
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

DIVISIÓN DE CIENCIAS VETERINARIAS



**CAMBIOS EN LA CELULARIDAD DEL LAVADO
BRONQUIOLO-ALVEOLAR EN RELACIÓN A LA VIABILIDAD DEL
PARÉNQUIMA PULMONAR TEÑIDO CON LA TÉCNICA DE AZUL DE
TRIPANO A DIFERENTES TIEMPOS *POST MORTEM*.**

T E S I S

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

P R E S E N T A

P.M.V.Z. ADRIANA SÁNCHEZ ROLDÁN

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

LAS AGUJAS, NEXTIPAC, ZAPOPAN, JALISCO. AGOSTO DE 1998

AGRADECIMIENTOS.

A MI PAPI Y A MI MAMI:

Gracias por apoyarme todo este tiempo, yo sé que tarde un poquito en darles esta satisfacción pero creo que valió la pena, **GRACIAS** nuevamente por todo su amor y comprensión "los adoro".

A MIS HERMANITOS OMAR Y JANETH:

Gracias por esperar este feliz momento conmigo, por atormentarme a toda hora preguntando ¿cuando terminas la tesis? los amo y no podría vivir sin ustedes.

AL GRAN AMOR DE MI VIDA:

Helio gracias por apoyarme y estar siempre presente en los momentos mas difíciles, **GRACIAS** por tu amor y comprensión. **te amo.**

A DAVID GARCIA MARTINEZ (MI TUTOR) :

"DADY", gracias por ayudarme a hacer este sueño realidad, por tu cariño, comprensión y por aguantarme todo este tiempo, **te quiero lo normal.**

AL M.en C. ELISEO PORTILLA DE BUEN:

Gracias por darme la oportunidad de ingresar al apasionante mundo de la investigación, por tenerme confianza y por aguantar todas mis insolencias, **le guardo eterna gratitud y afecto**, y no se preocupe mañana será peor.

A MONIQUITA:

"Borreguito", gracias por ser mi amiga, confidente y fiel compañera de loqueras, **GRACIAS** por sufrir conmigo y alentarme a seguir adelante. **mi amiga te quiero mucho.**

A CARLITOS ROMERO:

Querido hermanito de tesis, gracias por tu apoyo, ayuda. y por los buenos momentos que pasamos juntos **te voy a extrañar.**

AL MAESTRO ADOLFO CARDENAS:

Gracias por compartir mis vivencias y anhelos durante este tiempo. maestro lo quiero mucho, **gracias por todo.**

A SOCO BARBA:

Mami Soco, gracias por ser buena conmigo nunca voy a olvidar tus buenos consejos, **GRACIAS** por ayudarme. **te quiero.**

A MIS COMPAÑEROS DE LA DIVISION:

Gracias por permitirme gozar de su compañía durante todo este tiempo.

A HERNAN CORTES VELAZCO :

Querido amigo este triunfo es de los dos, te recordaré siempre.

Y FINALMENTE:

Agradezco a todas y cada una de las ratitas cuyas vidas tomé para llevar a cabo esta investigación, **Con todo respeto y dolor de mi parte.**

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	i
INTRODUCCIÓN.....	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	7
JUSTIFICACIÓN.....	8
OBJETIVOS.....	9
HIPOTESIS.....	10
MATERIAL Y MÉTODOS.....	11
RESULTADOS.....	17
DISCUSION.....	24
CONCLUSIONES.....	28
BIBLIOGRAFIA.....	29

RESUMEN

La viabilidad de los pulmones después de la muerte del donador disminuye paulatinamente aun utilizando métodos de preservación, de tal modo que hay un tiempo crítico antes del cual pueda realizarse exitosamente el trasplante. El objetivo de este trabajo fue determinar si existe correlación entre la viabilidad de las células del lavado bronquiolo-alveolar (LBA), y la viabilidad del parénquima pulmonar determinada con la técnica de azul de tripano a diferentes tiempos *post mortem*. Se utilizaron 30 ratas machos de 250 a 300 g, distribuidos en 6 grupos de 5 animales, fueron estudiados a las 0,1,2,4,8 y 12 horas *post mortem*; al término de tales periodos, en el pulmón izquierdo se realizó perfusión a través de la arteria pulmonar con azul de tripano 150 mL, seguido de 100 mL de formol amortiguado al 10%, el tejido se incluyó en parafina y se tiñó con eosina, se contaron 200 células por laminilla para calcular el porcentaje de viabilidad celular en el parénquima. En el pulmón derecho se realizó LBA con solución de NaCl al 0.9 %, a partir de las células obtenidas se determinó en cámara de Neubauer el porcentaje de viabilidad con azul de tripano, y se calculó la cuenta total celular por mL de LBA recuperado. Se concluye que el porcentaje de viabilidad tanto en parénquima pulmonar como en LBA, disminuye a medida que transcurre el tiempo *post mortem*, desde 94.62% y 98.2% respectivamente a las cero horas, hasta 27.54% y 21.2% a las doce horas. En contraste, la cuenta total celular en el LBA aumentó de 0.505×10^6 a las cero horas, hasta 2.429×10^6 a las doce horas. Se encontró diferencia significancia por ANOVA en cada una de las variables ($P < 0.001$). Para las variables porcentaje de viabilidad en parénquima y porcentaje de viabilidad en el LBA, se obtuvo un coeficiente de determinación de $r^2 = 0.56$ ($p < 0.001$). Los resultados en los valores de viabilidad, tanto en parénquima pulmonar, como en el LBA, muestran una tendencia a la disminución en el tiempo. El aumento de la cuenta total de las células (en LBA) en el tiempo, puede ser reflejo de la disminución en la viabilidad del órgano. La correlación entre la viabilidad del parénquima pulmonar y la viabilidad del lavado bronquiolo-alveolar podría conducir a pronósticos de función pulmonar.

