

24
Lej



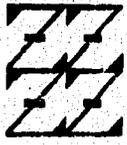
UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

"Efecto de los Inmunosupresores en la
Cicatrización Bronquial en un Modelo de
Autotransplante Pulmonar"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A
VICTOR MANUEL RUIZ LOPEZ

U N A M
F E S
Z A R A G O Z A



LO HUMANO ES
DE NUESTRA OPTACION

MEXICO, D. F.

MARZO 1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

**ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE BIOLOGIA
MOLECULAR, EN COLABORACION CON LOS LABORATORIOS DE
CIRUGIA EXPERIMENTAL Y DE PATOLOGIA EXPERIMENTAL DEL
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
BAJO LA DIRECCION DE LA DRA. GEORGINA GONZALEZ AVILA**

ESTE TRABAJO LO DEDICO A:

**MI HIJO EFREN,
POR SU GRAN VALENTIA.**

**A MI ESPOSA,
POR SU AYUDA, CARIÑO Y COMPRESION.**

**A MI MADRE,
POR SU DEDICACION Y ESFUERZO POR EDUCARME.**

**A MIS HERMANOS Y SOBRINOS,
POR SU GRAN CARIÑO.**

AGRADEZCO:

**AL DR. MOISES SELMAN LAMA
SUBDIRECTOR DE INVESTIGACION DEL I.N.E.R.**

**A LA DRA. GEORGINA GONZALEZ AVILA
LABORATORIO DE BIOLOGIA MOLECULAR**

AL GRAN EQUIPO DE CIRUGIA EXPERIMENTAL

**A LA DRA. BEATRIZ VANDA CANTON
PATOLOGIA EXPERIMENTAL**

**AL M. EN C. IGNACIO PARAMO RAMIREZ
LABORATORIO DE BIOLOGIA MOLECULAR**

AL JURADO POR SUS APORTACIONES A ESTE TRABAJO

Y

**A TODOS MIS AMIGOS Y PROFESORES POR SU GRAN APOYO DURANTE
MIS ESTUDIOS.**

INDICE.

TEMA	PAG.
RESUMEN	
I. INTRODUCCION.....	1
1. Cicatrización.....	2
A. Fase inflamatoria.....	2
B. Fase proliferativa.....	4
C. Fase de remodelación.....	5
2. Colágenas.....	6
A. Biosíntesis.....	9
B. Degradación.....	11
3. Aspectos Inmunológicos del trasplante de órganos.....	13
4. Inmunosupresores.....	16
A. Prednisona.....	17
a. Mecanismo de acción.....	17
b. Efecto sobre los mediadores inmunológicos y componentes celulares.....	18
c. Efecto sobre la cicatrización.....	19
B. Ciclosporina.....	20
a. Mecanismo de acción.....	20
b. Efecto sobre los mediadores inmunológicos y componentes celulares.....	21
c. Efecto sobre la cicatrización.....	21
C. Azatioprina.....	21
a. Mecanismo de acción.....	22
b. Efecto sobre los mediadores inmunológicos y componentes celulares.....	22
c. Efecto sobre la cicatrización.....	23
II. ANTECEDENTES.....	24
III. HIPOTESIS.....	28
IV. OBJETIVO.....	28

TEMA	PAG.
V. MATERIAL Y METODOS.....	29
1. Modelo de autotransplante.....	29
2. Análisis Histológico.....	31
3. Medición de la fuerza tensil de ruptura.....	31
4. Determinación del contenido de colágena.....	31
5. Análisis estadístico.....	32
VI. RESULTADOS.....	33
1. Histología.....	33
A. Grupo 1.....	33
B. Grupo 2.....	34
C. Grupo 3.....	34
D. Grupo 4.....	36
E. Grupo 5.....	36
F. Grupo 6.....	37
G. Índice de colágena.....	39
2. Colágena.....	41
3. Fuerza tensil de ruptura.....	43
VII. DISCUSION.....	46
VIII. CONCLUSIONES.....	49
IX. BIBLIOGRAFIA.....	50
X. ANEXOS.....	57
1. Anexo 1.....	57
2. Anexo 2.....	60

RESUMEN

El trasplante pulmonar es la única posibilidad terapéutica, para pacientes con pulmón en estado terminal; sin embargo, las complicaciones que se presentan después del trasplante como la cicatrización bronquial deficiente, no han permitido que esta medida terapéutica sea muy exitosa. Esta complicación puede ser el resultado de varios factores como la inmunosupresión, la isquemia, infecciones y/o el fenómeno de rechazo. Para poder discernir, cual es el efecto de cada factor en la deficiente cicatrización bronquial, es necesario observar el efecto aislado de cada uno en la cicatrización bronquial.

Debido a que existen pocos trabajos que evalúen el efecto de los inmunosupresores en la cicatrización bronquial, en este trabajo se evaluó el efecto de 3 inmunosupresores (azatioprina, ciclosporina y prednisona) en la cicatrización bronquial, en un modelo de autotrasplante pulmonar canino.

Se emplearon tres parámetros comparativos, para lograr el objetivo, el histológico, la cuantificación de la concentración de colágena y la medición de la fuerza tensil de ruptura (FTR). Para el análisis estadístico se utilizó una prueba no paramétrica, la U de Mann-Whitney.

En cuanto al análisis histológico y la concentración de colágena de las anastomosis, no hubo diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo control con respecto a los grupos problema. Sin embargo, en lo que respecta a la FTR, los grupos de prednisona (4 mg/kg/día) y ciclosporina (5 mg/kg/día) presentan diferencias estadísticamente significativas al compararse con el grupo control. Es decir, la cicatrización bronquial es afectada por éstos dos fármacos a las dosis empleadas; pero este efecto no es debido a la cantidad de colágena depositada, sino probablemente a la forma de depositarse de ésta o a una polimerización deficiente de la misma, ya que se altera la FTR.

I. INTRODUCCION.

El término de enfermedad pulmonar en estado terminal se refiere a cambios anatómicos severos, extensos e irreversibles en los pulmones, distorsiones anatómicas que perturban el intercambio gaseoso (1).

Clínicamente el paciente se encuentra en un estado de insuficiencia respiratoria, por lo que no puede sostener el mecanismo aeróbico sin ayuda de O₂ suplementario (ventilación) (1-3).

Las enfermedades que provocan estos daños extremos e irreversibles en el parénquima pulmonar se han clasificado en tres grupos: de tipo restrictivo, como la fibrosis pulmonar idiopática; de tipo obstructivo, como el enfisema, la bronquiolitis, la bronquiolitis crónica y el asma; y las infecciosas crónicas (2).

Para todos estos pacientes, una vez que la enfermedad se encuentra en un estadio avanzado (pulmón en estado terminal), las posibilidades terapéuticas que mejoren su calidad de vida prácticamente son nulas, por lo que el trasplante pulmonar les ofrece una buena alternativa terapéutica (3).

Durante los años 80's hubo grandes progresos en el campo del trasplante, lo que trajo como consecuencia un impulso en la inmunología, la bioquímica, la fisiología, etc., en órganos como el riñón, el hígado y el corazón. Sin embargo, los progresos en el trasplante pulmonar fueron pocos (2,4).

El pulmón es un órgano particularmente complicado para el trasplante debido a que posee una superficie epitelial sumamente delicada y expuesta al ambiente externo, por lo que en condiciones normales requiere de una inmunidad natural muy eficiente contra antígenos provenientes del exterior (5,6). La experiencia en el trasplante de órganos ha demostrado que el pulmón tiene una capacidad de rechazo superior a la de cualquier otro órgano (7).

Además existen problemas con la cicatrización bronquial que se han atribuido en parte a la isquemia que sufre el lugar de la anastomosis bronquial, lo que entorpece el inicio del proceso de cicatrización (2,8,9).

Por otra parte, también la inmunosupresión dificulta el trasplante del pulmón debido a que disminuye la producción de macrófagos, interfiere probablemente con la regeneración celular, la proliferación de fibroblastos, el depósito de colágena y la neovascularización de la herida (4,10,11).

1. Cicatrización.

Como ya se mencionó anteriormente, uno de los principales problemas que se presentan después del trasplante pulmonar, está relacionado con la cicatrización bronquial.

El proceso de la formación de la cicatriz es similar en los diferentes tejidos. En cuanto se produce la lesión en el tejido conjuntivo, se desarrolla una compleja serie de fenómenos que eventualmente darán dos resultados. Uno, la inflamación, la cual llevará a la acumulación extravascular de células y de líquido. El otro, es la reparación mediante la formación de cicatriz, que continuará hasta restablecer la continuidad anatómica. Estos procesos tienen una superposición cronológica y comparten muchos de los períodos iniciales, así que la subdivisión del proceso en un orden de eventos es solamente con fines didácticos (2, 12-15).

El proceso de cicatrización, se puede subdividir en tres fases: a) fase inflamatoria o exudado, b) fase fibroblástica o proliferativa y c) fase de remodelación o maduración (15).

A. Fase inflamatoria. Es una reacción inespecífica del tejido conjuntivo vascularizado. Inmediatamente después de producida la lesión hay un período de isquemia variable, por lo general corto, en el cual disminuye el calibre de las

arteriolas y hasta pueden ocluirse por completo; pero a los pocos momentos se restablece el flujo sanguíneo en toda el área, ocurre dilatación arteriolar y la circulación aumenta considerablemente, no sólo debido al mayor calibre vascular sino también porque muchos capilares que estaban cerrados se abren a la circulación.

En la proximidad inmediata de la lesión el flujo sanguíneo experimenta los mismos cambios descritos, pero al poco tiempo se hace más lento y a las pocas horas se detiene por completo y la luz vascular es ocupada por un trombo (13). La trombina y las plaquetas se adhieren a las paredes de los vasos en el sitio del daño, iniciando la coagulación local (16). Como consecuencia, la trombina convierte al fibrinógeno en fibrina monomérica, la cual se polimeriza, por consiguiente los márgenes del sitio de la herida son rápidamente cubiertos por una malla de fibrina que contiene cantidades variables de fragmentos de tejido y material extraño (13). Las plaquetas liberan un potente vasoconstrictor, la serotonina, y un amplio espectro de citocinas: Factor de crecimiento transformante alfa y beta, y Factor de crecimiento derivado de plaquetas (TGF α , TGF β , y PDGF respectivamente) (15).

Este breve período de vasoconstricción es seguido por la liberación de histamina y bradicinina causando vasodilatación local y un incremento en la permeabilidad capilar en y alrededor de la herida. Por otro lado, las células endoteliales, mantienen la vasodilatación a través de la producción de óxido nítrico (NO), el cual mantiene relajado al músculo liso (17). Estos procesos permiten un influjo de leucocitos, proteínas, fluidos y hormonas.

Los monocitos que dejan el flujo sanguíneo migran al sitio de la herida y comienzan su actividad como macrófagos, los cuales comienzan a fagocitar detritos celulares y a destruir bacterias (18).

El movimiento de los neutrófilos y los macrófagos es ayudado por las sustancias quimiotácticas. La acción predominante de los neutrófilos es la liberación de enzimas

y de radicales libres de O₂. Los neutrófilos también expresan citocinas como TGFβ que juega un papel múltiple en la reparación de los tejidos (es una sustancia quimiotáctica de monocitos y fibroblastos, y un activador de la diferenciación de fibroblastos); los macrófagos influyen en el proceso de reparación a través de la expresión de citocinas, producen mediadores proinflamatorios como interleucina 1 (IL-1) y factor de necrosis tumoral (TNF) así como enzimas proteolíticas (colagenasas) (15).

B. Fase proliferativa. Comienza con la formación de tejido de granulación, con neoformación de vasos sanguíneos que gradualmente reemplazan las envolturas de fibrina. (13)

La vascularización puede ocupar hasta un 40% de la herida. Los fibroblastos ya existen en el lugar de la lesión, los cuales sintetizan fibronectina que a su vez sirve como sitio de anclaje para estas células, lo que permite la acumulación de fibroblastos en el tejido de granulación. También durante esta fase existe el depósito de ácido hialurónico y colágena tipo I (15).

