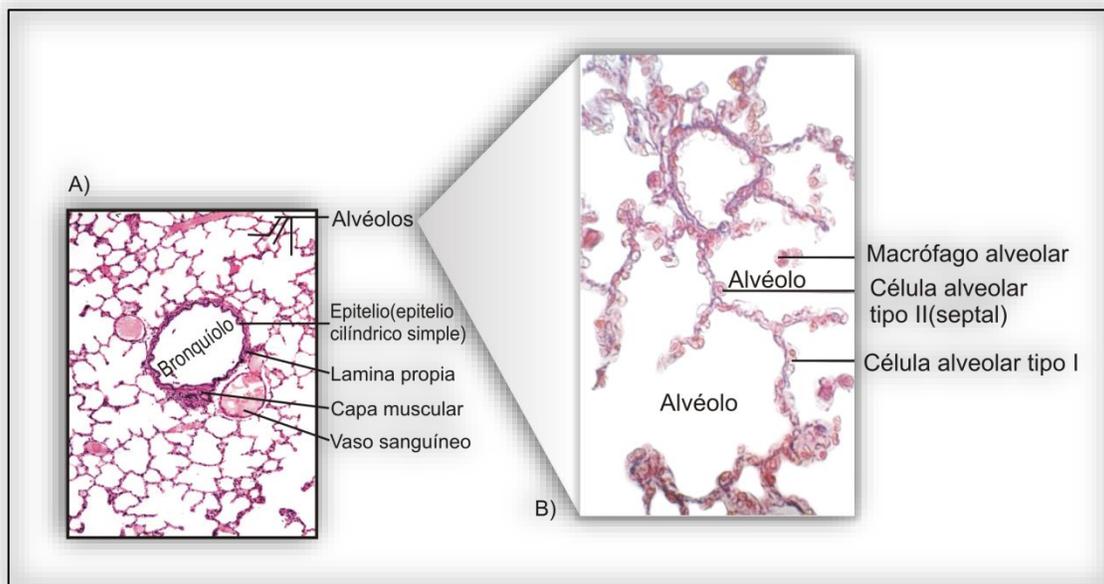


Figura 3. Imagen histológica del pulmón. A) Tinción Hematoxilina -Eosina 30X. B) Tinción H-E 40X del pulmón, donde se observan las células alveolares (neumocitos tipo I y neumocitos tipo II) ^{12,15}

1.2.3 Fisiología

El pulmón es el órgano esencial del aparato respiratorio, participa en: La ventilación pulmonar, que se refiere al flujo de entrada, salida y regulación de aire entre la atmósfera y los alveolos pulmonares; la difusión del oxígeno y del dióxido de carbono entre los alvéolos y la sangre; el transporte de oxígeno y de dióxido de carbono en los líquidos corporales hacia las células de los tejidos corporales y desde las mismas; así como en la regulación de la ventilación.⁸⁻⁹

1.2.4 Circulación pulmonar

El pulmón es el único órgano con doble fuente de perfusión. Los pulmones reciben sangre a través de dos grupos de arterias, las arterias pulmonares y las arterias bronquiales. La circulación pulmonar, irriga los capilares del tabique alveolar y deriva de la arteria pulmonar (las arterias pulmonares derecha e

izquierda, son las únicas en el organismo, que llevan sangre desoxigenada) que sale del ventrículo derecho del corazón. Las ramas de la arteria pulmonar trascurren con los bronquios y los bronquiolos y llevan la sangre hasta los lechos capilares de los alveolos, constituyendo la unidad alveolo capilar que es el sitio de oxigenación de la sangre, que una vez oxigenada, es recogida por los capilares venosos, drenando la sangre a la aurícula izquierda del corazón, a través de las venas pulmonares.^{11,14}

La circulación bronquial, separada y mucho más pequeña, incluye las arterias bronquiales (que son las ramas de la aorta que suministran al pulmón la sangre oxigenada) que proviene de arterias sistémicas y forma capilares, los cuales drenan en las venas bronquiales o forman anastomosis con otros capilares o con las venas pulmonares. Parte de la sangre, drena en las venas bronquiales, ramas del sistema ácigos y vuelve al corazón por la vena cava superior.

La circulación bronquial nutre desde la tráquea hasta los bronquiolos terminales; asimismo, riega la pleura y los ganglios linfáticos hiliares.¹¹

1.2.5 Ventilación pulmonar

Los pulmones se pueden expandir y contraer de dos maneras, 1) mediante el movimiento hacia abajo y hacia arriba del diafragma para alargar o acortar la cavidad torácica y, 2) mediante la elevación y el descenso de las costillas para aumentar y reproducir el diámetro anteroposterior de la cavidad torácica.⁸

El movimiento del aire hacia el interior y el exterior de los pulmones tiene lugar debido a la diferencia de presión inducida por los cambios de volúmenes pulmonares. La presión en el espacio entre los pulmones y la pared torácica (presión intrapleurales), es subatmosférica. Durante la inspiración, el aire se desplaza hacia los pulmones cuando la presión del aire en el interior es menor a la presión atmosférica (La presión en la vía respiratoria se torna negativa). Al final de la inspiración, el aire se moviliza hacia afuera de los pulmones cuando la presión del aire dentro de estos es mayor que la presión atmosférica (la presión en la vía

respiratoria se vuelve positiva). La ventilación, está influida por la distensibilidad, que es unas propiedades físicas de los pulmones. ⁸

1.2.6 Distensibilidad

La distensibilidad se define como la propiedad de un cuerpo para cambiar de volumen cuando se ejerce una presión

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

Distensibilidad (D), es igual al incremento de volumen (ΔV) sobre el incremento de la presión (ΔP), y se representa en una curva presión-volumen (Figura 4). ¹⁷

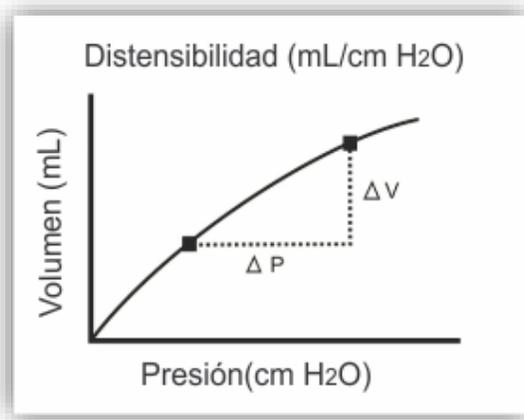


Figura 4. Curva de presión-volumen. La distensibilidad pulmonar es igual al $\Delta V / \Delta P$.¹⁸

La distensibilidad se relaciona con dos factores principales, la elasticidad del pulmón y la tensión superficial y no se refiere exclusivamente a la capacidad del pulmón para modificar su volumen en respuesta a la aplicación de presión a su alrededor, involucra también la capacidad de la caja torácica para expandirse durante la fase inspiratoria, por lo que resulta importante 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 aéreo y representa la distensibilidad del pulmón exclusivamente.

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.

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 de distensibilidad en relación al volumen pulmonar se denomina distensibilidad específica.¹⁸

1.3 Angiogénesis

Angiogénesis, se refiere al proceso que conduce a la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura pre-existente. El proceso de angiogénesis incluye, la migración y proliferación de células endoteliales, así como la formación y organización de grupos celulares en estructuras tubulares, que eventualmente se unirán, para finalmente madurar en vasos sanguíneos estables.¹⁹⁻²⁰

Entre los estímulos que promueven la angiogénesis se encuentran la hipoxia y la isquemia. En modelos experimentales, se ha demostrado que la isquemia pulmonar (obstrucción de flujo sanguíneo) es un estímulo relevante para inducir angiogénesis extra-pulmonar a partir de las arterias intercostales provocando una remodelación de la matriz extracelular del pulmón (cambios en la estructura de los vasos sanguíneos asociados con el crecimiento en los tejidos nuevos o existentes).³⁻⁵ Figura 5.

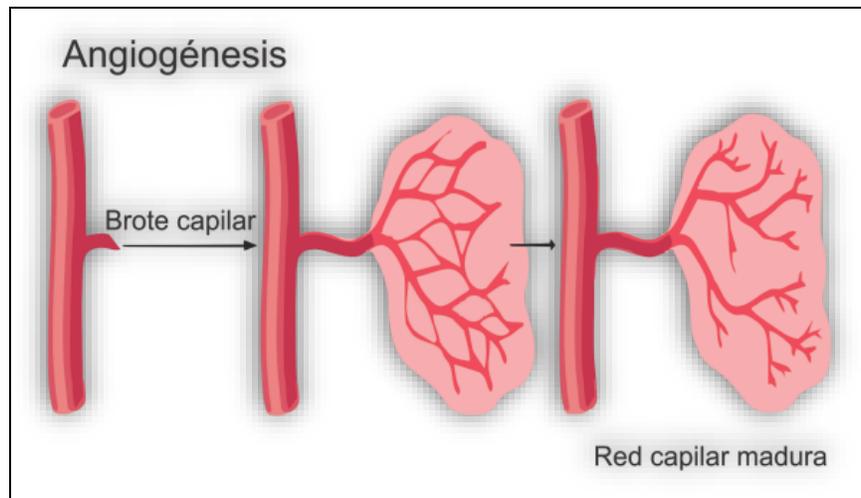


Figura 5. Angiogénesis. Proceso que conduce a la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura pre-existente.²¹

1.3.1 Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF)

El Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF), es el principal regulador de las células endoteliales vasculares y de la formación de vasos sanguíneos. El VEGF, es un factor de crecimiento con actividad mitogénica altamente específica para las células endoteliales. Es un miembro de la súper familia de genes VEGF-PDGF que incluye al VEGF-A, -B, -C, -D Y -E, así como el Factor de Crecimiento de Placenta (PIGF).²⁰

El VEGF, responde a estímulos como hipoxia e isquemia principalmente, mediante el Factor Inducible de Hipoxia 1 (HIF-1), a distintos factores de crecimiento como Factor de Crecimiento Derivado de Queratinocitos (KGF), Factor de Crecimiento Insulinico tipo 1 (IGF-1), Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas(PDGF), a oncogenes activados (por ejemplo Ras) así como a distintas citocinas como la interleucina 1- α y 6 (IL- α e IL-6), al gen p53 mutado, estrógeno y óxido nítrico (NO).^{2, 20} Mediante estos estímulos, se aumenta la expresión del VEGF generando la proliferación de células endoteliales derivadas de las arterias, venas y vasos linfáticos, así como la proliferación de algunos tipos celulares no endoteliales. Además, el VEGF promueve la proliferación celular e inhibe la

apoptosis. Cuando la regulación de VEGF es normal, contribuye al remodelamiento vascular de la cicatrización y reparación mientras que cuando es inadecuada, este factor contribuye al desarrollo de tumores sólidos al promover la angiogénesis. ²²⁻²³

1.3.2 Molécula de Adhesión Celular Endotelial Plaquetaria (PCAM-1 o CD-31)

La molécula de Adhesión Celular Endotelial Plaquetaria (CD31 o PECAM-1), es una glicoproteína transmembranal tipo I de 130 -140 kDa que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig) expresada por diferentes células de la línea hematopoyética incluyendo las plaquetas, monocitos, neutrófilos y ciertos subgrupos de linfocitos. Las células endoteliales también expresan CD-31 que es un componente principal de las uniones celulares en los lechos vasculares e interviene en la migración transendotelial de leucocitos. ²⁴⁻²⁵

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. CD-31 interviene en la adhesión y señalización al inmunorreceptor tirosina (ITIMs) que se encuentran en su cola citoplasmática, con lo que juega un papel recíproco durante la respuesta inflamatoria. Esta molécula de adhesión, también promueve la inflamación facilitando la migración transendotelial de leucocitos, y de igual forma, 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. ²⁶⁻²⁷

1.4 Matriz Extracelular

La Matriz Extracelular (ME), es un conjunto de proteínas y polisacáridos secretados por las células propias de cada tejido, que rellena los espacios entre las células y une las células y los tejidos entre sí, proporcionando el soporte estructural. ²⁸

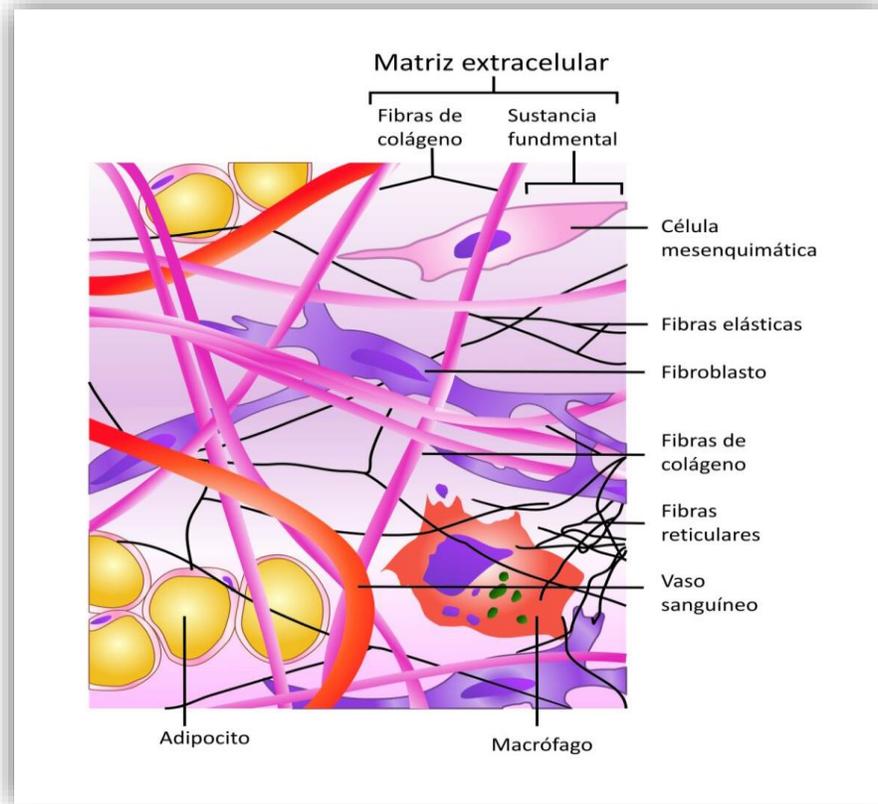


Figura 6. Matriz extracelular. Consta de las fibras de proteína colágeno y elastina, así como una sustancia fundamental parecida a un gel. El gel está compuesto de glicoproteínas y moléculas llamadas proteoglicanos.⁹

La ME está formada por gran cantidad de componentes que se clasifican en tres grandes grupos: proteoglicanos y glucosaminoglicanos, proteínas estructurales (colágeno y elastina), y proteínas de adhesión (fibronectina y laminina). Estas familias de macromoléculas se encuentran interconectadas y están reguladas por una familia de proteasas denominadas metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP).²⁹

La proteína estructural principal de la matriz extracelular es el colágeno, que es la proteína más abundante en los tejidos animales. Los colágenos son una gran familia de proteínas, constituidas al menos por 19 miembros diferentes. Se caracteriza por formar hélices triples en las que tres cadenas polipeptídicas se

enredan estrechamente una alrededor de la otra. Los dominios de triple hélice de los colágenos consisten en repeticiones de la secuencia de aminoácidos (Figura 7).^{14, 30}

El colágeno forma una parte importante del pulmón constituyendo un 10.0 % de la cantidad de colágena que existe en el organismo, en el pulmón prevalece el tipo de colágena III, la cual está constituida por un tipo de cadena que tiene como características principales la de mantener la estructura y rigidez pulmonar.¹⁴

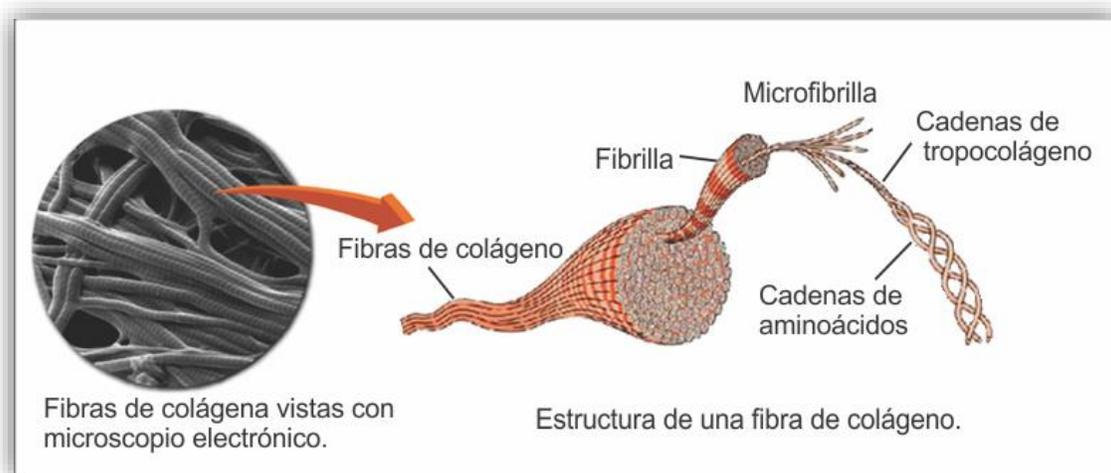


Figura 7. Estructura de las fibras de colágeno. El colágeno está constituido por un conjunto de tres cadenas polipeptídicas (1.000 aminoácidos por cadena), agrupadas en una estructura helicoidal.³¹

1.4.1 Metaloproteinasas de la Matriz Extracelular (MMP)

Las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP) están implicadas en procesos fisiológicos y patológicos que intervienen en la plasticidad y degradación de la matriz extracelular. Las MMP desempeñan un papel central en la proliferación, migración, diferenciación, angiogénesis y apoptosis.³²

Las MMP constituyen una familia de enzimas endopeptidasas neutras, dependientes de zinc, capaces de degradar los componentes esenciales de la matriz. Se han descrito 25 miembros de la familia de las MMP que se clasifican en cinco subfamilias: colagenasas, gelatinasas, estromelisin, metaloproteinasas de

membrana (MT-MMP) y otras MMP (Tabla 1). Todas ellas difieren en su estructura (Figura 8) y especificidad de sustrato, pero su acción combinada es capaz de conducir a la degradación prácticamente de la totalidad de los componentes macromoleculares de la ECM.^{33, 34}

Grupo	MMP	Nombre	Sustrato
Colagenasas	MMP-1	Colagenasa fibroblástica Colagenasa intersticial	Colágenos fibrilares tipo III, I,II,VII YX, agrecanos y serpinas
	MMP-8	Colagenasa de los neutrófilos	Colágenos fibrilares tipo I, III y II agrecanos y serpinas
	MMP-13	Colagenasa-3	Colágeno II
Gelatinasas	MMP-2	Gelatinasa A72 kDa gelatinasa Colagenasa 4	Colágenos IV, V, VII y X, elastina
	MMP-9	Colagenasa 5 92kDa gelatinasa	Colágenos I, IV, V, elastina
Estreptomelisininas Matrisilinas Metaloelastasas	MMP-3	Estromelisinina-1	Fibronectina, colágenos IV, V, IX y X ,elastina, laminina y proteoglicanos
	MMP-10	Estromelisinina-2	Fibronectia, colágenos III, IV, V, elastina, laminina y proteoglicanos
	MMP-11	Estromelisinina-3	Muy débilmente: laminina y fibronectina
	MMP-7	Matrisilina PUMT- 1 Matrina	Proteoglicanos, laminina, fibronectina, elastina, gelatina
	MMP-12	Metaloelastasa macrofágica	Elastina, fibronectina, colágeno tipo IV
Metaloproteinasas de membrana	MMP-14	MT1-MMP	Colágenos I, II y III, laminina, fibronectina, elastina, gelatina, fibronectina y proteoglicanos. ProMMP-2
	MMP-15	MT2-MMP	
	MMP-16	MT3-MMP	proMMP-2
	MMP-17	MT4-MMP	
	MMP-24	MT5-MMP	proMMP-2 Forma parte de la actividad proteolítica leucocitaria
	MMP-25	MT6-MMP	
Otras	MMP-19	RASI-1	Gelatinas Amelogenina
	MMP-20	Enamelsina	
	MMP-21	XMMP	Gelatina tipo 1, vitronectina y colágeno desnaturalizo
	MMP-22	CMMP	
	MMP-23	CA-MMP	
	MMP-26	Endometasa	
	MMP-27		
	MMP-28	Epilisina	

Tabla 1. Clasificación de las metaloproteinasas. Las MMP que se clasifican en cinco subfamilias.