INTRODUCCION

La principal función del aparato respiratorio es proporcionar oxígeno a la sangre y eliminar el bióxido de carbono. El tejido respiratorio en el que se efectúa este intercambio gaseoso se localiza en los pulmones, situados en la cavidad torácica que es prácticamente un espacio cerrado; los pulmones pueden comunicarse con el exterior a través de una porción conductora constituida por: cavidad nasal, faringe, laringe, tráquea y bronquios (21,37). 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 pulmón cuenta con varias barreras que filtran el aire, como son las vibras de las fosas nasales, cilios cubiertos por moco, etc., las partículas menores de 2 μm logran llegar hasta los alvéolos donde se hallan células encargadas de neutralizarlas como los neutrófilos y macrófagos (estos últimos más abundantes) (9,13,17,21,37). El tejido pulmonar también participa en funciones como el metabolismo de sustancias biológicamente activas, sintetiza y utiliza agente tensoactivo; almacena y vierte a la sangre: prostaglandinas, histamina y calicreína; activa angiotensina I a tipo II y participa en el control de la temperatura corporal (12,27,35,36).

Entre las diversas patologías que afectan al aparato respiratorio, existen condiciones que alteran al tejido pulmonar de manera irreversible, como es el caso de enfermedades crónico-degenerativas como la fibrosis pulmonar, la sarcoidosis, el granuloma eosinofílico, el enfisema, y la hipertensión pulmonar primaria (28,32).

En los casos mencionados el tratamiento de elección es el trasplante pulmonar (8,21, 28,37).

Trasplante pulmonar.

El trasplante pulmonar, que puede ser unilateral (un solo pulmón) o bilateral (ambos pulmones), consiste en la eccisión de uno o ambos pulmones en el paciente enfermo (receptor) y la subsecuente colocación del pulmón, los pulmones o segmentos obtenidos de un paciente sano o con muerte cerebral (donador), con la finalidad de conseguir una adecuada función respiratoria en el receptor, que lo conduzca a una mejor calidad de vida, inclusive con capacidad de reintegrarse a sus actividades laborales (8,22).

El trasplante pulmonar ha evolucionado constantemente desde el primer sobreviviente exitoso. A pesar de las mejoras en la procuración de las técnicas quirúrgicas, de la detección y manejo del rechazo, existe una gran limitante: el tiempo en el que el pulmón puede mantenerse en isquemia antes de ser trasplantado, que no supera las 6 horas en la práctica clínica, lo que obliga a obtener un diagnóstico rápido y oportuno del estado funcional y arquitectónico del órgano a transplantar (2,6,8,15,22).

Los criterios de selección de donadores de pulmón están basados en una adecuada función del órgano. En la clínica una vez obtenido el pulmón, es mantenido en condiciones de preservación, generalmente en hipotermia a 4°C, previamente perfundidos a través de la arteria pulmonar con soluciones preservadoras que contienen distintos metabolitos, con lo que se pretende aumentar el período en el que puede ser utilizado (1,8,9,10,15,22,34,35).

VIABILIDAD

La viabilidad de un órgano, puede definirse como la capacidad para mantenerse funcional después de ser extirpado (2,6,10).

Los métodos de preservación deben mantener a los órganos viables, y se requiere de pruebas que determinen la viabilidad con alta precisión, para que los órganos puedan ser trasplantados oportunamente (22). 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 (6,8,15).

Actualmente se sabe que el tejido pulmonar a diferencia de otros tejidos, tiene la capacidad de mantenerse vivo después de que el individuo muere, y esto se debe en parte a que el oxígeno que consume no requiere ser de origen sanguíneo y puede ser tomado directamente del alvéolo (2,6,8).

Pruebas de viabilidad

Específicamente en los pulmones, se ha intentado determinar la viabilidad por diversos métodos (1,5,6,7,8,10,14,15,16,19,26,33,34,38). Mediante microscopía electrónica se ha observado en pulmones ventilados con O₂ al 100 % y no ventilados de ratas *post mortem*, el daño ultraestructural en escala semicuantitativa con base en la proporción de cromatina nuclear, degeneración mitocondrial, edema intracelular e integridad de la membrana y se ha visto que a partir de las 4 horas es importante el daño ultraestructural en los pulmones que no

fueron ventilados, mientras que en los pulmones ventilados se presentan cambios isquémicos de ligeros a moderados después de las 8 horas (2).

Otro método preciso y práctico para determinar la viabilidad pulmonar, 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) Posteriormente se puede observar al microscopio de luz, que los núcleos de las células muertas se tiñen de color azul, mientras que las vivas no se modifican (6,14,40), se ha demostrado con esta técnica, que pulmones de ratas con 12 horas de ventilación con 100% de FIO_2 después de la muerte, llegan a tener cerca del 74% de células parenquimatosas viables, atribuido esto a la oxigenación alveolar, y a que se alcanza menor viabilidad en pulmones no ventilados (5,6).

Sin embargo, la prueba más importante para determinar viabilidad experimentalmente, al menos en lo que se refiere a trasplantes, es el trasplante *per se*, con la limitante de que ésta no es una forma práctica de hacerlo (6,22). En estudios recientes se utiliza la microscopía intravital para poder observar *in vivo* el comportamiento microvascular de los órganos bajo condiciones fisiológicas y fisiopatológicas, lo que abre un campo enorme para el entendimiento de la viabilidad de los órganos. En esta técnica se emplean tinciones especiales como la bisbenzimidida, que tiene la capacidad de teñir los núcleos de todas las células, y el bromuro de etidio que solamente tiñe los núcleos de las células cuyas membranas celulares han sido dañadas (30).

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 isotónica directamente en un bronquio y extraerla con el contenido celular libre del lóbulo o segmento pulmonar en cuestión (1,7,11,14,16,18,19,20,24,25,27,28,29,31,32,33,35,36,38,40). La cuenta celular total, la viabilidad celular, la cuenta celular diferencial, la morfología celular, el contenido de algunas sustancias, y la presencia de microorganismos, son algunas de las variables que pueden ser objeto de estudio en el LBA (3,25,31,32,33,38).

Sus indicaciones abarcan la valoración diagnóstica, pronóstica y terapéutica de diversas enfermedades respiratorias (1,9,11,18,22,24,32,38,40).