Durante esta fase los fibroblastos (70% aproximadamente) se diferencian a su fenotipo contráctil, los miofibroblastos. Estas células tienen la característica de tener en su citoplasma filamentos compuestos de actina como la del músculo liso. Tanto la proliferación de fibroblastos como su diferenciación, es causada por péptidos secretados del endotelio vascular llamados endotelinas, de las cuales la más activa es la endotelina 1 (ET-1) (19).

Otros componentes de la matriz acompañan a este estado como la decorina (pequeño proteoglicano) la cual puede afectar la fibrinogénesis (13), ya que se une a TGFβ y lo inactiva (20).

Los eventos tardíos de esta fase coinciden con la eliminación del revestimiento de fibrina y la reducción del número de células inflamatorias. La intensa reacción celular

del proceso es reemplazada por la acumulación del tejido conjuntivo, siendo la colágena tipo I la molécula predominante (16).

La mitosis y la migración de células epiteliales sobre el tejido de granulación, cierra gradualmente la herida.

C. Fase de remodelación. Es la fase en la que se forma la cicatriz, comienza aproximadamente 3 semanas después del daño y se puede extender por 2 años. Todos los eventos que se producen durante las fases de cicatrización, tienen el objeto de restablecer la continuidad anatómica del tejido afectado lo más cercano posible a como era originalmente antes de la lesión.

La eliminación de los restos de tejido, la infiltración celular y la neoformación vascular, tienen una existencia transitoria en la reparación de la herida; no ocurre lo mismo con el depósito de componentes de la matriz extracelular (ME), que proporciona a la cicatriz su principal característica física, la fuerza tensil (15).

Aunque la producción de colágena disminuye, la nueva que se forma tiene una mayor organización y resistencia que la que se formó durante la fase proliferativa. El depósito de esta colágena, incrementa la fuerza tensil de ruptura en la cicatriz. Sin embargo, la fuerza tensil en la cicatriz no es usualmente mayor al 80% de la fuerza original (18).

Uno de los eventos importantes en la cicatrización, es la síntesis de componentes de la ME que está conformada por una gran variedad de moléculas como las colágenas que son responsables de la resistencia mecánica, la elastina que confiere cualidades de flexibilidad y elasticidad, los proteoglicanos que son esenciales para la adhesividad, y la fibronectina que participa en las interacciones intercelulares, y de la célula con su ambiente extracelular (21).

2. Colágenas

Las colágenas son las proteínas más abundantes en los animales, de los que constituyen una tercera parte de su masa proteica y, aunque tradicionalmente, el papel que se les ha atribuido ha sido estructural, también desempeñan una función importante en el desarrollo de los tejidos y en su resistencia mecánica, sirviendo como soporte celular, etc.

Las colágenas son una clase heterogénea de moléculas que constituyen el producto de una familia de genes altamente relacionados. A la fecha se han identificado en los vertebrados 19 tipos diferentes de colágenas referidos como tipos I-XIX (tabla 1), todos los cuales tienen en común, el ser proteínas estructurales que contienen uno o más dominios con una estructura de triple hélice, compuesta de cadenas polipeptídicas llamadas cadenas α (21).

La diversa estructura molecular de las cadenas α ha hecho difícil clasificar a las colágenas en subfamilias. Tal clasificación es sólo obvia para el grupo referido como colágenas fibrilares. Estas colágenas están formadas por largos segmentos de triple hélice de aproximadamente 1000 aminoácidos con una secuencia de repetida de Gli-X-Y; en donde cerca de 30% de las posiciones X y Y están ocupadas por prolina e hidroxiprolina (22). Por ejemplo, en la colágena tipo I, cada triple hélice se encuentra compuesta de 3 cadenas polipeptídicas (α), cada una de las cuales tiene la forma de una hélice levógira con alrededor de 3.3 residuos de aminoácidos por cada vuelta. Estas tres cadenas helicoidales, están enrolladas en un giro dextrógiro sobreponiéndose una a la otra, para producir una estructura de triple hélice (fig. 1) (21,23).

TABLA 1. Tipos de colágena.

TIPO DE COLAGENA	COMPOSICION	FORMA	FUNCION
I	$[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$	Fibrillas estriadas	Provee fuerza tensil al tejido conjuntivo.
II	$[\alpha 1(II)]_3$	Fibrillas estriadas	Provee fuerza tensil al tejido conjuntivo.
III	$[\alpha 1(III)]_3$	Fibrillas estriadas	Provee fuerza tensil al tejido conjuntivo.
IV	$[\alpha 1(IV)]_2\alpha 2(IV)$	Malla	Componente estructural de membrana basal.
V	$[\alpha 1(IV)]_2\alpha 2(V)$	Fibrillas estriadas	Provee fuerza tensil al tejido conjuntivo.
VI	$\alpha 1(VI)\alpha 2(VI)\alpha 3(VI)$	Filamentos en rosario, microfibrillas.	Puente entre células y matriz extracelular.
VII	$[\alpha 1(VII)]_3$	Fibrillas de anclaje	Da fuerza a las uniones dermales-epidermales.
VIII	$[\alpha 1(VIII)]_2\alpha 2(VIII)$	Mallas hexagonales	Desconocida.
IX	$\alpha 1(IX)\alpha 2(IX)\alpha 3(IX)$	Superficie de fibrillas que contienen colágena II.	Liga grupos funcionales de las fibrillas.
X	$[\alpha 1(X)]_3$	Mallas hexagonales asociadas a fibrillas.	Unión de calcio.
XI	$\alpha 1(XI)\alpha 2(XI)\alpha 1(II)$	Fibrillas heterotípicas con colágena II.	Provee fuerza tensil al tejido conjuntivo.
XII	$[\alpha 1(XII)]_3$	Fibrillas asociadas	Desconocida.
XIV	$[\alpha 1(XIV)]_3$	Fibrillas asociadas	Desconocida.

La lista incluye sólo los tipos de colágena que están bien caracterizados a nivel proteico. Todos los demás tipos sólo son conocidos por su secuencia de cDNA.
Tomada de Brown J. y Timpl R., 1995 (22).

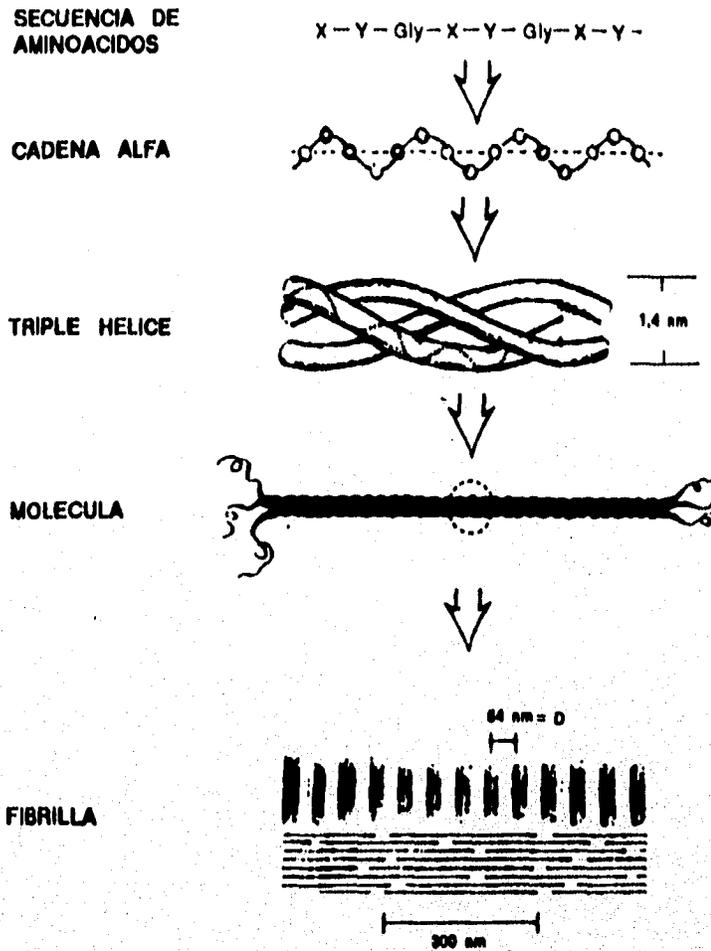


Figura 1. Estructura de la colágena tipo I. La molécula se encuentra compuesta de 3 cadenas polipeptídicas (cadenas α), cada una de las cuales tiene la forma de una hélice levógira con alrededor de 3.3 residuos de aminoácidos por vuelta. Estas tres cadenas helicoidales, están enrolladas en un giro dextrógiro sobreponiéndose una a la otra para producir una estructura de triple hélice. Tomado de Brown J. y Timpl R., 1995 (22).

Otro grupo de colágenas son las no fibrilares o globulares. Sus segmentos de triple hélice son de tamaño variable y algunos son subdivididos por grandes segmentos no colagénicos sin una estructura modular reconocible. Una de las características es la frecuencia de secuencias diferentes a Gli-X-Y dentro de las secuencias helicoidales, tales secuencias son Gli-X o X-Y. Estas colágenas se pueden asociar con colágenas fibrilares para formar mallas.

El otro grupo de colágenas (tipos XIII y XV-XIX), se descubrieron de su secuencia de DNA complementario (DNAc), sin embargo todavía no hay una caracterización proteínica de estas colágenas encontrada en los tejidos. Aparentemente se han expresado en tejidos como se indica por el análisis de RNA. Varían considerablemente en su largo y en los segmentos helicoidales de su triple hélice, pero estos segmentos están interrumpidos por segmentos que no forman hélices, presumiblemente estructuras globulares (22).

Las propiedades físicas y biológicas de la colágena se explican por las diferentes propiedades químicas de los aminoácidos que la componen, ya que la secuencia de aminoácidos es regular y periódica donde uno de cada tres aminoácidos es glicina. Por otra parte, la secuencia glicina-prolina-hidroxiprolina se repite frecuentemente (cerca del 30%), lo cual explica la rigidez y estabilidad de la molécula. La prolina e hidroxiprolina son en realidad iminoácidos que difieren de los aminoácidos por que su cadena carbonada se repliega cíclicamente sobre sí misma (21,23).

A. Biosíntesis.

Las cadenas que constituyen la colágena se sintetizan en forma de precursores mayores. Por ejemplo, el precursor de la cadena α -1 de la colágena tipo I, es el llamado pro- α -1 el cual tiene una masa de 140 Kd; este precursor a diferencia de la cadena α -1 (la cual tiene 95 Kd) contiene en los extremos amino y carboxiterminal

péptidos adicionales llamados propéptidos los cuales tienen una composición diferente al resto de la cadena. Las regiones carboxiterminales de las cadenas de los precursores (procolágenas) están enlazadas mutuamente por puentes disulfuro intercatenarios que no existen en la colágena. Los propéptidos de la procolágena evitan la formación prematura de fibras de colágena, facilitan el alineamiento de las tres cadenas y promueven la formación de la triple hélice para lo cual son muy importantes los puentes disulfuro intracatenarios (21,24,25). Una vez que la procolágena se encuentra fuera de la célula los propéptidos son escindidos por las procolágena peptidasas, existiendo una peptidasa para el extremo amino y otra para el carboxilo para cada tipo de colágena. Cuando se han escindido los propéptidos, la parte que se conserva es llamada tropocolágena y es entonces cuando se lleva a cabo la formación de las fibras de colágena; dicha formación tiene lugar en el espacio extracelular, cerca de la superficie de las células. Las fibras de colágena están formadas por moléculas de tropocolágena ordenadas de manera desfasada (formación escalonada) en donde las tropocolágenas de una misma fila están separadas por brechas de 400 Å; estas brechas permiten establecer enlaces cruzados entre moléculas después de formarse la fibra o bien sirven como centros de nucleación para la fase mineral del hueso. Posteriormente las fibras se refuerzan mediante enlaces cruzados intramoleculares entre los aldehídos de la lisina y la hidroxilisina (23).