Todas ellas difieren en su estructura y especificidad de sustrato.^{34,35}

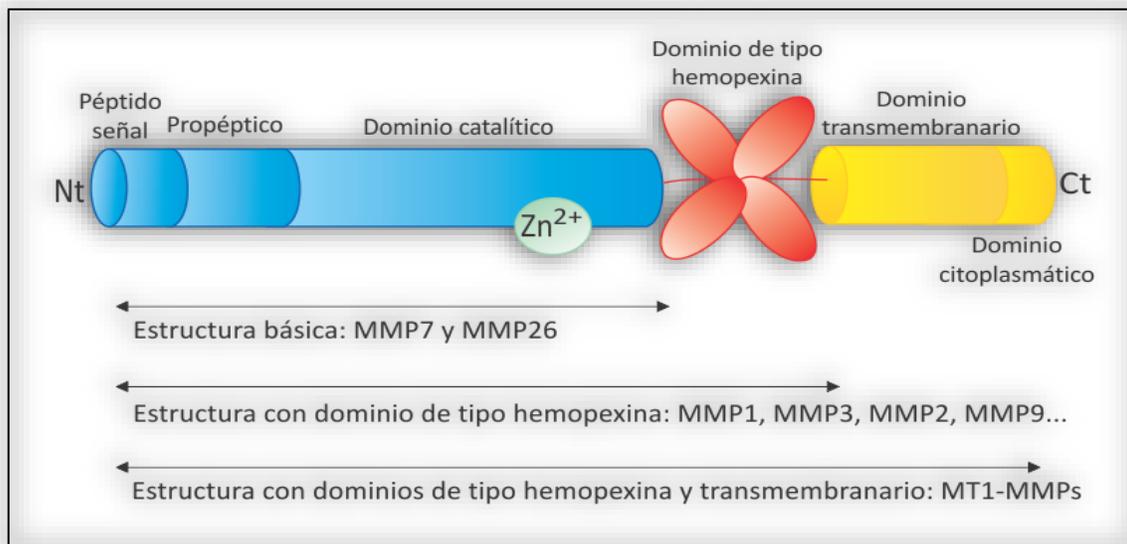


Figura 8. Clasificación y estructuras de las metaloproteinasas. Todos los miembros de las metaloproteinasas de la matriz contienen una péptida señal, un propéptico obtenido mediante la activación del precursor o zimógeno y un dominio catalítico amino terminal, que contiene el sitio fijador de Zinc.³⁶

Cada MMP posee una secuencia señal N-terminal o predominio, un propéptico (alrededor de 80 aminoácidos) o predominio que mantiene a la enzima latente hasta que se elimina por proteólisis, y un dominio catalítico que contiene la región conservada de unión a Zn^{2+} .³⁷

Estudios de diferentes tipos de cáncer en humanos, relacionan la expresión alterada de las MMP con mal pronóstico de la enfermedad. Las MMPs pueden jugar distintos papeles durante la progresión del cáncer, dependiendo del estadio del tumor. Por ejemplo, en estadios tempranos, la proteólisis mediada por MMP-3 y 7 de las proteínas específicas que unen factores de crecimiento contribuye a la proliferación celular. Posteriormente, la activación de las moléculas de adhesión E-cadherina y CD44 activa la motilidad de las células tumorales y facilita las metástasis. La MMP-8 en cambio, tiene un efecto protector disminuyendo el potencial metastásico de las células del cáncer de mama. La sobreexpresión de MMP-2 y 9 es índice de un pronóstico desfavorable al degradar el colágeno tipo IV localizado en las membranas basales e induce la expresión de factores

angiogénicos. La invasión local de los tumores depende de la degradación de las proteínas de las membranas basales, como colágeno tipo IV o V y proteólisis del colágeno intersticial tipo I, II o III presente en el tejido conjuntivo que rodea las células tumorales. Se ha comprobado que los niveles de MMPs pueden afectar la conducta invasora del tumor y su habilidad para metastatizar.³⁶

1.4.1.1 Metaloproteinasas y Pulmón

Las metaloproteinasas desempeñan un papel importante y complejo en varios procesos interrelacionados que suceden en las patologías pulmonares. Por lo que es importante la regulación de las metaloproteinasas, en los procesos de remodelación tisular, crecimiento tumoral, metástasis y en enfermedades inflamatorias como el asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).^{1,31-32,39}

La participación de las MMP en la remodelación de la matriz extracelular es compleja y multifuncional. Estas metaloproteasas son responsables, no solo de la degradación de la matriz extracelular, sino que, además participan en el procesamiento de diversos mediadores bioactivos que incluyen factores de crecimiento, quimiocinas, citocinas, factores de crecimiento y receptores en superficies celulares modulando su activación, lo que hace compleja la interpretación biológica de la acción de estas enzimas en el microambiente pulmonar.^{32-33,40}

1.4.1.2 Metaloproteinasa de la Matriz Extracelular 1 (MMP1)

La metaloproteinasa 1 (colagenasa 1, intersticial) se expresa en su forma latente o zimógena con un peso de 52 kDa que se convierte en 42 kDa, al activarse; pierde su dominio propéptido. MMP-1, tiene como sustrato la colágena del tejido conectivo (tipo I, II y III), así como los proteoglicanos, aunque es casi específica del colágeno tipo III. Entre las células que sintetizan MMP1 se encuentran fibroblastos, queratinocitos, células endoteliales y macrófagos.^{34, 41} En el pulmón, se ha demostrado que existe una extensa expresión epitelial de la MMP-1 en

pulmones fibróticos. Esta enzima, está implicada en enfermedades que presentan una exagerada degradación de la matriz extracelular, como artritis reumatoide y enfisema pulmonar. Se expresa fundamentalmente en células del epitelio alveolar y del epitelio bronquial que recubren los espacios quísticos, mientras que parece estar ausente en compartimentos intersticiales y en las células mesenquimatosas de los focos de fibroblastos que son áreas de fibrosis activa.⁴²

1.4.1.3 Metaloproteinasa de la Matriz Extracelular 7 (MMP7)

La metaloproteinasa 7, también conocida como matrilisina, es secretada en su forma latente con un peso de 29 kDa. Como enzima activa, tiene un peso de 20 kDa. MMP-7 es característica de las células epiteliales glandulares, es responsable de hidrolizar proteoglicanos, glicoproteínas de la matriz extracelular. Está relacionada con el proceso angiogénico degradando las membranas basales y actúa sobre procolágenos, fibronectina, laminina, elastina y colágeno.^{34, 41} En el pulmón, la proteína se expresa primordialmente en el epitelio anormal de los pulmones con fibrosis. Diversos estudios han sugerido que MMP-7 desempeña un papel fisiológico durante los mecanismos de re-epitelización, apoptosis, inflamación e inmunidad innata.⁴³

1.4.1.4 Metaloproteinasa de la Matriz Extracelular 13 (MMP13)

La metaloproteinasa 13 (colagenasa 13) es secretada en forma latente con un peso de 60 kDa, e inmediatamente después de su corte como enzima activa, obtiene un peso de 48 kDa. Aunque su mayor eficiencia es sobre el colágeno tipo II, a diferencia de la MMP-1, no actúa preferencialmente sobre algún sustrato específico; ya que degrada en igual forma, cantidades de colágeno tipo I, II y III, membranas basales de colágeno IV, proteoglicanos, fibronectina, fibrina y tenascina.³⁴ En el pulmón, estudios de hipertensión pulmonar en ratas con hipoxia, reportan la participación de la MMP-13 en la remodelación vascular con expresión localizada en los conductos pulmonares, en pequeñas arterias musculares y alveolares.⁴⁴

1.5 Remodelación pulmonar (Interacción Angiogénesis-Matriz Extracelular)

La inflamación, la inducción de angiogénesis y los procesos de remodelación están, en gran parte, mediados por proteínas y proteasas de la matriz extracelular. Por ejemplo, en la respuesta inflamatoria, persistente, se incrementa la permeabilidad capilar que induce la activación endotelial, generando brotes capilares.^{2, 45}

La generación de brotes capilares es uno de los mecanismos existentes para la formación de nuevos vasos sanguíneos, en donde el VEGF, es el factor más importante en esta respuesta, presentando isoformas con afinidades distintas para determinadas proteínas de la matriz extracelular. Esta interacción, puede ser modificada por procesamiento proteolítico. En concreto, la plasmina y un subconjunto de las metaloproteinasas pueden escindir la región C-terminal del VEGF para liberar el factor de crecimiento bioactivo.^{2,45}

Las células endoteliales continuamente deben adaptarse a las necesidades de los tejidos circundantes. La adaptación vascular implica la expansión física de los lechos vasculares a través de los procesos antigénicos precedidos por un evento inflamatorio y amplía la remodelación de la matriz. La matriz extracelular, expone sitios críticos de adhesión con liberación de fragmentos biológicos activos y secuestra factores de crecimiento, críticos para la morfogénesis vascular. La remodelación de la matriz y la regresión vascular contribuyen a la resolución de la respuesta inflamatoria y facilitan la reparación de tejidos en donde el proceso inflamatorio también puede implicar la persistencia vascular crónica (Figura 9).^{2,46}

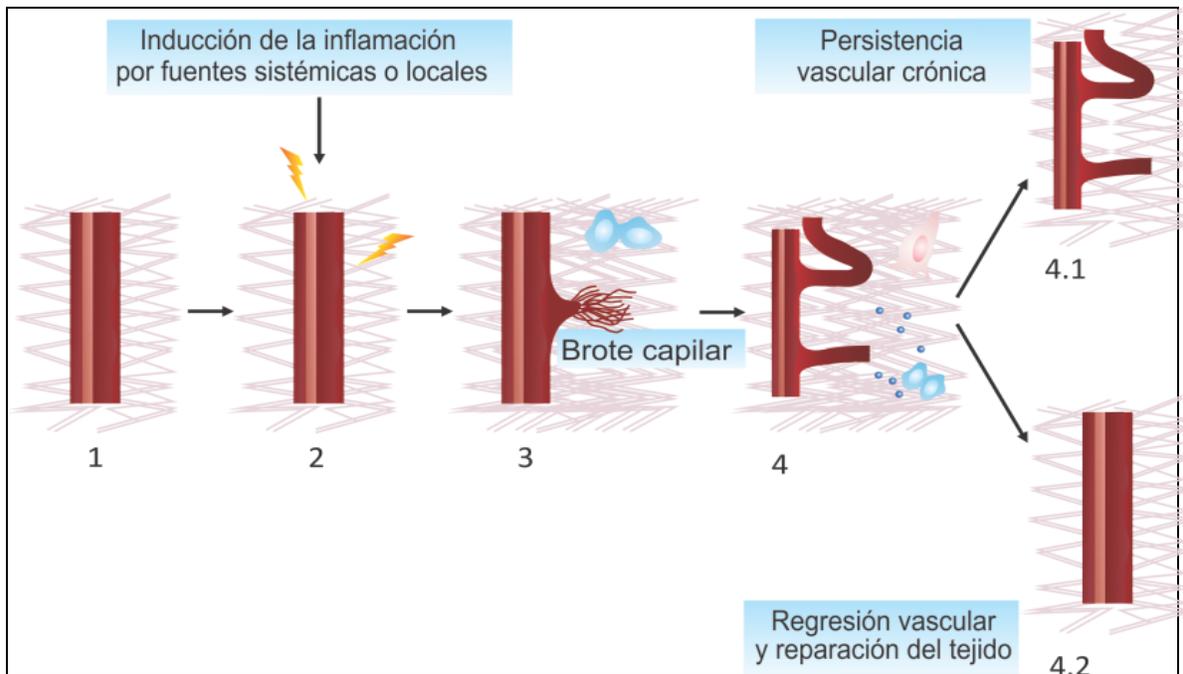


Figura 9. Angiogénesis e inflamación. 1. Vasculatura en reposo 2. Inflamación inducida por fuentes sistémicas o locales que activa el programa angiogénico, incrementando la permeabilidad del vaso sanguíneo y desestabilizando las uniones de las células endoteliales. 3. Proteólisis de la matriz extracelular durante el brote capilar. 4. La angiogénesis puede tener dos destinos: 4.1, la persistencia vascular crónica y 4.2, la regresión vascular y reparación del tejido.²

1.6 Muerte celular

1.6.1 Apoptosis

La apoptosis, es un mecanismo de muerte celular que se caracteriza por cambios bioquímicos y morfológicos bien definidos. Se ha propuesto como un evento crítico para mantener la homeostasis celular. Desempeña un papel importante en la regulación del crecimiento, el desarrollo, de la respuesta inmune, de células anormales en el organismo y se restringe a células individuales con la producción de citocinas que inhiben la inflamación, y sin la liberación de material intracelular al medio intersticial.⁴⁷⁻⁴⁸

1.6.1.2 Características bioquímicas

La muerte celular por apoptosis comienza con la fase de iniciación, la cual ocurre en respuesta a señales externas, cambios farmacológicos, fisiológicos o patológicos en las condiciones celulares internas por efecto de diferentes estímulos, tales como radiaciones, quimioterapia, hipoxia, temperatura, pérdida de adhesión celular, glucocorticoides y factores de crecimiento. Continúa con la segunda fase, conocida como fase de activación, en la que sucede el reconocimiento y la transducción de la señal de muerte celular, cuyo resultado metabólico conlleva a la tercera ó última fase, que es la conocida como fase de ejecución de la muerte celular. En esta fase se hidrolizan las proteínas de la lámina nuclear, ocurre la fragmentación del ácido desoxirribonucleico (ADN) y del contenido celular con deterioro de la morfología celular.⁴⁹

1.6.1.1 Características morfológicas

Entre los cambios morfológicos que ocurren en la célula durante la fase terminal de la apoptosis se incluyen la condensación y fragmentación de la cromatina nuclear, condensación del citoplasma, engrosamiento del retículo endoplásmico, disminución del tamaño celular, pérdida de la estructura de la superficie celular y la formación de cuerpos apoptóticos, los cuales son fagocitados por células vecinas o por macrófagos.⁵⁰ (Figura 10).

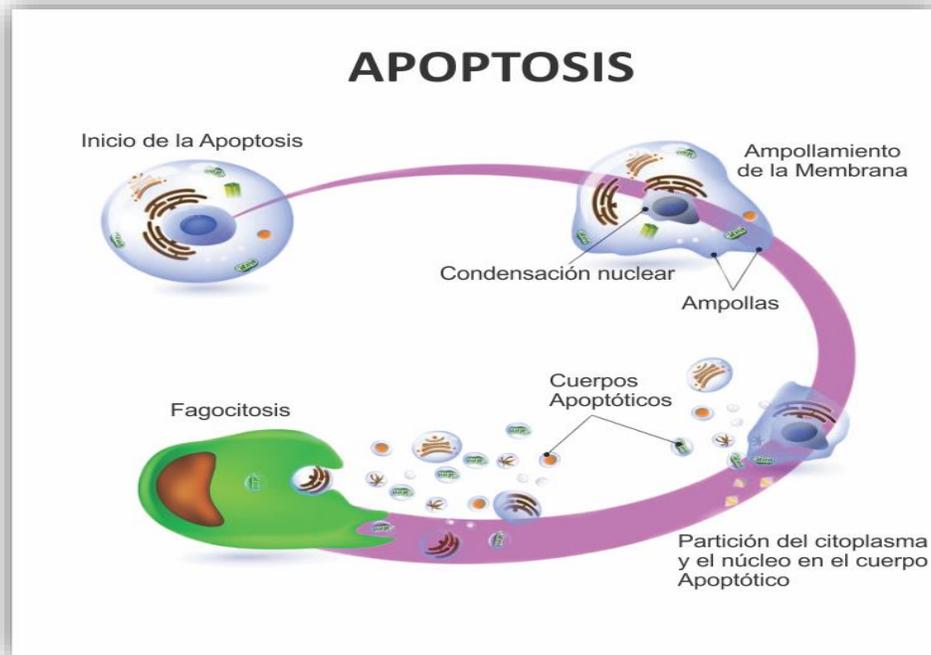


Figura 10. Cambios morfológicos de las células durante la apoptosis. Condensación y fragmentación de la cromatina nuclear, condensación del citoplasma, engrosamiento del retículo endoplásmico, disminución del tamaño celular, pérdida de la estructura de la superficie celular y la formación de cuerpos apoptóticos, los cuales son fagocitados por células vecinas o por macrófagos.⁵¹

1.6.1.3 Vías de ejecución y caspasa-3

La inducción y la ejecución de la apoptosis requieren de la cooperación de una serie de moléculas que dan señal a otras moléculas, receptores, enzimas y proteínas reguladoras del gen. Entre ellas, la cascada de señalización de las caspasas, regulada por diversas moléculas tales como las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP), proteínas de la familia de las Bcl2 y calpaína.⁴⁸

Las caspasas (cisteín aspartato-proteasas) son las enzimas que median las fases de activación y ejecución durante la apoptosis. Constituyen la familia denominada enzimas responsables de la conversión del precursor de la interleucina1 β (ICE por sus siglas en inglés), integrada por 14 cistein-aspártato proteasas que participan en la muerte celular por apoptosis con mecanismos de

acción similares pero con modelos de actividad y especificidad diferentes que se activan mediante la hidrólisis en secuencias específicas de cuatro residuos que cortan un enlace peptídico localizado estrictamente después de un residuo de ácido aspártico.^{48,52}

Las vías de señalización, a través de las que procede la muerte celular por apoptosis incluyen: a) la vía extrínseca que requiere de la activación de la caspasa-8 principalmente y está mediada por receptores de muerte localizados en la membrana plasmática (por ejemplo FAS o APO1), activados por ligandos de muerte específicos (FasL para FAS o APO1) promoviendo la oligomerización del receptor y la proteína adaptadora (FADD), y b) la vía intrínseca, en la que ocurre despolarización de la membrana mitocondrial, acompañada generalmente de la liberación de citocromo C y activa principalmente la caspasa-9. La activación de proteínas pro-apoptóticas (Bid, Bim) de la familia de Bcl² y proteínas como Bax, Bak, Puma, Noxa, VpR, p53, JNK, Ca²⁺, especies reactivas de oxígeno (ROS), ceramida, gangliósido GD3 promueve la liberación de citocromo-c que activa un complejo proteico (apoptosoma) que activa directamente a la caspasa-9. Además de la salida de citocromo-c desde la mitocondria ocurre la liberación de otra proteína (SMAC/DIABLO) que neutraliza a los inhibidores de las caspasas (IAPS). La vía mitocondrial puede conectarse también con la vía de receptores de muerte, ya que una vez activada la caspasa-8 por dichos receptores, esta caspasa activa a la proteína Bid, lo que provoca la apertura del poro mitocondrial y la activación de la caspasa-9 (Figura 11). En los mamíferos, las dos rutas de iniciación de la apoptosis que se disparan por eventos separados convergen en la activación de la caspasa-3 que actúa como ejecutor central de muerte.⁵³

La caspasa-3, conocida también como CPP32 (cisteín-proteasa de 32 KDa), Yama ó Apopaína, existe en las células como una pro-enzima inactiva de 32 KDa denominada procaspasa-3, que al activarse genera un dímero de dominios catalíticos idénticos formado por las subunidades activas de 12 y 17 kDa derivadas del precursor proteico por corte en Asp²⁸-Ser²⁹ y Asp¹⁷⁵-Ser¹⁷⁶.⁵⁴

La activación de la caspasa-3 provoca cambios en el núcleo, en la membrana plasmática y en la mitocondria. Es responsable parcial o totalmente de la proteólisis de proteínas tales como poli ADP-ribosa polimerasa (PARP), y está implicada en el daño tisular por efecto de la isquemia, de la reperfusión, de la hipoxia, de la intubación orotraqueal debido al volumen corriente.⁴⁸

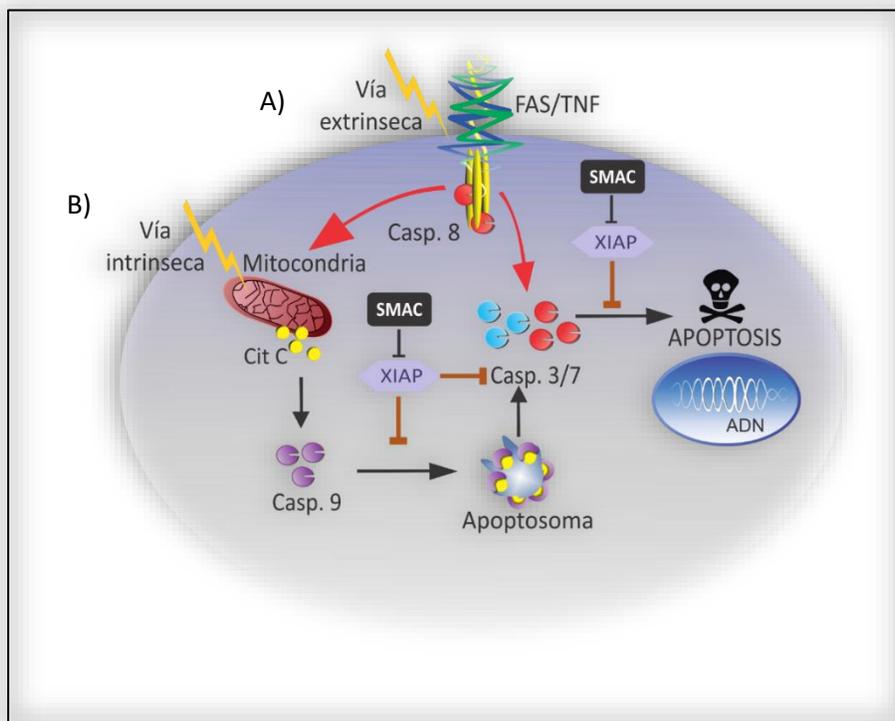


Figura 11. Vías de activación de la apoptosis. A) Vía extrínseca: requiere de la activación de la caspasa-8 principalmente y está mediada por receptores de muerte localizados en la membrana plasmática (por ejemplo FAS o APO1). B) Vía intrínseca: ocurre despoliarización de la membrana mitocondrial, acompañada generalmente de la liberación de citocromo C y activa principalmente la caspasa-9. Las dos rutas de iniciación de la apoptosis convergen en la activación de la caspasa-3.⁵⁵

1.6.1.4 Anti-apoptosis y Survivina

Las caspasas son las únicas proteasas que no se encuentran compartimentalizadas en la célula. Debido a sus efectos catastróficos sobre el microambiente celular es crucial que la activación y la actividad de las caspasas estén estrechamente reguladas. Este proceso está controlado por varios mecanismos como la localización subcelular, la regulación de los niveles de procaspasa (por ejemplo, el factor de transcripción Stat-1 regula la expresión de las procaspasas 1,2 y 3 o más probable, por la actividad de inhibidores de las caspasas: proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs) que se identificaron por primera vez en baculovirus, en donde son indispensables para impedir la apoptosis por el virus y por consiguiente permiten la infección.

Survivina es única entre las IAPs de mamíferos, que contiene solamente un dominio BIR (Región identificada en Baculovirus) y carece dominio RING en el extremo carboxilo. Actúa como supresor de la apoptosis, interviene en la división celular y permite la homeostasis celular. Survivina es una proteína de 16.5 kD de 142 aminoácidos, miembro de las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPS). El gen que genera esta proteína se localiza en la posición telemétrica del cromosoma 17.⁴⁸ Survivina no tiene un dominio que recluta a las caspasas. Se ha expuesto que la survivina inhibe al procesamiento de la procaspasa-3 y la procaspasa -7 y se une a estas caspasas activas in vitro. Survivina es regulada durante el ciclo celular, la cual se expresa en la fase G2-M y se asocia directamente con los microtúbulos del huso mitótico. A diferencia de las otras proteínas del grupo IAPs, survivina se expresa durante el desarrollo embrionario y fetal, siendo indetectable en tejido adulto normal.⁵⁶⁻⁵⁷

2. Justificación

El pulmón, es un órgano muy complejo cuya gran área de la superficie interactúa con el medio ambiente y con el sistema circulatorio. Sin embargo, a pesar del alto potencial de la exposición al medio ambiente o daño sistémico, la renovación de células epiteliales es un proceso muy lento.⁵⁸

En la actualidad tras un daño pulmonar, existen opciones terapéuticas limitadas. El trasplante de pulmón es la única terapia disponible para muchos pacientes con enfermedad del pulmón en fase terminal, como la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) y fibrosis pulmonar. Sin embargo, el número de pacientes enumerados para el trasplante pulmonar supera ampliamente el número de órganos donantes adecuados. Es por ello que se buscan nuevas terapias con el objeto de reparar y regenerar el tejido pulmonar, restaurando la función pulmonar.⁵⁹

La compleja naturaleza de la estructura y de los mecanismos de reparación pulmonar, impacta en la habilidad que afecta la eficiente reparación.¹ Las metaloproteinasas intervienen en diversos procesos fisiológicos y patológicos del organismo regulando las vías de señalización que controlan procesos como el crecimiento celular, la inflamación, la remodelación y la angiogénesis, característicos de patologías como fibrosis quística, asma y tromboembolia en los que prevalece la inflamación crónica.⁵ La remodelación de la matriz extracelular y la regresión vascular contribuyen a la resolución de la respuesta inflamatoria y facilitan la reparación, aunque, por otro lado, la expresión incesante de las proteínas de la matriz extracelular aunada al incremento en la angiogénesis sostiene la progresión de padecimientos neoplásicos.²

El daño pulmonar, altera el programa de homeostasis celular, activando mecanismos para reparar y regenerar el epitelio que pueden, continuar hacia una remodelación aberrante con procesos de diferenciación inadecuados o interacciones defectuosas entre el epitelio y el mesénquima generando

enfermedades crónicas del parénquima pulmonar como bronquiolitis obliterante, fibrosis y enfisema que pueden involucrar padecimientos vasculares pulmonares.¹

Se han desarrollado diseños experimentales de angiogénesis pulmonar en roedores en los que se genera la producción de nuevos vasos a partir de las arterias intercostales como consecuencia de la obstrucción del flujo pulmonar pinzando la arteria pulmonar.³⁻⁴ Estos modelos son de gran importancia para el estudio de los mecanismos de inflamación, participación de diferentes moléculas como quimiocinas, medicamentos, mecanismos de acción para tratar de evitar la neoformación de vasos sanguíneos en procesos carcinogénicos, además, de evaluar las alteraciones en la distensibilidad pulmonar.

