
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
Centro Universitario de Ciencias Biológico - Agropecuarias

DIVISIÓN DE CIENCIAS VETERINARIAS



*"ACTIVIDAD FAGOCÍTICA DE LOS MACRÓFAGOS ALVEOLARES
OBTENIDOS DE PULMONES VENTILADOS Y NO VENTILADOS
DE RATAS SPRAGUEDAWLEY, A DIFERENTES
TIEMPOS POST MORTEM"*

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA**

PRESENTA

P.M.V.Z. MÓNICA CERDA PAREDES

DIRECTOR DE TESIS: M.V.Z. DAVID GARCÍA MARTÍNEZ

ASESOR DE TESIS: M. EN C. ANA MARÍA PUEBLA PÉREZ

LAS AGUJAS, NEXTIPAC, MPIO. ZAPOPAN, JAL. MAYO DE 1998.

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS

DIVISIÓN DE CIENCIAS VETERINARIAS

**ACTIVIDAD FAGOCÍTICA DE LOS MACRÓFAGOS ALVEOLARES OBTENIDOS
DE PULMONES VENTILADOS Y NO VENTILADOS DE RATAS SPRAGUE-
DAWLEY, A DIFERENTES TIEMPOS *POST MORTEM*.**

TESIS que para obtener el Título de Médico Veterinario Zootecnista presenta la

P.M.V.Z: Mónica Cerda Paredes

Director de TESIS: M.V.Z. David Zeferino García Martínez.

Asesor de TESIS: M. en C. Ana María Puebla Pérez.

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jalisco, mayo de 1998.

GRACIAS.

A todas las ratitas porque con su vida se hizo posible la realización de esta investigación. Y lograr dar un paso más en mi vida.

GRACIAS

DIOS. Porque en mis grandes decisiones me has iluminado mostrandome el camino que debo seguir.

PAPA Y MAMA.

Porque con su gran amor, paciencia, dedicación y apoyo me han dado confianza y la fuerza para no claudicar.

LOS AMO.

CHES.

Porque con tu insistencia a cada instante lograste darme fuerza para seguir adelante.

Te Quiero Mucho.

M.V.Z. DAVID Z. GARCIA MARTINEZ.

Por ser un excelente tutor y tener el don más valioso " paciencia"

Con respeto y admiración

ADRIANA SANCHEZ.

Porque en las buenas y en las malas nos mantuvimos juntas, mi compañera y amiga.

Te quiero mucho.

M. EN C. ELISEO PORTILLA DE BUEN.

Por darme una oportunidad, por sus sabios consejos y por su valioso tiempo que nunca me nego .

Con admiración y Respeto.

M. EN C. ANA MARIA PUEBLA PEREZ.

Por su apoyo tecnico.

A todas aquellas personas que de alguna manera estuvieron conmigo, confiando en mi y dandome su cariño, apoyo y me animaron a seguir adelante

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	i
INTRODUCCIÓN.....	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	7
JUSTIFICACIÓN.....	8
HIPÓTESIS.....	9
OBJETIVOS.....	10
MATERIAL Y MÉTODOS.....	11
RESULTADOS.....	17
DISCUSIÓN.....	30
CONCLUSIONES.....	35
BIBLIOGRAFÍA.....	40

RESUMEN

Se ha visto que el tiempo de viabilidad del parénquima pulmonar se prolonga cuando se mantiene a cadáveres de rata bajo ventilación mecánica con O₂ al 100%. La actividad fagocítica *in vitro* de los macrófagos alveolares (MA) de pulmones cadavéricos, podría ser un indicador funcional del órgano. Los objetivos de este trabajo fueron: valorar la actividad fagocítica *in vitro* de los MA obtenidos de cadáveres de ratas a diferentes tiempos *post mortem*; el efecto de la ventilación con O₂ al 100% sobre dicha actividad; y determinar si existe correlación entre la actividad de los MA y la viabilidad del parénquima. Se utilizaron tres grupos de ratas Sprague-Dawley: Ventilado (V) con O₂ al 100%; No Ventilado (NV), y Control (C) de cero horas. Los grupos NV y V fueron estudiados a las 1, 2, 4, 8, y 12 horas *post mortem*. En el pulmón derecho se obtuvieron MA mediante lavado bronquiolo-alveolar, para medir su actividad fagocítica. En el pulmón izquierdo se determinó el porcentaje de viabilidad del parénquima. El porcentaje de fagocitosis en el grupo C fue de 21.4%; en el grupo NV, de 24.6%, 14.0%, y 5.6% a las 1, 2, y 4 horas, con ausencia de actividad posteriormente; en el grupo V, de 14.4%, 10.6%, 10.6%, 17.2%, y 19.6%, a las 1, 2, 4, 8, y 12 horas respectivamente. El porcentaje de viabilidad del parénquima en el grupo C fue de 90.95%, mientras que en los grupos NV y V, el comportamiento a través del tiempo fue similar (disminución progresiva hasta 70% a las 12 horas). Se concluye que la ventilación con O₂ al 100% estimula la actividad de los MA, mientras que no afecta significativamente la viabilidad del parénquima; no se encontró correlación entre ambos parámetros.

INTRODUCCIÓN

Los pulmones son órganos que cumplen varias funciones en el organismo: son esenciales en la ventilación, que consiste en el transporte de O_2 a la sangre y por medio de ésta a los tejidos; participan en funciones como el metabolismo de sustancias biológicamente activas, sintetizan y utilizan agente tensoactivo; almacenan y vierten a la sangre prostaglandinas, histamina y caliceína, y convierten angiotensina tipo I a tipo II; participan en el control de la temperatura corporal, etc. (11,19,27,33,34)

Durante su función ventilatoria, los pulmones entran en contacto con el aire ambiental en el que se encuentran suspendidos *infinidad* de microorganismos y partículas inertes. Aunque el aparato respiratorio cuenta con varias barreras que filtran este aire como son las vibrisas de las fosas nasales, cilios cubiertos por moco, etc., las partículas menores de $2\mu m$ logran llegar hasta los alvéolos, donde se hallan células encargadas de neutralizarlas como son los neutrófilos y los macrófagos (más abundantes). (8,12,17,19,22) Estos últimos, llamados "células contra el polvo", se encuentran en el intersticio de los tabiques interalveolares, libres en los espacios alveolares, y pasando a través de la pared alveolar hacia los espacios alveolares; actúan como componentes importantes de los mecanismos de defensa y forman parte del sistema reticuloendotelial. Proviene originalmente de la médula ósea donde son llamadas promonocitos, migran a la corriente sanguínea como monocitos todavía inmaduros y posteriormente ya maduros, pasan a los órganos recibiendo diferentes nombres dependiendo donde se encuentren. (11,17,22,35,)

En piel y tejidos son llamados histiocitos o células de Langerhans; en hígado, células de Kupffer; en bazo, macrófagos de la pulpa roja; en hueso osteoclastos; en encéfalo, microglia; y en pulmón, macrófagos alveolares. (16,17,22,33)

Los macrófagos alveolares, por lo general, son células de forma irregular con prolongaciones que suelen ser cortas y romas, en ocasiones pueden presentar prolongaciones largas, delgadas, y ramificaciones. Cuando son estimulados, son capaces de realizar movimientos ameboides y en esta fase presentan un contorno muy irregular con pseudópodos que se extienden en diferentes direcciones, teniendo la particularidad de adherirse al vidrio. (11,12,22,31,35)