Algunas de las aplicaciones del LBA son: la identificación y cuantificación de monocitos alveolares en pacientes con enfermedad crónica inflamatoria como sarcoidosis, alveolitis alérgica extrínseca y enfermedad vascular de colágena (20,34). Además, experimentalmente se ha utilizado en el estudio del efecto de la preservación pulmonar sobre el sistema surfactante en ratas (estudio y análisis de los cambios bioquímicos del surfactante en el lavado bronquiolo-alveolar) (1).

La información derivada a partir del lavado bronquiolo-alveolar más comúnmente utilizada en la clínica, es el conteo diferencial de células recuperadas. Para obtener esta información es necesario recobrar las células,

concentrarlas y teñirlas para identificar los diferentes tipos celulares. Las preparaciones citocentrifugadas teñidas con Wrigth-Giemsa (o tinciones hematológicas similares) son las más comúnmente utilizadas para obtener el conteo diferencial celular (7,14,16,19,20,24,31,32,35,38); otras técnicas de tinción utilizadas para identificación celular son la de hematoxilina y eosina, Papanicolaou y Diff-Quick (8,18,22,29,31,32,33,38,40).

De las células obtenidas mediante el LBA en un estudio en perros normales, los macrófagos alveolares indiferenciados son el tipo celular más abundante (80% o más de todas las células nucleadas). En promedio los neutrófilos componen el 5% del total de la cuenta. Las proporciones de linfocitos, eosinófilos y células cebadas son más variables. Las células epiteliales significan menos del 1% de células nucleadas recolectadas (7,11,32,38,40). No se dispone de datos de cuenta diferencial celular en el LBA de las ratas, aunque en monos y humanos los valores en la cuenta diferencial son similares a los de los perros (4,19,20,38).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El uso de órganos obtenidos de cadáveres sin manejo clínico de donador ha cobrado interés recientemente. Experimentalmente se ha demostrado que el pulmón es un órgano que puede ser trasplantado exitosamente después de haber sido obtenido de sujetos con paro respiratorio. Actualmente no existe un método lo suficientemente rápido y práctico para determinar las condiciones de viabilidad del pulmón, lo que se agrava porque ésta disminuye paulatinamente conforme pasa el tiempo. Se requiere por lo tanto de un método que cumpla con este objetivo, el lavado bronquiolo-alveolar podría ser un indicador indirecto del estado en que se encuentra el pulmón y si es apto para trasplante o no, en una situación clínica.

JUSTIFICACION

Ante la necesidad de disponer de órganos para trasplante en pacientes con enfermedad pulmonar terminal y la problemática de disponer de órganos cadavéricos en buen estado funcional, es necesario contar con métodos diagnósticos de viabilidad pulmonar que puedan realizarse en tiempo breve. Actualmente no existe una prueba que pueda cumplir con este objetivo.

A pesar de la vasta información en relación a la celularidad (cuenta celular total y viabilidad) encontrada en el lavado bronquiolo-alveolar en condiciones normales y patológicas del pulmón, no existen estudios que describan dicha celularidad en el cadáver. Es importante conocer las condiciones en las que se encuentran las células recuperadas en el LBA en el sujeto con paro cardiocirculatorio, y buscar si existe relación con la viabilidad del parénquima, determinada con el método de tinción por exclusión con azul de tripano.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Determinar si existe correlación entre los parámetros de celularidad del LBA, con la viabilidad del parénquima pulmonar determinada con el método de azul de tripano en pulmones de ratas a diferentes tiempos *post mortem*.

Objetivos Particulares:

1. Describir la cantidad de células recuperadas en el LBA de ratas Sprague-Dawley a diferentes tiempos *post mortem*.
2. Describir los cambios en el porcentaje de viabilidad del lavado bronquiolo-alveolar de ratas Sprague-Dawley a diferentes tiempos *post mortem*.
3. Describir los cambios en el porcentaje de viabilidad del parénquima pulmonar de ratas Sprague-Dawley a diferentes tiempos *post mortem*.

HIPÓTESIS

El decremento paulatino *post mortem* de la viabilidad del parénquima pulmonar correlaciona directamente con la viabilidad de las células recuperadas en el lavado bronquiolo-alveolar.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 30 ratas Sprague-Dawley machos, sanos, adultos de 250 a 300g de peso, mantenidos en condiciones de bioterio y de acuerdo a las normas internacionales de manejo de los animales para experimentación. Se formaron 6 grupos de 5 animales: 0h, 1h, 2h, 4h, 8h, y 12h, que fueron estudiados a las 0,1,2,4,8 y 12 horas *post mortem* respectivamente.

Los animales fueron tranquilizados con Droperidol (1.5 mg/kg IM), y anestesiados con ketamina (20 mg/kg IM), posteriormente fueron heparinizados por la vena dorsal del pene (200 UI DT IV) y sacrificados con sobredosis de anestesia (tiopental sódico 25 mg) por la misma vía. Los pulmones de cada rata fueron expuestos por medio de costotomía bilateral a las 0h,1h, 2h, 4h, 8h y 12h (según su grupo correspondiente). En el pulmón derecho se realizó LBA para medir viabilidad y cuenta total de las células recuperadas; el pulmón izquierdo fue perfundido con solución de azul de tripano (500 μ M) y fijado, también por perfusión, con formol al 10% amortiguado en solución de fosfatos.

Metodología para LBA:

Se realizó exposición de la traquea por apertura del cuello sobre línea media. Se incidió parcialmente en forma transversal y se introdujo una cánula calibre 14, la cual se fijó por medio de una ligadura con seda calibre 00. Posteriormente se realizó costotomía bilateral para exponer el bloque cardiopulmonar con el objeto de evitar lesionar las estructuras anatómicas. Se localizó el bronquio izquierdo, en el que se colocó una pinza microvascular para

evitar el paso de líquido de lavado (18,33). Se introdujeron con una jeringa hipodérmica a muy baja presión, 8 mL de solución de NaCl al 0.9% (19,23,24,35) dividido en 4 alícuotas de 2.0 mL cada una, 10 segundos después de aplicada la solución se recuperó el líquido de lavado por medio de una bomba de aspiración, con presión negativa de 5 cmHg (General Electric, modelo 2H47EAX, Serie EH, Hecho en México) (28,29). El sistema de recuperación de lavado consta de un tubo flexible con una trampa intermedia (matraz de 250mL), sumergida en hielo "Frappé" para mantener la muestra, a una temperatura de 4°C (40).