Utilizando un modelo experimental en ratas a las que se les ligó la arteria pulmonar izquierda (LAPI) para provocar la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura pre-existente, en este trabajo de tesis, se estudiaron los cambios que ocurren en la remodelación de la matriz extracelular mediante la expresión de las metaloproteinasas 1, 7 y 13 por efecto de la angiogénesis y su consecuencia sobre la distensibilidad pulmonar, evaluando, además la remodelación tisular a través de: 1) formación de nuevos vasos sanguíneos (expresión de VEGF y CD-31), 2) muerte celular por apoptosis de las células del endotelio vascular, epitelio bronquial, epitelio alveolar (expresión de caspasa-3, fragmentación de DNA), 3) expresión de survivin endotelio vascular, epitelio bronquial, epitelio alveolar (proteína inhibidora de la apoptosis) y 4) evaluación histológica.

3. Hipótesis

La ligadura de la arteria pulmonar izquierda provocará isquemia e inflamación en el pulmón izquierdo generando la compensación de la irrigación sanguínea mediante la formación de nuevos vasos sanguíneos en el pulmón a partir de las arterias intercostales, ocasionando cambios en la homeostasis celular y cambios en la matriz extracelular por lo que:

Mientras mayor sea el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos mayor será la expresión de VEGF, CD31 y la degradación de colágena y por lo tanto, una sobreexpresión de las metaloproteinasas 1, 7 y 13 en la matriz extracelular.

Existirá una disminución de la distensibilidad ocasionada por el daño pulmonar al ligar la arteria pulmonar izquierda.

4. Objetivos

Investigar los cambios que ocurren en la expresión de las metaloproteinasas 1, 7 y 13 cuando ocurre remodelación de la matriz extracelular por efecto de la angiogénesis y su consecuencia sobre la distensibilidad pulmonar.

Objetivos específicos

- 1) Evaluar los cambios que ocurren en la expresión de la metaloproteinasa 1 de la matriz extracelular pulmonar post-angiogénesis.
- 2) Evaluar los cambios que ocurren en la expresión de la metaloproteinasa 7 de la matriz extracelular pulmonar post-angiogénesis.
- 3) Evaluar los cambios que ocurren en la expresión de la metaloproteinasa 13 de la matriz extracelular pulmonar post-angiogénesis.
- 4) Evaluar los cambios que ocurren en la degradación de las colágenas tipo 1 y 3 de la matriz extracelular pulmonar post-angiogénesis.
- 5) Evaluar los procesos de neovascularización mediante la expresión del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) y la Molécula de Adhesión Celular Endotelial Plaquetaria (CD31 o PECAM-1) en el parénquima pulmonar post-angiogénesis.
- 6) Evaluar la homeostasis celular mediante la expresión de caspasa-3, survivin y fragmentación del ADN en el parénquima pulmonar post-angiogénesis.
- 7) Evaluar los cambios histológicos que ocurren en remodelación de la matriz extracelular post-angiogénesis.

5. Material y Métodos

5.1 Diseño experimental

Se utilizaron 36 ratas Wistar de cualquier sexo, edad variable, con un peso entre 200 y 300 gramos, no relacionadas entre sí, sin antecedentes de cualquier enfermedad y libres de patología general y pulmonar. 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-1999⁶ y en la Guide for Care and Use of Laboratory Animals, U.S.A.⁷

5.1.1 Grupos de Estudio

Los animales fueron divididos al azar en 6 grupos de estudio.

Grupo I, control sin toracotomía (n=6): Las ratas no fueron sometidas a ningún procedimiento quirúrgico.

Grupo II, control con toracotomía (n=6): Las ratas fueron sometidas a una toracotomía.

Grupo III, ligadura de la arteria pulmonar izquierda de 1 a 3 días (n=6): Las ratas fueron sometidas a una toracotomía con ligadura de la arteria pulmonar izquierda que se mantuvo pinzada durante un periodo de tiempo comprendido entre 1 y 3 días.

Grupo IV, ligadura de la arteria pulmonar izquierda de 4 a 6 días (n=6): Las ratas fueron sometidas a una toracotomía con ligadura de la arteria pulmonar izquierda que se mantuvo pinzada durante un periodo de tiempo comprendido entre 4 y 6 días.

Grupo V, ligadura de la arteria pulmonar izquierda de 7 a 12 días (n=6): Las ratas fueron sometidas a una toracotomía con ligadura de la arteria pulmonar izquierda que se mantuvo pinzada durante un periodo de tiempo comprendido entre 7 a 12 días.

Grupo VI, ligadura de la arteria pulmonar izquierda de 13 a 15 días (n=6): Las ratas fueron sometidas a una toracotomía con ligadura de la arteria pulmonar izquierda que se mantuvo pinzada durante un periodo de tiempo comprendido entre 13 a 15 días.

5.1.1 Anestesia

Todos los animales se prepararon con 12 horas de ayuno para sólidos y 8 horas para líquidos, fueron anestesiados con ketamina (0.24ml/100mg peso) y xilacina (0.012ml/100mg peso) vía intramuscular.

5.1.2 Intubación, ventilación y técnica quirúrgica

Las ratas se colocaron sobre una tabla de cirugía en posición supina, se intubaron con una sonda orotraqueal y se conectaron a un ventilador (Viasys Respiratory Care, AVEATM) manteniendo una frecuencia respiratoria de 90 resp/min. Se realizó tricotomía y asepsia en la región de abordaje e inmediatamente después, con base en el grupo de estudio y utilizando las técnicas quirúrgicas habituales, se realizó una toracotomía a nivel del tercer espacio intercostal izquierdo (grupos de estudio II al VI), acto seguido, se procedió a ligar la arteria pulmonar izquierda con seda 6-0 (grupos de estudio III al VI).

5.2 Registro de la distensibilidad pulmonar

Los registros de la distensibilidad pulmonar basal se realizaron inmediatamente después de que las ratas fueron anestesiadas, intubadas y conectadas al ventilador de la siguiente manera:

1) Registro de la distensibilidad pulmonar basal en el grupo control sin toracotomía: Se realizó un registro de la distensibilidad pulmonar con el tórax cerrado y una Fracción inspirada de oxígeno (FiO_2) del 21% bajo tres diferentes presiones inspiratorias (14,16 y 18 cm H₂O, *registros basales con FiO_2 del 21%*). Obtenido el último registro basal a 18 cm H₂O, se incrementó la FiO_2 del 21% al 100%. Transcurridos 5 minutos, las ratas se sometieron a un minuto de apnea e inmediatamente después, se registró la distensibilidad pulmonar (*registro inmediato post-apnea con FiO_2 del 100%*). Concluido este registró y manteniendo, el tórax cerrado, se registró la distensibilidad pulmonar con una FiO_2 del 100% bajo tres diferentes presiones inspiratorias (14,16 y 18 cm H₂O, *registros basales con FiO_2 del 100%*).

2) Registro de la distensibilidad pulmonar basal en el grupo control con toracotomía: Se realizó un registro de la distensibilidad pulmonar en forma previa a la realización de una toracotomía (tórax cerrado) y una FiO_2 del 21% bajo tres diferentes presiones inspiratorias (14,16 y 18 cm H₂O, *registros basales pre-toracotomía con FiO_2 del 21%*). Obtenido el último registro basal a 18 cm H₂O, se incrementó la FiO_2 del 21% al 100%. Transcurridos 5 minutos, las ratas se sometieron a un minuto de apnea e inmediatamente después, se registró la distensibilidad pulmonar (*registro inmediato post-apnea y pre-toracotomía con FiO_2 del 100%*). Concluido este registro se registró la distensibilidad pulmonar con una FiO_2 del 100% bajo tres diferentes presiones inspiratorias (14,16 y 18 cm H₂O, *registros basales con FiO_2 del 100%*). Se realizó una toracotomía a nivel del tercer espacio intercostal izquierdo e inmediatamente después, se realizó un registro de la distensibilidad pulmonar post-toracotomía y una FiO_2 del 21% bajo tres diferentes presiones inspiratorias (14,16 y 18 cm H₂O, *registros post-toracotomía, FiO_2 del 21%*). Obtenido el último registro basal a 18 cm H₂O post-toracotomía, se incrementó la FiO_2 del 21% al 100%, transcurridos 5 minutos, las ratas se sometieron a un minuto de apnea e inmediatamente después, se registró la distensibilidad pulmonar (*registro inmediato post-apnea post-toracotomía, FiO_2 del 100%*). Se registró la distensibilidad pulmonar con una FiO_2 del 100% bajo tres

diferentes presiones inspiratorias (14,16 y 18 cm H₂O, *registros post-toracotomía con FiO₂ del 100%*).

3) Registro de la distensibilidad pulmonar basal de los grupos con ligadura de la arteria pulmonar izquierda: En los grupos de estudio III al VI, se realizó un registro de la distensibilidad pulmonar en forma previa a la realización de una toracotomía (tórax cerrado) y una FiO₂ del 21% bajo tres diferentes presiones inspiratorias (14, 16 y 18 cmH₂O, *registros basales pre-toracotomía con FiO₂ del 21%*). Obtenido el último registro basal a 18 cm H₂O, se incrementó la FiO₂ del 21% al 100%. Transcurridos 5 minutos, las ratas se sometieron a un minuto de apnea e inmediatamente después, se registró la distensibilidad pulmonar (*registro inmediato post-apnea y pre-toracotomía con FiO₂ del 100%*). Se registró la distensibilidad pulmonar con una FiO₂ del 100% bajo tres diferentes presiones inspiratorias (14,16 y 18 cm H₂O, *registros basales con FiO₂ del 100%*). Se realizó una toracotomía a nivel del tercer espacio intercostal izquierdo y se procedió a ligar la arteria pulmonar izquierda, inmediatamente después, se realizó un registro de la distensibilidad pulmonar post-ligadura de la arteria pulmonar izquierda y una FiO₂ del 21% bajo tres diferentes presiones inspiratorias (14,16 y 18 cm H₂O, *registros post-ligadura de la arteria pulmonar izquierda, FiO₂ del 21%*). Obtenido el último registro basal a 18 cm H₂O post-LAPI, se incrementó la FiO₂ del 21% al 100%. Transcurridos 5 minutos, las ratas se sometieron a un minuto de apnea e inmediatamente después, se registró la distensibilidad pulmonar (*registro inmediato post-apnea, post-ligadura de la arteria pulmonar izquierda, FiO₂ del 100%*). Concluido este registro, se registró la distensibilidad pulmonar con una FiO₂ del 100% bajo tres diferentes presiones inspiratorias (14,16 y 18 cm H₂O, *registros post-ligadura de la arteria pulmonar izquierda con FiO₂ del 100%*).

Una vez obtenidos todos los registros basales de distensibilidad pulmonar, se cerró la cavidad torácica y los planos superficiales de manera convencional permitiendo que las ratas de los grupos III al VI se recuperaran de la anestesia. Una vez recuperadas, las ratas se marcaron con plumón indeleble para su

identificación, se colocaron en una caja de acrílico y se mantuvieron bajo condiciones de bioterio hasta cubrir el tiempo estipulado para el fin de estudio con base en el grupo de estudio. Concluido el tiempo de estudio establecido, las ratas fueron anestesiadas, intubadas y conectadas al ventilador de la siguiente manera:

4) Registro de la distensibilidad pulmonar final de los grupos con ligadura de la arteria pulmonar izquierda: Se realizó un registro de la distensibilidad pulmonar con tórax cerrado y una FiO_2 del 21% bajo tres diferentes presiones inspiratorias (14,16 y 18 cm H_2O , *registros finales tórax cerrado post-LAPI con FiO_2 del 21%*). Obtenido el último registro basal a 18 cm H_2O , se incrementó la FiO_2 del 21% al 100%. Transcurridos 5 minutos, las ratas se sometieron a un minuto de apnea e inmediatamente después, se registró la distensibilidad pulmonar (*registro inmediato post-apnea post-ligadura de la arteria pulmonar izquierda con FiO_2 del 100%*). Se registró la distensibilidad pulmonar con una FiO_2 del 100% bajo tres diferentes presiones inspiratorias (14,16 y 18 cm H_2O , *registros finales post-LAPI con FiO_2 del 100%*).

5.3 Obtención de las muestras.

Concluidos los registros finales de la distensibilidad pulmonar, las ratas fueron eutanaziadas mediante la administración de una sobredosis de anestésico y se procedió a la obtención de las muestras de parénquima pulmonar, de ambos pulmones.

5.4 Procesamiento de las muestras.

De cada uno de los pulmones (derecho e izquierdo), se obtuvieron muestras, y se sumergieron en una solución amortiguada de formol al 10% durante 24 horas para su fijación. Transcurrido este tiempo, las muestras fueron retiradas del formol y procesadas para su inclusión en bloques de parafina y obtención de cortes de 3-4 μm que fueron montados sobre laminillas previamente con se montaron sobre portaobjetos que fueron tratados previamente con poli-L-lisina para la realización de las determinaciones histológicas e inmunohistoquímica.

5.5 Evaluaciones

5.5.1 Evaluación Histológica

Se realizó una evaluación histopatológica en las muestras de parénquima de ambos pulmones utilizando las tinciones de hematoxilina-eosina y rojo sirio. La tinción hematoxilina-eosina se clasifica como coloración topográfica, ésta permite obtener una visión general de las estructuras contenidas en un tejido y fue utilizadas para evaluar la integridad y alteraciones en la matriz extracelular (inflamación, hemorragia, fibrosis, formación de nuevos vasos sanguíneos), mientras que la tinción rojo sirio se clasifica como una tinción histoquímica e indica la presencia de compuestos químicos así como su distribución dentro de las células o espacios extracelulares de un tejido pero no proporciona detalles estructurales y fue utilizada para observar los cambios en el tipo de colágena de la matriz extracelular del pulmón a través de la captación de colorante.

5.5.2 Evaluación Inmunohistoquímica

Se evaluó la expresión de las metaloproteinasas MMP-1, MMP-7 y MMP-13, Caspasa-3, VEGF, CD31 y Survivin, en las muestras de parénquima de ambos pulmones mediante la técnica inmunohistoquímica del sistema estreptavidina-biotina-peroxidasa, tinción con hematoxilina, contratinción con diaminoetilcarbazol y los anticuerpos primarios anti-VEGF (Mouse anti-human Monoclonal, Anti-VEGF, LS-C124779-6, Lifespan, Biosciences), CD-31 (Rabbit Polyclonal Anti-CD31, 250590, ABBIOTEC), Caspasa-3 (Rabbit Polyclonal Anti-Caspase 3, ab79123, Abcam) anti-survivin (Anti-Survivin NB-500-20-1, Novus Biologicals), MMP-1 (Rabbit Polyclonal Anti-MMP1 Hemopexin domain, ab38929, Abcam), MMP-7 (Rabbit Polyclonal Anti-MMP7 antibody, ab5706, Abcam) MMP-13 (Rabbit Polyclonal Anti-MMP13 Hinge region, ab39012, Abcam), con base en la siguiente técnica:

5.5.2.1 Preparación del tejido

Las laminillas sobre las que se montaron los cortes de tejido, se incubaron durante 20 minutos dentro de una estufa mantenida a una temperatura 55°C para eliminar la parafina. Inmediatamente después, el tejido se rehidrató y clarificó mediante una inmersión seriada en xilol (10 minutos), etanol absoluto (1 minuto), etanol al 90% (1 minuto) y etanol al 70% (1 minuto). Posteriormente, las laminillas se colocaron en agua destilada durante 10 minutos y en una solución Buffer Tris-Salina-Tween 20 con pH 7.6 (TBST: Tris-HCl 0,05 mol/L, NaCl 0,3 mol/L, Tween 20 al 0,1%, conservante al 0,01%, pH 7.6) durante 10 minutos.

5.5.2.2 Exposición y recuperación del antígeno

Concluida la preparación del tejido, se realizó la recuperación del antígeno colocando las laminillas en una caja de Coplin: a) sumergidas en una solución amortiguadora de citratos 10X (Ácido cítrico 210 g, 1 L de agua destilada , NaOH para ajustar a pH 6) para la búsqueda de VEGF, CD-31, Caspasa-3 y Survivin, y b) en Solución de EDTA–Amortiguada 10x (24g Tris Base, 7.4g EDTA [sal disódica], 2 L de agua destilada, pH 9) para la búsqueda de MMP1, MMP7 y MMP13; siendo este el método químico de recuperación.

Al mismo tiempo, el método físico incluyó la colocación de la caja de Coplin en el horno de microondas durante 5 minutos a una potencia de 30 en un rango de temperatura entre 95-100°C. Transcurrido este tiempo, la caja de Coplin se retiró del horno y se mantuvo a temperatura ambiente para su enfriamiento. Inmediatamente después de esto, las laminillas se colocaron dentro de una cámara de incubación húmeda mantenida a temperatura ambiente. El tejido, de cada una de las laminillas se delineó con un lápiz de cera (Super Pap Pen, BioCare Medical, PEN1111). El tratamiento del tejido para la exposición de las metaloproteinasas, se complementó adicionando una gota de Proteinasa K (Proteinase K, 21627, IHC Select) seguido de una incubación durante 15 minutos. Las laminillas fueron lavadas con TBST durante 10 minutos.

5.5.2.3 Eliminación de la peroxidasa endógena.

Una vez que las laminillas fueron lavadas con TBST durante 10 minutos, se adicionaron 100 μ L de una solución de peróxido de hidrógeno al 3% (diluído en metanol para la determinación de las metaloproteinasas y diluido en agua para la determinación de survivina, VEGF, Caspasa-3 y CD31). Transcurridos 15 minutos, y para la eliminación de la peroxidasa endógena, se realizaron dos lavados de 10 minutos con TBST.

5.5.2.4 Bloqueo del pegado inespecífico

Para evitar el “pegado inespecífico” se adicionaron 100 μ L de suero bloqueador (Blocking Serum. Normal Horse Serum, VECTASTAIN, Kit Universal, PK-8800), a cada una de las laminillas permitiendo una incubación de 15 minutos.

5.5.2.5 Primer anticuerpo

Se adicionaron, a cada uno de los tejidos, 100 μ L del primer anticuerpo (anti-VEGF [LS-C124779-6, Lifespan, Biosciences], Anti-CD31 [250590, ABBIOTEC], anti-survivin [NB-500-20-1, Novus Biologicals], anti-MMP-1 [ab38929, Abcam], anti-MMP-7 [ab5706, Abcam] y Anti MMP-13 [ab39012, Abcam]) en dilución 1:100 (VEGF), 1:150 (CD31), 1:50 (Caspasa-3), 1:300 (Survivina), 1:250 (MMP 1, 7 y 13) en TBST. Las muestras se incubaron durante 24 horas a una temperatura de 4°C. Se incluyeron controles negativos (sin la adición de anticuerpo a determinar) en todos los ensayos.

5.5.2.6 Reacción streptavidina-biotina-peroxidasa.

Transcurrido el tiempo de incubación a 4°C, se realizaron tres lavados seriados de 10 minutos cada uno con solución TBST. Posteriormente se adicionaron 100 μ L del segundo anticuerpo (Biotinylated Universal Secondary antibody that recognizes

mouse, rabbit and goat IgG. VECTASTAIN, Kit Universal, PK-8800) y después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente se realizaron tres lavados seriados de diez minutos cada uno con solución TBST en forma previa a la adición de 100 μ L del conjugado streptavidina-biotina-peroxidasa (Streptavidin-Peroxidase, VECTASTAIN, Kit Universal, PK-8800). Transcurridos 15 minutos se realizaron tres lavados seriados de cinco minutos cada uno con solución TBST.

5.5.2.7 Revelado de la reacción antígeno-anticuerpo

Para revelar la reacción antígeno-anticuerpo se utilizó diaminobenzidina (Betazoid DAB Chromogen Kit, BioCare Medical, DBD-2004) para el caso de las metaloproteinasas y aminoetilcarbazol (AEC Substrate Pack, BioGenex, HK092-5K) para caspasa-3, VEGF, CD-31 y survivina con base en las instrucciones recomendadas en los estuches comerciales.

A cada uno de los tejidos se les adicionaron 100 μ L de diaminobenzidina o de aminoetilcarbazol con base en la expresión del antígeno a determinar y después de cinco minutos de incubación a temperatura ambiente, las muestras se enjuagaron en agua corriente. Para la contratincción de todos los tejidos, sin importar el uso de diaminobenzidina o de aminoetilcarbazol se realizó adicionando una gota de hematoxilina (Hematoxylin QS Vector, Laboratories, H-3404) y después de treinta segundos, las muestras se enjuagaron con agua corriente en forma previa a la incorporación a una solución saturada de carbonato de litio (Fisher Scientific Chemical, S93278) y al montaje en medio acuoso. La expresión positiva de todos los antígenos evaluados se tiñe de color marrón, los controles negativos se observan de color azul.

La determinación de apoptosis por el método de TUNEL (TdT- mediated dUTP nick end labelling) se realizó con ayuda de un estuche comercial (ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit S7101, Chemicon Inc) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este ensayo se basa en la incorporación de nucleótidos conjugados con digoxigenina en los extremos 3'OH de los fragmentos

de ADN que se forman durante la apoptosis, mediante la acción de la enzima Terminal Deoxinucleotidol transferasa (TdT). Los fragmentos de ADN que se han marcado con el digoxigenina-nucleótido se une a un anticuerpo anti-digoxigenina que esta conjugada con un molécula indicadora de peroxidasa. El conjugado de anticuerpo de peroxidasa ligado genera enzimáticamente una tinción permanente, intensa y localizada a partir de sustratos cromogénicos (Diaminoetilcarbazol), proporcionando detección sensible en inmunohistoquímica. La expresión positiva de fragmentación nuclear se marca de color marrón.

En la figura 12 se ilustra el procedimiento representativo de los pasos a realizar para la determinación inmunohistoquímica de los diferentes antígenos.