Son células extremadamente activas, intervienen en la inflamación y la fiebre, participan en la destrucción bacteriana y tumoral y en la cicatrización tisular. También contribuyen en las reacciones inmunológicas del organismo, ingieren y procesan antígenos y transmiten la información específica a las células vecinas inmunológicamente competentes (linfocitos y células plasmáticas), poseen receptores que se unen con los anticuerpos y luego, son capaces de buscar y destruir los antígenos contra los cuales son específicos, además, secretan un gran número de sustancias como citocinas: Interleucina-1 alfa y beta, Factor de Crecimiento de Fibroblastos, Interferón alfa y gamma, lisozima beta glucuronidasa; enzimas: Factor Activador de Plaquetas, Enzima Convertidora de Angiotensina, elastasa, serina, metaloenzima, colagenasa, cisteína proteinasa; lípidos biológicamente activos: leucotrienos B, C, y D₄, tromboxano A₂, prostaglandinas E₂, D₂, 6-ceto-PGF-1 alfa y F₂ alfa; proteínas: antiproteasas como el Inhibidor proteinasa-alfa₁, y alfa₂ macroglobulina. (1,11,14,27,33,35)

El término macrófago se originó de la observación de que estas células engloban material extraño, proceso denominado fagocitosis, la cual consta de:

1. Quimiotaxis: Las células emigran hacia la partícula atraída por factores quimiotácticos.
2. Adherencia: Las células se adhieren a la partícula opsonizada.
3. Ingestión: La célula ingiere la partícula englobándola dentro del citoplasma.
4. Digestión: La partícula es digerida por las enzimas lisosómicas en el interior de un fagolisosoma. (22,27,35)

La fagocitosis elimina también desechos celulares en los tejidos lesionados o enfermos, los macrófagos tienen la capacidad de fusionarse entre ellos para formar finalmente células gigantes y fagocitar partículas muy grandes. Los macrófagos alveolares son los únicos que pueden sobrevivir en condiciones aeróbicas y su medio parece influenciar el comportamiento de estos fagocitos.(9,19,22)

Existen pruebas de laboratorio por medio de las cuales es posible medir la actividad fagocítica y sobrevivencia de los macrófagos alveolares como son: tinción con naranja de acridina (con fagocitosis de *E. coli*); sobrevivencia de bacterias; y prueba de adhesión al vidrio (con fagocitosis de levaduras de *C. albicans* opsonizadas). (6,10,13,14,21,24,28)

Lavado bronquiolo-alveolar (LBA):

Una forma que se emplea en la clínica para determinar algunas disfunciones pulmonares, es el lavado bronquiolo-alveolar, (LBA) el cual consiste en infundir algún tipo de solución fisiológica directamente en un bronquio y extraerla con el contenido

celular del lóbulo o segmento pulmonar en cuestión.(21,29,31) La cuenta celular total, la viabilidad celular, la cuenta celular diferencial, la morfología celular, contenido de algunas sustancias, y la presencia de microorganismos, son algunas de las variables que pueden ser objeto de estudio en el LBA. (3,17,23,31,36)

De las células obtenidas en el LBA de animales normales, los macrófagos alveolares (MA) son el tipo celular más abundante con alrededor de 90%. Las otras células encontradas en el LBA son neutrófilos, linfocitos, eosinófilos, basófilos y células cebadas cuyos porcentajes varían ligeramente según la especie de que se trate. (3,18,30,33,36)

Viabilidad:

En los exámenes citológicos, como sucede con el LBA, la morfología o el funcionamiento de ciertas células pueden reflejar la viabilidad de un órgano. (2,3,8,9,32) La viabilidad se puede definir como la capacidad de un sistema vivo para mantenerse por sí mismo, reflejada por la interacción adecuada con su medio ambiente. (2,4,5,15,30) Una prueba completa de viabilidad de un órgano debe reflejar la viabilidad celular, la integridad vascular y la potencialidad de una función normal *in vivo*, aunque valorar en la práctica estas condiciones no es siempre posible. (5,15)

En la clínica los pulmones que pueden ser utilizados para trasplante, generalmente son preservados en hipotermia a 4°C, previamente perfundidos a través de la arteria pulmonar con soluciones preservadoras que contienen distintos metabolitos. (3,5,15,26,30) Según las condiciones en las que se preserve, el tejido

pulmonar puede tener una viabilidad de 4 a 6 horas. (5) El método generalmente empleado para determinar viabilidad del pulmón consiste en la evaluación de la función del órgano (el cual ha sido sometido a los diversos métodos de preservación) posteriormente al transplante experimental. (4,14)

No existe un método lo suficientemente preciso y práctico para determinar la viabilidad pulmonar; quizá el que refleje mayor precisión es el que consiste en el conteo de células parenquimatosas por tinción de exclusión de azul de tripano, en el que se somete al tejido pulmonar a una perfusión con dicho colorante y un fijador (formol amortiguado), donde se puede observar microscópicamente que los núcleos de las células muertas se tiñen de color azul, mientras que las células vivas no se modifican. (2,5,7,9)

En estudios en ratas, se observó que los pulmones mantenidos *in situ* y bajo ventilación con oxígeno al 100% hasta 12 horas después de la muerte, logran conservar cerca del 74% de células parenquimatosas viables, determinado por el método previamente mencionado, lo cual habla de una viabilidad alta después de la muerte. En el mismo estudio, se pudo determinar que las células parenquimatosas pulmonares, a diferencia de lo que ocurre en otros tejidos, tienen la capacidad de ser viables algún tiempo después de que el sujeto muere y esto se atribuye a que el oxígeno que consume no requiere ser de origen sanguíneo y puede ser tomado directamente del alvéolo. (5) Esto hace suponer que las células que permanecen en la luz alveolar, como lo son los macrófagos, podrían asimismo conservar su integridad funcional en la misma medida que las células parenquimatosas, e incluso, el hecho de ventilar los pulmones cadavéricos podría preservar dichas células por

más tiempo que en los pulmones que no son ventilados.

El observar la actividad fagocítica *in vitro* de los macrófagos alveolares obtenidos por LBA en ratas a diferentes tiempos *post mortem*, podría conducir a establecer alguna correlación con el estado de viabilidad de las células parenquimatosas.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha visto que el tiempo de viabilidad pulmonar se ve prolongado si al cadáver se le mantiene con ventilación mecánica con oxígeno al 100%.

Es probable que las células presentes en la luz alveolar mantengan el mismo grado de viabilidad que las células parenquimatosas, y esto podría suceder del mismo modo después de la muerte del sujeto. El estudio de la capacidad fagocítica *in vitro* de los macrófagos alveolares, obtenidos de pulmones cadavéricos a diferentes tiempos, podría ser un indicador de su capacidad funcional, y que pudiera corresponder de manera directa con la viabilidad del pulmón. Asimismo, la ventilación de los cadáveres con O₂ al 100% podría prolongar la capacidad fagocítica de los macrófagos alveolares.

JUSTIFICACIÓN

El conocimiento de la viabilidad de los órganos cobra interés sobre todo en lo que se refiere al manejo de los órganos para trasplante. Es necesario mantener los tejidos en estado funcional durante el mayor tiempo posible y para esto se han ideado diversos métodos de preservación.

Aunque dichos métodos son cada vez más eficientes, existe un problema mayor que se refiere a la poca disponibilidad de donadores para trasplante. Dentro de las alternativas propuestas, el uso de órganos obtenidos del cadáveres sin manejo clínico de donador ha cobrado interés recientemente.

Experimentalmente se ha demostrado que el pulmón es uno de los órganos que puede ser obtenido de cadáveres sin manejo clínico y que puede ser trasplantado exitosamente.