Posteriormente se midió la cantidad de lavado recuperado con una jeringa de 10 mL, el líquido de lavado fue filtrado en un embudo con cuatro capas de gasa quirúrgica para quitar el moco (4,19,20,28) y colocado en un tubo de ensayo de plástico para evitar la adherencia de las células al vidrio. La muestra fue centrifugada (centrífuga de gabinete modelo Optima II, marca BHG) durante 5 min, a 1500 rpm, posteriormente fue decantada con una pipeta Pasteur (33). El botón celular fue resuspendido en 0.5 mL de PBS y agitado para dispersar nuevamente las células (4). Se tomaron 50 µL de la muestra y se colocaron en otro tubo de plástico (3), a éste se le agregaron 50 µL de solución de azul de tripano (32). Posteriormente se tomaron 10 µL y se depositaron en un hemocitómetro (cámara de Neubauer) para realizar la cuenta total de células y evaluar al mismo tiempo su porcentaje de viabilidad de la siguiente forma (3,7,15,19,33,):

Cuenta total celular (CTCEL) = Se expresa como el número de células por mL de LBA.

Fórmula:

$$\frac{\text{Número de células contadas} \times \text{Dilución} \times 10 \times 1000}{\text{número de cuadrantes.}} \times 2$$

mL centrifugados

Dilución = 2 (factor de dilución de la tinción)

10 = Volumen del hemocitómetro (Profundidad 0.1 mm).

1000 = Conversión de microlitros a mililitros.

2 = Factor de dilución de la resuspensión.

Porcentaje de Viabilidad = No de células vivas x 100/Cuenta total celular

Metodología para Perfusión de Azul de Tripano.

Se disecó el bloque cardiopulmonar de sus inserciones ligamentosas y fue colocado sobre una gasa humedecida con NaCl al 0.9% dentro de una caja de Petri. El esófago fue desprendido para dejar libres las estructuras respiratorias, se retiró la pinza previamente colocada en el bronquio principal izquierdo, y la misma fue utilizada para ocluir el hilio pulmonar derecho. Se introdujo un catéter calibre 18 en la arteria pulmonar y se seccionó la orejuela izquierda; a través de éste catéter se perfundieron 150 mL de solución de azul de tripano (500 μM en una solución amortiguada de Krebs-Henseleit pH 7.4) a una altura de 25 cm. Posteriormente se perfundieron 100 mL de solución de formol al 10% amortiguado en PBS por la misma vía. Se tomó una muestra de tejido pulmonar de 3 mm de espesor, y se colocó en un recipiente con formol al 10% amortiguado. El tejido se procesó con la técnica convencional de inclusión en parafina, y se realizaron

cortes histológicos de 5 μm de espesor para teñirlos con eosina (6,40). La cuantificación celular fue realizada por dos microscopistas distintos. Cada microscopista fue cegado al grupo en cuestión para cada una de las laminillas; se observaron cuatro campos diferentes en las secciones histológicas con el empleo de un microscopio de luz (100x), se identificaron y contaron 25 núcleos celulares parenquimatosos en cada uno de los campos y se registró el color de cada núcleo. Los núcleos celulares identificados fueron de color rosa (células viables) y de color azul (células no viables) (6,14). En total fueron contados 200 núcleos (100 por cada microscopista), a partir de los cuales se calculó el porcentaje de viabilidad celular en el parénquima (6).

CRITERIOS

Criterios de inclusión: Ratas Sprague Dawley, adultas, machos, de 250 a 300 g, sanas.

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

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

Variables:

INDEPENDIENTE: Tiempo *post mortem*.

DEPENDIENTES:

Mililitros recuperados en el lavado bronquiolo-alveolar.

Cuenta total de células en lavado bronquiolo-alveolar.

Porcentaje de viabilidad celular en lavado bronquiolo-alveolar.

Porcentaje de viabilidad del parénquima pulmonar.

Relación entre el porcentaje de viabilidad del lavado bronquiolo-alveolar y el porcentaje de viabilidad en el parénquima pulmonar.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó Análisis de Varianza (ANDEVA)* entre todos los grupos para cada variable; cuando no existió normalidad en la distribución de los datos, se aplicó el Análisis de Varianza de Kruskal-Wallis**.

Se realizó comparación múltiple pareada de Student Newman-Keuls* para determinar las diferencias entre los grupos; en las variables sin normalidad, esta comparación se hizo con la prueba de rangos de *U* de Mann-Whitney**.

Se calculó el coeficiente de determinación *** entre las variables porcentaje de viabilidad del parénquima pulmonar y porcentaje de viabilidad celular en lavado bronquiolo-alveolar .

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

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

El análisis estadístico fue realizado en los programas para computadora:

*Sigmastat, Statistical software, versión 1.0 Copyright 1992-1994, Jandel Corporation.

**SPSS para Windows, Release 6.1 (24 de junio de 1994).

***Microsoft Excel para Windows, versión 7.0 Copyright 1985-1995.

RESULTADOS

Los resultados se expresan en media aritmética \pm error estándar de la media.

El peso promedio de los animales fue de 266 ± 6.50 g.

La cantidad de mL recuperados en el lavado bronquiolo-alveolar fue de 6.7 ± 0.38 mL para el grupo C (Control de 0 horas).

La cantidad de mL recuperados para los grupos 1h, 2h, 4h, 8h y 12h (1, 2, 4, 8, y 12 horas *post mortem*) fue de 6.88 ± 0.23 , 6.26 ± 0.58 , 6.16 ± 0.52 , 5.2 ± 0.38 , y 5.6 ± 0.81 ; respectivamente. No se encontró diferencia significativa por ANOVA de Kruskal Wallis. Se encontraron diferencias significativas con *U* de Mann Wittney entre el grupo C y el grupo 8 horas, y entre los grupos 1h y 8h ($p < 0.05$) (Gráfica 1).