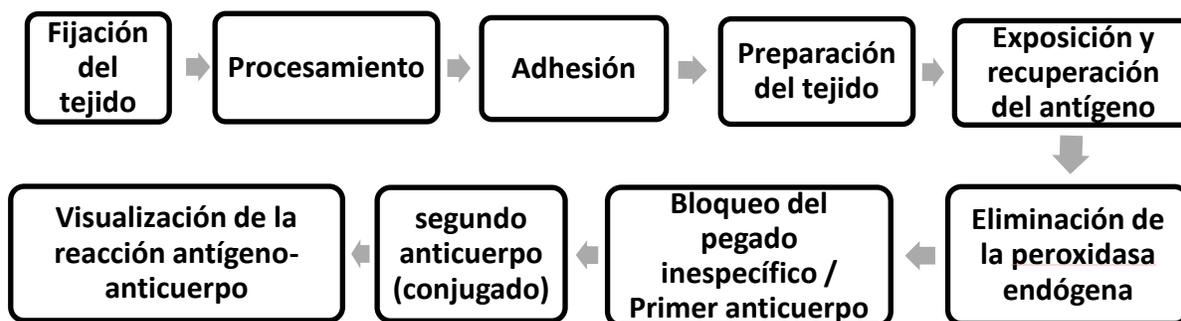


Figura 12. Procedimiento representativo de los pasos a realizar para la determinación inmunohistoquímica de los diferentes antígenos.

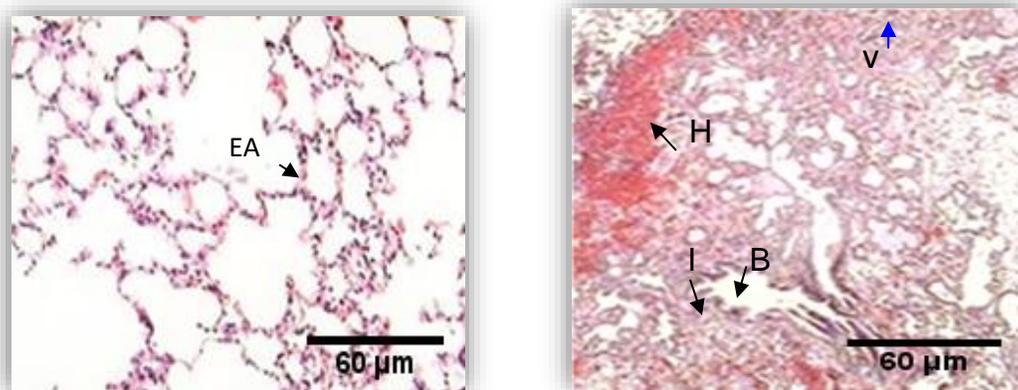
6. Resultados

6.1 Evaluaciones

6.1 .1 Evaluación histológica

6.1.1.1 Hallazgos en pulmón

Con la tinción hematoxilina-eosina, se pudo observar la presencia de nuevos vasos, junto con los procesos de inflamación, hemorragia, fibrosis y reacción fibroblástica. Estos fueron visiblemente mayor en el pulmón izquierdo de las ratas de todos los grupos de estudio en los que se ligó la arteria pulmonar izquierda, con respecto al pulmón derecho de esos mismos animales y en comparación con ambos pulmones de los sujetos de los grupos control (GI y GII). En la figura 13 se observa las imágenes representativas de un pulmón sano y un pulmón con LAPI que ha sufrido hemorragia, inflamación y la formación de nuevos vasos sanguíneos.



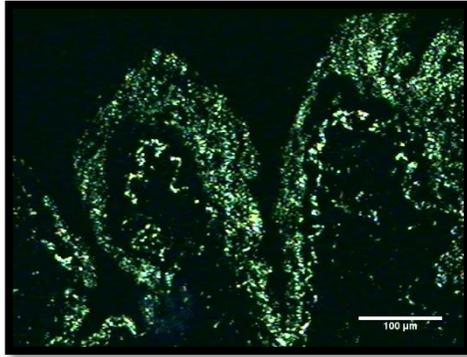
(A)

(B)

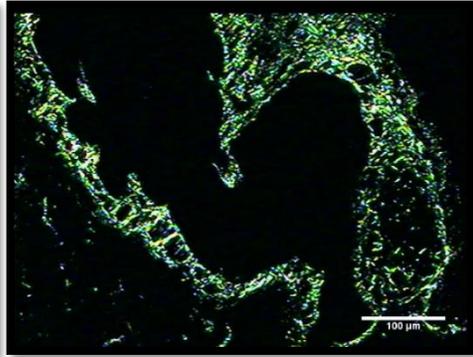
Figura 13. Tinción hematoxilina-eosina H-E (10x Y 2.5X). A) Pulmón control sano. B) Pulmón izquierdo 10 días post-ligadura de la arteria pulmonar. SA: Saco alveolar EA: Epitelio alveolar, B: Bronquio, V: Vaso sanguíneo, H: hemorragia, I: inflamación. Barra de 60 µm.

6.1.1.2 Tipo de colágena

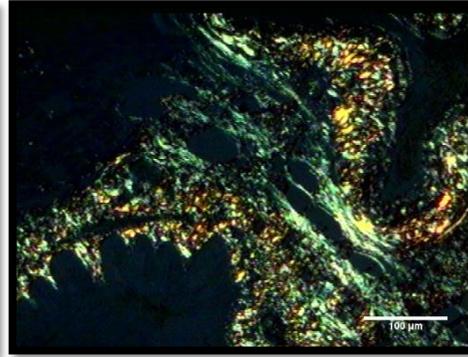
Al evaluar el tejido pulmonar con la tinción rojo sirio y luz polarizada, se observó que en los grupos control (en los que no se ligó la arteria pulmonar izquierda, GI, sin toracotomía y GII con toracotomía) en ambos pulmones (derecho e izquierdo), predomina la presencia de colágena tipo III (fibras de color verde), mientras que en el grupo III, en el que las ratas fueron sometidas a ligadura de la arteria pulmonar y eutanasia entre uno y tres días después, se aprecia, además de la expresión de colágena tipo III, la expresión de colágena tipo I (fibras de color rojo) principalmente, en el pulmón izquierdo (en el que se ligó la arteria) (Figura 14). Esta expresión, se incrementa en el grupo IV en ambos pulmones (4-6 días post-LAPI), aparentemente disminuye en el grupo V (7-12 días post-LAPI) y se incrementa considerablemente en el grupo con mayor tiempo de estudio (VI, 13-15 días).



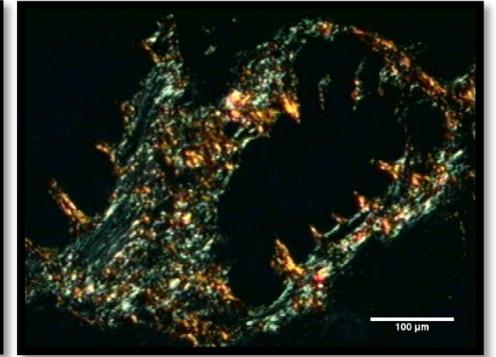
A



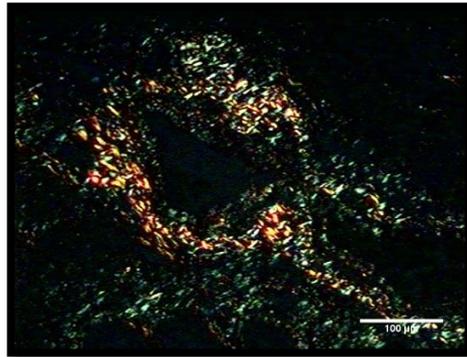
B



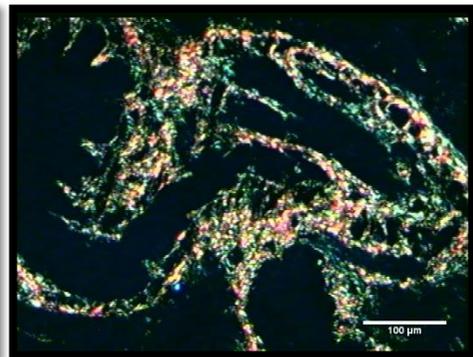
C



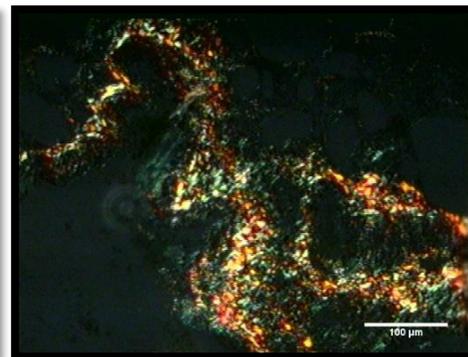
D



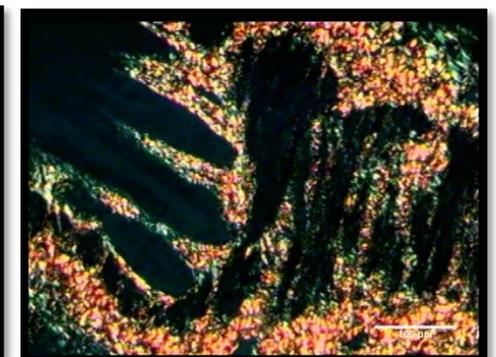
F



G



H



I

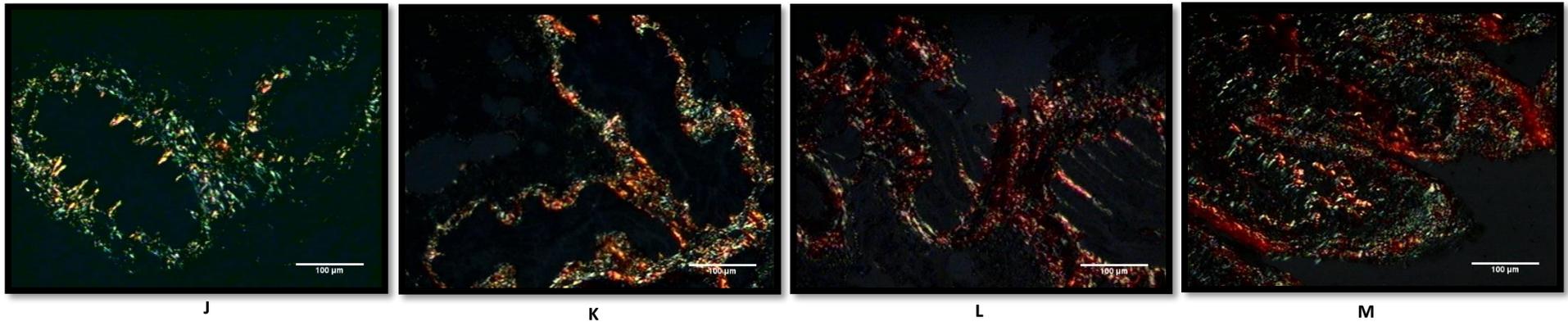


Figura 14. (A-L) Tinción Rojo Sirio. Observado con microscopio con luz polarizada (40X). Fibras de colágena tipo I (fibras de color rojo o anaranjado), tipo II (fibras de color amarillo) y/o tipo III (fibras de color verde). Imágenes representativas de: A) Tejido pulmonar izquierdo control sin toracotomía (GI). B) Tejido pulmonar derecho sin toracotomía (GI). C) Tejido pulmonar izquierdo con toracotomía (GII). D) Tejido pulmonar derecho con toracotomía (GII). E) Tejido pulmonar izquierdo 1-3 días con ligadura de la API (GIII). F) Tejido pulmonar derecho 1-3 días con ligadura de la API (GIII). G) Tejido pulmonar izquierdo 4-6 días con ligadura de la API (GVI). H) Tejido pulmonar derecho 4-6 días con ligadura de la API (GIV) (I). Tejido pulmonar izquierdo 7-12 días con ligadura de la API (GV). J) Tejido pulmonar derecho 7-12 días con ligadura de la API (GV). (K) Tejido pulmonar izquierdo 13-15 días con ligadura de la API (GVI). (L) Tejido pulmonar derecho 13-15 días con ligadura de la API (GVI). Barra=100 µm, n=6/grupo de estudio, 3 campos.

6.1.2 Evaluación inmunohistoquímica.

Para la interpretación de los resultados de la expresión inmunohistoquímica de las metaloproteinasas 1,7 y 13; del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), del CD-31, y de la survivina, se estableció una escala subjetiva de interpretación en donde, expresión negativa (-) refiere la no expresión del antígeno, leve (+) corresponde a una marca muy tenue del anticuerpo alrededor del vaso o bronquiolo, moderada (++) corresponde a una marca fuerte del anticuerpo alrededor del vaso o bronquios y severa (+++) corresponde a una marca intensa del anticuerpo alrededor del vaso o bronquios, observado en 10 campos.

La expresión de caspasa-3 y de T-dUTP, indicadores de la muerte celular que ocurre por apoptosis, se cuantificó obteniendo el porcentaje promedio de células positivas (epiteliales bronquiales, epiteliales alveolares y endoteliales vasculares) en 10 campos 40X para caspasa-3 y en 3 campos 40X para la visualización de la fragmentación del DNA por el método de TUNEL.

6.1.2.1 Metaloproteinasas de matriz extracelular- 1,-7 y -13 (MMP-1, MMP-7, MMP-13)

a) Metaloproteínasa de matriz extracelular-1 (MMP-1)

Con respecto al control negativo del ensayo y a las muestras de tejido pulmonar de los grupos control (GI y GII), en las ratas del (GV), se observó una marcada expresión de MMP1 en el endotelio vascular y en el epitelio bronquial de ambos pulmones (derecho e izquierdo) 8 días después de haber ligado la arteria pulmonar izquierda y cuatro días después, en los animales del grupo (IV), se observó, además, doce días después de haber ligado la arteria pulmonar izquierda, compromiso de la pared alveolar pero únicamente en el pulmón izquierdo (en el que se ligó la arteria pulmonar), con marca evidente de esta

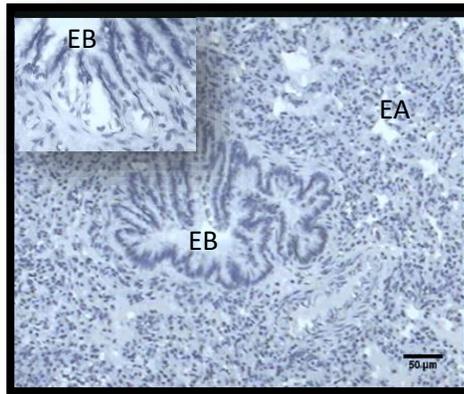
metaloproteinasa en los nuevos vasos, al día 15 post-ligadura de la arteria pulmonar izquierda (Foto K, figura 15).

En la tabla 2 se muestra la expresión de la MMP-1 en los diferentes grupos de estudio, tanto en el epitelio bronquial como el endotelio vascular, observado en 10 campos.

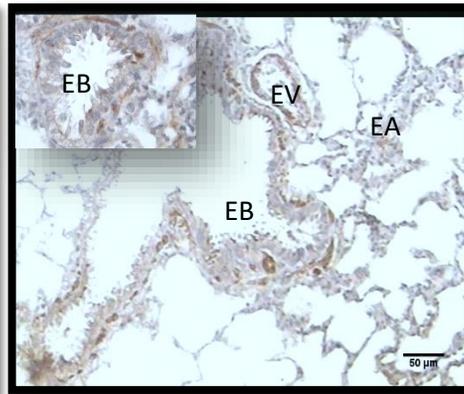
		<i>GI</i>	<i>GII</i>	<i>GIII</i>	<i>GIV</i>	<i>GV</i>	<i>GVI</i>
<i>Epitelio bronquial</i>	<i>Pulmón derecho</i>	+	-	+	+	+++	-
	<i>Pulmón izquierdo</i>	+	+	+	+	++	+++
<i>Endotelio vascular</i>	<i>Pulmón derecho</i>	+	-	-	-	++	-
	<i>Pulmón izquierdo</i>	+	+	+	+	++	+++

Escala subjetiva de interpretación inmunohistoquímica para la expresión de metaloproteinasa 1: negativa (-), leve (+), moderada (++), severa (+++).

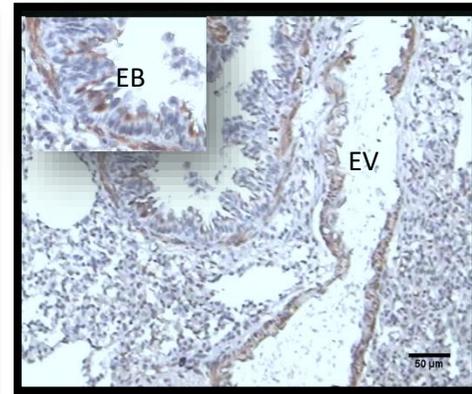
Tabla 2. Expresión de la metaloproteinasa-1, MMP-1 en epitelio bronquial y endotelio vascular del pulmón derecho e izquierdo de los grupos control GI y GII (Control sin toracotomía y con toracotomía respectivamente) y de estudio GIII-GV (Grupos con ligadura de la arteria pulmonar de 1-15 días post ligadura).



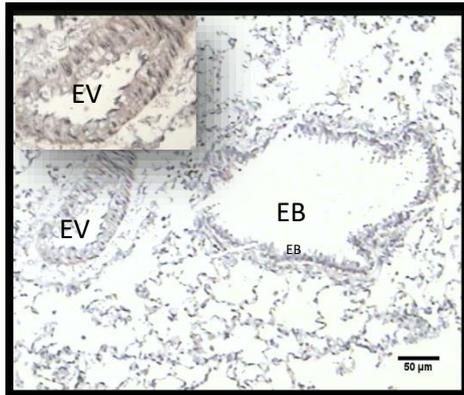
A



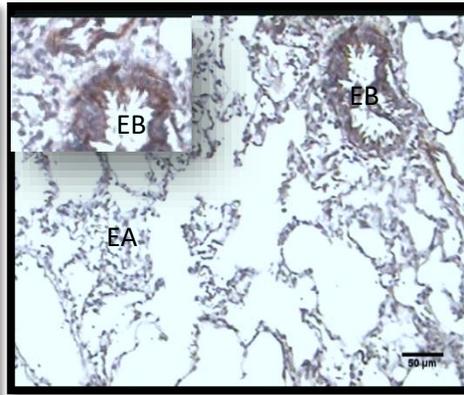
B



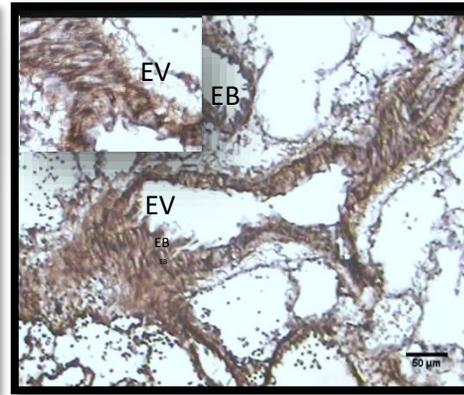
C



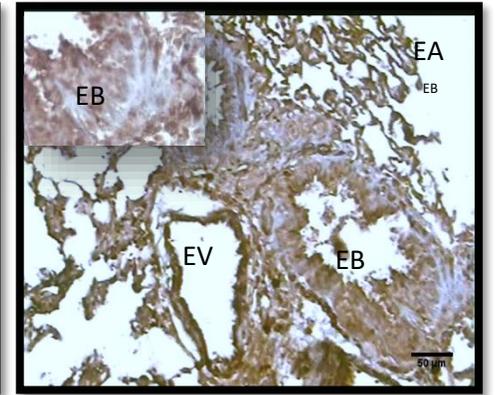
D



E



F



G

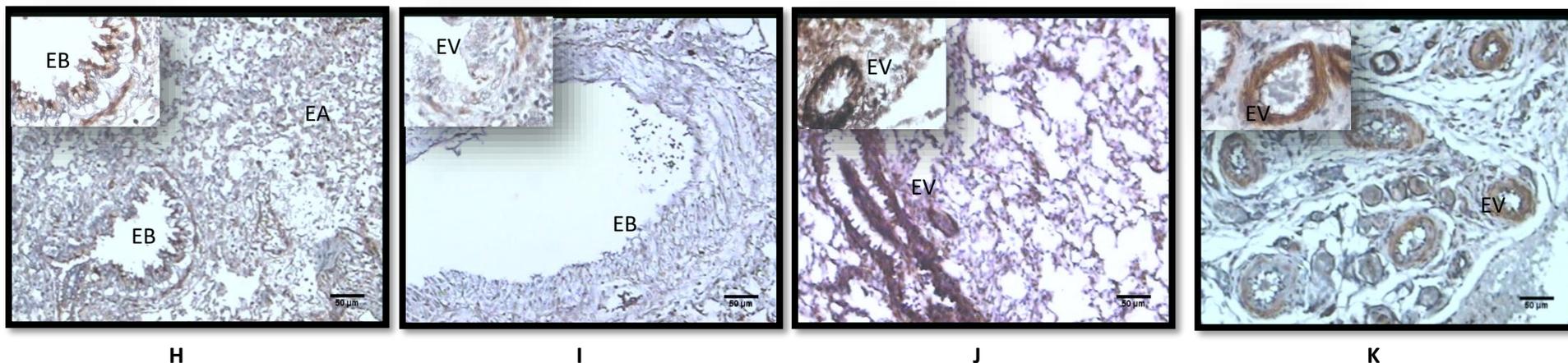


Figura 15. (A-K) Determinación inmunohistoquímica de MMP-1 en tejido pulmonar (10X y 40X). Sistema Avidina-Biotina-Peroxidasa, tinción con diaminobencidina, contratinción con hematoxilina. Imágenes representativas de: A) Tejido pulmonar control sin anti-MMP-1. B) Tejido pulmonar control sin toracotomía (GI). C) Tejido pulmonar control con toracotomía (GII). D) Tejido pulmonar derecho 1-3 días con ligadura de la API (GIII). E) Tejido pulmonar derecho 4-6 días con ligadura de la API (GIV). F) Tejido pulmonar derecho 7-12 días con ligadura de la API (GV). G) Tejido pulmonar derecho 13-15 días con ligadura de la API (GVI). H) Tejido pulmonar izquierdo 1-3 días con ligadura de la API (GIII). I) Tejido pulmonar izquierdo 4-6 días con ligadura de la API (GIV). J) Tejido pulmonar izquierdo 7-12 días con ligadura de la API (GV). K) Tejido pulmonar izquierdo 13-15 días con ligadura de la API (GV). EA: Epitelio Alveolar, EB: Epitelio Bronquial, EV: Endotelio Vascular. Barra= 50 µm, n=6/grupo de estudio, 10 campos.