La duda principal en los órganos que pueden ser utilizados para trasplante, es su capacidad funcional para garantizar su eficiencia una vez que es trasplantado. La medición de viabilidad con algunos métodos (como la tinción de exclusión con azul de tripano) ha permitido establecer algunos parámetros para calcular el tiempo en el que un órgano puede ser todavía apto para trasplante. Medir la capacidad fagocítica de los macrófagos alveolares obtenidos de cadáveres a diferentes tiempos *post mortem*, podría indicar de manera indirecta el estado de viabilidad del parénquima pulmonar.

HIPÓTESIS

1. La actividad fagocítica *in vitro* de los macrófagos alveolares obtenidos de cadáveres de ratas Sprague-Dawley, disminuye en forma directa al tiempo *post mortem*, pero en menor grado en los cadáveres ventilados con oxígeno al 100%.

2. La ventilación con oxígeno al 100% en cadáveres de ratas Sprague-Dawley retarda la muerte celular del parénquima pulmonar, en relación a los pulmones de los cadáveres no ventilados.

3. Existe correlación positiva entre la actividad fagocítica de los macrófagos alveolares *in vitro*, y la viabilidad del parénquima pulmonar, en pulmones de cadáveres de ratas Sprague-Dawley ventilados con oxígeno al 100%, y no ventilados.

OBJETIVOS

1. Valorar la actividad fagocítica *in vitro* de los macrófagos alveolares obtenidos de cadáveres de ratas Sprague-Dawley a diferentes tiempos *post mortem*, y determinar si la ventilación con oxígeno al 100% prolonga el tiempo de dicha actividad.
2. Determinar la viabilidad del parénquima pulmonar de cadáveres de ratas Sprague-Dawley, ventilados con oxígeno al 100%, y no ventilados, a diferentes tiempo *post mortem*.
3. Establecer si existe correlación entre los parámetros de la actividad fagocítica *in vitro* de los macrófagos alveolares y la viabilidad del parénquima pulmonar, en pulmones de cadáveres de ratas Sprague-Dawley.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 55 ratas Sprague-Dawley, machos sanos adultos de 250-350g de peso, mantenidos en condiciones de bioterio y de acuerdo a las normas internacionales de manejo de los animales para experimentación. Se formaron 3 grupos:

Grupo V (Ventilado), n=25, animales que fueron tranquilizados con droperidol (1.5 mg/kg IM), anestesiados con ketamina (20 mg/kg) y tiopental sódico (30 mg/kg IP), y anticoagulados con heparina (400 UI DT IV). Se realizó costotomía bilateral para obtener sangre por punción directa del corazón (aprox. 5mL) y utilizar el suero en la prueba de capacidad fagocítica de los macrófagos alveolares. Posteriormente se sacrificaron los animales con una dosis letal de 1mL de cloruro de potasio de 7.5% (2mEq) por vía intracardíaca. Se intubaron orotraquealmente con un catéter calibre 16 para mantenerse ventilados por medio de un ventilador ciclo-volumen para roedores (Harvard Apparatus Limited), con volumen corriente de 10 mL/kg, FiO₂ de 100% y frecuencia ventilatoria de 36/min. Se mantuvieron ventilados ambos pulmones durante 1, 2, 4, 8, y 12 horas (5 animales por periodo). Al término del periodo correspondiente se perfundió el pulmón izquierdo vía arteria pulmonar con solución de azul de tripano y formol al 10% amortiguado en solución de fosfatos (PBS) para el conteo de células vivas y muertas en cortes histológicos. En el pulmón derecho se hizo LBA para medir viabilidad celular, cuenta total y obtención de macrófagos pulmonares para actividad fagocítica *in vitro* con Candida albicans.

Grupo NV (No ventilado), n=25, animales con el mismo manejo del grupo 1, pero sin ser sometidos a ventilación mecánica. Se hicieron las mismas mediciones que en los animales del grupo ventilado, a las 1,2,4,8, y 12 h.

Grupo C (Control) n=5, animales con el mismo manejo que los grupos anteriores, pero en los cuales se realizó el lavado bronquiolo-alveolar y la obtención de los pulmones inmediatamente después de la muerte (hora cero).

Metodología para el LBA:

Se colocó una pinza microvascular en el bronquio izquierdo para evitar que el líquido de lavado penetrara en el pulmón. Se colocó una cánula calibre 14 en la tráquea para introducir a través del bronquio derecho 8mL de solución Hanks (33) en condiciones estériles, dividido en 4 alícuotas de 2mL cada una. Inmediatamente se succionó el líquido por la misma vía mediante una jeringa de 10mL (21); las muestras recuperadas fueron filtradas con un embudo con cuatro capas de gasa quirúrgica para quitar el moco. La alícuota fue medida y colocada en un tubo de ensaye de plástico. Dicha muestra fue centrifugada (centrífuga de gabinete modelo Optima II, marca BHG) durante 5 min, a 1500 rpm, posteriormente fue decantada con una pipeta Pasteur dejando aproximadamente 1mL de la misma suspensión, el botón celular obtenido fue agitado para dispersar las células. Se tomaron 50 μ L de la muestra que se colocaron en un tubo de microcentrífuga, a éste se le añadieron 50 μ L de solución de azul de tripano. Posteriormente se tomaron 10 μ L de esta mezcla y se colocaron en una cámara de Neubauer para realizar el conteo total de células y evaluar al mismo tiempo su porcentaje de viabilidad basándose en la

proporción de células vivas/muertas. (3,6,7,14,21,36)

Perfusión pulmonar con azul de tripano:

Se desprendió el bloque de pulmones y corazón de sus inserciones ligamentosas, y se colocó en una caja de Petri con solución salina al 0.9% para evitar su deshidratación, se pinzó el hilio pulmonar derecho con una pinza microvascular, y se retiró la pinza del bronquio principal izquierdo. Se colocó un catéter calibre 18 en la arteria pulmonar y se seccionó la orejuela cardíaca izquierda. A través del catéter colocado en la arteria pulmonar se perfundieron 150mL de solución de azul de tripano a una altura de 25cm, y posteriormente 100mL de solución de formol al 10% amortiguado en PBS como fijador. Se tomó una muestra de tejido pulmonar de 3mm de espesor, en corte transversal. Se procesó el tejido con la técnica convencional de inclusión en parafina, se realizaron cortes histológicos de 5 μ m para teñirlos con eosina y se observaron en microscopio de luz.

(5)

Actividad fagocítica con Candida albicans:

De la suspensión obtenida de la centrifugación del LBA, se tomaron 200 μ L con una micropipeta y se colocaron sobre un cubreobjetos de 5x5 mm. El cubreobjetos con la muestra fue colocado en una cámara húmeda, y se incubó a 37°C en estufa bacteriológica (con termostato remodable, marca Kinet, México) durante 30 minutos para que los macrófagos se adhirieran al vidrio; se sacó de la estufa y se lavó con solución de Hanks a 37°C a goteo con piseta. Sin permitir que se secase el cubreobjetos, se le añadió 100 μ L de suspensión de un cultivo de

levaduras de *C. albicans* a concentración de 1×10^6 levaduras / mL, al mismo tiempo se añadieron 100 μ L de suero sanguíneo autólogo.

Esta preparación se incubó en la estufa bacteriológica a 37°C por 30 min para que se pudiera llevar a cabo la ingestión de las levaduras por los macrófagos. Posteriormente se sacó de la estufa y se repitió el lavado con solución Hanks a 37°C como se hizo previamente. Se procedió a colocar nuevamente 100 μ L de suero autólogo para favorecer el proceso de digestión, incubando la preparación durante 30 minutos en la estufa bacteriológica a 37°C. Se realizó un tercer lavado con solución Hanks. Se dejó secar la preparación y se procedió a su tinción con solución de Wright. Se colocó la preparación en un portaobjetos y se montó con resina.