La colágena tiene unidades de carbohidratos unidas covalentemente a los residuos de hidroxilisina. Normalmente se encuentra un disacárido formado por glucosa y galactosa, y éstos son insertados por la galactosiltransferasa y la glucosiltransferasa las cuales son enzimas específicas que reconocen a las hidroxilisinas de la colágena naciente antes de que adopte la conformación helicoidal. El número de unidades de carbohidrato incorporadas por unidad de tropocolágena depende del tejido (25).

B. Degradación.

La degradación de las moléculas de colágena se lleva a cabo por enzimas altamente específicas conocidas originalmente como colagenasas. Estas enzimas son parte de una familia de moléculas conocidas como metaloproteinasas de la matriz extracelular (MPP).

Este grupo de enzimas son responsables de la degradación de moléculas de la matriz extracelular tales como la gelatina, los diferentes tipos de colágena, los proteoglicanos, la laminina, la fibronectina y la elastina (tabla 2).

Las características de las MPP son:

- 1.- Son sintetizadas y secretadas por células hematopoyéticas y del tejido conjuntivo.
- 2.- Todas las MMPs son proteínas y sus secuencias de aminoácidos determinadas de sus cDNA, revelan que están constituidas por un prodomonio, responsable de mantener su latencia enzimática; un dominio catalítico, el cual se cree ser el sitio de unión del zinc; y un dominio carboxiterminal.
- 3.- Su actividad enzimática es mayor a pH cercano a la neutralidad.
- 4.- Su mecanismo catalítico es dependiente del zinc y calcio.
- 5.- Se secretan en forma de zimógeno.
- 6.- Los zimógenos pueden ser activados por proteasas o por organomercuriales.
- 7.- La regulación de las MMPs ocurre no sólo a nivel de expresión génica, sino también extracelularmente, después de su secreción, por inhibidores específicos.

El principal es el inhibidor tisular de metaloproteasas (TIMP) (26-29).

TABLA 2. Nomenclatura y sustratos naturales de las metaloproteinasas.

GRUPOS	NOMBRE DE LA ENZIMA	MASA MOLECULAR DEDUCIDA (KDa)	SUSTRATOS
I	Colagenasas Colagenasa Intersticial MMP-1	54.1	Colágenas tipo I, II, III, VII, X
	Colagenasa de fibroblastos Colagenasa de Neutrófilos MMP-5 Colagenasa PMM	53.4	Colágenas I, II, III
II	Gelatinasas Gelatinasa A MMP-2 Gelatinasa 72 KDa Colagenasa IV	73.9	Gelatinas, Colágena IV ?, V, Elastina
	Gelatinasa B Gelatinasa 92-KDa MMP-9 Colagenasa IV 92-KDa	78.4	Gelatinas, Colágena IV ?, V, Elastina
III	Estromelisin Estromelisin 1 MMP-3	54.0	Proteoglicanos, Proteínas de unión Fibronectina, Laminina, Gelatinas, Colágenas III, IV, V, IX
	Transina Proteoglicanasa Activador de Proteoglicanasa		
	Estromelisin-2 MMP-10 Transina-2	54.1	Proteoglicanos, Proteínas de unión Fibronectina, Laminina, Gelatinas, Colágenas III, IV, V, IX.
	Matrilisina MMP-7 Pump-1 Metaloproteasa uterina	29.7	Proteoglicanos, Fibronectina, Elastina, Gelatinas, Colágenas IV ?
IV	Otras Estromelisin 3	54.6	?
	Metaloelastasa	53.9	Elastina, Fibronectina

Los miembros de la familia de las metaloproteinasas se pueden dividir en tres categorías dependiendo de la especificidad del sustrato: las colagenasas, gelatinasas y estromelisin. La masa deducida de la proteína comienza en la metionina inicial y esta dada en kilodaltones (KDa). Los signos de interrogación indican que hay algunas discrepancias en la literatura al considerar los sitios de corte de los sustratos indicados y en el caso de la estromelisin 3, que la especificidad del sustrato todavía no ha sido determinada. Tomada de Matrisian L.M., 1992 (27).

3. Aspectos inmunológicos del trasplante de órganos.

Para entender como los fármacos inmunosupresores regulan las respuestas inmunológicas de un organismo, y si éstos pueden afectar los mecanismos de cicatrización, es necesario conocer la respuesta inmune en condiciones normales.

El sistema inmune es multifacético y está diseñado para proteger al individuo de agentes extraños (antígenos) que en un momento dado le pueden causar enfermedades.

Sin embargo, en algunas ocasiones el sistema inmune reacciona en contra de los tejidos propios del organismo al cual pertenece, produciendo enfermedades llamadas autoinmunes, tales como la tiroiditis, adrenalitis, anemia hemolítica, trombocitopenia, etc. , por lo que no es de sorprenderse que, cuando un órgano es transplantado de un individuo a otro, el sistema inmune del receptor reconocerá como extraño al órgano transplantado y producirá una respuesta inmune como consecuencia (5).

Cuando el trasplante se da entre gemelos idénticos, no existe el problema del rechazo; esto sugiere que los antígenos en el trasplante que estimulan la respuesta inmune, están determinados por factores genéticos (5,30,31).

La aceptación o el rechazo de un tejido u órgano transplantado en un organismo en condiciones inmunológicamente normales, lo determinan las diferencias entre sus glicoproteínas codificadas por genes del *complejo principal de histocompatibilidad* (MHC). El MHC es encontrado en todos los vertebrados, y las proteínas codificadas por esos genes son esenciales para los mecanismos de defensa del organismo (30,32).

Los antígenos MHC clase I son expresados en todas las células nucleadas. Estas moléculas sirven como unidades de reconocimiento que presentan antígenos a linfocitos T (usualmente células T $CD8^+$) y determinan la especificidad del ataque a las células blanco, tales como células infectadas por virus, tumores y células alogénicas (5).

Los antígenos MHC clase II son solamente expresados por células que son esenciales para las respuestas inmunes, e incluyen a células presentadoras de antígenos (monocitos, macrófagos, células de Langerhans de la epidermis y células dendríticas de órganos linfoides), linfocitos B y células epiteliales tímicas. Otras células, tales como los linfocitos T y células endoteliales vasculares, pueden expresar moléculas MHC clase II después de su activación por citocinas y ciertos agentes infecciosos (30).

Los antígenos clase II sirven como elementos de restricción de las interacciones entre células presentadoras de antígenos y las células T (usualmente células T CD4⁺) en las respuestas inmunológicas que permiten la producción de linfocinas, expresión de hipersensibilidad de tipo retardada, y la cooperación de los linfocitos T que es necesaria para la producción óptima de anticuerpos por los linfocitos B (31).

Hay fuerte evidencia de que ambas clases de antígenos (MHCs I y II) puedan servir directamente como estimuladores de las reacciones del rechazo. Ya que los antígenos de clase I están expresados en todas las células nucleadas, cada aloimplante expone al organismo receptor a sus antígenos clase I. Los antígenos clase II pueden ser intrínsecos al órgano transplantado (tales como las células de la médula ósea) o pueden ser acarreados en los linfocitos B o monocitos presentes en la porción vascular del órgano transplantado (5).

Es evidente que los linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ pueden mediar el rechazo de manera aislada o en conjunto (figura 2). La naturaleza de las reacciones de rechazo expresadas por el organismo receptor está determinada por la población de linfocitos T que es activada por la interacción con células presentadoras de antígenos (4).

El inicio de la respuesta inmune depende de la interacción antigénica específica de los receptores de las células T con los aloantígenos. Esta interacción pone en marcha la activación de señales transmembranales que permiten la activación celular.

Las consecuencias tempranas de la activación incluyen la expresión de linfocinas que actúan en una variedad de células para coordinar su participación en las respuestas del sistema inmune (figura 2). Los genes que codifican para la producción tanto de interleucina-2 (IL-2) como para los receptores de IL-2 son de los primeros que se activan, y sus productos génicos son esenciales para la proliferación de células T (31).

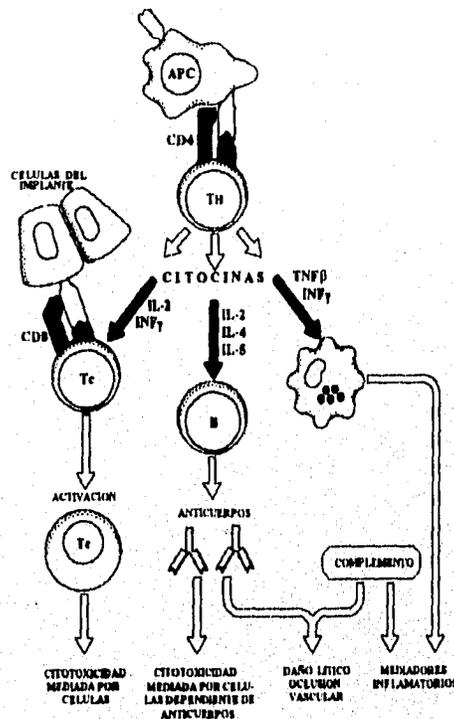


Figura 2. Componentes inmunológicos del rechazo. Las células T cooperadoras (Th) son activadas por células presentadoras de antígeno para liberar linfocinas. IL-2 e IFN γ son requeridas para la activación de células T citotóxicas (Tc); IL-2, IL-4 e IL-6 están involucradas en la activación de las células B; una mezcla de TNF β e IFN γ actúan como activadores de macrófagos. El rechazo de los órganos se da de manera celular y por producción de anticuerpos, o por reacciones inflamatorias no específicas. Tomada de Roitt 1., et.al., 1993 (51).

Posteriormente, la interleucina 3 (IL-3) se sintetiza y estimula la producción de células mesenquimatosas, las cuales se pueden diferenciar a granulocitos y macrófagos. El interferón gamma (IFN γ) también se produce, induciendo la expresión de moléculas MHC clase II en células inducibles y promoviendo la función de los macrófagos. Los factores de crecimiento y de diferenciación de las células B, interleucinas 4 (IL-4), 5 (IL-5), y 6 (IL-6) inducen la expansión clonal de las células B que han sido estimuladas por un antígeno específico, permitiendo la producción de anticuerpos específicos para esas células. Las células T se dividen bajo la influencia de la IL-2 e IL-4 y asumen diferentes funciones tales como la alotoxicidad (31).

4. Inmunosupresores.

En el transplante de órganos, los regímenes de drogas inmunosupresoras buscan inhibir selectivamente las funciones de las células B y T lo que permite la adaptación e inducción de algún tipo de tolerancia al injerto, inhibiendo lo mínimo posible el reconocimiento específico de patógenos, de moléculas extrañas y de organismos, así como los elementos que participan en los mecanismos de defensa no específicos como los granulocitos, monocitos y macrófagos, que son responsables de la fagocitosis, la digestión y metabolismo de materiales extraños que le permitan una adecuada defensa a los retos antigénicos que el medio le haga. Además, por ser elementos importantes en los procesos de cicatrización, las drogas inmunosupresoras prototipo (azatioprina y corticosteroides adrenales) inhiben la división celular y la generación de citocinas por los elementos del sistema inmune, respectivamente. En cambio, la ciclosporina inhibe selectivamente la síntesis de IL-2 dentro de las respuestas inmunes adaptativas (32).

A. Prednisona.

Los glucocorticoides como la prednisona (figura 3) ejercen un profundo efecto en las respuestas inmune e inflamatoria de los mamíferos. La mayoría de las veces el proceso inflamatorio protege contra la infección, aunque en ocasiones el proceso es destructivo. La prednisona afecta los eventos inflamatorios y altera la producción y liberación de muchos mediadores y a las células responsables de este proceso (33,34).

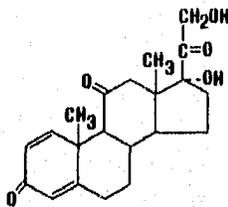


Figura 3. Estructura de la prednisona.

a. Mecanismo de acción.

La teoría clásica menciona que la prednisona se une a receptores intracelulares, provocando una serie de eventos que incluyen la síntesis de nuevas proteínas. La base molecular de la acción de la prednisona es la siguiente:

Se difunde a través de la membrana plasmática y se asocia con un receptor esteroideo; este complejo es translocado al núcleo, en donde se une a un elemento de respuesta específico (GRE) en la cromatina.