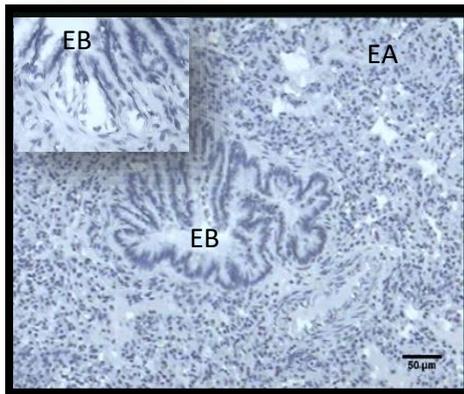
b) Metaloproteinasa de matriz extracelular -7

Se observó que la expresión de MMP-7 en el tejido pulmonar, se localiza, principalmente, alrededor de los vasos. Con respecto al control negativo del ensayo y a las muestras de tejido pulmonar de los grupos control (GI y GII); en las ratas del GIII durante los primeros 3 días después de haber pinzado la arteria pulmonar izquierda, la expresión de esta metaloproteinasa se evidencia como una gran marca alrededor de todos los vasos y bronquiolos, principalmente en el pulmón izquierdo (Figura 16). En el pulmón izquierdo de las ratas de los grupos de estudio IV y VI, en los que se ligó la arteria pulmonar, la expresión de MMP7 tiende a disminuir en los días 4 y 15 después de realizar la ligadura. Doce días después de haber ligado la arteria pulmonar izquierda, compromiso de la pared alveolar pero únicamente en el pulmón izquierdo (en el que se ligó la arteria pulmonar) y en el pulmón izquierdo de las ratas de los grupos de estudio V y VI (7-12 días y 13-15 días post-ligadura de la arteria pulmonar izquierda) la expresión de MMP7 predominó en los vasos pequeños (Tabla 3).

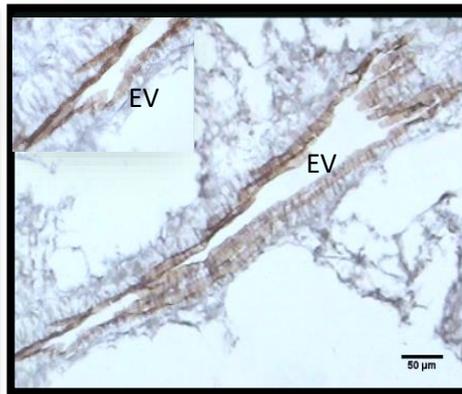
		<i>GI</i>	<i>GII</i>	<i>GIII</i>	<i>GIV</i>	<i>GV</i>	<i>GVI</i>
<i>Epitelio bronquial</i>	<i>Pulmón derecho</i>	+	+	+	+	+++	-
	<i>Pulmón izquierdo</i>	+	+	++	+	++	+++
<i>Endotelio vascular</i>	<i>Pulmón derecho</i>	+	+	-	-	++	-
	<i>Pulmón izquierdo</i>	+	+	++	+	++	+++

Escala subjetiva de interpretación inmunohistoquímica para la expresión de metaloproteinasa 7: negativa (-), leve (+), moderada (++), severa (+++).

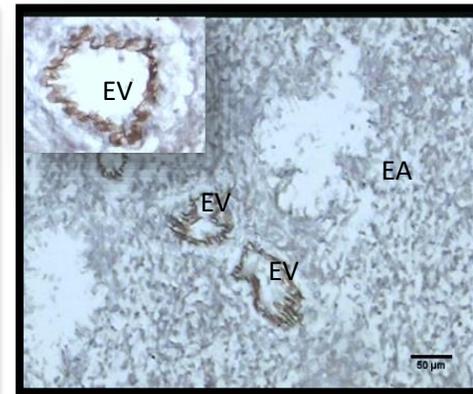
Tabla 3. Expresión de la metaloproteinasa-7, MMP-7 en epitelio bronquial y endotelio vascular de los pulmones derecho e izquierdo de los grupos control GI y GII (Control sin toracotomía y con toracotomía respectivamente) y de estudio GIII-GV (Grupos con ligadura de la arteria pulmonar de 1-15 días post ligadura).



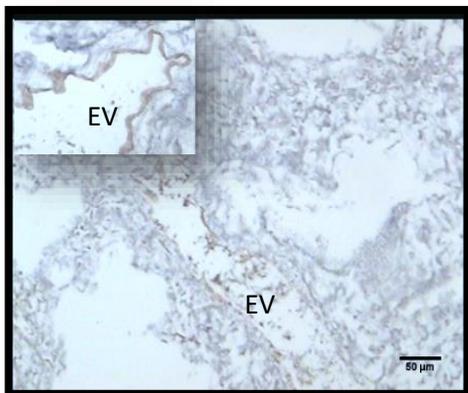
A



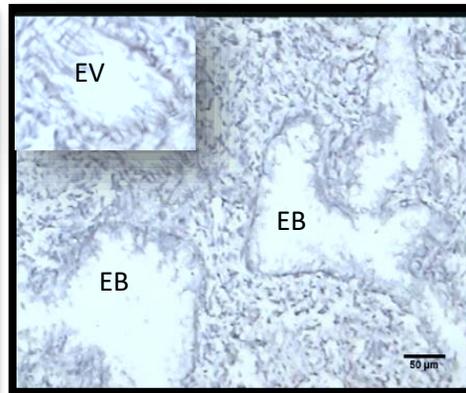
B



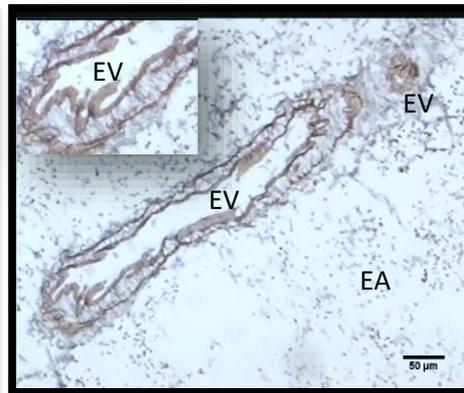
C



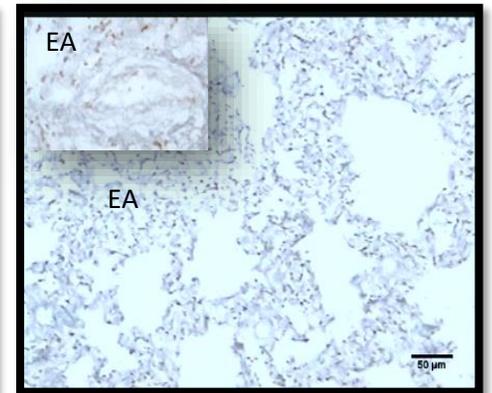
D



E



F



G

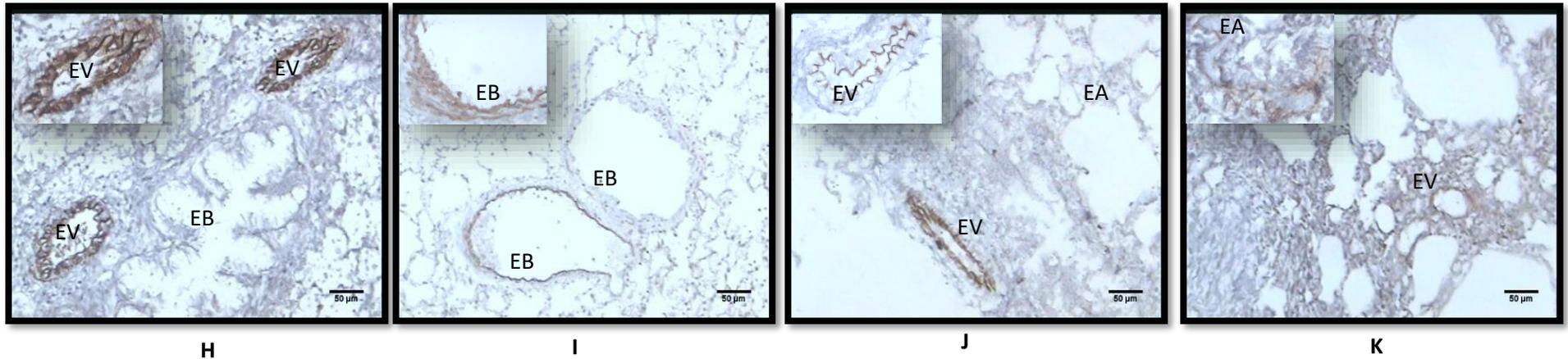


Figura 16. (A-K) Determinación inmunohistoquímica de MMP7 en tejido pulmonar (10X y 40X). Sistema Avidina-Biotina-Peroxidasa, tinción con diaminobencidina, contratinción con hematoxilina. Imágenes representativas de: A) Tejido pulmonar control sin anti-MMP-7. B) Tejido pulmonar control sin toracotomía (GI). C) Tejido pulmonar control con toracotomía (GII). D) Tejido pulmonar derecho 1-3 días con LAPI (GIII). (16-E) Tejido pulmonar derecho 4-6 días con ligadura de la API (GIV). F) Tejido pulmonar derecho 7-12 días con LAPI (GV). G) Tejido pulmonar derecho 13-15 días con ligadura de la API (GVI). H) Tejido pulmonar izquierdo 1-3 días con LAPI (GIII). I) Tejido pulmonar izquierdo 4-6 días con ligadura de la API (GIV). J) Tejido pulmonar izquierdo control 7-12 días con ligadura de la API (GV). K) Tejido pulmonar izquierdo 13-15 días con ligadura de la API (GVI). EA: Epitelio Alveolar, EB: Epitelio Bronquial, EV: Endotelio Vascular. Barra= 50 µm, n=6/grupo de estudio, observando 10 campos.

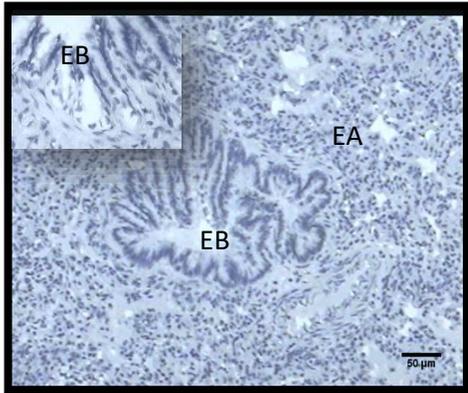
c) Metaloproteinasa de matriz extracelular- 13

Con respecto al control negativo del ensayo y a las muestras de tejido pulmonar de los grupos control (GI y GII), no encontramos cambios aparentes en la expresión de MMP13 por efecto de la angiogénesis (Figura 17). Sin embargo, en el grupo V tanto en el epitelio bronquial como el endotelio vascular se encontró una expresión moderada en el pulmón izquierdo, sin ser significativa, observada en 10 campos (Tabla 4).

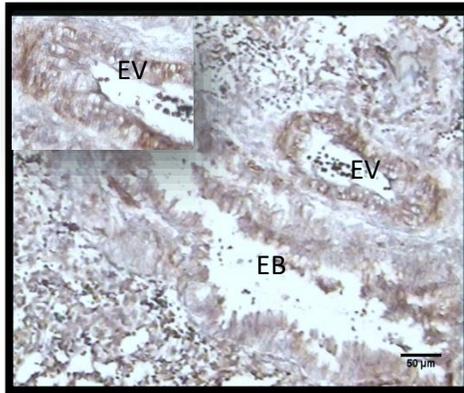
		GI	GII	GIII	GIV	GV	GVI
Epitelio bronquial	<i>Pulmón derecho</i>	+	-	+	+	+	+
	<i>Pulmón izquierdo</i>	+	+	+	+	++	+
Endotelio vascular	<i>Pulmón derecho</i>	+	+	+	+	+	+
	<i>Pulmón izquierdo</i>	+	+	+	+	++	+

Escala subjetiva de interpretación inmunohistoquímica para la expresión de metaloproteinasa 13: negativa (-), leve (+), moderada (++), severa (+++).

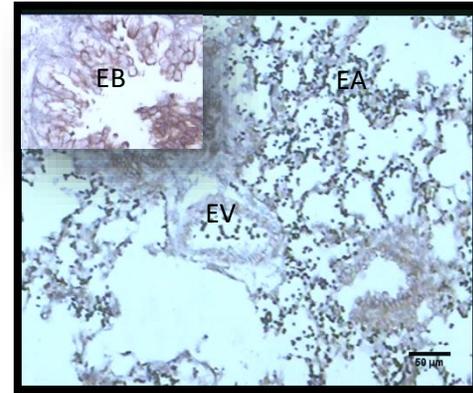
Tabla 4. Expresión de la metaloproteinasa -13, MMP-13 en epitelio bronquial y endotelio vascular del pulmón derecho e izquierdo de los grupos control GI y GII (Control sin toracotomía y con toracotomía respectivamente) y de estudio GIII-GV (Grupos con ligadura de la arteria pulmonar de 1-15 días post ligadura).



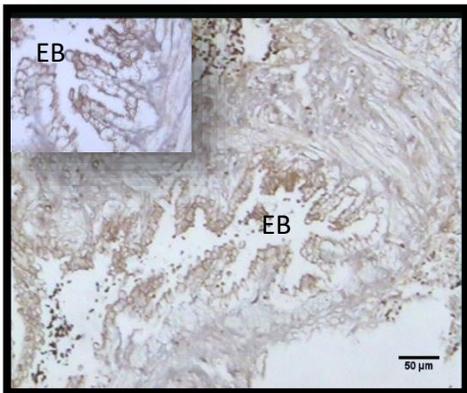
A



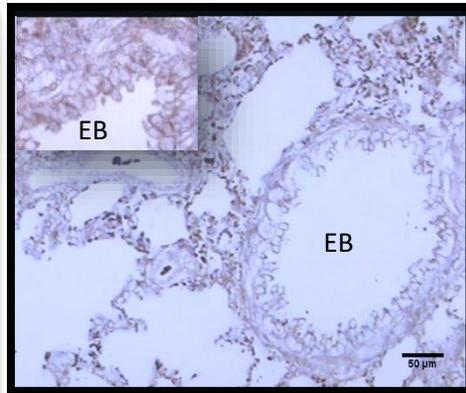
B



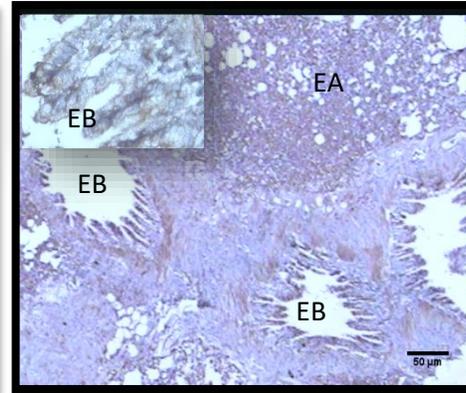
C



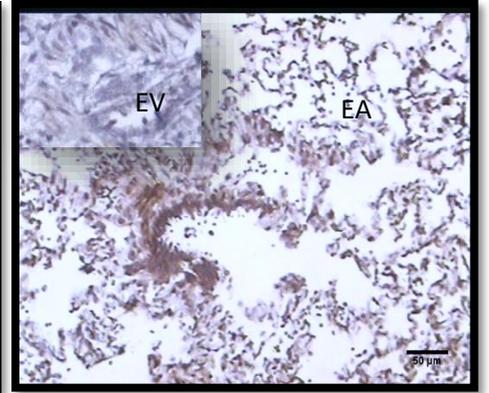
D



E



F



G

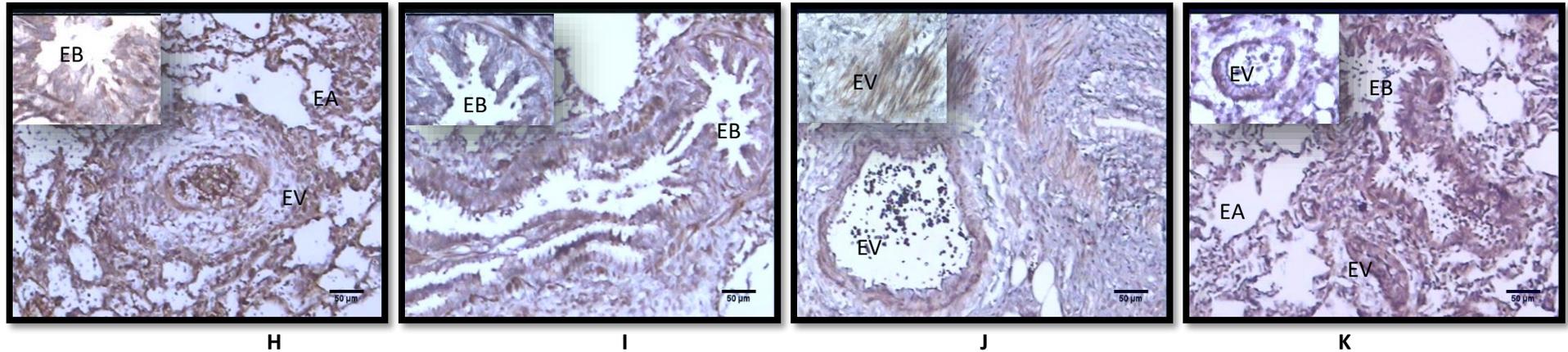


Figura 17. (A-K) Determinación inmunohistoquímica de MMP-13 en tejido pulmonar (10X y 40X). Sistema Avidina-Biotina-Peroxidasa, tinción con diaminobencidina, contratinción con hematoxilina. Imágenes representativas de: A) Tejido pulmonar control sin anti-MMP-13. B) Tejido pulmonar control sin toracotomía (GI). C) Tejido pulmonar control con toracotomía (GII). D) Tejido pulmonar derecho 1-3 días con ligadura de la API (GIII). E) Tejido pulmonar derecho 4-6 días con ligadura de la API (GIV). F) Tejido pulmonar derecho 7-12 días con ligadura de la API (GV). G) Tejido pulmonar derecho 13-15 días con ligadura de la API (GVI). H) Tejido pulmonar izquierdo 1-3 días con ligadura de la API (GIII). I) Tejido pulmonar izquierdo 4-6 días con ligadura de la API (GIV). J) Tejido pulmonar izquierdo control 7-12 días con ligadura de la API (GV). K) Tejido pulmonar izquierdo 13-15 días con ligadura de la API (GVI). EA: Epitelio Alveolar, EB: Epitelio Bronquial, EV: Endotelio Vascular. Barra= 50 µm, n=6/grupo de estudio, observando 10 campos.

6.1.2.2 Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF)

No se observó expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) en ninguna de las muestras de pulmón (tanto derecho como izquierdo) de las ratas de los grupos control (GI: con toracotomía y GII: sin toracotomía). Con respecto al resto de los grupos de estudio, se encontró, que la aparición de nuevos vasos sanguíneos ocurrió tres días después de haber ligado la arteria pulmonar izquierda, siendo francamente evidente en los grupos IV (4-6 días de LAPI) y grupo VI (13-15 días de LAPI). Estos hallazgos ocurrieron únicamente en el pulmón izquierdo (Figura 18-B).

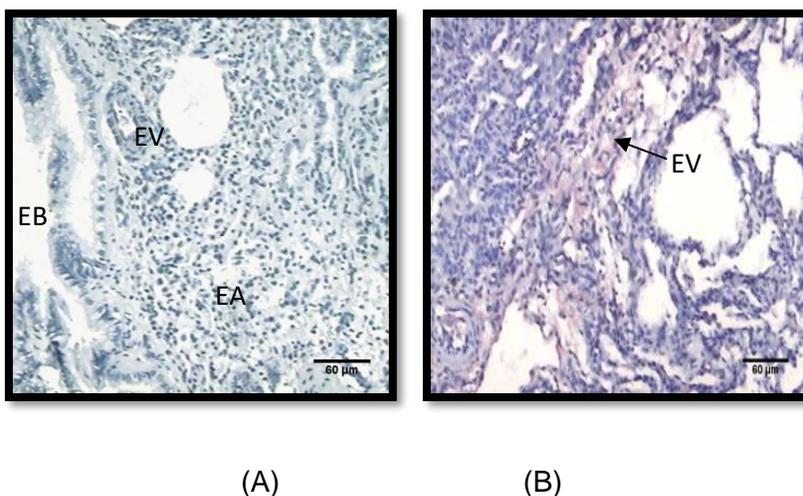


Figura 18. Determinación inmunohistoquímica de VEGF en tejido pulmonar (10X). Imagen representativa. Sistema Avidina-Biotina-Peroxidasa, tinción con diaminobencidina, contratinción con hematoxilina. (A): Control negativo, tejido pulmonar sin expresión del VEGF; (B): Expresión del VEGF en el pulmón izquierdo de una rata del grupo VI, post-15 días con ligadura de la arteria pulmonar. EA: Endotelio Alveolar, EB: Epitelio Bronquial, EV: Endotelio Vascular. Barra de 60 µm n=6/grupo de estudio, 10 campos.

En la tabla 5 se observa Expresión de Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular VEGF en tejido pulmonar derecho e izquierdo de los grupos de estudio control (GI-GII) y Grupos con ligadura de la arteria pulmonar de 1-15 días post ligadura (GIII-GVI).

	<i>GI</i>	<i>GII</i>	<i>GIII</i>	<i>GIV</i>	<i>GV</i>	<i>GVI</i>
<i>Tejido pulmonar derecho</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Tejido pulmonar izquierdo</i>	-	-	+	++	+	+++

Escala subjetiva de interpretación inmunohistoquímica para la expresión de VEGF: negativa (-), leve (+), moderada (++), severa (+++).

Tabla 5. Expresión de Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular VEGF en tejido pulmonar derecho e izquierdo de los grupos de estudio GI y GII (Control sin toracotomía y con toracotomía respectivamente) y GIII-GV (Grupos con ligadura de la arteria pulmonar de 1-15 días post ligadura).

6.1.2.3 Molécula de Adhesión Celular al Endotelio Plaquetario

No se observó expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (*PECAM-1* o *CD31*) en ninguna de las muestras de pulmón (tanto derecho como izquierdo) de las ratas de los grupos control (GI: con toracotomía y GII: sin toracotomía). Con respecto al resto de los grupos de estudio, se identificó la presencia de (*PECAM-1* o *CD31*) en el pulmón izquierdo de los animales del grupo VI (13-15 días de LAPI) (Tabla 6). Estos hallazgos ocurrieron únicamente en el pulmón izquierdo (Figura 19-B).

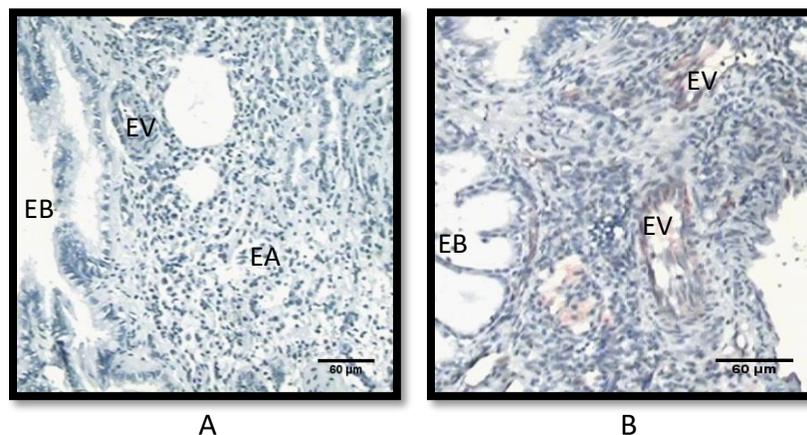


Figura 19. Determinación inmunohistoquímica de CD-31 en tejido pulmonar (10X). Sistema Avidina-Biotina-Peroxidasa, tinción con diaminobencidina, contratinción con hematoxilina. (A): Control negativo (sin anticuerpo), tejido pulmonar sin expresión de CD-31 (B): Expresión de CD-31 en el pulmón izquierdo de una rata del grupo VI, post-15 días con ligadura de la arteria pulmonar. Barra=60 µm, n =6 /grupos de estudio, 10 campos.