Bajo el microscopio de luz, con el objetivo 40X40, se contaron 300 células y los resultados se reportaron como: a) Porcentaje de Fagocitosis (macrófagos activos). b) Índice Fagocítico (macrófagos que fagocitaron). c) Índice digestivo (macrófagos con vacuola). (24)

Criterios de utilización de animales:

Criterios de inclusión: Ratas Sprague-Dawley, adultas, machos, de 250-350 g de peso, sanas.

Criterios de no inclusión: Animales enfermos; animales fuera del peso.

Criterios de exclusión: Animales que sufrieran contaminación bronquial durante el procedimiento; pulmones con daño en el parénquima durante el procedimiento.

Variables:

Variable Independiente: Tiempo *post-mortem*.

Variables Dependientes:

Cantidad de mL recuperados por LBA.

Cuenta total de células en LBA.

Porcentaje de viabilidad en el LBA.

Porcentaje de viabilidad del parénquima.

Actividad fagocítica de los macrófagos:

- Porcentaje de fagocitosis.
- Índice de fagocitosis.
- Índice digestivo.

Análisis estadístico*:

Se calculó la media y la desviación estándar para cada grupo en cada uno de los tiempos de estudio.

Se realizó análisis de varianza (ANDEVA) dentro de los grupos NV y V, comparando las medias de sus tiempos estudiados.

Se realizó prueba *t* de Student entre el grupo C y cada uno de los tiempos de los grupos NV y V.

*El análisis estadístico se realizó en el programa Slide Write Plus for Windows, versión 3.00, Advanced Graphics Software, Inc. USA.

Se realizó prueba *t* de Student entre cada uno de los tiempos dentro de los grupos NV y V.

Se realizó prueba *t* de Student entre los grupos NV y V, en cada uno de los tiempos (pareados).

Se calculó el coeficiente de determinación (r^2) entre las variables porcentaje de viabilidad en el LBA y porcentaje de viabilidad del parénquima dentro de los grupos V y NV.

En todas las pruebas estadísticas, se determinó significancia estadística con $p < 0.05$.

Cuando las cifras se expresaron en decimales, se redondearon a dos cifras significativas.

RESULTADOS

Los resultados se expresan en media aritmética \pm desviación estándar.

El peso promedio de los animales fue de 246.76 ± 20.64 .

La cantidad de mL recuperados por LBA en el grupo C (Control de 0 horas) fue de 6.0 ± 0.79 . (Gráfica 1)

La cantidad de mL recuperados por LBA en el grupo V (Ventilado) fue de 5.5 ± 1.0 , 6.34 ± 0.68 , 6.48 ± 0.65 , 3.4 ± 1.14 , y 3.46 ± 0.51 a las 1,2,4,8 y 12 horas respectivamente; se encontró diferencia significativa dentro del grupo por ANDEVA ($p=0.000$). Se encontraron diferencias significativas entre el grupo C y el tiempo 8h ($p<0.01$), y el tiempo 12h ($p<0.001$). (Gráfica 1)

La cantidad de mL recuperados por LBA en el grupo NV (No Ventilado) fue de 5.66 ± 1.24 , 5.26 ± 1.22 , 5.0 ± 1.22 , 5.8 ± 1.09 , 4.0 ± 1.73 a las 1,2,4,8 y 12 horas respectivamente; no se encontró diferencia significativa dentro del grupo por ANDEVA. No se encontraron diferencias significativas con el grupo C. Se encontró diferencia significativa entre los grupos V y NV a las 8h ($p<0.01$), a partir de este tiempo la cantidad recuperada disminuyó notablemente en el grupo V. (Gráfica 1)

La cuenta total de células en LBA del grupo C fue de $7.48 \times 10^6 \pm 1.97 \times 10^6$. (Gráfica 2)

La cuenta total en LBA en el grupo V fue de $5.50 \times 10^6 \pm 0.73 \times 10^6$, $5.36 \times 10^6 \pm 2.35 \times 10^6$, $5.98 \times 10^6 \pm 0.59 \times 10^6$, $4.12 \times 10^6 \pm 1.77 \times 10^6$, y $5.88 \times 10^6 \pm 2.75 \times 10^6$, a las 1,2,4,8 y 12h respectivamente; no se encontró diferencia significativa dentro del grupo por ANDEVA. Se encontraron diferencias significativas entre el grupo C y

el tiempo de 8h ($p < 0.05$). (Gráfica 2)

La cuenta total de LBA en el grupo NV fue de $7.96 \times 10^6 \pm 0.75 \times 10^6$, $14.72 \times 10^6 \pm 1.57 \times 10^6$, $8.48 \times 10^6 \pm 1.88 \times 10^6$, $8.76 \times 10^6 \pm 2.42 \times 10^6$, y $13.52 \times 10^6 \pm 3.98 \times 10^6$, a las 1,2,4,8 y 12 h respectivamente; se encontró diferencia significativa dentro del grupo por ANDEVA ($p = 0.000$). Se encontraron diferencias significativas entre el grupo C y el tiempo de 2h con ($p < 0.001$) y el tiempo 12h ($p < 0.05$). (Gráfica 2)

La cuenta total de células recuperadas fue mayor en todas las horas en el grupo NV, se encontraron diferencias significativas entre los grupos V y NV en cada uno de los tiempos; en los tiempos 1 y 2h ($p < 0.001$), en el tiempo 4h ($p < 0.05$), y en los tiempos 8 y 12h ($p < 0.01$). (Gráfica 2)

El porcentaje de viabilidad en el LBA para el grupo C fue de 96.58 ± 0.97 , dato que fue el mayor para los tres grupos en todos los tiempos. (Gráfica 3)

El porcentaje de viabilidad en el LBA para el grupo V fue de 91.3 ± 3.35 , 79.18 ± 4.97 , 84.72 ± 3.55 , 63.80 ± 12.07 , y 67.6 ± 11.59 a las 1,2,4,8 y 12 horas respectivamente; se encontró diferencia significativa estadística dentro del grupo por ANDEVA ($p = 0.000$). Se encontraron diferencias significativas entre el grupo C y todos los tiempos del grupo V; en el tiempo 1h, $p < 0.05$ y en los tiempos 2, 4, 8, y 12h $p < 0.01$. (Gráfica 3)

El porcentaje de viabilidad en el LBA para el grupo NV fue de 95.6 ± 2.3 , 92.2 ± 2.94 , 78.6 ± 7.23 , 91.6 ± 2.7 , y 74.2 ± 8.84 . a las 1,2,4,8 y 12h respectivamente; se encontró diferencia significativa dentro del grupo por ANDEVA con $p = 0.000$. Se encontraron diferencias significativas entre el grupo C y el tiempo 2h ($p < 0.05$), el

tiempo 4h ($p<0.01$), el tiempo 8h ($p<0.05$), y el tiempo 12h ($p<0.01$). No se encontró diferencia entre el grupo C y el tiempo 1h. (Gráfica 3)

La viabilidad de las células recuperadas en el LBA fue mejor en el grupo NV en la mayor parte del tiempo, se encontraron diferencias significativas entre los grupos V y NV, en el tiempo 1h ($p<0.05$), 2h y 8h ($p<0.01$). (Gráfica 3)

El porcentaje de viabilidad del parénquima en el grupo C fue de 90.95 ± 12.05 . (Gráfica 4)

El porcentaje de viabilidad del parénquima en el grupo V fue de 88.4 ± 9.43 , 91.45 ± 3.07 , 85.45 ± 2.95 , 78.0 ± 9.33 , y 72.18 ± 8.22 a las 1,2,4,8 y 12 horas respectivamente; se encontró diferencia significativa por ANDEVA ($p=0.003$). Se encontró diferencia significativa entre el grupo de C y el tiempo 12h ($p<0.05$). (Gráfica 4)