Esta unión permite la asociación de la RNA polimerasa a genes específicos y la transcripción de los RNAm respectivos. Los transcritos procesados son transportados al citoplasma en donde forman nuevas proteínas.

Los receptores intraplasmáticos para prednisona están presentes en todas las células del sistema inmune normal. Recientemente se ha propuesto que algunos de sus efectos son mediados a través de la síntesis de proteínas inhibidoras de fosfolípidos o lipocortinas que controlan la biosíntesis de las prostaglandinas y leucotrienos, los cuales son potentes mediadores de la inflamación. El efecto parece que se debe a la inhibición indirecta de la enzima responsable de la liberación de ácido araquidónico, llamada fosfolipasa A₂ (PLA₂) (33).

Las lipocortinas han mostrado tener también una variedad de otras acciones, tales como la inhibición de la quimiotaxis de neutrófilos, inducción de la diferenciación celular, efecto teratogénico y acción inmunomoduladora (30,33,35).

b. Efectos sobre los mediadores inmunológicos y componentes celulares.

El número total de inmunoglobulinas particularmente IgG, IgA e IgE se suprime *in vivo* por la prednisona. Dentro de las citocinas, la gama entera es afectada profundamente por la prednisona, la cual inhibe la producción de IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, INF γ , factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) y TNF α . También inhibe la producción de IL-8, que es quimiotáctico para neutrófilos y células T (figura 4).

La administración de prednisona causa linfopenia, monocitopenia, eosinopenia y neutrofilia. La linfopenia es causada primariamente por el secuestro de linfocitos recirculantes, mayormente células T, dentro del tejido linfoide, incluyendo la médula ósea. Las células T cooperadoras son más afectadas que las T supresoras y

citotóxicas. La liberación de mediadores para macrófagos y granulocitos es dañada, lo cual es probablemente consecuencia de las acciones anti-inflamatorias a dosis reducidas (33).

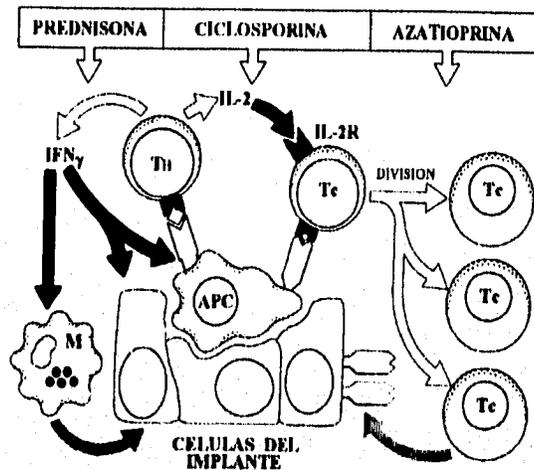


Figura 4. Mecanismo de acción de la prednisona, de la ciclosporina y de la azatioprina. La prednisona suprime la actividad de macrófagos (M), decrementa la función de las células presentadoras de antígenos. Ciclosporina interfiere con la producción de IL-2. Azatioprina, previene la producción de las células activadas. Linfocitos T cooperadores (Th). Linfocitos T citotóxicos (Tc). Células presentadoras de antígeno (APC). Tomada de Roitt I. et.al., 1993 (51).

c. Efecto sobre la cicatrización.

La terapia esteroidea prolonga el tiempo de cicatrización y en ocasiones la imposibilita, a través de la inhibición de la fase inflamatoria reduciendo la migración de neutrófilos y macrófagos, así como su densidad.

La supresión del arribo de macrófagos y leucocitos al sitio de la lesión afecta la formación de tejido de granulación e inhibe la síntesis de colágena y la angiogénesis (8,15,33,34,36).

B. Ciclosporina.

La ciclosporina (figura 5) inhibe reversiblemente las respuestas autoinmunes y aloinmunes mediadas por células T; las reacciones primarias no son afectadas, y después de que las células T son estimuladas por dosis terapéuticas de ciclosporina, no sólo expresan receptores para IL-2, sino que también comienzan la estimulación primaria de las células B y la hipersensibilidad de tipo retardada antiviral (31,37). Sin embargo, ya que este fármaco bloquea la producción de IL-2 (figura 4), interfiere con la producción de colágena, ya que IL-2 estimula a leucocitos de sangre periférica a producir IL-1, TNF α , TNF β y PDGF los cuales inducen proliferación de fibroblastos y depósito de colágena (38-41).

a. Mecanismo de acción.

El mecanismo primario de acción se piensa que es la inhibición de la actividad de las células T cooperadoras. La ciclosporina A forma un complejo con la ciclofilina, una peptidil-profil cis-trans isomerasa (32). Este complejo, se une a la calcineurina y la inactiva. Se tiene evidencia que la calcineurina, sea la responsable de la activación, a través de la desfosforilación, del componente citoplasmático (NF-ATc) del factor que activa la transcripción del gen de IL-2 (42).

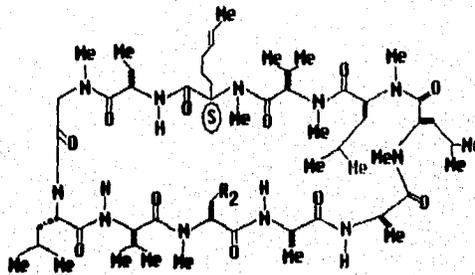


Figura 5. Estructura de la ciclosporina.

b. Efectos sobre los mediadores inmunológicos y componentes celulares.

La ciclosporina inhibe la cascada de activación para las funciones inmunes específicas, particularmente la producción de IL-2. Inhibe también la síntesis de INF γ , la lincocina que provee una señal de amplificación para la proliferación de macrófagos y monocitos (43).

c. Efecto sobre la cicatrización.

La ciclosporina interfiere con la producción de IL-2 por los linfocitos. IL-2 actúa en monocitos y macrófagos estimulándolos para producir TGF- β y PDGF, que inducen a los fibroblastos a proliferar y a producir colágena; lo anterior indica que la ciclosporina puede afectar el proceso cicatricial, disminuyendo el depósito de colágena. Sin embargo existe controversia a este respecto, ya que existen trabajos donde se demuestra la participación de este fármaco alterando el proceso de cicatrización (44-46) y otros que demuestran que no tiene ningún efecto (47,48).

C. Azatioprina.

La azatioprina (figura 6), es un compuesto del grupo de las tiopurinas, y las células T parecen ser su blanco preferido (figura 4). Así, las respuestas inmunes, tales como la hipersensibilidad retardada y el rechazo de los injertos, son particularmente afectados (4). Por otro lado, la azatioprina reduce la formación de monocitos en la médula ya que inhibe la actividad mitótica de los promonocitos (11,49).

El grado de inmunosupresión sobre las células T es incierto, y mucho de las actividades anti-inflamatorias ha sido atribuido a la inhibición de la función de los monocitos. El mayor efecto tóxico es sobre los elementos de la médula ósea (10).

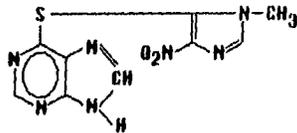


Figura 6. Estructura de la azatioprina.

a. Mecanismo de acción.

In vivo la azatioprina es metabolizada a su correspondiente análogo de ribonucleótido de monofosfato, el cual sirve como un sustrato de las enzimas responsables de la formación de difosfatos y trifosfatos, permitiendo su acumulación intracelular. Debido a esto son afectadas múltiples rutas biosintéticas, incluyendo la retroalimentación de la conversión de fosforribosil pirofosfato a ribosilamina 5-fosfato, un paso limitante en la síntesis de nucleótidos de purina. Adicionalmente, los análogos de nucleótidos de trifosfato que son formados, pueden ser incorporados dentro del DNA celular, provocando errores de transcripción (10).

b. Efectos sobre los mediadores inmunológicos y componentes celulares.

Este fármaco puede suprimir la producción de anticuerpos y las funciones inmunológicas mediadas por células. Puede causar linfopenia, así como inhibir la síntesis de gammaglobulinas (50). También puede suprimir la inducción de la respuesta primaria de hipersensibilidad; sin embargo, la hipersensibilidad retardada permanece sin alteraciones (11).

c. Efecto sobre la cicatrización.

La azatioprina afecta indirectamente la cicatrización a través de la reducción de monocitos en la sangre periférica y macrófagos en el sitio de la anastomosis (10,50,51).

II. ANTECEDENTES

A lo largo de la historia de la investigación del trasplante pulmonar, la mayoría de las investigaciones se han hecho con perros, utilizando diferentes técnicas y evaluando distintos parámetros (2).

La mayoría de los trabajos en el campo del trasplante de pulmón atribuyen el primer autotrasplante a Juvenelle en 1951 (52); sin embargo un año antes Metras en Francia publicó la técnica de alotrasplante pulmonar en perro (53). Neptune en Filadelfia desarrolló la técnica de manera independiente, y también documentó que la supervivencia después del trasplante pulmonar mejora en los perros tratados con la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) (54).

Hardy en 1963, observó que la supervivencia en perros después del trasplante de pulmón unilateral aumenta casi al doble tratando al animal con metotrexano, extendiéndose a 29 días si los animales se tratan con azatioprina sola o en combinación con hidrocortisona (55). Hardy acumuló la suficiente experiencia en perros, antes de su primer intento de trasplante pulmonar en humanos, llevado a cabo en la Universidad de Mississippi en 1963. El paciente que recibió el órgano, sobrevivió 18 días y su muerte se atribuyó a problemas renales y a su estado de desnutrición; la autopsia no demostró evidencia histológica de rechazo. La inmunosupresión consistió en azatioprina y prednisona (2).

Este esfuerzo pionero, estableció una técnica viable y mostró que el trasplante de pulmón puede funcionar en humanos. Sin embargo, en los 20 años posteriores a este evento, no ha habido grandes progresos (48). Esta falta de progreso clínico ha provocado un impulso en la investigación de laboratorio, tanto en los aspectos técnicos como en los fisiológicos, farmacológicos, bioquímicos, etc.

Uno de los problemas más graves que se presentan después del trasplante pulmonar, es la deficiente cicatrización bronquial. Se ha postulado que este problema es causado por la isquemia, el fenómeno de rechazo, los medicamentos inmunosupresores o la combinación de todos estos factores (15,34,35,56).

Arumugan en 1971, observó en ratas el efecto que ejercen los esteroides y la azatioprina, separados o en combinación, sobre la cicatrización en incisiones hechas en piel abdominal. Utilizando parámetros como la fuerza tensil de ruptura y el contenido de hidroxiprolina en las cicatrices, encontró que la azatioprina (20 mg/kg/día) no ejerce efecto inhibitorio en la cicatrización. También encontró que este inmunosupresor y la prednisona utilizadas en combinación (20 y 0.5 mg/kg/día respectivamente) no ejercen efecto alguno en la cicatrización (8).

Lima y cols. en 1981, utilizando la técnica de autotrasplante pulmonar para eliminar el fenómeno de rechazo, trabajaron con dos grupos de perros. Un grupo fue tratado sin inmunosupresión y el segundo grupo recibió metil-prednisona (2 mg/kg/día) y azatioprina (1.5 gr/kg/día) hasta el día del sacrificio (a los 23 días, después de la intervención). Además, se hicieron también 4 incisiones de piel en el lomo de cada animal al mismo tiempo del implante de pulmón. Al tiempo del sacrificio se midió la fuerza tensil de ruptura en las anastomosis tanto en bronquio como en las incisiones de piel.

Los resultados mostraron que la fuerza tensil de ruptura de las anastomosis de los bronquios y de las incisiones de piel en los grupos inmunosuprimidos, fue significativamente menor a la encontrada en el grupo control. Además, los animales que recibieron terapia inmunosupresora mostraron una incidencia significativamente más alta de disrupción y necrosis en la anastomosis bronquial (57).

Usando el modelo anteriormente descrito, se probó la ciclosporina (20 mg/kg/día) y se encontró que en los animales tratados con este fármaco la fuerza tensil de ruptura en las anastomosis es equivalente a la de los animales no tratados (48).