	<i>GI</i>	<i>GII</i>	<i>GIII</i>	<i>GIV</i>	<i>GV</i>	<i>GVI</i>
<i>Tejido pulmonar derecho</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Tejido pulmonar izquierdo</i>	-	-	-	-	-	++

Escala subjetiva de interpretación inmunohistoquímica para la expresión de CD-31: negativa (-), leve (+), moderada (++), severa (+++).

Tabla 6. Expresión de CD-31 en tejido pulmonar (pulmón derecho e izquierdo) de los grupos de estudio *GI* y *GII* (Control sin toracotomía y con toracotomía respectivamente) y *GIII*-*GV* (Grupos con ligadura de la arteria pulmonar de 1-15 días post ligadura) observado en 10 campos.

6.1.2.4 Caspasa-3, Fragmentación del DNA (Método de TUNEL) y Survivina

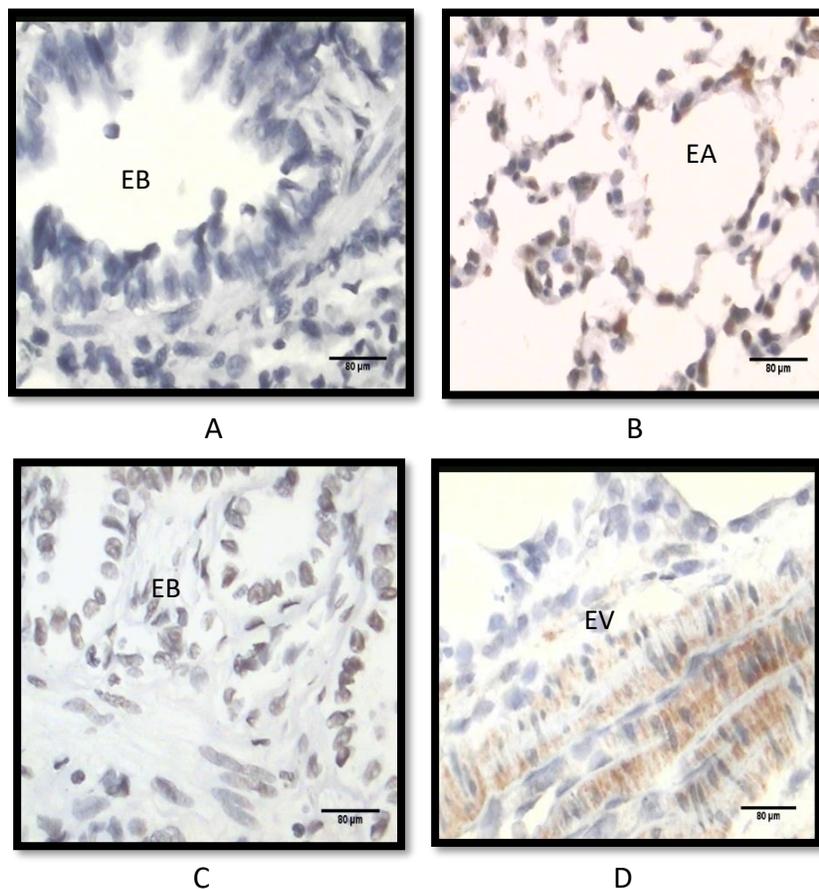


Figura 20. (A-D) Determinación inmunohistoquímica en tejido pulmonar (40X). Imágenes representativas: A) Control negativo, tejido pulmonar sin anticuerpo (B): Expresión de Caspasa-3, (C) TUNEL positivo en el pulmón izquierdo de una rata del grupo VI, 15 días post-ligadura de la arteria pulmonar y (D) expresión de survivina en el tejido pulmonar de una rata del grupo IV. Barra= 80 μm, n=6/ grupo de estudio.

La expresión de caspasa-3 en las células pulmonares fue prácticamente nula. En promedio, se observó únicamente en cuatro de diez campos. El porcentaje de células epiteliales alveolares y epiteliales bronquiales que expresaron caspasa-3 se muestra en la tabla 7. En esta tabla, no se incluyó el porcentaje de células endoteliales que expresaron caspasa-3 ya que se observó, solamente en dos campos de una muestra de tejido pulmonar que correspondió a una rata del grupo control con toracotomía. En el resto de las laminillas, no se observó la expresión de caspasa-3 en las células endoteliales.

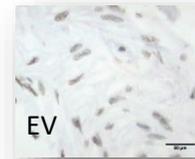
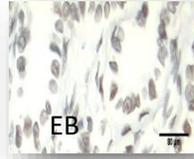
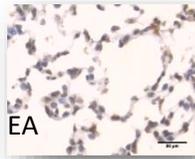
		GI	GII	GIII	GIV	GV	GVI
Epitelio alveolar	Pulmón derecho	06.625± 12.501	00.000± 00.000	00.00± 00.000	10.375± 11.388	08.250± 10.444	16.375± 16.970
	Pulmón izquierdo	16.375 ± 16.970	05.125± 14.991	18.25± 22.840	15.625± 18.007	07.625± 10.350	00.000± 00.000
Epitelio bronquial	Pulmón derecho	00.750± 02.121	00.000± 00.000	00.00± 00.000	00.000± 00.000	16.500± 21.098*	00.000± 00.000
	Pulmón izquierdo	00.000± 00.000	01.500 ± 02.966	03.62± 05.423	00.000± 00.000	00.000± 00.000	00.000± 00.000

Tabla 7. Porcentaje promedio ± DE de 10 campos (40X) de células apoptóticas determinada por el método inmunohistoquímica por expresión de Caspasa-3 en epitelio alveolar, epitelio bronquial de los pulmones derecho e izquierdo de los grupos de estudio GI y GII (Control sin toracotomía y con toracotomía respectivamente) y GIII-GV (Grupos con ligadura de la arteria pulmonar de 1-15 días post ligadura).

El porcentaje de células epiteliales bronquiales que expresaron caspasa-3 de las ratas del grupo VI (7 a 12 días post-ligadura de API) fue significativamente mayor en el pulmón derecho (contralateral al pulmón al que se le ligó la arteria pulmonar izquierda) (ANDEVA+Tukey: $p < 0.001$ vs GI, $p < 0.001$ vs GII) y significativamente menor, en el pulmón izquierdo (pulmón con LAPI, ratas del grupo V, 7-12 días post-LAPI) (ANDEVA+Tukey: $p < 0.001$ vs GI, $p < 0.001$ GII). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de células alveolares

que expresaron caspasa-3, entre los grupos de estudio (ANDEVA+Tukey: GI, vs GII, vs GIII, vs GIV, vs GV, vs GVI: $p>0.001$).

Los resultados de porcentajes obtenidos de las células del epitelio bronquial, alveolar y endoteliales que sufrieron muerte celular por apoptosis determinada por el método de TUNEL se muestran en la tabla 8. Los resultados indican que la tendencia del porcentaje de células apoptóticas del endotelio vascular, del epitelio alveolar y del epitelio bronquial, con excepción de las células epiteliales (alveolares y bronquiales) del grupo V, fue mayor, prácticamente en todos el pulmón derecho de las ratas a las que se les ligó la arteria pulmonar con respecto al pulmón izquierdo de las ratas de los grupos control y del pulmón izquierdo de las ratas de todos los grupos de estudio, aunque este incremento únicamente fue estadísticamente significativo* en: A) las células epiteliales alveolares del pulmón derecho de las ratas de los grupos de estudio III, V y VI (1-3,7-12,13-15 días post-ligadura de la API) que las células epiteliales bronquiales de los pulmones derecho e izquierdo de las ratas de los grupos control con y sin toracotomía (I y II respectivamente, ANDEVA+Tukey: $p=0.002$ vs GIII, $p=0.007$ vs GVI) y omitiendo el grupo III, que las células del epitelio alveolar del pulmón izquierdo de los grupos control con y sin toracotomía (ANDEVA+Tukey: I y II respectivamente, ANDEVA: $p=0.003$ vs GIII, $p=0.014$ vs GVI), B) las células epiteliales bronquiales del pulmón derecho de las ratas de los grupos de estudio III, V y VI (1-3,7-12,13-15 días post-ligadura de la API) que las células epiteliales bronquiales del pulmón derecho e izquierdo de las ratas de los grupos control con y sin toracotomía (I y II respectivamente, ANDEVA+Tukey: $p=0.002$ vs GIII, $p=0.004$ vs V $p=0.007$ vs GVI) y C) las células endoteliales del pulmón derecho de las ratas del grupo VI (13-15 días con ligadura de la API) que las células endoteliales del pulmón derecho de las ratas de los grupos control con y sin toracotomía (GI y GII respectivamente, ANDEVA+Tukey: $p=0.003$ vs GIV) y que las células endoteliales del pulmón izquierdo de las ratas de los grupos de estudio I,II, IV y V (controles con y sin toracotomía, 4-6 días y 7-10 días post-ligadura de la API, ANDEVA+ Tukey: $p=0.007$ vs GIV; $p=0.008$ vs GV).



		<i>% Células apoptóticas del epitelio alveolar.</i>	<i>% Células apoptóticas del epitelio bronquial.</i>	<i>% Células apoptóticas del endotelio vascular.</i>
<i>GI</i>	Pulmón derecho	00.000 ± 00.000	07.000± 11.269	00.000± 00.000
	Pulmón izquierdo	00.000± 00.000	07.500± 11.269	00.000± 00.000
<i>GII</i>	Pulmón derecho	05.500± 07.778	08.500± 12.021	07.000± 09.899
	Pulmón izquierdo	04.500± 06.364	00.000± 00.000	00.000± 00.000
<i>GIII</i>	Pulmón derecho	51.333± 14.978*	50.333± 01.528*	42.667± 08.622
	Pulmón izquierdo	37.770± 19.858	33.954± 28.082	30.763± 19.193
<i>GIV</i>	Pulmón derecho	22.333± 03.215	20.333± 14.503	18.667± 17.673
	Pulmón izquierdo	17.667± 08.021	00.000± 00.000	12.000± 01.000
<i>GV</i>	Pulmón derecho	12.667± 13.317	52.333± 15.822	38.667± 13.650
	Pulmón izquierdo	47.667± 04.826*	63.667± 05.033*	04.000± 06.928
<i>GVI</i>	Pulmón derecho	33.286± 18.340*	57.786± 13.712*	46.714± 15.102
	Pulmón izquierdo	11.833± 09.390	34.167± 27.250	34.667± 12.388

Tabla 8. Porcentaje promedio ± DE de 3 campos (40X) de células apoptóticas determinadas por el método de TUNEL en epitelio alveolar, epitelio bronquial y endotelio vascular de los pulmones derecho e izquierdo de los grupos control GI y GII (Control sin toracotomía y con toracotomía respectivamente) y de estudio GIII-GV (Grupos con ligadura de la arteria pulmonar de 1-15 días post ligadura). Estadísticamente significativo*.

Las células del pulmón derecho de las ratas a las que se les ligó la arteria pulmonar izquierda, presentaron mayor porcentaje de muerte celular por apoptosis que el pulmón derecho de los grupos control y en su mayoría, que del contralateral (izquierdo) con un proceso, inverso a la expresión de survivina (Tabla 8). Sin embargo, esto último no comparativo, ya que no se cuantificó su expresión.

		GI	GII	GIII	GIV	GV	GVI
Epitelio alveolar	<i>Pulmón derecho</i>	-	-	+	+	+	+
	<i>Pulmón izquierdo</i>	-	-	++	++	++	++
Epitelio bronquial	<i>Pulmón derecho</i>	-	-	+	+	+	+
	<i>Pulmón izquierdo</i>	-	-	++	++	++	+
Endotelio vascular	<i>Pulmón derecho</i>	-	+	+	+	+	+
	<i>Pulmón izquierdo</i>	-	+	+	++	++	+

Escala subjetiva de interpretación inmunohistoquímica para la expresión de survivina: negativa (-), leve (+), moderada (++), severa (+++).

Tabla 9. Expresión de Survivin en tejido pulmonar en 10 campos (pulmón derecho e izquierdo) de los grupos de estudio GI y GII (Control sin toracotomía y con toracotomía respectivamente) y GIII-GV (Grupos con ligadura de la arteria pulmonar de 1-15 días post ligadura).

6.2 Distensibilidad pulmonar

6.2.1 Distensibilidad basal con fracción inspirada de oxígeno al 21% (FiO_2 , 21%)

El promedio de la **distensibilidad pulmonar basal \pm error estándar**, expresada en (cm H₂O) obtenida al ventilar a las ratas **con una fracción inspirada de oxígeno al 21 % y con una presión inspirada de 14 cm H₂O** y antes de realizar cualquier tipo de intervención quirúrgica, para cada uno de los grupos de estudio fue: grupo I, control sin toracotomía 0.137 \pm 0.007 cm H₂O, grupo II, control con toracotomía 0.019 \pm 0.009 cm H₂O, grupo III, 1-3 días 0.170 \pm 0.016 cm H₂O, grupo IV, 4-6 días 0.177 \pm 0.017 cm H₂O, grupo V, 7-12 días 0.265 \pm 0.045 cm H₂O, y grupo VI, 13-15 días 0.217 \pm 0.037 cm H₂O. **Al incrementar la presión inspiratoria a 16 cm H₂O**, los valores fueron: 0.135 \pm 0.009 cm H₂O en el grupo I,

0.162± 0.022 cm H₂O en el grupo II, 0.150±0.015 cm H₂O en el grupo III, 0.163±0.013 cm H₂O en el grupo IV, 0.250±0.043 cm H₂O en el grupo V y 0.203±0.036 cm H₂O en el grupo VI, y finalmente, al incrementar la **presión inspiratoria a 18** cm H₂O los valores fueron, para el grupo I, 0.123±0.006 cm H₂O, para el grupo II, 0.145±0.024 cm H₂O, para el grupo III, 0.140±0.015 cm H₂O, para el grupo IV, 0.1500±0.011 cm H₂O, para el grupo V, 0.257±0.042 cm H₂O y para el grupo VI, 0.200±0.039 cm H₂O. Aunque los valores de la distensibilidad fueron basales, se obtuvieron antes de realizar cualquier tipo de intervención quirúrgica y las ratas de todos los grupos de estudio se encontraban bajo las mismas condiciones, la distensibilidad basal, fue significativamente mayor en el grupo V en comparación con la encontrada en los grupos I y III, cuando se manejó una presión inspiratoria de 14 cm H₂O (ANDEVA+Tukey+Bonferroni, p:0.008 vs Grupo I) y cuando fue de 18 cm H₂O (ANDEVA+Tukey+Bonferroni, p:0.011 vs Grupo I, p:0.005 vs III).

6.2.2 Distensibilidad final con fracción inspirada de oxígeno al 21% (FiO₂, 21%)

El promedio de la **distensibilidad pulmonar final ± error estándar**, expresada en (cm H₂O) obtenida después de realizar una toracotomía en el grupo II y de mantener ligada la arteria pulmonar izquierda de las ratas durante 1 a 3 días en el grupo III, 4 a 6 días en el grupo IV, 7 a 12 días en el grupo V y 13 a 15 días en el grupo VI fueron, al ventilar a las ratas **con una fracción inspirada de oxígeno al 21% con una presión inspirada de 14** cm H₂O: grupo II, control con toracotomía 0.167±0.006 cm H₂O, grupo III, 1-3 días 0.153±0.013 cm H₂O, grupo IV, 4-6 días 0.153±0.013 cm H₂O, grupo V, 7-12 días 0.177±0.029 cm H₂O, y grupo VI, días 0.212±0.037 cm H₂O. **Al incrementar la presión inspiratoria a 16** cm H₂O, los valores fueron: grupo II (0.170±0.005 cm H₂O), grupo III (0.143±0.009 cm H₂O), grupo IV (0.123±0.014 cm H₂O) grupo V (0.198±0.053 cm H₂O) y grupo VI (0.198±0.053 cm H₂O), y finalmente, al incrementar la **presión inspiratoria a 18** cm H₂O, los valores fueron, grupo II: 0.147±0.006 cm H₂O, grupo III: 0.132±0.007 cm H₂O, grupo IV: 0.118±0.014 cm H₂O, grupo V: 0.188±0.039 cm H₂O y grupo VI:

0.210±0.043 cm H₂O. Independientemente del valor de la presión inspiratoria, no encontramos diferencias estadísticamente significativas al comparar la distensibilidad final entre los grupos de estudio, tampoco al comparar estos valores con los obtenidos en la distensibilidad basal (ANDEVA+Tukey+Bonferroni, p>0.05). Los valores de la distensibilidad pulmonar promedio ± error estándar obtenida en forma basal o al finalizar el tiempo de estudio establecido para cada uno de los grupos de estudio, con una fracción inspirada de oxígeno al 21% y con presiones inspirada de 14, 16 y 18 cm H₂O se muestran en la tabla 10 y se ilustran en las figuras 21, 22 y 23.

Grupos de estudio	Pre-LAPI	Pre-LAPI	Post-LAPI	Pre-LAPI	Post-LAPI	Pre-LAPI
	<i>FiO₂ 21% P.ins 14 cm H₂O</i>	<i>FiO₂ 21% P.ins 14 cm H₂O</i>	<i>FiO₂ 21% P.ins 16 cm H₂O</i>	<i>FiO₂ 21% P.ins 16 cm H₂O</i>	<i>FiO₂ 21% P.ins 18 cm H₂O</i>	<i>FiO₂ 21% P.ins 18 cm H₂O</i>
GI	0.137± 0.007	0.000± 0.000	0.135± 0.009	0.000± 0.000	0.123± 0.006	0.000± 0.000
GII	0.0192± 0.009	0.167± 0.006	0.162± 0.022	0.170 ±0.005	0.145± 0.023	0.146± 0.006
GIII	0.170± 0.016	0.153± 0.013	0.150± 0.015	0.143± 0.009	0.140± 0.015	0.132± 0.007
GIV	0.177± 0.017	0.153± 0.014	0.163± 0.013	0.123± 0.014	0.150± 0.011	0.118± 0.014
GV	0.265± 0.045	0.177± 0.029	0.250± 0.043	0.198± 0.053	0.257± 0.041	0.188± 0.039
GVI	0.217± 0.037	0.212± 0.037	0.203± 0.036	0.198± 0.053	0.200± 0.039	0.210± 0.043

Tabla 10. Valores promedio de la distensibilidad pulmonar (cm H₂O) basal (pre-LAPI) y final (Post-LAPI) ± Error Estándar (EE) expresadas en cm H₂O de los grupos de estudio I al VI, obtenidos con una fracción inspirada de oxígeno al 21% y presiones inspiratorias de 14, 16, 18 cm H₂O.

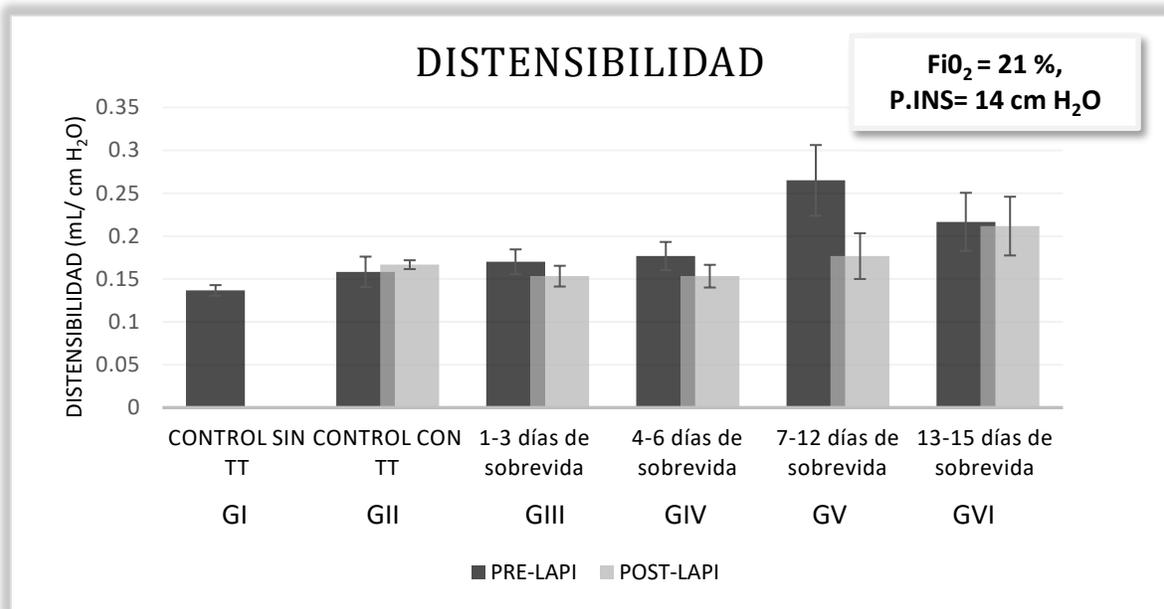


Figura 21. Distensibilidad pulmonar basal (Pre-LAPI) y final (Post-LAPI) promedio \pm EE de los grupos control (I y II) y de los grupos con ligadura de la arteria pulmonar izquierda (III-VI), con una FiO_2 al 21% y una presión inspiratoria de 14 cm H₂O.

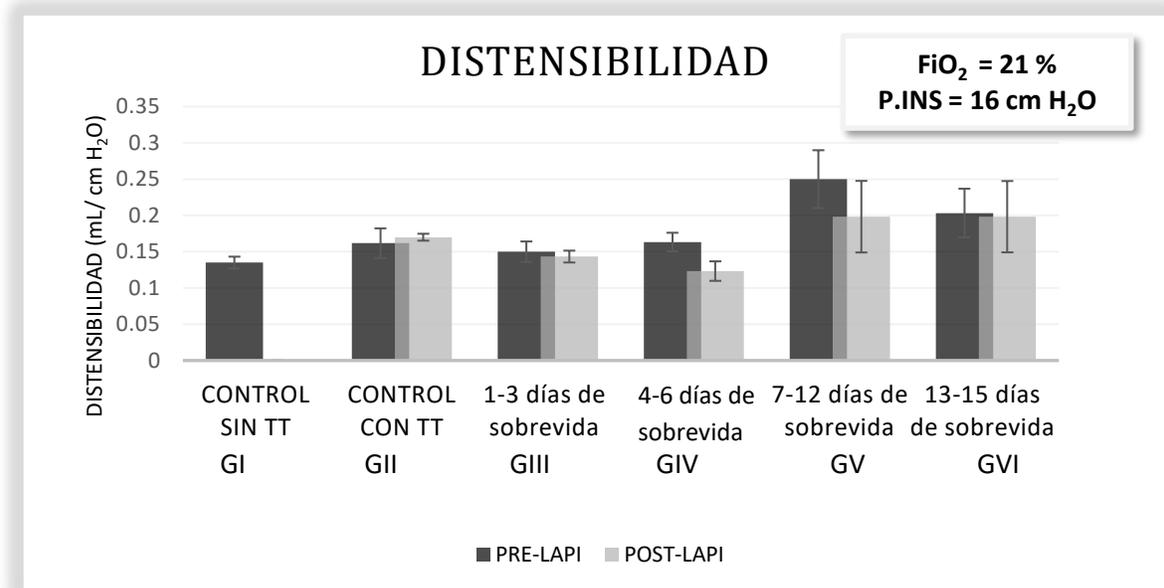


Figura 22. Distensibilidad pulmonar basal (Pre-LAPI) y final (Post-LAPI) promedio \pm EE de los grupos control (I y II) y de los grupos con ligadura de la arteria pulmonar izquierda (III-VI), con una FiO_2 al 21% y una presión inspiratoria de 16 cm H₂O.