El porcentaje de viabilidad del parénquima en grupo NV fue de 94.4 ± 2.18 , 91.1 ± 3.72 , 89.65 ± 4.02 , 71.15 ± 4.39 , y 69.9 ± 6.03 a las 1,2,4,8 y 12 horas respectivamente; se encontró diferencia significativa dentro del grupo por ANDEVA ($p=0.000$). Se encontraron diferencias significativas con el grupo C a los tiempos 8 y 12h ($p<0.05$). (Gráfica 4)

Los valores de viabilidad en el parénquima son más bajos que los encontrados en la viabilidad del LBA, y fueron decayendo con el tiempo. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos V y NV. (Gráfica 4)

Actividad fagocítica de los macrófagos

El porcentaje de fagocitosis en el grupo C fue de 21.4 ± 4.61 . (Gráfica 5)

El porcentaje de fagocitosis en el grupo V aumentó a partir de la hora 8, y fue de 14.4 ± 2.51 , 10.6 ± 4.3 , 10.6 ± 3.2 , 17.2 ± 4.9 , y 19.6 ± 3.5 a las 1,2,4,8 y 12h respectivamente; se encontró diferencia significativa dentro del grupo por ANDEVA ($p=0.003$). Los datos siempre fueron menores que el grupo C, se encontró diferencia significativa entre el grupo C y los tiempos 1h ($p<0.05$), 2h y 4h ($p<0.01$). (Gráfica 5)

El porcentaje de fagocitosis del grupo NV fue disminuyendo en forma paulatina, desde 24.6 ± 4.92 , 14.0 ± 1.0 , 5.6 ± 1.51 a las 1, 2, y 4 horas respectivamente. En los tiempos 8 y 12h, no hubo fagocitosis; se encontró diferencia significativa dentro del grupo por ANDEVA ($p=0.000$). A partir de la hora 2, la disminución es estadísticamente significativa con el grupo C; en el tiempo 2h ($p<0.05$), y en los tiempos 4,8, y 12h ($p<0.001$). (Gráfica 5)

Se encontraron diferencias significativas entre el grupo V y NV en los tiempos 1h ($p<0.01$), 4h ($p<0.05$), 8h ($p<0.01$) y 12h ($p<0.001$), el porcentaje en el grupo NV sólo fue mayor a la hora 1. (Gráfica 5)

El índice de fagocitosis en el grupo C fue de 0.29 ± 0.05 . (Gráfica 6)

El índice de fagocitosis en el grupo V fue de 0.22 ± 0.07 , 0.19 ± 0.06 , 0.18 ± 0.10 , 0.42 ± 0.14 y 0.27 ± 0.09 a las 1,2,4,8 y 12h respectivamente; se encontró diferencia significativa dentro del grupo por ANDEVA ($p=0.004$). Se encontró diferencia significativa entre el grupo de C y el tiempo 2h ($p<0.05$). (Gráfica 6)

El índice de fagocitosis en el grupo NV fue de 0.32 ± 0.07 , 0.22 ± 0.04 , y 0.08 ± 0.02 , a las 1,2, y 4h respectivamente; a las 8 y 12 h fue de 0; se encontró

diferencia significativa estadística dentro del grupo por ANDEVA ($p=0.000$). Se encontró diferencia significativa entre el grupo C y los tiempos 2h ($p<0.05$), 4h, 8h y 12h ($p<0.001$). (Gráfica 6)

Se encontraron diferencias significativas entre el grupo V y NV en los tiempos 1h ($p<0.05$), 8h y 12h ($p<0.01$).

El índice digestivo en el grupo C fue de 0.15 ± 0.05 . (Gráfica 7)

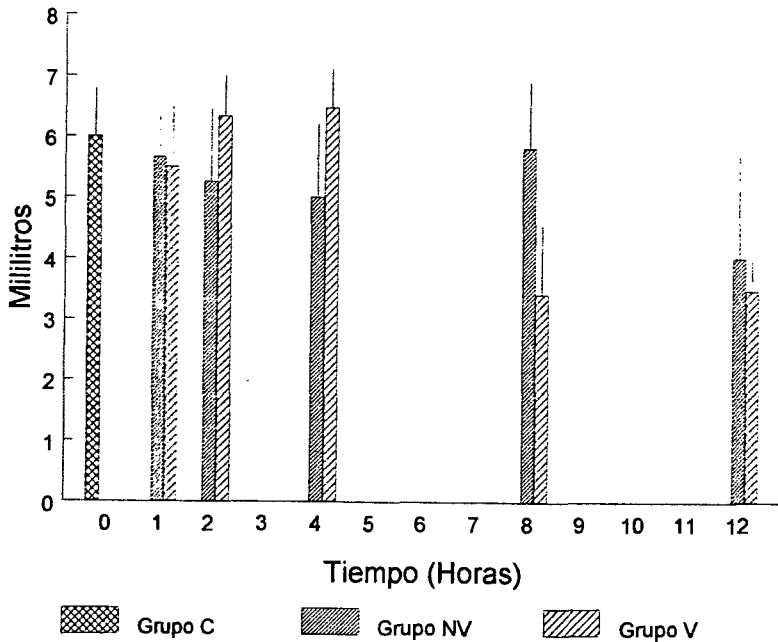
El índice digestivo en el grupo V fue de 0.15 ± 0.05 , 0.02 ± 0.03 , 0.04 ± 0.02 , 0.17 ± 0.05 y 0.15 ± 0.04 a las 1,2,4,8 y 12h respectivamente; se encontró diferencia significativa dentro del grupo por ANDEVA ($p<0.000$). Se encontraron diferencias significativas entre el grupo C y los tiempos 2h ($p<0.01$), y 4h ($p<0.05$). (Gráfica 7)

El índice digestivo del grupo NV fue de 0.06 ± 0.04 , 0.10 ± 0.05 y 0.01 ± 0.01 , a las 1,2, y 4 horas respectivamente; se encontró diferencia significativa dentro del grupo por ANDEVA ($p<0.000$). Para las horas 8 y 12 fue de 0. Se encontraron diferencias significativas entre el grupo C y los tiempos 1h ($p<0.05$), 4h, 8h y 12h ($p<0.01$). (Gráfica 7)

Se encontraron diferencias significativas entre los grupos N y NV en los tiempos 1h, y 2h ($p<0.05$); 4, 8, y 12h ($p<0.01$).

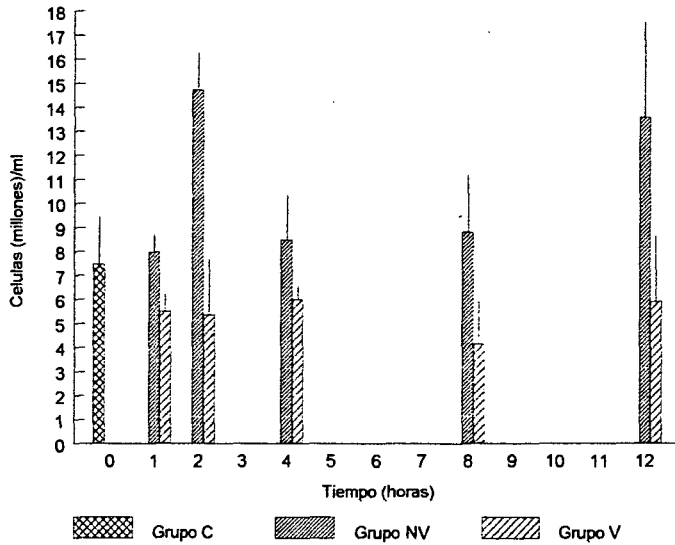
El coeficiente de determinación (r^2) entre viabilidad en el LBA y viabilidad del parénquima en el grupo NV fue de 0.15, y en el grupo V fue de 0.25

GRAFICA 1

CANTIDAD RECUPERADA EN EL LAVADO
BRONQUIOLO-ALVEOLAR

Las barras muestran la cantidad del líquido recuperado en ml, en el LBA en los grupos C, V y NV. Se puede observar una disminución notable en el grupo V a partir del tiempo 8 hrs.