La cuenta total de células en LBA en el grupo C fue de $0.505 \times 10^6 \pm 0.06 \times 10^6$ células/mL.

La cuenta total de LBA para los grupos 1h, 2h, 4h, 8h y 12h fue $0.55 \times 10^6 \pm 0.14 \times 10^6$, $0.44 \times 10^6 \pm 0.13 \times 10^6$, $0.72 \times 10^6 \pm 0.27 \times 10^6$, $1.81 \times 10^6 \pm 0.57 \times 10^6$, y $2.43 \times 10^6 \pm 0.56 \times 10^6$ células/mL respectivamente; se encontró diferencia significativa entre los grupos por ANDEVA de Kruskal Wallis ($p < 0.01$). Se encontraron diferencias significativas con *U* de Mann Wittney entre el grupo C y los grupos 8h y 12h ($p < 0.01$). Se encontraron diferencias significativas entre los grupos 1h y los grupos 8h ($p < 0.01$) y 12h ($p < 0.05$); entre el grupo 2h y los grupos 8h ($p < 0.01$) y 12h ($p < 0.05$); y entre los grupos 4h y 12h ($p < 0.05$) (Gráfica 2).

El porcentaje de viabilidad en el LBA para el grupo C fue $94.62 \pm 1.69\%$.

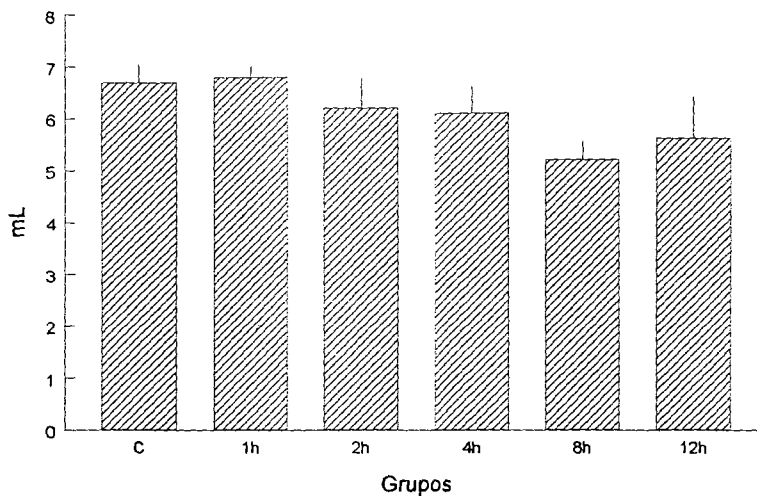
A partir de las 8 horas *post mortem*, el porcentaje de viabilidad en el LBA disminuyó drásticamente; para los grupos 1h,2h,4h,8h y 12h fue 80.96 ± 3.75 , 85.28 ± 1.92 , 71.76 ± 5.50 , 19.10 ± 4.82 , y $27.54 \pm 2.97 \%$, respectivamente. Se encontró diferencia significativa entre los grupos por ANDEVA ($p < 0.001$). Se encontraron diferencias significativas con la prueba de t- Student Newman-Keuls entre el grupo C y los grupos 1h, 4h, 8h y 12h ($p < 0.05$). Se encontraron diferencias significativas entre el grupo 1h y los grupos 8h y 12h ($p < 0.05$); entre el grupo 2h y los grupos: 4h, 8h y 12h ($p < 0.05$) y entre el grupo 4h y los grupos 8h y 12h ($p < 0.05$) (Gráfica 3).

El porcentaje de viabilidad del parénquima pulmonar en el grupo C fue de $98.2 \pm 0.88\%$.

El porcentaje de viabilidad del parénquima observó una tendencia a disminuir paulatinamente en el tiempo. Para los grupos 1h,2h,4h,8h y 12h fue 91.7 ± 1.86 , 78.4 ± 5.35 , 83.7 ± 4.48 , 52.2 ± 12.74 y $21.2 \pm 6.81\%$ respectivamente. Se encontró diferencia significativa por ANDEVA ($p < 0.001$). Se encontraron diferencias significativas con la prueba de Student Newman-Keuls entre el grupo C y los grupos 8h y 12h ($P < 0.05$); entre el grupo 1h y los grupos 8h y 12h ($p < 0.05$); entre el grupo 2h y los grupos 8h y 12h ($p < 0.05$); entre el grupo 4h y los grupos 8h y 12h ($p < 0.05$), y entre el grupo 8h y el grupo 12h ($p < 0.05$) (Gráfica 4).

El coeficiente de determinación entre las variables Porcentaje de Viabilidad del Parénquima y Porcentaje de Viabilidad en el LBA fue de $r^2 = 0.563$ ($p < 0.001$), el cual indica un grado de asociación importante entre las dos variables (Gráfica 5).

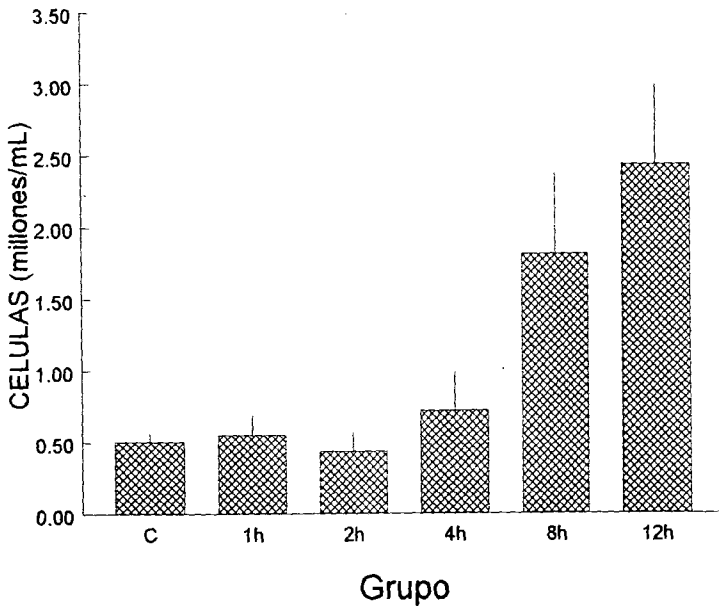
GRAFICA 1

CANTIDAD RECUPERADA EN EL LAVADO
BRONQUIOLO-ALVEOLAR

Las barras muestran la cantidad del líquido recuperado en mL en el LBA en los grupos de 0 a 12 horas *post mortem*. A pesar de las variaciones en las horas 8 y 12, no se encontró significancia por ANDEVA.