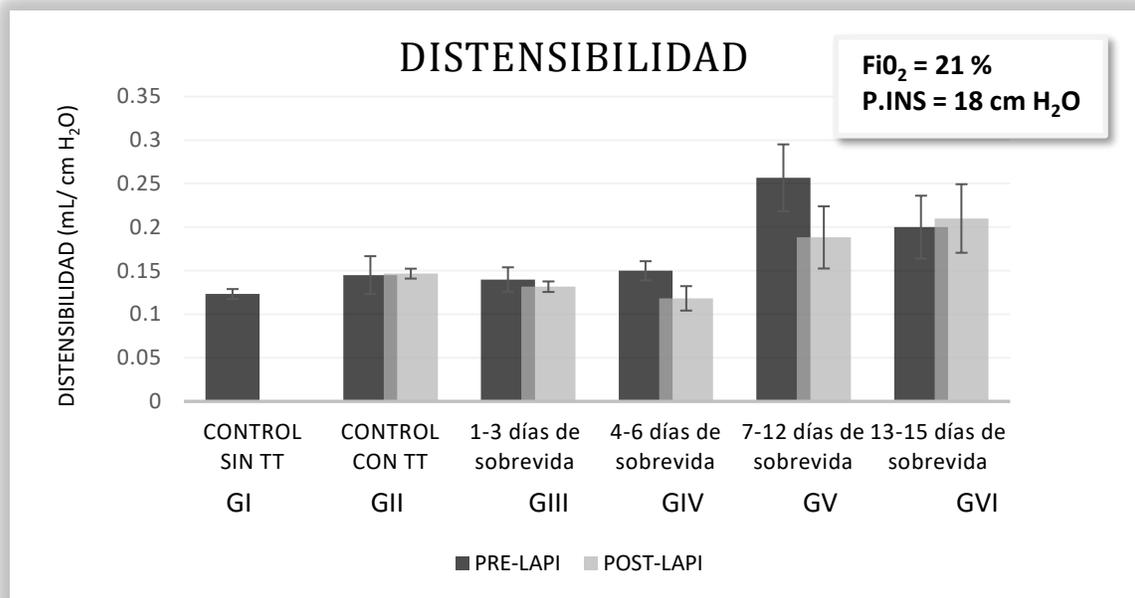


Figura 23. Distensibilidad pulmonar basal (Pre-LAPI) y final (Post-LAPI) promedio \pm EE de los grupos control (I y II) y de los grupos con ligadura de la arteria pulmonar izquierda (III-VI), con una FiO_2 al 21% y una presión inspiratoria de 18 cm H₂O.

6.2.3 Distensibilidad basal con fracción inspirada de oxígeno al 100%, (FiO_2 , 100%)

El promedio de la **distensibilidad pulmonar basal \pm error estándar**, expresada en (cm H₂O) obtenida al ventilar a la rata **con una fracción inspirada de oxígeno al 100% y con una presión inspirada de 14 cm H₂O** y con apnea inducida durante 1 **min** fue: grupo I: (0.050 \pm 0.017 cm H₂O), grupo II: (0.132 \pm 0.021 cm H₂O), grupo III: (0.102 \pm 0.014 cm H₂O), grupo IV (0.153 \pm 0.018 cm H₂O), grupo V (0.192 \pm 0.044 cm H₂O), y grupo VI (0.125 \pm 0.031 cm H₂O). **Al suspender el minuto de apnea, la distensibilidad con una presión inspiratoria de 14 cm H₂O** fue: grupo I (0.117 \pm 0.007 cm H₂O), grupo II (0.163 \pm 0.020 cm H₂O), grupo III (0.145 \pm 0.011 cm H₂O), grupo IV (0.177 \pm 0.021 cm H₂O), grupo V (0.248 \pm 0.042 cm H₂O) y grupo VI (0.203 \pm 0.037 cm H₂O). **Al incrementar la presión inspirada a 16 cm H₂O**, grupo I (0.105 \pm 0.006 cm H₂O), grupo II (0.147 \pm 0.014 cm H₂O), grupo III

(0.145±0.012 cm H₂O), grupo IV (0.160 ±0.011 cm H₂O), grupo V (0.242±0.041 cm H₂O) y grupo VI (0.178±0.033 cm H₂O), **con presión inspiratoria de 18 cm H₂O**, las mediciones fueron: grupo I: (0.107±0.008 cm H₂O), grupo II: (0.143±0.017 cm H₂O), grupo III, (0.135±0.014 cm H₂O), grupo IV, (0.143±0.014 cm H₂O), grupo V, (0.237±0.041 cm H₂O) y grupo VI (0.162±0.032 cm H₂O). Aunque los valores de la distensibilidad fueron basales, se obtuvieron antes de realizar cualquier tipo de intervención quirúrgica y las ratas de todos los grupos de estudio se encontraban bajo las mismas condiciones, la distensibilidad basal, fue significativamente mayor en el grupo V en comparación con la encontrada en el grupo I cuando se manejó una presión inspiratoria de 14 cm H₂O más un minuto de apnea (ANDEVA+Tukey+Bonferroni, p:0.005), la misma presión, sin apnea inducida (ANDEVA+Tukey+Bonferroni, p:0.022 vs Grupo I) y con una presión inspiratoria de 18 cm H₂O (ANDEVA+Tukey+Bonferroni, p:0.022 vs Grupo I).

6.2.4 Distensibilidad final pulmonar con fracción inspirada de oxígeno al 100%, (FiO₂, 100%)

El promedio de la **distensibilidad pulmonar final ± error estándar**, expresada en (cm H₂O) obtenida después de realizar una toracotomía en el grupo II y de mantener ligada la arteria pulmonar izquierda de las ratas durante 1 a 3 días en el grupo III, 4 a 6 días en el grupo IV, 7 a 12 días en el grupo V y 13 a 15 días en el grupo VI fueron, al ventilar a las ratas **con una fracción inspirada de oxígeno al 100% con una presión inspirada de 14 cm H₂O** y un minuto de apnea inducida fue: grupo II (0.143±0.012 cm H₂O), grupo III (0.083±0.020 cm H₂O), grupo IV (0.087±0.0177 cm H₂O), grupo V (0.168±0.043 cm H₂O), y grupo VI (0.147±0.026 cm H₂O). **Al suspender el minuto de apnea, la distensibilidad con una presión inspiratoria de 14 cmH₂O** fue: grupo II (0.153±0.003 cm H₂O), grupo III (0.135±0.012 cm H₂O), grupo IV (0.142±0.015 cm H₂O), grupo V (0.235±0.053 cm H₂O) y grupo VI (0.218±0.033 cmH₂O), al incrementar la **presión inspiratoria a 16 cm H₂O**, los valores fueron: grupo II (0.155±0.007 cm H₂O), grupo III (0.118±0.016 cm H₂O), grupo IV (0.123±0.012 cm H₂O), grupo V (0.212±0.050 cm

H₂O) y grupo VI (0.202±0.032 cm H₂O) y finalmente, **con una presión inspiratoria de 18 cm H₂O**: grupo II (0.143±0.007 cm H₂O) grupo III (0.118±0.005 cm H₂O), grupo IV (0.118±0.011 cm H₂O), grupo V (0.203±0.056 cm H₂O) y grupo VI (0.192±0.025 cm H₂O). Independientemente del valor de la presión inspiratoria y del minuto de apnea inducida con una presión de 14 cm H₂O, no encontramos diferencias estadísticamente significativas al comparar la distensibilidad final entre los grupos de estudio, tampoco al comparar estos valores con los obtenidos en la distensibilidad basal (ANDEVA+Tukey+Bonferroni, p>0.05). Los valores de la distensibilidad pulmonar promedio ± error estándar obtenida en forma basal o al finalizar el tiempo de estudio establecido para cada uno de los grupos de estudio, con una fracción inspirada de oxígeno al 100 % y con presiones inspirada de 14 (con y sin un minuto de apnea), 16 y 18 cm H₂O se muestran en la tabla 11 y se ilustran figuras 24, 25, 26 y 27.

Grupos de estudio	Pre-LAPI	Post-LAPI	Pre-LAPI	Post-LAPI	Pre-LAPI	Post-LAPI	Pre-LAPI	Post-LAPI
	FiO ₂ 100%, P.ins 14 +Apnea	FiO ₂ 100%, P.ins 14 +Apnea	FiO ₂ 100%, P.ins 14 cm H ₂ O	FiO ₂ 100%, P.ins 14 cm H ₂ O	FiO ₂ 100%, P.ins 16 cm H ₂ O	FiO ₂ 100%, P.ins 16 cm H ₂ O	FiO ₂ 100%, P.ins 18 cm H ₂ O	FiO ₂ 100%, P.ins 18 cm H ₂ O
GI	0.050± 0.017	0.000± 0.000	0.117± 0.007	0.000± 0.000	0.105± 0.006	0.000 ±0.000	0.107± 0.008	0.000± 0.000
GII	0.132± 0.021	0.143± 0.012	0.163± 0.020	0.153± 0.003	0.147± 0.014	0.155± 0.007	0.143± 0.017	0.143± 0.007
GIII	0.102± 0.014	0.083± 0.020	0.145± 0.011	0.135± 0.012	0.145± 0.012	0.118± 0.016	0.135± 0.014	0.118± 0.005
GIV	0.153± 0.018	0.087± 0.017	0.177± 0.020	0.142± 0.015	0.160± 0.011	0.123± 0.012	0.143± 0.014	0.118± 0.010
GV	0.192± 0.043	0.168± 0.043	0.248± 0.042	0.235± 0.053	0.242± 0.041	0.212± 0.050	0.237± 0.041	0.203± 0.056
GVI	0.125± 0.0311	0.147± 0.027	0.203± 0.036	0.218± 0.033	0.178± 0.033	0.202± 0.032	0.162± 0.032	0.192± 0.025

Tabla 11. Valores promedio de la distensibilidad pulmonar (cm H₂O) basal (pre-LAPI) y final (Post-LAPI) promedio ± Error Estándar (EE) expresadas en cm H₂O de los grupos de estudio I al VI, obtenidos con una fracción inspirada de oxígeno al 100 % y presiones inspiratorias de 14,16,18 cm H₂O además de 14 cm H₂O con un minuto de apnea inducida.

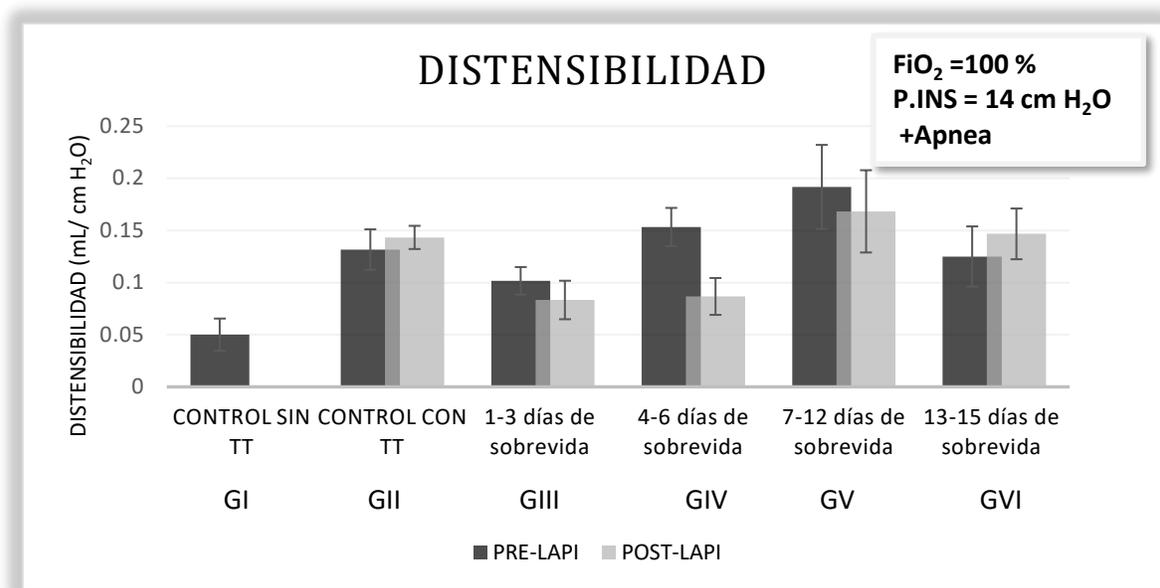


Figura 24. Distensibilidad pulmonar basal (Pre-LAPI) y final (Post-LAPI) promedio \pm EE de los grupos control (I y II) y de los grupos con ligadura de la arteria pulmonar izquierda (III-VI), con una FiO_2 al 100% y una presión inspiratoria de 14 cm H₂O con un minuto de apnea.

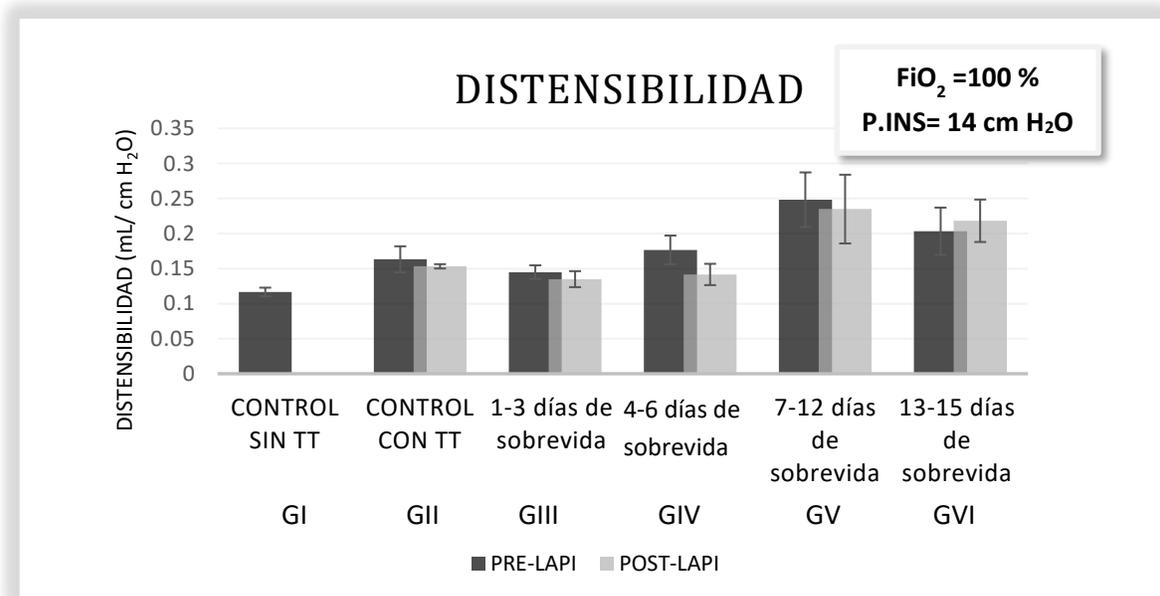


Figura 25. Distensibilidad pulmonar basal (Pre-LAPI) y final (Post-LAPI) promedio \pm EE de los grupos control (I y II) y de los grupos con ligadura de la arteria pulmonar izquierda (III-VI), con una FiO_2 al 100 % y una presión inspiratoria de 14 cm H₂O.

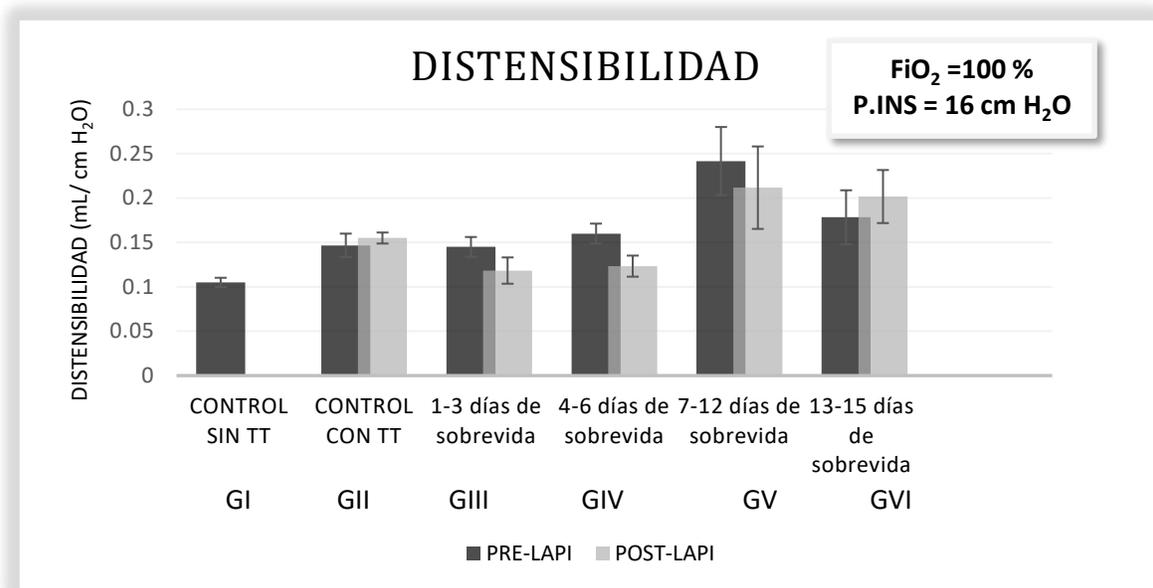


Figura 26. Distensibilidad pulmonar basal (Pre-LAPI) y final (Post-LAPI) promedio \pm EE de los grupos control (I y II) y de los grupos con LAPI (III-VI), con una FiO_2 al 100 % y una presión inspiratoria de 16 cm H₂O.

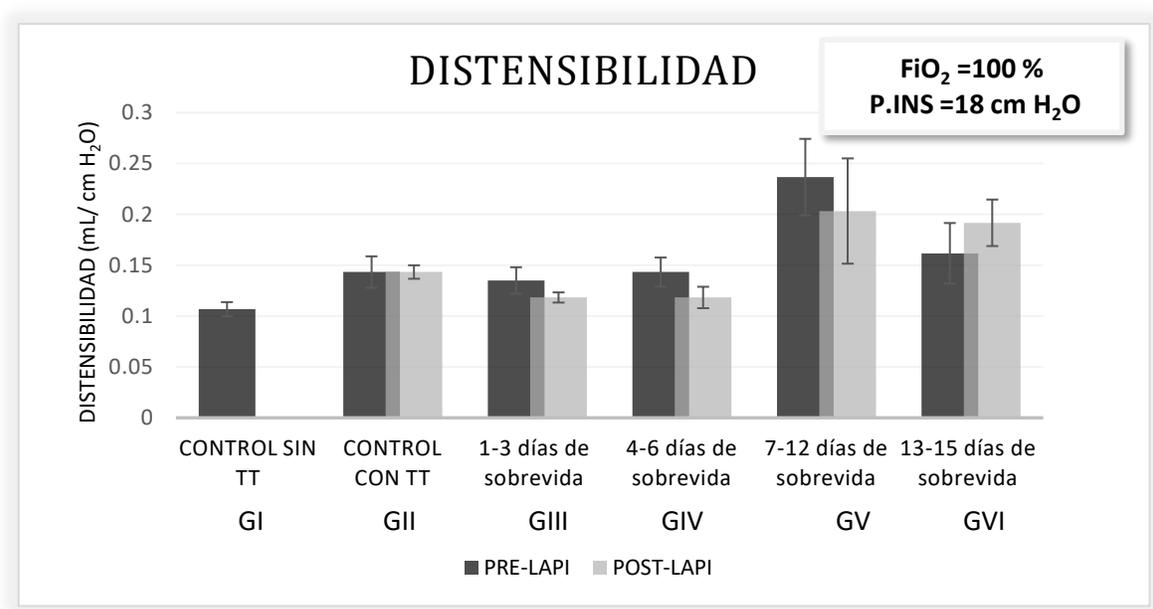


Figura 27. Distensibilidad pulmonar basal (Pre-LAPI) y final (Post-LAPI) promedio \pm EE de los grupos control (I y II) y de los grupos con ligadura de la arteria pulmonar izquierda (III-VI), con una FiO_2 al 100 % y una presión inspiratoria de 18 cm H₂O.

7 Discusión

La angiogénesis, se refiere al proceso que conduce a la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura pre-existente, y específicamente en el pulmón. Requiere remodelación y crecimiento de la vasculatura sistémica, lo que es de suma importancia en diferentes alteraciones caracterizadas por inflamación crónica como fibrosis, asma, y tromboembolia^{1,4} en las que, la matriz extracelular, junto con la acción de las metaloproteinasas, regulan la actividad de diferentes moléculas y factores que contribuyen en la reparación del daño y resolución de la inflamación.² La isquemia pulmonar, que resulta de un tromboembolismo o de otras causas de obstrucción de la arteria pulmonar, permite que la circulación sistémica prolifere dentro y alrededor del pulmón y “ligar la arteria pulmonar”, crea un modelo experimental único de obstrucción pulmonar y angiogénesis, con el que es posible investigar mecanismos de neovascularización,⁴ mecanismo importante para la remodelación vascular, el proceso cicatricial y sus anomalías.⁶⁰

El objetivo de este trabajo, radicó en investigar los cambios que ocurren en la expresión de metaloproteinasas 1, 7 y 13 (MMP1, MMP7 y MMP13) en el tejido pulmonar por efecto de la angiogénesis y su consecuencia, sobre la distensibilidad pulmonar, utilizando un modelo experimental en rata, en el que mediante técnicas quirúrgicas convencionales, se mantuvo ligada la arteria pulmonar izquierda durante diferentes periodos de tiempo, con el fin de obstruir el flujo sanguíneo y generar angiogénesis pulmonar a partir de las arterias intercostales.

La angiogénesis se basa en la migración de células endoteliales dentro y alrededor de los tejidos conectivos, en donde las metaloproteinasas, degradan compuestos de la matriz extracelular como laminina, fibronectina, elastina y proteoglicanos con la subsecuente liberación de fragmentos bioactivos pro-angiogénicos, y proteínas como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) que se une a la fracción heparan-sulfato de los proteoglicanos,

procesando factores de crecimiento, integrinas, moléculas de adhesión, creando un balance entre los efectos pro-angiogénicos y anti-angiogénicos.