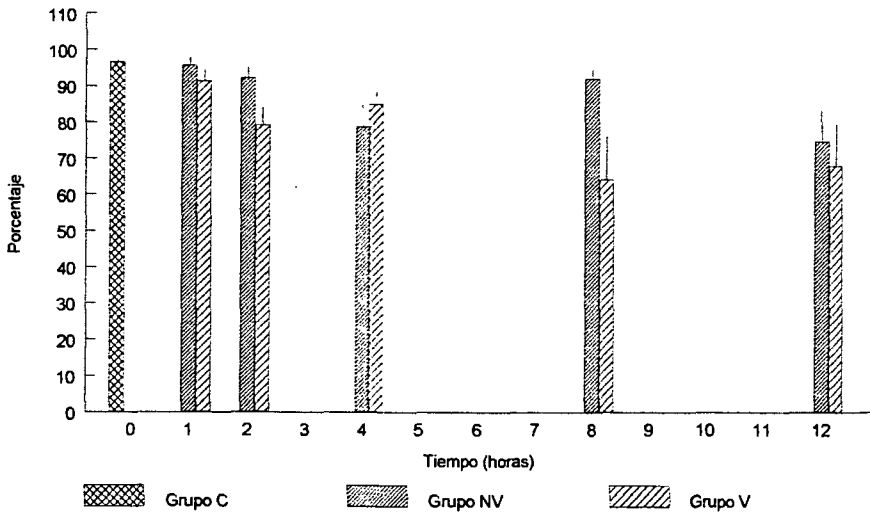
GRAFICA 2

CUENTA TOTAL DE CELULAS EN LAVADO
BRONQUIOLO-ALVEOLAR

Se muestra la cuenta total de células recuperadas en el LBA, en los grupos C, V y NV. Se observa una diferencia entre grupos en todos los tiempos, y un claro aumento en los tiempos 2 y 12hrs el grupo NV.

GRAFICA 3

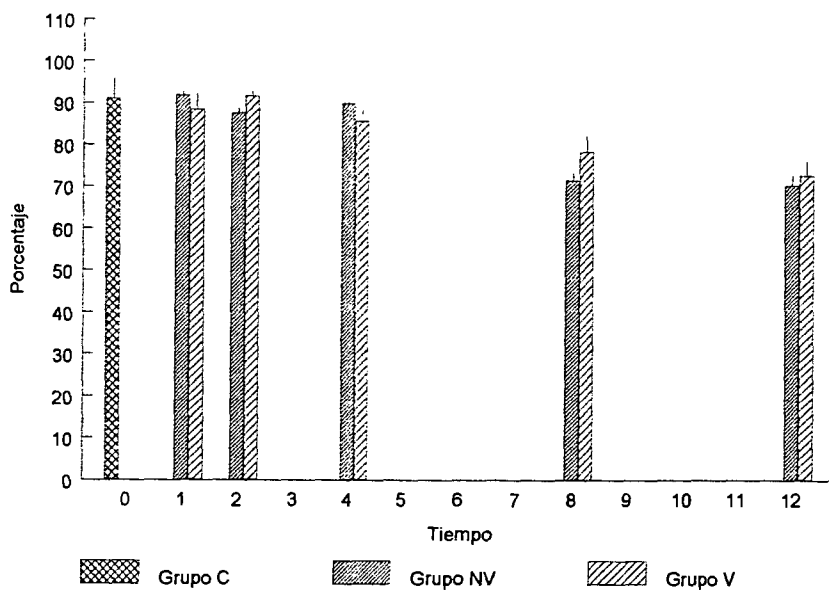
PORCENTAJE DE VIABILIDAD EN EL LAVADO BRONQUIOLO ALVEOLAR



Se muestra el porcentaje de células vivas en el LBA en los grupos C, V y NV. Se observa una disminución importante en el grupo V a partir del tiempo 8 hrs.

GRAFICA 4

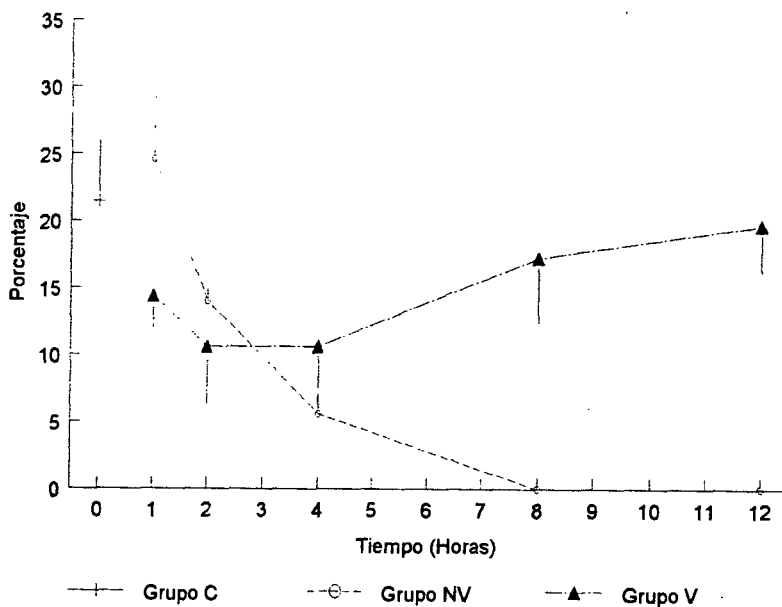
PORCENTAJE DE VIABILIDAD EN EL PARENQUIMA



Porcentaje de células vivas en el parénquima pulmonar con la tinción de azul de tripano en los grupos C,V y NV. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos V y NV.

GRAFICA 5

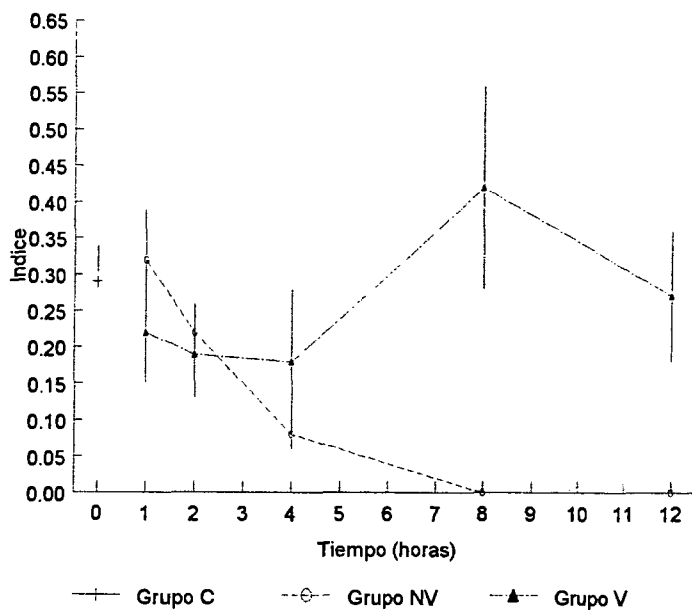
PORCENTAJE DE FAGOCITOSIS



Porcentaje de fagocitosis en los grupos C,V y NV. La fagocitosis en el grupo NV decayó continuamente, hasta llegar a cero a partir del tiempo 8 h; mientras que en el grupo V la fagocitosis se mantuvo activa durante todos el tiempo.