GRAFICA 2

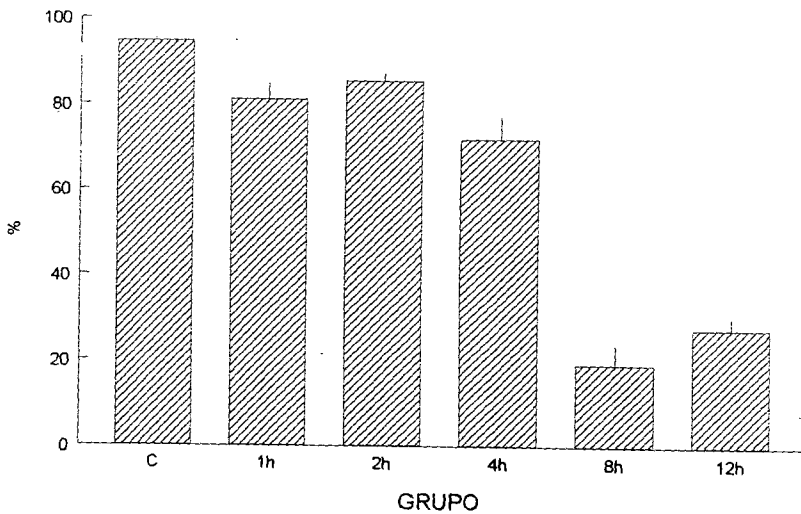
CUENTA TOTAL DE CELULAS EN LAVADO BRONQUIOLO-ALVEOLAR



Se muestra la cuenta total de células recuperadas en el LBA, en los grupos de 0 a 12 horas *post mortem*. Se encontró diferencia por ANDEVA $p > 0.001$. Se encontraron diferencias entre los grupos C, 1h, 2h y 4h contra los grupos 8h y 12 h $p < 0.05$.

GRAFICA 3

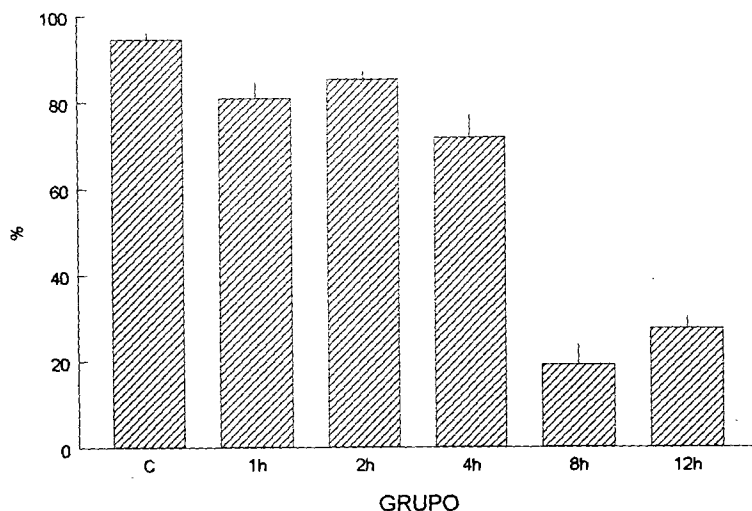
PORCENTAJE DE VIABILIDAD CELULAR EN EL LAVADO BRONQUIOLO-ALVEOLAR



Se muestra el porcentaje de células vivas en el LBA en los grupos 0 a 12 horas. Se encontró diferencia significativa entre grupos por ANDEVA ($p < 0.001$). Se encontró diferencia significativa entre el grupo C contra 1h, 4h, 8h y 12h $p < 0.05$, entre el grupo 1h contra los grupos 8h y 12h $p < 0.05$, entre el grupo 2h y los grupos 4h, 8h y 12h $p < 0.05$ y entre el grupo 4h y los grupos 8h y 12h $p < 0.05$. Se observa que a partir de las 4 horas el porcentaje de viabilidad disminuye de manera considerable.

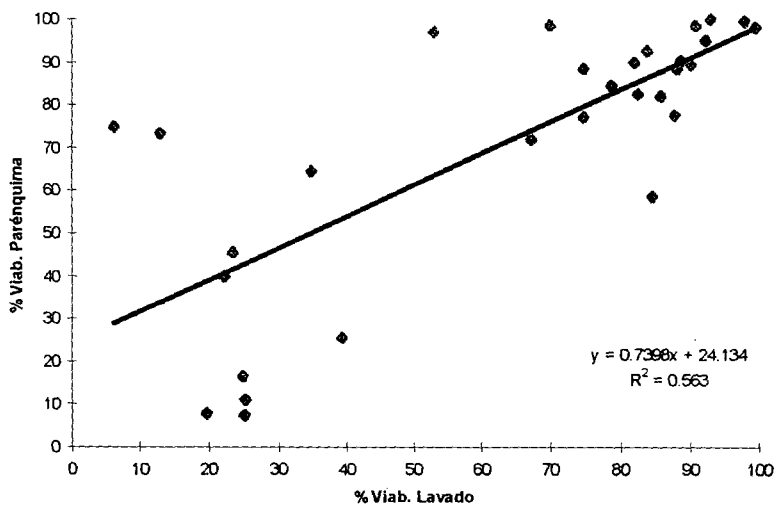
GRAFICA 4

PORCENTAJE DE VIABILIDAD DEL PARENQUIMA PULMONAR



Se muestra el porcentaje de células vivas en el parénquima pulmonar con la tinción de azul de tripano en los grupos de C a 12 horas. Se encontró diferencia significativa entre grupos por ANDEVA ($p < 0.001$). Se encontraron diferencias significativas entre los grupos C contra 8h y 12h, entre el grupo 1h contra los grupos 8h y 12h, entre el grupo 2h y los grupos 8h y 12h, entre el grupo 4h y los grupos 8h y 12h, y entre el grupo 8h y 12h $p < 0.05$.