Diferentes factores pro-angiogénicos como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), se activan por metaloproteinasas facilitando la angiogénesis.⁶⁰ Está reportado que, en ratones, la proliferación de arterias intercostales y la perfusión del pulmón, se desarrolla entre 4 y 5 días después de ligar la arteria pulmonar izquierda con un incremento de células inflamatorias en el líquido de lavado bronquioalveolar y que las células inflamatorias que rodean la microvasculatura, son esenciales para la neovascularización.⁴ En este trabajo, la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) en el tejido pulmonar, se observó tres días después de haber ligado la arteria pulmonar y únicamente en el pulmón en el que se ligó la arteria (pulmón izquierdo), siendo francamente evidente; en los grupos de estudio IV y VI que corresponden a los días (4-6) y (13-15) post-ligadura de la arteria pulmonar izquierda. De igual forma, mediante la tinción rojo sirio se identificó que las fibras de colágena tipo I, mostraron un comportamiento similar al de la expresión del VEGF; ya que se identificaron más fibras de colágena tipo I, tres días después de haber ligado la arteria pulmonar y únicamente en el pulmón en el que se ligó la arteria (pulmón izquierdo); esta expresión, se incrementó entre 4 y 6 días post-ligadura de la arteria pulmonar y de manera considerable entre 13 y 15 días después de haber ligado la arteria pulmonar izquierda. Esta reportado que las metaloproteinasas, ejercen diferentes efectos sobre las células endoteliales necesarios para la migración celular y formación del tubo. La metaloproteinasa de membrana 1 (MT1-MMP) está principalmente relacionada con la migración endotelial e invasión de las barreras de fibrina debido a su actividad fibrinolítica.⁶⁰ La colagenólisis, requiere la unión del dominio hemopexina de las colagenasas a las fibras de colágena nativa para que ocurra la proteólisis. El mecanismo por el cual, la metaloproteinasa de membrana 1 (MT1-MMP) contribuye al brote de nuevos vasos es a través de la degradación de colágena tipo 1 y de la activación de la pro-metaloproteinasa 2 (pro-MMP2); que en su forma activa (MMP2) regula el

brote de los nuevos vasos mediante la liberación de citocinas y factores de crecimiento. La matriz extracelular, además de mantener la estructura funcional de un tejido, funciona como “esponja” para la unión de citocinas y factores de crecimiento que, de manera controlada, son blanco de diferentes metaloproteinasas como es el caso de la unión factor de crecimiento del endotelio vascular-metaloproteinasa (VEGF-MMP) que permanece como complejo inactivo con el factor de crecimiento del tejido conectivo (CTFC) que se activa cuando es blanco de las metaloproteinasas MMP1 y MMP13. Esta unión específica del VEGF a los componentes de la matriz extracelular crea un soporte guía para las células endoteliales que desencadenan la neo-angiogénesis, sin embargo, si durante este proceso ocurre la unión del VEGF a las metaloproteinasas 3 o 9 (VEGF-MMP3, VEGF-MMP9) se forma un complejo de unión no-heparina activo y de vida corta que provoca un brote irregular de los vasos sanguíneos.^{2, 61}

Con respecto a la expresión de las metaloproteinasas, en este trabajo, se observó una marcada expresión de la metaloproteinasa MMP1 en el endotelio vascular y en el epitelio bronquial de ambos pulmones (derecho e izquierdo) 8 días después de haber ligado la arteria pulmonar con compromiso de la pared alveolar entre los días 12 y 15 post-ligadura de la arteria pulmonar pero únicamente en el pulmón izquierdo, mientras que la expresión de MMP-7 en el tejido pulmonar, se observó tres días después de haber pinzado la arteria pulmonar izquierda principalmente en bronquiolos del pulmón derecho del grupo GV y pulmón izquierdo del grupo VI y al igual que la MMP-1, con compromiso de la pared alveolar pero únicamente en el pulmón izquierdo (en el que se ligó la arteria pulmonar), sin embargo, no se observaron cambios en la expresión de la metaloproteinasa 13 (MMP-13). La metaloproteinasa 7 (MMP-7) expresada en células y tejidos relacionados con factores de transcripción, exclusivamente de tipo de origen epitelial³⁹, promueve la vascularización incrementando la proliferación de células endoteliales sobre-regulando la expresión endotelial de MMP-1, e induce angiogénesis “in vitro”,⁶⁰ expresada por diferentes tipos de células (fibroblastos, células endoteliales, condrocitos y osteoblastos).⁶¹ Las colagenasas MMP1 y

MMP13 degradan fibras de colágena tipo I, II y III en gelatina, que es blanco de las gelatinasas MMP2 y MMP9. La metaloproteinasa MMP13 degrada también, colágena tipo IV, IX, X y XIV, tenesina, fibronectina, agregan, fibrilina-1 mientras que MMP7 no es capaz de degradar colagenas fibrilares intactas, pero puede digerir otros componentes de la matriz extracelular como gelatina, laminina, fibronectina, vitronectina y elastina.^{60,62}

Contrariamente a la actividad pro-angiogénica, las metaloproteinasas se enclavan en el ectodominio de VE-cadherina alterando la unión de adhesión célula-célula, liberando fragmentos solubles de VEGF, que compiten con el VEGF unido a la matriz, por el mismo receptor de superficie (VEGFR2). La metaloproteinasa 7 (MMP7), regula negativamente la angiogénesis. MMP7 genera polipéptidos anti-angiogénicos por la vía plasminógeno-angostatina. Esta última, inhibe la proliferación de células endoteliales y promueve la apoptosis epitelial. Por otro lado, MMP7 genera endostatina (otro inhibidor endógeno de la angiogénesis) por degradación de la colágena tipo XVIII y genera, por proteólisis neostatina.⁶⁰

La distensibilidad pulmonar no se modificó significativamente ni por efecto de la ligadura de la arteria pulmonar, ni por efecto del tiempo que se mantuvo ligada la arteria pulmonar. Sin embargo, aunque no fue estadísticamente significativa, se observó una disminución en la distensibilidad pulmonar en todos los grupos de estudio en los que se mantuvo ligada la arteria. Y la diferencia estadística entre las mediciones de distensibilidad basal entre los grupos de estudio se atribuye a que justamente, 4 ratas del grupo de estudio V, presentaron distensibilidades muy altas, que fluctuaban entre 0.2 y 0.3 cm H₂O/mL, independientemente de que los animales asignados a cada uno de los grupos de estudio fueron elegidos al azar. Los resultados histológicos mostraron desarrollo de fibrosis pulmonar a partir del día 10 post-ligadura de la arteria pulmonar izquierda. Los principales constituyentes de una lesión fibrótica son colágenas intersticiales como la tipo I y la tipo III y el depósito excesivo de estas fibras durables puede provocar alteraciones en la estructura y función propia del tejido. Las metaloproteinasas son

moléculas importantes en el mantenimiento de la matriz extracelular y en los procesos de reparación del tejido que si son disfuncionales pueden culminar en fibrosis. Los procesos pueden transcurrir normalmente u ocurrir una respuesta fibrótica al daño tisular. Las metaloproteinasas tienen efectos inhibidores y estimuladores en la fibrosis, mientras unas la reducen, otras la promueven participando en los procesos de proliferación, diferenciación, angiogénesis y apoptosis celular de la matriz, responsable del mantenimiento del soporte estructural de los tejidos.³⁹ Diferentes reportes experimentales de daño pulmonar inducido por bleomicina y radiación, indican que las metaloproteinasas MMP7 y MMP13 tienen actividad pro-fibrótica y que la MMP13 permanece sin alteraciones y no ejerce efecto alguno en los diseños experimentales de hipoxia pulmonar³⁹, lo que podría explicar de alguna manera, que la expresión de esta metaloproteinasa no se modificara en este proyecto de investigación; y con respecto al proceso apoptótico, se observó que las células epiteliales tanto del bronquio como del alveolo, así como las células endoteliales del pulmón derecho de las ratas a las que se les ligó la arteria pulmonar izquierda, presentaron mayor porcentaje de muerte celular por apoptosis que el pulmón derecho de los grupos control y en su mayoría, que el pulmón contralateral (izquierdo) siendo este proceso, inverso a la expresión de survivina y está documentado que las metaloproteinasas tienen la capacidad de actuar sobre sustratos que influyen la apoptosis con actividad pro-apoptótica sobre las células endoteliales.⁶⁰ La metaloproteinasa 7 (MMP7) incrementa la apoptosis a través de la activación de Fas, excepto en células cancerosas que son refractarias a esta señal apoptótica debido a anomalías proteicas en la cascada de señales de transducción⁶⁰ concomitantemente, FasL protege a las células cancerosas de la toxicidad por quimioterapia.⁶⁰

8 Conclusiones

Con base en el objetivo de este proyecto, que radicó en investigar los cambios que ocurren en la expresión de metaloproteinasas 1, 7 y 13 (MMP1, MMP7 y MMP13) en el tejido pulmonar por efecto de la angiogénesis y su consecuencia, sobre la distensibilidad pulmonar, utilizando un modelo experimental en rata; en el que mediante técnicas quirúrgicas convencionales, se mantuvo ligada la arteria pulmonar izquierda durante diferentes periodos de tiempo con el fin, de obstruir el flujo sanguíneo y generar angiogénesis pulmonar a partir de las arterias intercostales y en la hipótesis planteada que dicta que “La ligadura de la arteria pulmonar izquierda provocará isquemia e inflamación en el pulmón izquierdo generando la compensación de la irrigación sanguínea mediante la formación de nuevos vasos sanguíneos en el pulmón a partir de las arterias intercostales, ocasionando cambios en la homeostasis celular y cambios en la matriz extracelular, se concluye que:

- 1) La metaloproteinasa 1, se expresa en ambos pulmones (derecho e izquierdo) 8 días post ligadura de la arteria pulmonar (LAPI) y únicamente en el pulmón izquierdo entre 13 y 15 días post-LAPI.
- 2) La metaloproteinasa 7, se expresa 3 días después de haber pinzado la arteria pulmonar.
- 3) La metaloproteinasa 13, no se modifica por LAPI.
- 4) La expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), y la identificación de las fibras de colágena tipo I, se observan a partir del día 3 post-LAPI únicamente en el pulmón en el que se ligó la arteria y es más evidente, entre los días (4-6) y (13-15) post-LAPI.
- 5) La distensibilidad pulmonar no se modificó significativamente ni por efecto de la ligadura de la arteria pulmonar, ni por efecto del tiempo que se mantuvo ligada la arteria pulmonar, aunque se observa una disminución en la distensibilidad pulmonar en todos los grupos de estudio en los que se

mantuvo ligada la arteria con valores de recuperación a los 13-15 días post-LAPI.

- 6) Las células del pulmón derecho de las ratas a las que se les ligó la arteria pulmonar izquierda, presentaron mayor porcentaje de muerte celular por apoptosis que el pulmón derecho de los grupos control y en su mayoría, que del contralateral (izquierdo) con un proceso, inverso a la expresión de survivina.
- 7) Las metaloproteinasas de la matriz extracelular desempeñan un papel central en los procesos isquemia, inflamación, proliferación, migración, diferenciación, angiogénesis y apoptosis que mantienen la distensibilidad pulmonar.

9 Referencias

1. Beers M F and Morrisey E. *The tree R's of lung health and disease: repair, remodeling and regeneration*. Science in medicine The Journal of Clinical investigation 2011;121(6):2065- 2073.
- 2 Arrollo G A and Iruela A M. *Extracellular Matrix, Inflammation and the angiogenic response*. Spotlight Review. Cardiovascular Research 2010;86:226-235.
3. Wayne Mitzner, Won Lee, Dimitrios Georgakopoulos, and Elizabeth Wagner. *Angiogenesis in the Mouse Lung*. American Journal of Pathology 2000;15: 93-110.
4. Elizabeth M. Wagner, Jesu's Sanchez, Jessica Y. McClintock, John Jenkins, and Aigul Moldobaeva. *Inflammation and ischemia-induced lung angiogenesis*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2008; 294: L351–L357.
5. Elizabeth M. Wagner, Irina Petrache, Brian Schofield, and Wayne Mitzner. s.l. *Pulmonary ischemia induces lung remodeling and angiogenesis*. J Appl Physiol 2006; 100: 587–593.
6. NOM-062-ZOO-1999, Norma Oficial Mexicana. *Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales del laboratorio*. Estados Unidos Mexicanos. Diciembre de 1999.
7. *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.
8. AC., Guyton. *Tratado de Fisiología Médica*. 11. Madrid : Elsevier, 2006.
9. Fox SI. *Fisiología Humana*. McGraw-Hill-Interamericana. Décima edición. 2008 : 510 – 543.
10. Curtis, H; Barnes, S; Schnek, A; Flores, G. *Biología*. Sexta Edición en español. Editorial Médica Panamericana. Madrid. España. 2000:691
11. Junqueira L.C., Carneiro J. *Histología Básica Texto y Atlas*. Quinta reimpresión . Barcelona. Masson, 2011.
12. Tortora GJ, Derrickson B. *Principios de Anatomía y Fisiología*. 11ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2006.

13. Caballero S Los pulmones, como funcionan y la importancia de cuidarlos .2016. Obtenido el 30 de agosto de 2017. Página web: <https://www.verdelive.com/noticias/pulmones-funcion/>
14. Ross Michael H. *Histología: Textos y atlas de color con biología celular y molecular*. Buenos Aires : Panamericana, Quinta Edición 2008:165-172.
15. Genesser F. *Histología. Medica panamericana*, Tercera edición 2000:535-552.
16. Gartner LP, Hiatt JL. Atlas en Color de Histología. 5ª Edición. Editorial Medica Panamericana. México, 2011: 247-251.
17. Zamora, Farid Ramírez. *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 la IL-6 e IL-10*. México : Tesis de Licenciatura .
18. Cristancho,GW. *Fisiología Respiratoria lo esencial en la practica clínica* .El manual moderno , Segunda edición 2008:6-10.
19. Areck AU, Andrew AG, Andrea TE and Howard P. G. *Molecular Mediators of Angiogenesis*.J Burn Care Res 2010; 31:1-28.
20. Martinez E J, Herrera L A. *Angiogénesis: VEGF/VEGFRs como blancos terapéuticos en el tratamiento contra el cáncer*. Cancerología 1, 2006: 83-96.
21. Kumar et al: Robbins & Cotran Phatologic Basis of Diseases, 8th Edition.2009.
22. Helen Christou, Atsushi Yoshida, Victoria Arthur, Toshisuke Morita, and Stella Kourembanas. *Vascular Endothelial Growth Factor Production in the Lungs of Rats with Hypoxia-induced Pulmonary Hypertension*. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology 1998; 18: 768-776.
23. Josko J, Mazurek M. *Transcription factors having impact on vascular endothelial growth factor (VEGF) gene expression in angiogenesis* . Med Sci Monit .2004;10(4): RA89-98.
24. DeLisser HM, Christofidou-Solomidou M, Strieter RM, Burdick MD, Robinson CS, Wexler RS, Kerr JS, Garlanda C, Merwin JR, Madri JA, Albelda SM. *Involvement of Endothelial PECAM-1/CD31 in Angiogenesis*. American Journal of Phathology 1997; 151(3):671-677.
25. Juan R de la Haba Rodríguez, Ignacio Porrás Quintela, Gema Pulido Cortijo, Concepción Lucena Martínez, Javier García Corbacho, Enrique Aranda Aguilar.

Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule (PECAM-1) Expression in Malignant Human Tumours and their Metastases. Journal of Cancer Therapy, 2010 ; 1:66-70.

26. Park S, Sorenson CM, Sheibani N *PECAM-1 isoforms. Enos and endoglin axis in regulation of angiogenesis.* Clin Sci (Lond). 2015;129(3):217-34.

27. Gaoyuan Cao, Melane L. Fehrenbach, James T. Williams, Jeffrey M. Finklestein, Jing-Xu Zhu, and Horace M. DeLisser. *Angiogenesis in Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1-Null Mice.* The American Journal of Pathology 2009; 175(2): 903-915.

28. Tomás Álvaro Naranjo, Rosa Noguera-Salvá, Fernando Fariñas Guerrero. *La matriz extracelular: morfología, función y biotensegridad.* Rev Esp Patol , 2009; 42:249-261.

29. Robert K. Murray, David A. Bender, Kathleen M. Botham, Peter J. Kennelly, Victor W. Rodwell, P. Anthony Weil. *Harper. Bioquímica ilustrada. CAPÍTULO 48: La matriz extracelular.* 29ª Edición : McGRAW-HILL.

30. Geoffrey C, Hausman RE. *La Célula: Biología Celular y Molecular.* Marbán Tercera edición. 2005: 518-523.

31. Torolis, S.L. Colágeno. España .2017. Obtenido el 30 de agosto de 2017. Página web: <http://www.torolis.com/conocimiento/componentes/>

32. Elkington PT, Friedland JS. *Matrix metalloproteinases in destructive pulmonary pathology.* Thorax, 2006; 61(3): 259-66.

33. Greenlee K J, Werb Z and Kheralmand F. *Physiol Matrix Metalloproteinases in Lung: Multiple, Multifarious, and Multifaceted.* Rev 2007; 87:69-98.

34. Jose R. Mora Solera ; Aldo Javier Manzur Conte ; Tatiana Ramírez Mora ; Daniel Silva Herzog Flores. *Papel de las Metaloproteinasas de la Matriz en la Degradación del Tejido Pulpar: Una revisión literaria.* Revista Científica Odontológica 2005; 1:20-26.

35. Pérez García, L J. *Metaloproteinasas y piel.* Actas dermo-sifiliográficas 2004; 95(7):413-423

36. Coronato S, Laguens G, Di Girolamo V. *Rol de las metaloproteinasas y sus inhibidores en patología tumoral.* Medicina (Buenos Aires) 2012; 72: 495-502.

37. Lagente V, Manoury B, Nénan S , Le Quément C., Martin-Chouly C. and E. Boichot. *Role of matrix metalloproteinases in the development of airway*

inflammation and remodeling. Journal of Medical and Biological Research, 2005;38:1521-1530.

38. Rundhaug, Joyce E. *Matrix Metalloproteinases, Angiogenesis, and Cancer*. The Biology Behind Clinical Cancer Research, 2003; 9: 551–554.

39. Matthew Giannandrea and William C. Parks. *Diverse functions of matrix metalloproteinases during fibrosis*. Disease Models & Mechanisms, 2014 ; 7: 193-203.

40. Yan, W. *Identification of MMP-9 specific microRNA expression profile as potential targets of anti-invasion therapy in glioblastoma multiforme*. Brain Research, 2011; 1411 :108-115.

41. Raulo, SM . *Matrix Metalloproteinases as Markers of Inflammation in Equine Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) : With Special Reference to Gelatinases and Collagenases*. Department of clinical Veterinary Sciences. University of Helsinki.2001:22-30.

42. Bustos Jaimes I, Castañeda Patlán C, Oria Hernández J, Rendón Huerta E, Reyes Vivas H, Romero Álvarez I. *Metaloproteinasas de Matriz en la Remodelación*. Mensaje Bioquímico. 2008; XXXI.

43. Mitsiades N, Yu W, Poulaki V, Tsokos M, and Stamenkovic I. *Matrix Metalloproteinase-7-mediated Cleavage of Fas Ligand Protects Tumor Cells*. Cancer research 2001;61:577–581.

44. Vajner L, Vytasek R, Lachmanova V, Uhlik J, Konradova V, Navotna J, Hampl V and Herget J. *Acute and Chronic hypoxia as well as 7 day recovery from chronic hypoxia affects the distribution of pulmonary mast cells and their MMP-13 expression in rats*. Int J Exp path 2006; 87: 383-391.

45. Mitzner W, Wagner EM. *Vascular remodeling in the circulations of the lung*. J Appl Physiol 2004;97(5): 1999-2004.

46. McDonald DM, *Angiogenesis and remodeling of airway vasculature in chronic inflammation*. s.l. : Am J Respir Crit Care Med, 2001: 39-45.

47. Ting-Jun FAN1, Li-Hui HAN, Ri-Shan CONG, and Jin LIANG. *Caspase Family Proteases and Apoptosis*. Acta Biochimica et Biophysica Sinica 2005;37(11): 719-727.

48. A., Sotro-Vega. Evaluación de las alteraciones macroscópicas, microscópicas y en la expresión de caspasa-3 en el tejido traqueal criopreservado por efecto de

la solución, de la temperatura y del tiempo de congelación. Tesis doctoral. México D.F.

49. Ortega-Camarillo C, Diaz Flores M., Avalos-Rodriguez A, Vergara-Onofre. *La apoptosis y su importancia Bioquímica*. Gac Med Mex, 2001; 137(6); 563-577.

50. Hotchkiss R, Strasser A, Mc Dunn JE, Swanson PE. *Cell Death*. N Eng J Med, 2009; 361: 1570-83.

51. wiseGREEK. What is Apoptosis? Copyright © 2003 – 2017. Obtenido el 30 de agosto de 2017. Página web: <http://www.wisegeek.org/what-is-apoptosis.htm>

52. Sulpizi M, Rothlisberger U, and Carioni P. *Molecular Dynamics Studies of Caspase 3*. Biophysical Journal 2003 84(4): 2207-2215.

53. Elmore, S. *Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death*. Toxicol pathol, 2007; 35(4): 495 -516.

54. Geral M, Cohen. *Caspases: The Executioners of Apoptosis*. Biochem J 1997; 326: 1-16.

55. Muñoz Cendales D, Cuca Suárez. *Compuestos citotóxicos de origen vegetal y su relación con proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP)*. Rev Colomb Cancerol 2016; 20(3):124-134.

56. Johnson M. E and Howerth E. W. *Survivin: a bifunctional inhibitor of apoptosis protein*. Vet Pathol, 2004; 41: 599–607.

57. Raniin I, Wang V, Sausville E, Scudiere DA, Vigna N, Oltersdorf T and John C. *IAP-Family Protein Survivin Inhibits Caspase Activity and Apoptosis Induced by Fas (CD95), bax, caspases, and anticancer drugs*. Cancer Research 1998; 58 :5315-5320.

58. Garcia O, Carraro G, Navarro S, Bertoncello I, McQualter J, Driscoll B, Jesudason E, Warburton D. *Cell-based therapies for lung disease*. Br Med Bull, 2012;101: 147–161.

59. Königshoff M, Saglani S, Marsland B J and Eieckelberg O. *Rebuilding a diseased lung: repair and regeneration*. Eur Respir J 2013; 41(3) :497-499.

60. Amălinei C, Căruntu ID, Giușcă SE, Bălan RA. *Rom J Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions*. Morphol Embryol 2010; 51(2):215-28.

61. S. Löffek, O. Schilling, C-W. Franzke *Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance*. European Respiratory Journal 2011;38: 191-208.
62. Shiomi T, Lemaître V, D'Armiento J, Okada Y. *Matrix metalloproteinases, a disintegrin and metalloproteinases, and a disintegrin and metalloproteinases with thrombospondin motifs in non-neoplastic diseases*. Pathol Int. 2010;60(7):477–496.
63. Alfaro Moreno E, García Cúellar C, Dueñas González A. *Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones*. Cancerología 2000;46(4):275–280.