GRAFICA 6

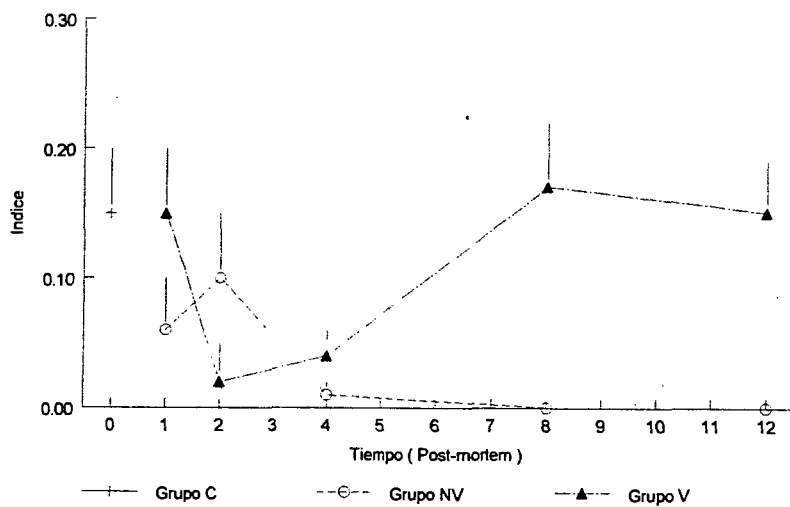
INDICE DE FAGOCITOSIS



Indice de Fagocitosis en los grupos C,V, NV. Se observa un aumento considerable en los tiempos 8 y 12hrs del grupo V, y ausencia total en el grupo NV a partir del tiempo 8 horas.

GRAFICA 7

INDICE DIGESTIVO



Indice de Digestión en los grupos C,V, NV. Se observa un aumento en el grupo V en los tiempos 8 y 12 hrs, con valores similares al grupo C. En el grupo NV el índice disminuye a partir del tiempo 4 horas.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten presuponer, utilizando el método de tinción de exclusión con azul de tripano, que el pulmón permanece viable cuando menos durante las primeras cuatro horas *post mortem*, debido a que la disminución en la cantidad de células vivas es mínima hasta este tiempo. Además, en este modelo la ventilación parece no tener efecto sobre la viabilidad del parénquima pulmonar, demostrado por el comportamiento similar de los grupos Ventilado (V) y No Ventilado (NV) en cada uno de los tiempos.

En un trabajo realizado por D'Armini, los porcentajes de viabilidad que obtuvo en un grupo de cadáveres de ratas ventiladas con oxígeno al 100%, fueron muy semejantes a los del presente estudio, pero la viabilidad que encontró en un grupo no ventilado fue considerablemente menor a partir de la primera hora *post mortem*; el autor atribuye el mantenimiento de la viabilidad a la ventilación con oxígeno, lo que no ocurre en el presente estudio. Una diferencia importante en este trabajo con respecto al de D'Armini, fue que los animales fueron exanguinados antes de someterse al período de estudio, lo que posiblemente resultaría en una disminución de constituyentes sanguíneos presentes en la red capilar en todos los grupos y consecuentemente en menor adherencia de leucocitos al endotelio pulmonar, aunque esto último debe ser objeto de estudios posteriores. (5)

En el presente modelo se pudo observar disminución paulatina de la viabilidad registrada en el lavado bronquiolo-alveolar (LBA), como sucede en el parénquima, sin existir efecto aparente de la ventilación al no encontrarse diferencia clara entre los grupos V y NV. Se supondría por lo tanto, que podría existir

correlación entre la viabilidad del parénquima pulmonar y la viabilidad del lavado bronquiolo-alveolar. Sin embargo, los coeficientes de determinación entre ambas variables en grupos V y NV son tan bajos, que no es posible hacer predicciones de viabilidad. Aún así, si se considera que las referencias de LBA en diferentes especies de animales vivos indican valores de viabilidad por arriba del 80%, se puede observar que durante las primeras cuatro horas del presente estudio, los valores de viabilidad en el LBA están por encima o cercanos a ese porcentaje, lo que refuerza la idea de que el pulmón puede ser un órgano potencialmente recuperable todavía hasta ese momento. (7, 10, 18, 33, 36)

Está claro que durante las primeras horas *post mortem* existe una disminución en la actividad fagocítica de los macrófagos recuperados en el LBA, incluso sin que ésta se vea afectada por la ventilación mecánica, pero después de las cuatro horas el retorno a la actividad normal en el grupo V se hace evidente. Quizá la presencia del oxígeno proporcionado por la ventilación sea un inductor en el retorno de la actividad de los macrófagos alveolares. En un trabajo previo, Burges cultivó macrófagos alveolares (obtenidos por LBA) de monos *cynomolgus* durante 24 horas en ambientes de hiperoxia, y describió un incremento en la producción de IL-1 β y de IL-6 en las células expuestas a 95% de oxígeno, además, esa concentración de oxígeno también indujo la sobreexpresión del receptor CD-11b, específico de moléculas de adhesión; con esos hallazgos se apoya la teoría de que la hiperoxia induce la activación de los macrófagos alveolares para producir citocinas proinflamatorias, que conducen a la lesión pulmonar causada por hiperoxia. La capacidad fagocítica aumentada en el grupo V del presente trabajo podría ser

explicada por el aumento en la activación de los macrófagos alveolares inducida por la concentración de oxígeno proporcionada por la ventilación mecánica en el cadáver. (3)

A pesar de la alta viabilidad observada en el parénquima pulmonar después de varias horas de ventilación con oxígeno al 100%, la cual, en teoría es promisoría de una buena función del órgano, la activación detectada en los macrófagos alveolares, por el contrario, sería capaz de impedirla por efecto de una lesión pulmonar causada por hiperoxia. Estudios posteriores relacionados permitirían comprender las interacciones celulares en el pulmón *post mortem* bajo diferentes circunstancias ambientales y de manejo, como por ejemplo, el ventilar con fracciones inspiradas de oxígeno menores, que podría frenar quizá la activación de los macrófagos.

Finalmente, dada la tendencia de la actividad fagocítica a desaparecer después de las cuatro horas *post mortem* en el grupo NV, y en el grupo V a mantenerse en niveles cercanos a los basales durante todo el tiempo estudiado, no hay fundamentos suficientes para establecer correlación entre esta variable y la viabilidad del parénquima pulmonar, la cual presenta una tendencia a disminuir conforme transcurre el tiempo.(3)

CONCLUSIONES

1. Los pulmones cadavéricos de ratas Sprague-Dawley son potencialmente viables hasta las cuatro horas *post mortem*.

2. La actividad de los macrófagos alveolares se mantiene en cadáveres de ratas Sprague-Dawley durante 12 horas *post mortem*, si se mantienen bajo ventilación mecánica con O₂ al 100%.

3. Existe disminución progresiva de la viabilidad del parénquima pulmonar y de las células obtenidas por LBA, conforme transcurre el tiempo *post mortem*, independientemente de la ventilación con O₂ al 100%, o no ventilación de los cadáveres.