En otros trabajos, utilizando la técnica de alotransplante en perros, se encontró que usando ciclosporina (5 mg/kg/día) como agente inmunosupresor, la supervivencia media, con una buena función del alotransplante, fue de 155 días, muy superior a la obtenida con animales tratados con metilprednisolona (1.5 mg/kg/día) y azatioprina (2 mg/kg/día), utilizadas aisladamente o en combinación, en los cuales la supervivencia fue de 15 a 22 días (44).

Pinsker y cols., trabajaron con 3 grupos de perros a los cuales se les practicó un auto-transplante pulmonar, y se les administró 40 mg/día de prednisona por períodos de 7, 14 y 21 días respectivamente, después del auto-transplante. Todos los animales se sacrificaron el día 21 después de la intervención. Histológicamente, estos autores encontraron que los animales tratados con corticosteroides mostraron un menor grado de daño por inflamación que los animales del grupo control (36).

Auteri y cols., analizaron el efecto de los esteroides en la cicatrización bronquial utilizando un modelo de alotransplante unilateral de pulmón. A 20 perros mestizos se les transplantó un pulmón izquierdo. Todos los animales recibieron una dosis de ciclosporina (15 mg/kg/día) y azatioprina (1 mg/kg/día) y se subdividieron en tres grupos A, B y C. Al grupo A se le administró una dosis de 1.5 mg/kg/día de prednisona, mientras que los grupos B y C recibieron 5 mg/kg/día. El grupo C recibió adicionalmente una dosis de prednisona de 5 mg/kg/día por un mes antes de la intervención. Todos los animales se sacrificaron al día 28 después del transplante. Ninguno de los animales presentó dificultad respiratoria y el análisis histológico mostró una cicatrización bronquial normal en todas las anastomosis. Lo anterior

sugiere que la inmunosupresión con esteroides no es una contraindicación para el trasplante pulmonar (58).

Filipec (1992) probó el efecto de la ciclosporina A al 2%, en forma de ungüento en la cicatrización del epitelio y el estroma de la córnea, utilizando como modelo de estudio al conejo. La diferencia en la tasa de cicatrización en el grupo problema con respecto al grupo control no fue estadísticamente significativa. Tampoco hubo diferencias en la fuerza tensil de ruptura, ni en el contenido de hidroxiprolina del área cicatricial de la córnea en ambos grupos, por lo cual se concluyó que este tratamiento no inhibe significativamente la cicatrización de la córnea, tanto del epitelio como del estroma (47).

Existen pocos trabajos que evalúen el efecto de fármacos inmunosupresores, sobre la cicatrización bronquial, sin que intervengan otras variables, como el fenómeno de rechazo, la isquemia u otros. Debido a esto, en el presente trabajo se pretende observar y comparar el efecto que tienen tres inmunosupresores: azatioprina, ciclosporina y prednisona, sobre la cicatrización bronquial en un modelo de autotrasplante pulmonar canino.

III. HIPOTESIS.

Debido a que los inmunosupresores azatioprina, ciclosporina y prednisona, afectan de manera directa o indirecta los mecanismos que están involucrados en el proceso cicatricial, la administración de estos fármacos en el modelo experimental de autotransplante pulmonar canino, afectará dicho proceso en las anastomosis bronquiales.

IV. OBJETIVO.

Observar el efecto que tienen 3 fármacos inmunosupresores (azatioprina, ciclosporina y prednisona) sobre la cicatrización bronquial, en un modelo de autotransplante pulmonar canino.

V. MATERIAL Y METODOS.

En este estudio se utilizó el modelo de autotransplante pulmonar canino (11) el cual tiene la ventaja de eliminar el fenómeno de rechazo como variable, lo que permite observar directamente los efectos de los fármacos inmunosupresores en la cicatrización bronquial.

Para el estudio se utilizaron perros mestizos sin importar el sexo y con un peso aproximado entre 15 y 20 kgs. que se obtuvieron en los centros antirrábicos. Estos animales se mantuvieron en el bioterio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), de acuerdo al reglamento de la Ley General de Salud en materia de Investigación y a la "Guide for the care and use of Laboratory Animals" (59).

Para la cirugía, todos los animales fueron anestesiados con tiopental sódico (28 mg/kg) y se mantuvieron estabilizados con halotano al 1%.

1. Modelo de autotransplante.

El procedimiento quirúrgico es el siguiente:

Se realizó toracotomía izquierda en el quinto espacio intercostal, se disecó el hilio pulmonar extensamente liberando la arteria y las venas pulmonares, y se seccionó el pericardio para liberar la aurícula izquierda.

Posteriormente se disecó el bronquio y se seccionó a la mitad entre la carina principal y la salida del lóbulo superior. Las anastomosis bronquiales se realizaron con surgete continuo de material monofilamento no absorbible (Nylon Prolene 4-0), y se suturó por planos. Durante la recuperación, el animal fue manejado con antibiótico (penicilina cristalina 22000 UI/kg/día y estreptomicina 15 mg/kg/día por una semana.

después de la cirugía) y analgésico (dipirona 28 mg/kg cada 6 horas, durante 3 días después de la cirugía) (60).

Los tratamientos con los fármacos se iniciaron después de la intervención quirúrgica (el mismo día). Los fármacos se administraron por vía oral, durante la comida.

Los grupos experimentales constaron de 6 animales c/u y fueron los siguientes:

Grupo	Tratamiento
1	Control sin fármaco.
2	Prednisona v.o. 2 mg/kg/día.
3	Prednisona v.o. 4 mg/kg/día.
4	Azatioprina v.o. 2 mg/kg/día.
5	Ciclosporina A v.o. 5 mg/kg/día.
6	Tratamiento triple: Ciclosporina v.o. 5 mg/kg/día Azatioprina v.o. 2 mg/kg/día Prednisona v.o. 2 mg/kg/día

v.o. =vía oral.

Todos los animales se sacrificaron a las cuatro semanas después de la intervención, utilizando una sobredosis de tiopental sódico (24mg/kg), extrayéndose el bloque pulmonar sin afectar la zona de la anastomosis bronquial. Se dividió la carina por la mitad separándose el bronquio derecho normal (BPD) y el bronquio izquierdo con la anastomosis experimental (BPI). Ambos bronquios fueron divididos a su vez por la mitad, y una de las mitades, se utilizó para la medición de la fuerza tensil de ruptura, mientras que la otra se dividió a su vez en dos porciones, una de las

cuales sirvió para la determinación del contenido de colágena y la otra porción se usó para el análisis histológico.

2. Análisis Histológico.

El material para análisis histológico, se fijó en formalina neutral al 10%, se embebó en parafina, y se realizaron cortes que se tiñeron utilizando la tinción tricrómica de Masson (Anexo 1) (61).

Los resultados se expresaron de manera cualitativa, en cuanto a la presencia de las estirpes celulares. La cantidad de colágena se evaluó mediante un índice, el cual consiste en la asignación de un número a cada segmento de anastomosis bronquial y de bronquio normal analizado; la escala va de 0 a 3, dependiendo de la abundancia relativa de colágena. Este número se asignó a criterio del patólogo, que analizó 3 cortes de cada anastomosis bronquial.

3. Medición de la fuerza tensil de ruptura (FTR).

Se fijó uno de los extremos del segmento bronquial en estudio, y al extremo que quedó libre se le agregó gradualmente peso, hasta que el segmento bronquial mostró ruptura parcial o total. El peso se agregó perpendicularmente a la anastomosis y los resultados se expresaron en kilogramos (9).

4. Determinación del contenido de colágena.

La concentración de colágena se determinó por el método de Woessner (Anexo 2) (62).

5. Análisis estadístico.

Los resultados se expresaron como la media y la desviación estándar. Se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney, para determinar si las diferencias eran estadísticamente significativas, tomándose como significativos aquellos valores de p que fueron menores de 0.05 (63).

VI. RESULTADOS

1. Histología.

A. Grupo I, Control sin fármaco (figura 7).

En los BPI de este grupo se observó inflamación de grado moderado (grado 2), la cual consistió de células mononucleares y neutrófilos.

Hay fibras de colágena de nueva formación, gruesas y desordenadas, en cantidad un poco superior a la normal; también se observaron numerosos fibroblastos localizados principalmente en el sitio de la anastomosis, alrededor de los vasos y cercanos a las zonas que presentan inflamación.

En los BPI hay necrosis de grado leve (grado 1) en la submucosa y el músculo liso, cerca de las suturas; sin embargo el epitelio se observa hiperplásico y el cartílago presenta buena regeneración.



Figura 7. Grupo I. Bronquio control anastomosado (sin tratamiento). Núcleo teñido en color negro; colágena en azul; citoplasma, queratina y fibras musculares en rojo. Aumento 12X.

B. Grupo 2, Prednisona 2 mg/kg/día (figura 8a).

En los BPI, cerca del sitio de las anastomosis, la submucosa se apreció más engrosada que en los BPD, debido a la presencia de fibroblastos que están sintetizando colágena, la cual se observa densa y desorganizada a diferencia de los BPD, en donde está menos densa y se dispone en fibras delgadas y ordenadas en forma paralela entre sí, dándole un aspecto más laxo. Probablemente la cantidad de colágena es igual en ambos bronquios (anastomosado y control), y en lo que difieren es en el estado de maduración, en los BPI es inmadura y no se distribuye en forma ordenada.

En el 28% de los BPI se observó un infiltrado inflamatorio constituido principalmente por linfocitos y células plasmáticas que se agrupan en pequeños focos localizados casi siempre en la submucosa; también se encontraron en el 42% de los BPI neutrófilos y células gigantes cerca de los puntos de sutura.

C. Grupo 3, Prednisona 4 mg/kg/día (Figura 8b).

En los BPI, la submucosa se apreció más engrosada que en los respectivos BPD, a expensas de un mayor depósito de fibras de colágena, las cuales se condensan cercanas a la membrana basal y alrededor del cartílago preferentemente. Se presentaron en cantidades moderadas (grado 1 a 2) con respecto a los BPD, en donde éstas son más delgadas, menos densas y guardan una disposición más ordenada, disponiéndose en largas hebras.

En el 66% de los BPI se observó un infiltrado inflamatorio escaso o leve (grado 1), constituido por pequeños focos de linfocitos y células plasmáticas; en el 33% de los BPI la inflamación estuvo ausente. Sólo en el 33% de los BPI se aprecia necrosis de grado leve (grado 1).



Figura 8. Bronquios anastomosados. a) Grupo 2: Prednisona (2mg/kg/día). b) Grupo 3: Prednisona (4mg/kg/día). Aumento 12X.

D. Grupo 4. Azatioprina 2 mg/kg/día (figura 9a).

Los BPI se encontraron más engrosados que los BPD, ya que presentan edema y fibrina, así como necrosis del músculo liso; además hay fibroblastos que se agrupan cercanos a la membrana basal y al cartílago.

La colágena no es más abundante que en los BPD, solamente que en los BPI se observa que es de neoformación.

En el 60% de los BPI existió un leve infiltrado inflamatorio de tipo crónico (constituido por células mononucleares) y agudo (por neutrófilos) que se distribuyen focalmente alrededor del cartílago y entre el músculo liso. En el 40% de los casos no se observó inflamación.

En el 40% de los BPI hubo fibrinas y necrosis de grado moderado (grado 2) en el tejido periférico a la anastomosis; en el otro 40% esta necrosis fue leve (grado 1) y en el 20% ausente (grado 0).

E. Grupo 5. Ciclosporina 5 mg/kg/día (figura 9b).

La cantidad de colágena pareció ser menor en los BPI que en sus respectivos controles, además de que en éstos se aprecia más laxa, inmadura y desorganizada que en los BPD, donde la colágena se aprecia más densa y homogénea en su distribución; las fibras guardan una misma dirección, por lo que tienen un aspecto más ordenado.

En el 33% de los BPI existieron numerosos fibroblastos y más colágena de lo normal, muy cerca de los puntos de sutura.

En el 33% de los BPI la inflamación fue de grado moderado (grado 2), siendo de tipo agudo en el resto, es decir constituida por polimorfonucleares entre los que destacan los eosinófilos, y cerca de la sutura se aprecian los linfocitos y macrófagos.