GRAFICA 5

CORRELACION ENTRE PORCENTAJE DE VIABILIDAD DEL
LBA Y PORCENTAJE DE VIABILIDAD EN PARENQUIMA
PULMONAR

Se muestra el grado de asociación que existe entre las variables porcentaje de viabilidad en LBA y porcentaje de viabilidad en parénquima pulmonar, $r^2 = 0.563$.

DISCUSIÓN

El uso cada vez más frecuente del LBA en la práctica experimental y clínica hace necesaria la utilización de metodologías uniformes que permitan hacer comparaciones de los parámetros de estudio. Dada la muy escasa información en ratas, la metodología del presente trabajo se apoya fundamentalmente en la experiencia de Vanda y cols.(40) en perros, con las modificaciones particulares de la especie diseñadas en el laboratorio de Investigación Quirúrgica del CIBO. Se utilizó un volumen de lavado que permitiera la distribución del fluido en la totalidad de las áreas del órgano con la precaución de no dañar las estructuras alveolares. Es probable que a esto se deba el hecho de haber recuperado una cantidad uniforme de líquido en el LBA durante todas las horas del experimento, además de que el tiempo *post mortem* no parece influir sobre dicha cantidad. En animales vivos, varios autores mencionan cierta uniformidad en la cantidades de líquido recuperado, en general más del 80% del volumen administrado (3,4,14,19,20,29,31,40).

Resulta relevante que durante las primeras cuatro horas *post mortem* la cuenta total de células recuperadas se mantiene sin cambios importantes, mientras que a partir de las 8 horas el aumento celular observado en el LBA podría tener un origen en los cambios de la integridad del pulmón y de las vías aéreas, que aumenten la descamación celular. Las cuentas celulares del presente estudio no concuerdan con las descritas en un trabajo paralelo en ratas sin

ventilación mecánica (5) en el que aparecen aumentos considerables con relación al grupo de 0 horas, a las horas 2 y 12; en dicho trabajo se utilizó una metodología de recuperación del líquido del LBA en la que no se controló la presión de extracción, esta diferencia con respecto al presente estudio es una probable causa de la discrepancia en los resultados. No es posible formular hipótesis sobre lo que realmente sucede al órgano porque no se determinó el tipo celular encontrado en los lavados, y sería interesante realizar a futuro cuentas celulares diferenciales en el LBA, en grupos de ratas bajo las mismas condiciones. Asimismo, debido a las características particulares de cada especie (capacidad alveolar principalmente), las cuentas celulares totales varían, pero, también cabe hacer notar que las diferencias en la metodología empleada, como los son: solución de lavado utilizada, presión de extracción y equipo de medición, entre otros, así como la manera de reportar los resultados (células/ml o cantidad total recuperada) hace difíciles los patrones de interpretación de los resultados (3,7,11,14,20,31,38)

La viabilidad mostrada en el LBA se mantiene por arriba del 80% hasta las dos horas *post mortem*, al igual que ocurre en los lavados realizados en diferentes especies animales *in vivo* (7,8,11,19,33,40). En contraste con el trabajo de Cerda, en el que encontró alta viabilidad en las horas 8 y 12, en el presente estudio se observa disminución en la viabilidad a partir de la hora 4, con un descenso muy marcado en las horas 8 y 12. El hecho de encontrar viabilidad alta durante las primeras dos horas, es un indicativo de condiciones todavía adecuadas en el órgano.

Como era de esperarse, en el parénquima pulmonar se presenta disminución de la viabilidad a medida que transcurre el tiempo *post mortem*, particularmente después de la hora 4, estos resultados se aproximan a los obtenidos por D'Armini en cadáveres de ratas no ventiladas (6). En un trabajo paralelo al presente (5), se obtuvieron datos muy superiores de viabilidad en cadáveres que no fueron sometidos a ventilación con O₂, el autor atribuye estos altos valores a la disminución de los constituyentes sanguíneos de la red capilar alveolar en su modelo, causada por la exanguinación casi total antes de la muerte del sujeto.

La obtención de pulmones adecuados para trasplante recuperados a partir de cadáveres con paro cardiovascular, es una posibilidad para aumentar la cantidad de donadores potenciales. Previamente se ha estudiado la función ventilatoria de pulmones de cadáveres de perros a diferentes tiempos *post mortem*, tanto en un modelo de órgano aislado, como de trasplante pulmonar, y se ha sugerido que el órgano está en buenas condiciones para ser trasplantado, cuando se obtiene una hora después de la muerte y ha sido mantenido bajo ventilación mecánica con FIO₂ de 0.4 (8,15). Los resultados obtenidos en el presente trabajo refuerzan la idea anterior, en la medida que en el modelo de pulmones de ratas se observa alta viabilidad tanto en el LBA como en el parénquima pulmonar, al menos durante las primeras cuatro horas *post mortem*, aunque esto no garantiza necesariamente una buena función de intercambio de gases durante todo ese tiempo.

En la búsqueda de métodos que determinen de manera eficiente el estado de viabilidad del tejido pulmonar, la correlación encontrada entre dicha variable y la viabilidad de las células del LBA en el presente estudio ($r^2=0.56$), proporciona un acercamiento importante que puede sugerirse en la práctica clínica.

Realizar LBA en pulmones para trasplante puede dar información relevante del estado del órgano a partir del estado de las células recuperadas.

CONCLUSIONES

1.- Los resultados en los valores de viabilidad, tanto en parénquima pulmonar, como en el LBA, muestran una tendencia a la disminución en el tiempo.

2.- La cuenta total de células recuperadas en el LBA se mantiene sin cambios importantes durante las primeras cuatro horas *post mortem* y posteriormente aumentan de manera considerable, esto puede ser asimismo, reflejo de la disminución en la viabilidad del órgano.

3.- La viabilidad en el LBA es muy alta durante las dos primeras horas *post mortem* y decae posteriormente.