4. No existe correlación entre la actividad fagocítica *in vitro* de los macrófagos alveolares obtenidos de pulmones cadavéricos, y la viabilidad del parénquima pulmonar.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Adams D. O., Macrophage Activation., Encyclopedia of Immunology., Roitt,I.M.,Delves.,P.J. ,Great Britain., 1992 ., Editorial Advisory Board.1020-1026
- 2.- Andrade, R.S., Solien, E.E., Wangenstein,O.D., Tsai,M.Y., Kshetry,V.R and Bolman R.B., Surfactant Dysfunction in Lung Preservation. Transplantation 1995; 60:536-541.
- 3.- Baudendistel, L.J., Vogler,G.A., Frank,P.A., Zanaboni,P.D., and Dahms,T.E. Bronchoalveolar Eosinophilia in Random-source versus Purpose-bred Dogs. Lab Anim Sc 1992 ;42 :491-496.
- 4.-Burges, A., Allmeling,A.M., Krombach,F., Hyperoxia induces upregulation of CD11b and amplifies LPS-induced TNF α release by alveolar macrophages. Eur J Med Res 1997;2:149-154.
- 5.-D'Armini, A.M., Roberts, C.S., Griffith, P.K., Lemasters, J.J., and Egan, T.M. When Does the Lung Die? I. Histochemical Evidence of Pulmonary Viability after 'Death'. J Heart Lung Transplant 1994; 13:741-747.
- 6.- De Alba, H.M.,Efecto del peryodato de sodio sobre los lisosomas de los macrófagos del ratón. Universidad de Guadalajara; Guadalajara Jal., México.,Tesis de Licenciatura en Biología.,1986.
- 7.- Doger, M., Jesh, N.K., Rieder G., Hirvonen, M.,R., Savolainen,K., Krombach,F., and Messmer K. Species Differences in NO Formation by Rat and Hamster Alveolar macrophages *In Vitro*. Am J. Respir Cell Mol Biol. 1997;16: 413-420.

- 8.- Erasmus, M.E., Petersen, A.H., Oetomo, S.B., and Prop, J. The Function of Surfactant is Impaired during the Reimplantation Response in Rat Lung Transplants. J Heart Lung Transplant 1994; 13: 791-801.
- 9.- Fahy,G.M Viability Assessment. Organ Preservation for Transplantation., Karow,A., University Microfilms International Ann Arbor., Michigan., Second Edition 1993; 53-73.
- 10.- Frachon, I., Fattal-German,M., Magnan,A., Cerrina,J., Ladurei,F., L.R., Parquin, F., Rain,B., Lencerf,F., Dartevelle,P., Emilie,D., and Berrih-Aknin.Transplantation 1994;57:1621-1628.
- 11.- Ganong W. F., Fisiología Médica., Manual Moderno 1990., México D.F., 12a edición.,1-690.
- 12.- Giese A.G., Fisiología Celular y General., Interamericana 1994; México D.F.5a edición.,1-726.
- 13.- Hernández D.,J., Bravo C.,A., Gómez E.,H. Actividad fagocitica de los macrófagos pulmonares de los ratones atímicos desnudos nu/nu Arch. Invest.med (Méx) 1982;13:65-67.
- 14.-Hildeman S., Hammer C. and Krombach F. Heterogeneity of Alveolar Macrophages in Experimental Silicosis. Environmental Health Perspectives 1992;97:53-57.
- 15.-Homatas.J., Bryant.L.,and Eiseman,.B.,Time limits of cadaver lung viability. J Thoracic and Cardiovasc Surg 1968;56:132-140.
- 16.-Kobzik, L. Lung Macrophage Uptake of Unopsonized Enviromental Particulates. J. Immunol ,1995;155:367-376.

- 18.- Kolb E., Fisiología Veterinaria, Acribia., 1987., Zaragoza España., 1-320.
- 19.- Kondo.T., Wu.G.D., Saito.R., Marchevsky.A.M., Matloff.J.M., Waters.P.F., Jordan.S.C., Immunocytology Analysis of Cells Obtained from Bronchoalveolar Lavage in a Model of Rat Allograft Rejection. Journal of Surgical Research 1993;55:351-356
- 20.- Krombach, F., Gelarch,C., Padovan,C., Buerges,S., Behr,T., Beinert,T., and Vogelmeier, C. Characterization and Quantification of Alveolar monocyte-like Cells in Human Chronic Inflammatory Lung Disease. Eur Respir J 1994;106:1753-1756.
- 21.- Lesson, L.R., Lesson, T.S., Histología., Interamericana 1987; México D.F. 5ta edición 1-503.
- 22.- Levy,H. Comparison of Ballard Catheter Bronchoalveolar Lavage with Broncoscopic Bronchoalveolar Lavage Chest; 1994 ;106: 1753-1756.
- 23.-Limas del Muro, E., Herrera E.R., y Camacho, G. Función Fagocítica en Diabetes Mellitus. Arch Invest Méd 1982; 13:89-91.
- 24.- Moumoni, H., Garaud, P., Diot, P., Lemarie, E., and Anthonioz, P., Quantification of Cell Loss during Bronchoalveolar Lavage Fluid Processing. Am J Respir Crit Care Med 1994;149:636-640.
- 25.- Moxley, M.A., Jacoby, J., and Longmore, W.J. Uptake and Reutilization of Surfactant Phospholipids by Type Cells of Isolated Perfused Lung. Lung Cell Mol Physiol 1991;268-273.
- 26.- North R.J. The Concept of the Activated Macrophage The Journal of Immunology 1978; 121:806-809.

- 26.-Partida, L.M. Efecto in vivo de concentraciones de oxígeno en macrófagos pulmonares de ratas recién nacidas. Universidad de Guadalajara; Guadalajara Jal., México., Tesis de Licenciatura en Biología., 1993.
- 27.-Pinsker, K.L., Norin, A.J., Kamholz, S.L., Montefusco, C., Schreiber, K., Hagstrom, J.W.C., and Veith, F.J. Cell Content in Repetitive Canine Bronchoalveolar Lavage. Acta Cytol. 1980; 24:558-563.
- 28.-Potter, R., Peters, M.D., Carson, M., Forbes, T., Ellis, C.G., Harris, K.A., De Rose, G., and Jamiseson, M.G., Measurement of tissue Viability using intravital microscopy and fluorescent nuclear dyes. Journal of Surgical Research; 1995;59:521-526.
- 29.-Rebar, A.H., DeNicola, D.B., and Muggenburg, B.A. Bronchopulmonary Lavage Cytology in the Dog: Normal Findings. Vet Pathol. 1980;17:294-304.
- 30.-Reis, A., Tötsch, M., Shennib, H., Öfner, D., Serrick, C., Jamjoom, A., Chikhani, N., Mikuz, G., and Margreiter, R. Bronchoalveolar Lavage Results of Sequential, Selective Techniques in Viable Murines. Am J Respir Crit Care Med 1994;150:547-601.
- 31.-Saltini, C., Hance, A.J., Ferrans, V.J., Basset, F., Bitterman, P., and Crystal, R.G. Accurate Quantification of Cells Recovered by Bronchoalveolar Lavage. Am Rev Respir Dis 1984;130:650-658.
- 32.-Sasaki, S., McCully, J.D., Palombo, J.D., Forse, R.A., and LoCicero, J., Lung Preservation Threshold in a Compromised Septic Lung Injury Model. Ann Thorac Surg 1995;60:958-963.
- 33.-Shennib, H., Nguyen, D., Guttman, R.D., and Mulder, D.S. Phenotypic

Expression of Bronchoalveolar Lavage Cells in Lung Rejection and Infection. Ann Thorac Surg 1991; 51:630-635.

34.-Sibille, Y; and Reynolds, H. Macrophages and Polymorphonuclear Neutrophils in Lung Defense and Injury. Am Rev Respir Dis 1990;141:471-501.

35.- Tizard Ian., *Imunología Veterinaria.*, Interamericana 1990; México D.F. 3a edición. 1-414.

36.-Vanda, B *Cuerpos Ferruginosos y Celularidad en Lavado Bronquioloalveolar en perros de la ciudad y de una zona rural.* Universidad Nacional Autónoma de México. Tesis de Maestría en Ciencias Veterinarias, Patología 1995.