En el 50% de los BPI el infiltrado inflamatorio fue leve o escaso (grado 1)

agrupándose en pequeños focos de células mononucleares (linfocitos y macrófagos), y en el 16% no se observó inflamación.

En el 83% de los BPI se encontró necrosis leve (grado 1) involucrando submucosa y músculo liso, al igual que destrucción del cartílago, que sin embargo muestra regeneración. En el 16% la necrosis fue de grado moderado (grado 2).

F. Grupo 6. Combinado (azatioprina 2 mg/kg/día, ciclosporina 5 mg/kg/día y prednisona 2 mg/kg/día) (figura 10).

La cantidad de colágena en el 50% de los BPI fue prácticamente igual que en sus respectivos BPD, en el 33% ligeramente mayor y en el 16% es menor. La diferencia consiste básicamente en que en los BPD las fibras de colágena son largas, ordenadas y corren paralelas entre sí; en cambio en los BPI, la colágena va de laxa a densa pero no hay tanto orden en su arreglo, además que se observan más fibroblastos que en los BPD. La inflamación estuvo ausente (grado 0) en el 16% de los BPI, en el 50% fue muy leve (grado 1) de tipo linfoplasmocitario y con macrófagos, de distribución muy localizada circunscrita exclusivamente a la periferia de los sitios de sutura. En el 33% de los BPD la inflamación fue de grado moderado (grado 2), focal, y se observaron además polimorfonucleares y células gigantes de cuerpo extraño.

En el 33% de los BPI hubo necrosis de grado leve (grado 1) que se aprecia en la fibras musculares cercanas al sitio de la anastomosis. En el 66% no existió necrosis (grado 0).

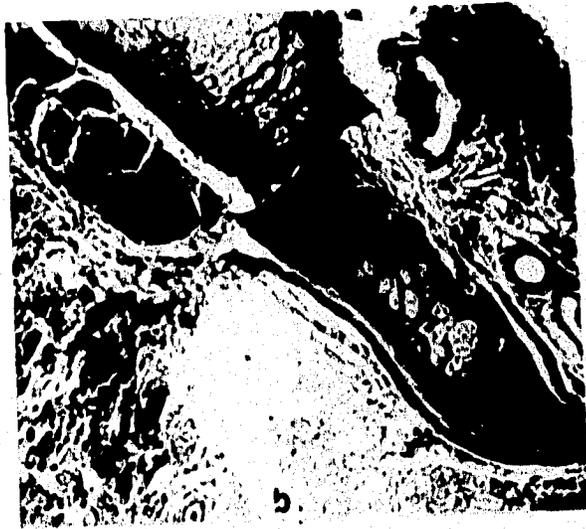
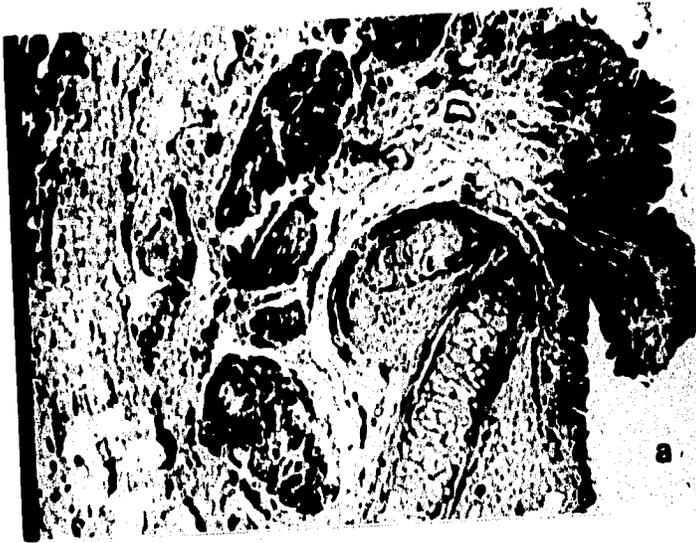


Figura 9. Bronquios anastomosados. a) Grupo 4: Azatioprina (2mg/kg/día). b) Grupo 5: Ciclosporina (5mg/kg/día). Aumento 12X.

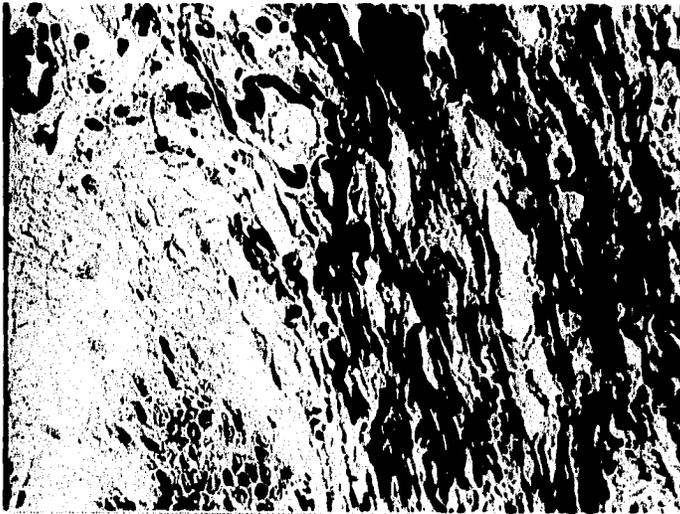


Figura 10. Bronquio anastomosado. Grupo 6: Tratamiento triple. Azatioprina (2mg/kg/día), Ciclosporina (5mg/kg/día) y Prednisona (2mg/kg/día). Aumento 40X.

G. Índice de colágena.

El índice de colágena evaluado histológicamente en los BPI del grupo control fue de 2.333 ± 0.577 , no encontrándose diferencias estadísticamente significativas al compararse con los BPI de los grupos experimentales (tabla 3). Tampoco se encontraron diferencias al comparar los BPD del grupo control, en el cual el índice

fue de 2.667 ± 1.528 , con respecto a los BPD de los grupos experimentales (tabla 4), ni se aprecian diferencias significativas intragrupo (tabla 5).

Tabla 3. Índice de colágena en los BPI

GRUPO	INDICE DE COLAGENA	P
GRUPO 1	2.330 ± 0.557	
GRUPO 2	2.143 ± 0.690	0.696
GRUPO 3	1.600 ± 0.548	0.121
GRUPO 4	1.400 ± 0.548	0.072
GRUPO 5	2.667 ± 0.577	0.456
GRUPO 6	2.167 ± 0.753	0.773

Tabla 4. Índice de colágena en los BPD

GRUPO	INDICE DE COLAGENA	P
GRUPO 1	2.667 ± 1.558	
GRUPO 2	2.571 ± 0.535	0.712
GRUPO 3	2.600 ± 0.894	1.000
GRUPO 4	2.000 ± 1.225	0.424
GRUPO 5	2.333 ± 1.155	0.637
GRUPO 6	3.167 ± 0.983	0.586

Valores expresados en Media \pm Desviación estandar.
Se toman como significativos los valores de p menores a 0.05.

**Tabla 5. Índice de colágena
BPD vs BPI de cada grupo**

GRUPO	P
GRUPO 1	0.653
GRUPO 2	0.225
GRUPO 3	0.059
GRUPO 4	0.811
GRUPO 5	0.796
GRUPO 6	0.092

Valores expresados en Media \pm Desviación estandar.
Se toman como significativos los valores de p menores a 0.05.

2. Colágena.

La concentración de colágena encontrado en los BPI del grupo control fue de 423.03 ± 104.60 mg/g de tejido seco, no encontrándose diferencias significativas con los BPI de los grupos experimentales (tabla 6).

Por otro lado, la concentración de colágena encontrado en los BPD del grupo control fue de 596.27 ± 247.59 mg/g de tejido seco no encontrándose tampoco diferencias significativas, al compararlo con los BPD de los grupos experimentales (tabla 7).

La concentración de colágena encontrada en los BPD de cada grupo, en comparación con la concentración de la misma en los BPI, no presenta diferencias significativas. Para el grupo 2 se encontró la mayor diferencia en la concentración de colágena entre ambos bronquios (657.20 ± 268.09 para el BPD y 339.64 ± 144.56 para el BPI), sin llegar a ser significativa. Es decir, no hubo diferencias intergrupo (tabla 8).

Tabla 6. Concentración de colágena en los BPI.

GRUPO	mg de colágena / g de tejido seco	p
GRUPO 1	423.03 ± 104.60	
GRUPO 2	339.64 ± 144.56	0.403
GRUPO 3	448.56 ± 71.26	0.719
GRUPO 4	344.43 ± 88.01	0.403
GRUPO 5	431.65 ± 38.10	0.676
GRUPO 6	444.99 ± 85.87	0.784

Tabla 7. Concentración de colágena en los BPD.

GRUPO	mg de colágena / g de tejido seco	p
GRUPO 1	596.27 ± 247.59	
GRUPO 2	657.20 ± 268.09	0.676
GRUPO 3	509.62 ± 66.26	0.676
GRUPO 4	440.61 ± 103.74	0.403
GRUPO 5	441.56 ± 81.61	0.411
GRUPO 6	449.81 ± 89.27	0.522

Valores expresados en Media ± Desviación estandar.
Se toman como significativos los valores de p menores a 0.05.

**Tabla 8. Concentración de colágena
BPD vs BPI de cada grupo**

GRUPO	P
GRUPO 1	0.296
GRUPO 2	0.060
GRUPO 3	0.177
GRUPO 4	0.210
GRUPO 5	0.522
GRUPO 6	0.688

Valores expresados en Media \pm Desviación estandar.
Se toman como significativos los valores de p menores a 0.05.

3. Fuerza Tensil de Ruptura.

En lo que respecta a la FTR se encontró lo siguiente:

La FTR de los BPI del grupo control fue de 1.69 ± 0.30 kg, sin que existieran diferencias significativas al compararla con la FTR de los BPI de los grupos en estudio (tabla 9).

La FTR encontrada en los BPD del grupo control fue de 4.16 ± 0.52 kg. Al compararla con la FTR de los grupos experimentales, se encontraron diferencias significativas con el grupo de Prednisona 4 mg/kg/día y el de tratamiento triple (3.95 ± 0.51 y 3.3 ± 0.75 kg respectivamente) (tabla 10).

Por otro lado, al comparar la FTR de los BPD de cada grupo con la de los BPI se encontraron diferencias significativas en el grupo de Prednisona a una dosis de 4 mg/kg/día y en el de ciclosporina (tabla 11).

Tabla 9. Fuerza tensil de ruptura de los BPI.

GRUPO	KILOGRAMOS	p
GRUPO 1	1.69 ± 0.30	
GRUPO 2	2.47 ± 0.94	0.172
GRUPO 3	1.20 ± 0.45	0.051
GRUPO 4	1.80 ± 0.57	0.472
GRUPO 5	2.37 ± 0.73	0.052
GRUPO 6	1.57 ± 1.35	0.516

Tabla 10. fuerza tensil de ruptura de los BPD.

GRUPO	KILOGRAMOS	p
GRUPO 1	4.16 ± 0.52	
GRUPO 2	4.12 ± 1.50	0.885
GRUPO 3	3.95 ± 0.51	0.026
GRUPO 4	4.32 ± 0.35	0.612
GRUPO 5	3.20 ± 1.03	0.053
GRUPO 6	3.30 ± 0.75	0.044

Valores expresados en Media ± Desviación estandar.
Se toman como significativos los valores de p menores a 0.05.

**Tabla 11. Fuerza tensil de ruptura
BPD vs BPI de cada grupo**

GRUPO	P
GRUPO 1	0.055
GRUPO 2	0.077
GRUPO 3	0.004
GRUPO 4	0.060
GRUPO 5	0.044
GRUPO 6	0.054

Valores expresados en Media \pm Desviación estandar.
Se toman como significativos los valores de p menores a 0.05.