4.- La viabilidad en el LBA es un indicador indirecto de la viabilidad en el parénquima pulmonar en sujetos *post mortem*, el grado de asociación entre las variables de viabilidad podría conducir a pronósticos de función pulmonar.

BIBLIOGRAFIA

- 1.-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.
- 2.-Alessandrini, F., D'Armini, A., Roberts, C., Reddick, R., and Egan, T. When does the lung die?. II Ultrastructural evidence of pulmonary viability after "death". J. Heart Lung Transplant 1994 ; 13: 748-757.
- 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.-Burgess, 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.-Cerdeña, P.M., Actividad Fagocítica De Macrófagos Alveolares Obtenidos de pulmones Ventilados y no Ventilados de Ratas Sprague-Dawley, a Diferentes tiempos Post-Mortem. Universidad de Guadalajara. Tesis de Licenciatura en Medicina Veterinaria, 1997.
- 6.-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.

- 7.-Dörger, M., Jesch, 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.-Egan, T.M., Lambert, C.J., Reddick, R., Ulichny, K.S., Keagy, B.A., and Wilcox, B.R. A Strategy to Increase the Donor Pool: Use of Cadaver Lungs for Transplantation. Ann Thorac Surg. 1991; 52:1113-1121.
- 9.-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: 791-802.
- 10.-Fahy, G.M. Viability Assessment. Organ Preservation for Transplantation University Microfilms International Ann Arbor., Michigan., Second Edition 1981; 53-73.
- 11.-Frachon, I., Fattal-German, M., Magnan, A., Cerrina, J., Ladurei, F., L.R., Parquin, F., Rain, B., Lencerf, F., Darteville, P., Emilie, Dominique., and Berrih-Aknin, S. Emergence of Inflammatory Alveolar Macrophages During Rejection Or Infection After Lung Transplantation. Transplantation 1994;57:1621-1628.
- 12.-Ganong W. F., Fisiología Médica., Manual Moderno 1990., México D.F., 12a edición., 564-610.
- 13.-Giese A.G., Fisiología Celular y General., Interamericana 1994; México D.F. 5ª edición., 1-726.
- 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 Environmental Particulates. The Journal of Immunology 1995;155:367-376.
- 17.-Kolb, E. Fisiología Veterinaria, Acribia., 1987., Zaragoza España., 1-320.
- 18.- Kondo,T., Wu,G.D., Saito,R., Marchevsky, A.M., Matloff,J.M., Waters,P.F., Jordan,S.C. Immunocytologic Analysis of Cells Obtained from Bronchoalveolar Lavage in a Model of Rat Allograft Rejection. Journal of Surgical Research 1993;55:351-356.
- 19.- Krombach, F., Gerlach, C., Padovan, C., Burges, A., Behr,T., Beinert, T., and Vogelmeier, C. Characterization and quantification of alveolar monocyte-like cells in human chronic inflammatory lung disease. Eur Respir J.1996; 9: 984-991.
- 20.-Krombach, F., Fiehl, E., Burkhardt, D., Rienmüller, R., König, G., Adelman, B.C., Idel, H., and Rosenbruch, M. Short-term and Long-Term Effects of Serial Bronchoalveolar Lavages in a Nonhuman Primate Model. Am J Respir Crit Care Med 1994;150:153-158.
- 21.-Lesson, L.R., Lesson, T.S. Histología. Interamericana 1987; México D.F. 5ta edición 1-503.
- 22.- Levine,M.S., Kapoor, A., and Laks, H. Patient selection and evaluation. Atlas of Heart-Lung Trasplantación. McGraw Hill, New York, 1994: 117-121
- 23.-Levy,H. Comparison of Ballard Catheter Bronchoalveolar Lavage with Bronchoscopic Bronchoalveolar Lavage. Chest; 1994; 106: 1753-1756.

- 24.-Meduri, G.U., Beals, D.H., Maijeb, A.G., and Baselski, V. New bronchoscopic Technique To Retrieve Uncontaminated Distal Airway Secretions. Am Rev Respir Dis 1991;143:855-864.
- 25.-Moumouni, 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.
- 26.-Moxley M.A., Jacoby J., and Longmore W.J: Uptake and reutilization of surfactant phospholipids by type II cells of isolated perfuse lung. Lung Cell Mol. Physiol 1991;268-273.
- 27.-North R.J The Concept of the Activited Macrophage The Journal of Immunology 1978; 121:806-809.
- 28.-Nguyen D.,Mulder D.S., andhennib H. Warm Ischemia Induces Alteration in lung Immune Cell Functions. J Thorac Cardiovasc Surg. 1991;101: 1030-1036.
- 29.-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.
- 30.-Potter,R., Peters,M.D., Carson,M., Forbes,T., Ellis,C.G., Harris, K.A., DeRose,G., and Jamiseson,M.G. Measurement of tissue Viability usig intravital microscopy and fluorescent nuclear dyes. Journal of Surgical Research; 1995;59:521-526.
- 31.-Rebar, A.H., DeNicola, D.B., and Muggenburg, B.A. Bronchopulmonary lavage Cytology in the Dog: Normal Findings.Vet Pathol. 1980;17:294-304.

- 32.-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.
- 33.-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.
- 34.-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.
- 35.-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.
- 36.-Sibille, Y; and Reynolds, H. Macrophages and Polymorphonuclear Neutrophils in Lung Defense and Injury. Am Rev Respir Dis 1990;141:471-501.
- 37.- Smith, T., El Sistema Respiratorio. Atlas del Cuerpo Humano Editorial Grijalbo Londres 1995;8:134-149.
- 38.-Xaubet A., y Agustí, C. Lavado broncoalveolar. Arch. Bronconeumol. 1991; 27:134-138.
- 39.-Valero, G., Citología diagnóstica. Diagnóstico Veterinario, editorial Sociedad Mexicana de Patólogos veterinarios 1993; México D.F. Primera Edición. 64-67.

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

41.-Waynforth, H. B. and Flecknell, P. A., Experimental and Surgical Technique in the Rat, Editorial Academic Press 1994; E. U.. Second Edition. 334-338.