VII. DISCUSION

Uno de los principales problemas del trasplante pulmonar, está relacionado con la cicatrización bronquial (7). En este sentido se han hecho estudios con el fin de evaluar si los inmunosupresores utilizados tienen algún efecto sobre el proceso cicatricial, encontrándose datos contradictorios, sobre todo al utilizar azatioprina y prednisona combinados o de manera independiente (2,3,41,46)

Histológicamente los resultados que se obtuvieron en el presente estudio no proporcionan evidencias de una cicatrización deficiente, ya que los índices de colágena que se calcularon, no presentan diferencias estadísticamente significativas al comparar los BPD (Bronquio control) con los BPI (Bronquio anastomosado) de cada grupo, es decir en el mismo animal. Tampoco se observan diferencias al comparar el BPD y el BPI del grupo control con los BPD y los BPI de los grupos experimentales.

Estos resultados histológicos correlacionan con las concentraciones de colágena observadas para cada grupo, donde no existen diferencias significativas al hacer la comparación entre el grupo control y los grupos experimentales ya sea, tanto en los bronquios anastomosados (BPI), como en los bronquios normales (BPD), así como dentro de cada grupo (BPD vs BPI), por lo que aparentemente no existen evidencias de que los fármacos aquí probados a las dosis empleadas tengan algún efecto sobre el recambio de colágena.

Estos resultados coinciden con los de otros autores quienes en los modelos experimentales de cicatrización que estudiaron, no encuentran alteraciones en la cantidad de colágena que se deposita al utilizar diferentes fármacos inmunosupresores (8,45,47).

Por otro lado, los efectos reportados de los inmunosupresores sobre la Fuerza Tensil de Ruptura (FTR) son contradictorios, ya que existen autores que no

encuentran ninguna alteración en la FTR al utilizar inmunosupresores como la prednisona, azatioprina y ciclosporina (8,45,48), mientras que Lima y cols. (34) al utilizar la combinación de metilprednisolona/azatioprina (2 y 1.5 mg/kg/día) o prednisona/ciclosporina (2 y 5 mg/kg/día), encuentran disminución en la FTR.

También Golberg y cols.(34,48) encuentran una disminución en la FTR al utilizar metil-prednisolona (2 mg/kg/día) y azatioprina (1.5 mg/kg/día) utilizados de manera combinada, y prednisona (4 mg/kg/día) y ciclosporina (5 mg/kg/día), utilizados de manera independiente.

En el presente estudio, al utilizar la prednisona y la ciclosporina (4 mg/kg/día y a 5 mg/kg/día respectivamente) de manera independiente, existe una disminución significativa en la FTR en los bronquios anastomosados (BPI) con respecto a los controles (tabla II).

Parece ser que la utilización de prednisona, con ciclosporina o azatioprina, tienen efecto sobre la cicatrización, aunque éste no se encuentre relacionado con una disminución en el depósito de colágena a pesar de que se han señalado efectos de estos fármacos sobre este proceso (36,43,46,48).

Cabe hacer énfasis en el efecto que tiene la prednisona a una dosis de 2 mg/kg/día y la azatioprina a una dosis de 1.5 mg/kg/día, sobre la disposición de las fibras de colágena, la cual se encuentra alterada al observarse por microscopía electrónica en bronquios anastomosados (48).

Al parecer, estos efectos sobre la disposición de las moléculas de colágena, puede ser independiente del proceso cicatricial, ya que al comparar la FTR de los BPD del grupo control con respecto a los BPD de los grupos problema, se encontraron diferencias significativas en el grupo de prednisona (4 mg/kg/día) y el grupo de tratamiento triple. Estos resultados tendrán sin embargo, que ser corroborados por microscopía electrónica.

En conclusión, parece ser que ninguno de los inmunosupresores utilizados en este estudio a las dosis administradas, tienen efectos sobre el recambio de colágena. Sin embargo, la FTR, que es un indicador de la resistencia de las anastomosis bronquiales, se encuentra disminuída sólo al utilizar prednisona (4 mg/kg/día) o ciclosporina (5 mg/kg/día), lo que puede ser indicativo de que existe otro tipo de alteración molecular relacionado probablemente con la organización de las fibras de colágena entre sí y con otros elementos de la matriz extracelular.

Estos fármacos podrían afectar la hidroxilación del aminoácido lisina, el cual al hidroxilarse sirve como sitio de unión para carbohidratos a los cuales se les ha propuesto como elementos importantes en el empaquetamiento de las moléculas de colágena en fibras, las cuales dan fuerza al tejido en el cual se forman (21). Otra posibilidad, es que de alguna manera estos inmunosupresores pudieran interferir con la formación de enlaces disulfuro intercatenarios, lo cual impediría la formación de la triple hélice (15).

VIII. CONCLUSIONES

a) De los inmunosupresores utilizados, solamente prednisona (4 mg/kg/día) y ciclosporina (5 mg/kg/día), afectan la cicatrización en las anastomosis bronquiales.

b) Esta alteración no parece deberse a una disminución en la cantidad de colágena que se deposita en las anastomosis bronquiales durante la cicatrización.

c) Probablemente la disposición de las fibras de colágena y/o su polimerización sea afectada por prednisona (4 mg/kg/día) y ciclosporina (5 mg/kg/día), ya que la fuerza tensil de ruptura es significativamente menor en el bronquio anastomosado que en el bronquio control.

IX. BIBLIOGRAFIA.

- 1.- KERN J.A. and FISHMAN A.P.(1988): End stage fibrotic lung disease: Treatment and prognosis. In: *Pulmonary Diseases and Disorders*. Fishman A.P. (ed). New York, McGraw Hill, pp. 2237-2250.
- 2.- COOPER J.(1989). Lung Transplantation. *Current Prob. Surg.* 23(2):681-747.
- 3.- PATTERSON A.G.(1993). Airway complications in lung transplantations. *Chest Surg. Clin. North America* 3(1):157-172.
- 4.- KIRKPATRICK C.H. and ROWLANS T.D. (1992). Transplantation Immunology. *JAMA* 268(20):2952-2958.
- 5.- RABIN B.S. (1987). Immunological aspects of tissue transplantation. In: *Anesthesia and Organ Transplantation*. Gelman S. (ed). W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 1-12.
- 6.- ZAHM J.M., CHEVILLARD M. and PUCHELLE E. (1991). Wound repair of human surface respiratory epithelium. *Amer. J. Resp. Cell. Mol. Biol.* 5:242-248.
- 7.- COOPER J.D., PATTERSON G.A., GROSSMAN R. and MAURER J. (1989). Double lung transplant for advanced chronic obstructive lung disease. *Amer. Rev. Resp. Dis.* 139:303-307.
- 8.- ARUMUGAN S. and NIMMANNIT S.D. (1971). The effect of Immunosuppression on Wound Healing. *Surg. Gynecol. Obstet.* 133:72-74.
- 9.- SHUMWAY S.J. (1993). Rejection and Immunosuppression in lung transplantation. *Chest Surg. Clin. of North America* 3(1):145-156.
- 10.- VAN-FURTH R.V., GASSMANN A.E. and DEN D.D. (1975). The effect of azathioprine (Imuran) on the cell cycle of promonocytes and the production of monocytes in the bone marrow. *J. Exp. Med.* 141:531-546.

- 11.- VEITH F.J., SINHA S.B.P., BLÜMCKE S., DOUGHERTY J.C. and HAGSTROM J.W.C. (1972). Nature and evolution of lung allograft rejection with and without immunosuppression. *J. Thorac. Cardiovas. Surg.* 63(4):509-519.
- 12.- FUJIMURA S., KONDO T., HANDA M., YAMAUCHI A., OKABE T. and NAKADA T. (1987). Histologic assessment of bronchial anastomotic healing in canine lung transplantation. *J. Thorac. Cardiovas. Surg.* 94(3):323-330.
- 13.- PEREZ T. (1990). Principios de Patología. Ed. Panamericana. México, D.F., pp. 139-164.
- 14.- GONDOS B., WHITE P. and BENFIELD R. (1971). Histologic changes associated with rejection of canine lung transplants. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 85(2):183-187.
- 15.- DAVIDSON J.M. (1992). Wound Repair. In: Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates. 2nd. Ed. Gallin J.I., Golstein I.M., and Snyderman R. (eds). Raven Press, Ltd., New York, pp. 809-819.
- 16.- FOLKMAN J. and BREM H. (1992). Angiogenesis. In: Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates. 2nd. Ed. Gallin J.I., Golstein I.M., and Snyderman R. (eds). Raven Press, Ltd. New York pp. 920-940.
- 17.- IANARO A., O'DONNELL M., DI ROSA M. and LIEW F.Y. (1994). A nitric oxide synthase inhibitor reduces inflammation, down-regulates inflammatory cytokines and enhances interleukin-10 production in carrageenin-induced oedema in mice. *Immunology* 82:370-375.
- 18.- HUDSON-GOODMAN N., GIRARD R.N. and BREWER J.M. (1990). Wound repair and the potential use of growth factors. *Heart and Lung*, 19(4):379-386.

- 19.- THIEMERMANN C. and CORDER R. (1992). Is endothelin-1 the regulator of myofibroblast contraction during wound healing ? *Lab. Invest.* 67(6): 677-679.
- 20.- WESTERGRENN T.G., HERNNÄS J., SÄRNSTRAND B. and MALMSTRÖM A. (1993). Altered expression of small proteoglycans, collagen, and transforming growth factor- β 1 in developing bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *J. Clin. Invest.* 92:632-637.
- 21.- PARDO A. (1993). La matriz extracelular y los diferentes tipos de colágena. *Rev. Inst. Nat. de Enfermedades Respiratorias* 6(3):154-164.
- 22.- BROWN J.C. and TIMPL R. (1995). The collagen superfamily. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 107:484-490.
- 23.- FLEISCHMAJER J.S. (1990). Type I and type III Collagen Interactions during Fibrillogenesis. *Ann. New York Acad. Sci.* 580:161-175.
- 24.- POSTLETHWAITE A.E. and KANG A.H. (1992). Fibroblast and Matrix Proteins. In: *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*. 2nd. Ed. Gallin J.I., Golstein I.M., and Snyderman R. (eds). Raven Press, Ltd. New York, pp. 747-773.
- 25.- STRYER L. (1975). *Bioquímica*. Ed. Reverté, Barcelona, España, pp. 833-834.
- 26.- WOESSNER Jr. (1991). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.* 5:2145-2154.
- 27.- MATRISIAN L.M. (1992). The matrix-degrading metalloproteinases. *BioEssays* 14(7):455-463.
- 28.- BIRKEDAL-HANSEN H. (1988). From tadpole collagenase to a family of matrix metalloproteinases. *J. Oral Pathol.* 17:445-451.

- 29.- MURPHY G. and DOCHERTY A. (1992). The matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Amer. J. Resp. Cell Mol. Biol.* 7:120-125.
- 30.- HADDEN J.W. and SMITH D.L. (1992). Immunopharmacology: Immunomodulation and Immunotherapy. *JAMA* 268(20):2964-2969.
- 31.- KRENSKY A.M., WEISS A., CRABTREE G., DAVIS M.M. and PARIHAM P.(1990). T-Lymphocyte-antigen interactions in transplantation rejection. *The New Engl. J. of Med.* 32(8):510-517.
- 32.- KAHAN B.D. (1989). Cyclosporine. *The New Engl. J. of Med.* 321(25):1725-1738.
- 33.- GOLDSTEIN R.A., BOWEN D.L. and FAUCI A.S. (1992). Adrenal Corticosteroids. In: *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*. 2nd. Ed. Gallin J.I., Golstein I.M., and Snyderman R. (eds). Raven Press, Ltd. New York, pp.1061-1081.
- 34.- LIMA O., GOLBERG M., PETERS W.J., AYABE H., TOWNSEND E. and COOPER J.D. (1982). Bronchial omentopexy in canine lung transplantation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 83:418-421.
- 35.- NOVICK R.J., MENKIS A.H. and AHMAD D. (1991). The Safety of Low-Dose Prednisone Before and Immediately After Heart-Lung Transplantation. *Ann. Thorac. Surg.* 51:642-645.
- 36.- PINSKER K.L., VEITH F.J. and HANSTROM J.W.C.(1984). Influence of bronchial circulation and corticosteroid therapy on bronchial anastomotic healing. *J. Thorac. Cardiovas. Surg.* 87:439-444.
- 37.- BOREL J.F. and KIS Z.L.(1991). The Discovery and Development of Cyclosporine (Sandimmune). *Transplan. Proc.* 23(2):1867-1874.

- 38.- DOS REIS G.A. and SHEVACH E.M. (1982). Effect of Cyclosporin A on T-cell function in vitro: The mechanism of suppression of T cell proliferation depends on the nature of the T cell stimulus as well as the differentiation state of the responding T cell. *J. Immunol.* 129(6):2360-2367.
- 39.- KOVACS E.J. (1991). Fibrogenic cytokines: The role of immune mediators in the development of scar tissue. *Immunology Today* 12(1):17-23.
- 40.- KOVACS E.J., BROCK B., SILVER I.E. and NEUMAN J.E. (1993). Production of Fibrogenic Cytokines by Interleukin-2- treated peripheral blood leukocytes: Expression of Transforming Growth Factor β and Platelet-Derived Growth Factor B Chain Genes. *Obstet. Gynecol.* 82(1):29-36.
- 41.- NEILSON E.G., JIMENEZ S.A. and PHILLIPS M. (1980). Cell-mediated immunity in interstitial nephritis. *J. Immunol.* 125(4):1708-1714.
- 42.- LIU J. (1993). FK506 and cyclosporin, molecular probes for studying intracellular signal transduction. *Immunology Today* 14(6):290-295.
- 43.- ABBAS A.K. (1994). Cellular and Molecular Immunology. W.B. Saunders and Company, Philadelphia, pp. 348-349.
- 44.- KAMHOLZ S.L., VEITH F.J., PINSKER K.L., KALEYA R.R. and MONTEFUSCO C.M. (1983). Single Lung Transplantation with cyclosporin immunosuppression. *J. Thorac. Cardiovas. Surg.* 86:537-542.
- 45.- OKUBO T. (1993). Influences of cyclosporine A on wound healing. *Hokkaido J. Medical Sci.* 68(5): 665-682.
- 46.- SAUNDERS N.R., EGAN T.M., CHAMBERLAIN D. and COOPER J.D. (1993). Cyclosporine and bronchial healing in canine lung transplantation. *J. Thorac. Cardiovas. Surg.* 88:993-999.

- 47.- FILIPEC M., PHAN T.M., ZHAO T.Z., RICE B.A. and FOSTER C.S. (1992). Topical cyclosporine A and corneal wound healing. *Cornea* 11(6): 546-552.
- 48.- GOLBERG M., LIMA O. and COOPER, J.D. (1983). A comparison between cyclosporin A and methylprednisolone plus azathioprine on bronchial healing following canine lung autotransplantation. *J. Thorac. Cardiovas. Surg.* 85:821-826.
- 49.- ROSMAN M. and BERTINO J.R. (1973). Azathioprine. *Ann. of Internal Med.* 79:694-700.
- 50.- GOURLEY M.F. (1992). Immunoregulatory Agents. In: *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*, 2nd Ed. Gallin J.I., Golstein I.M., and Snyderman R.(eds). Raven Press, Ltd. New York, pp. 747-773
- 51.- ROITT I., BROSTOFF J. and MALE D. (1993). *Immunology*. 3rd. Ed. Ed. Mosby, London, England pp. 23.1-23.14.
- 52.- HARDY J.D. and ALICAN F. (1986). Lung transplantation. *Adv. Surg.* 21:111-113.
- 53.- METRAS H. (1950). Note preliminaire sur la greffe totale du poumon chez le chien. *C.R. Acad. Sci.(Paris)* 231:1176-1178.
- 54.- NEPTUNE W.B., WELLER R. and BAILEY C.P. (1953). Experimental lung transplantation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 26:275-289.
- 55.- HARDY J.D., ERASLAN S. and DALTON L.M. (1963). Autotransplantation and homotransplantation of the lung. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 46:606-615.
- 56.- SANTILLAN D.P. (1990). Transplante unilateral de pulmón en un caso de fibrosis pulmonar terminal. *Rev. Invest. Clin.* 42(2):127-133.

- 57.- LIMA O., COOPER J.D. and GOLBERG M. (1981). Effects of methylprednisolone and azathioprine on bronchial healing following lung autotransplantation. *J. Thorac. Cardiovas. Surg.* 82:211-215.
- 58.- AUTERI J.S., JEEVANANDAM V., SANCHEZ J.A., MARBOE C.C. and SMITH C.R. (1992). Normal Bronchial Healing Without Bronchial Wrapping in Canine Lung Transplantation. *Ann. Thorac. Surg.* 53:80-84.
- 59.- National Institutes of Health (NIH). (1985). Guide for Use of Laboratory Animals. NIH Pub. No.86-23, Washington D.C., U.S. Department of Health and Human Services, pp. 20-25
- 60.- ALICAN C., CAYIRLI M., ISIN E. and HARDY J.D. (1971). Surgical technique of one stage bilateral lung reimplantation in the dog. *J. Thorac. Cardiovas. Surg.* 61:847-856.
- 61.- ESTRADA E.F. (1982). Manual de técnicas histológicas. Ed. AGT S.A., Madrid, España. pp. 45-50.
- 62.- ROJKIND M. and GONZALEZ E. (1974). An improved Method for Determining Specific Radioactivities of Proline-¹⁴C and Hydroxyproline-¹⁴C on Collagen and in Noncollagenous Proteins. *Anal. Biochem.* 57:1-7.
- 63.- DAWSON S.B. and TRAPP R.G. (1993). Bioestadística Médica. Ed. El Manual Moderno, México D.F., pp. 115-141.
- 64.- WOESSNER J.F. (1961). The determination of Hydroxyproline in Tissue and Protein Samples Containing Small Proportions of this Imino Acid. *Arch. Biochem. Biophys.* 93:440-447.

X. ANEXOS.

Anexo 1.

1. Preparación de tejido para análisis histológico (61).

- 1.- Fijar en formol al 10% por 24 hrs. como mínimo.
- 2.- Lavar en agua corriente de 15 a 30 minutos.
- 3.- Deshidratar con alcoholes de concentración ascendente de 30, 50, 70, 80, 96 grados y absoluto, de 30 min. a una hora.
- 4.- Aclarar en xilol de 30 min. a una hora.
- 5.- Trasparentar en aceite de cedro, de 12 a 24 horas.
- 6.- Colocar en xilol durante 15 minutos.
- 7.- Incluir en parafina: Se sumerge la pieza en parafina fundida (54°-56°).
Posteriormente, en cajas metálicas, se coloca parafina fundida, se deja formar una capa superficial sólida, la cual se licúa pasando una aguja de disección caliente; en ese momento se introduce el fragmento y se orienta de acuerdo a la forma en que se va a cortar. Finalmente, se deja solidificar en un recipiente con agua fría.
- 8.- Ya solidificada la parafina, se hacen los cortes de 5µm.
- 9.- Los cortes se colocan en un baño de flotación a 37°C con gelatina previamente disuelta, para que se extiendan y se adhieran al portaobjetos, con el cual se recogen, de modo que queden centrados.
- 10.- Posteriormente se dejan secar a temperatura ambiente por 24 hrs.
- 11.- Los cortes se colocan en tres cambios sucesivos de xilol, de 5 a 10 minutos cada uno.
- 12.- Luego se colocan en alcoholes de 100°, 96°, 80°, 70° y 50°, por 5 minutos en cada uno.
- 13.- Colocar en agua destilada. En este punto los cortes están listos para ser teñidos.

2. Técnica tricromica de Masson.

- 1.- Hidratar los cortes con agua destilada.
- 2.- Fijar en solución de Bouin durante 1hr. a 56°C.
- 3.- Lavar en agua corriente hasta que el color desaparezca.
- 4.- Enjuagar en agua destilada.
- 5.- Sumergir por 10 min. en solución de hematoxilina de Weigert y lavar al chorro de agua.
- 6.- Enjuagar con agua destilada.
- 7.- Sumergir en solución de Biebreich durante 15 min.
- 8.- Enjuagar con agua destilada.
- 9.- Sumergir en una solución de ácido fosfomolibdénico-fosfotungsténico por 10 a 15 min.
- 10.-Transferir los cortes a una solución de azul de anilina por 10 a 20 min.
- 11.-Enjuagar en agua destilada.
- 12.-Sumergir en una solución de ácido acético al 1% durante 3 a 5 minutos.
- 13.-Deshidratar con xilol.

A. Reactivos.

Solución de Bouin.

- | | |
|-------------------------------------|---------|
| -Acido pícrico saturado (21 g/lit.) | 1500ml. |
| -Formalina. | 500ml. |
| -Acido acético glacial. | 1000ml. |

Solución de hematoxilina de Weigert.

Solución A

- | | |
|----------------|--------|
| -Hematoxilina. | 1gr. |
| -Etanol al 95% | 100ml. |

Solución B

-Cloruro Férrico al 29%	4ml.
-Agua destilada.	95ml.
-Acido clorhidrico.	1ml.

Mezclar partes iguales de la solución A y B.

Azul de Anilina.

-Azul de anilina.	2.5gr.
-Acido acético glacial.	2.0ml.
-Agua destilada.	100ml.

Acido Fosfomolibdénico-Fosfotungsténico.

-Acido fosfomolibdénico.	5gr.
-Acido fosfotungsténico.	5gr.
-Agua destilada.	200ml.

Acido acético.

-Acido acético.	1ml.
-Agua destilada	100ml.

Solución de Biebrich.

-Stock de Biebrich al 1%.	90ml.
-Fucsina ácida al 1%.	10ml.
-Acido acético glacial.	1ml.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Anexo 2.**1. Determinación del contenido de colágena por el método de Woessner (62,64).**

Se tomaron las muestras de la parte membranosa a nivel de la anastomosis bronquial. Las muestras fueron colocadas en frascos y se calentaron en una estufa, a una temperatura de 90°C, para eliminar el agua. Las muestras se pesaron diariamente hasta obtener tres mediciones con el mismo peso. Posteriormente se procedió a determinar el contenido de colágena por el método de Woessner, que consiste en los siguientes pasos:

- 1.- El tejido ya seco, fue hidrolizado con 1.5ml de HCl 6N en ampollitas cerradas al vacío. El tiempo de hidrólisis fue de 36 hrs.
- 2.- Posteriormente, las muestras se sacaron de la ampollita y se filtraron; el filtrado obtenido se colocó en una evaporadora con el fin de eliminar el exceso de HCl.
- 3.- Enseguida la muestra se llevó a un pH de 7.0, y se diluyó hasta un volumen de 10 ml con agua destilada. De estos 10 ml se tomó una muestra de 100 µl para la determinación de hidroxiprolina.
- 4.- Para la determinación se preparó una curva patrón tomando 100 µl de una solución estándar que contiene 1mg de hidroxiprolina por 1ml de agua, y se llevó a un volumen de 10ml.

La preparación de la curva patrón se realizó como se observa en la siguiente tabla:

No. de tubo	B	1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12
Sol. patrón	---	0.2*	0.4	0.6	0.8	1.0	---
Agua dest.	2.0	1.8	1.6	1.4	1.2	1.0	1.9
Muestra	---	---	---	---	---	---	0.1

* mililitros .

- 5.- Posteriormente a cada tubo se le agregó 1ml de una solución de cloramina T 0.05 M, y se dejó 20 minutos a temperatura ambiente (1.41 g de cloramina T disueltos en 20 ml de agua, 30 ml de metilcelosolve y 50 ml de amortiguador de citratos pH 6.0.).
 - 6.- Enseguida se agregó, a cada tubo, un mililitro de ácido perclórico 3.0N.
 - 7.- Después se agregó 1 ml de una solución de para-dimetil aminobenzaldehído al 20% en metilcelosolve.
 - 8.- Las muestras se dejaron incubar durante 20 minutos a 60°C.
 - 9.- Transcurrido este tiempo, se leyó la absorbancia de cada muestra en un espectrofotómetro (DU-6, marca Beckman) a una longitud de onda de 560 nm.
- Los resultados obtenidos, se multiplicaron por el factor 7.42 y se expresaron en miligramos de colágena por gramo de tejido seco.