



UNIVERSIDAD DE VALPARAISO
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE OBSTETRICIA Y PUERICULTURA



“Distribución de Factor de Crecimiento Endotelial Vascular, Insulínico tipo II y Transformante Beta en las Etapas del Desarrollo Pulmonar de Ratas Wistar”.

Tesis para optar al Grado de Licenciado/a
en Obstetricia y Puericultura.

Tesistas: Daisy Marlene Ricotti Lara
Claudia Francisca Saavedra Romero

Profesor Guía: Sebastián San Martín Henríquez

Detrás de cada línea de llegada, hay una de partida

Detrás de cada logro hay otro desafío...

Agradecimientos

A Dios, por permitirnos alcanzar nuestras metas, por los obstáculos y desafíos que ha puesto en el sendero de nuestras vidas, por la inmensa fortaleza y felicidad que nos entrega en el diario vivir.

A nuestros padres, Ximena, José, Teresa y Marcos, a quienes adoramos con el alma, por ser el pilar fundamental de nuestra formación personal y profesional. Por su esfuerzo, entrega y sacrificio. Por estar presente incondicionalmente en nuestras penas y alegrías... Simplemente por existir...

A nuestros hermanos, Rodrigo, Francisca y Daniela, por su apoyo, preocupación absoluta, inmensa alegría y satisfacción; por acompañarnos en nuestros logros y caídas.

A Cristián, por su constante preocupación y apoyo, por hacerse partícipe de este proyecto y de mi vida.

A nuestros amigos, por cada palabra de aliento y abrazo sincero en los momentos arduos... por incentivarnos a seguir y mirar nuevamente el horizonte.

Al gran equipo de trabajo que esta investigación nos permitió conocer, Ricardo, Alejandra, Tamara y Daniel quienes nos cedieron sin distinción parte de sus conocimientos, por colaborar en nuestra formación, por el apoyo y cariño brindado y por la constante sonrisa y aliento en los momentos difíciles.

A nuestro Profesor y Guía Dr. Sebastián San Martín, por invitarnos a ser parte de este proyecto, por incentivar en nosotras el constante desafío a investigar y abrir las puertas de un mundo distinto de nuestra profesión. Por su paciencia y apoyo incondicional, por enseñarnos que los errores y caídas son parte de un aprendizaje que nos van engrandeciendo. Y finalmente por el coraje transmitido en cada uno de las frustraciones.

Daisy y Claudia.

FINANCIAMIENTO

Los costos para el desarrollo de este trabajo han sido cubiertos totalmente por el Proyecto DIPUV CI 05/2006 cuyo Investigador responsable es el Dr. Sebastián San Martín Henríquez. A través de este Proyecto se financiaron los costos relacionados con la obtención y proceso de las muestras biológicas. Además incluyó la compra de los reactivos necesarios para realizar los estudios de distribución de factores de crecimiento por técnicas inmunohistoquímica. Esta tesis ha sido patrocinada por el centro regional de estudios en alimentos saludables (CREAS, CONICYT).

Índice

Resumen	5
Abstract	6
Introducción	7
Definición de términos	9

Capítulo 1

1.- Sistema Respiratorio	11
1.1.- Desarrollo de la Vía Aérea Inferior	11
1.2.- Desarrollo de la Laringe	12
1.3.- Desarrollo de la Tráquea	13
1.4.- Desarrollo de los Bronquios	13
1.5.- Desarrollo Pulmonar	16
1.5.1.- Etapa Embrionaria	19
1.5.2.- Etapa Pseudoglandular	22
1.5.3.- Etapa Canalicular	23
1.5.4.- Etapa Sacular	24
1.5.5.- Etapa Alveolar	25
2.- Vasculogénesis	26
3.- Interacción Epitelio Mesénquima	28
4.- Factores de Crecimiento	31
4.1.- Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF- β)	32
4.1.1.- Señalización de TGF- β	34
4.2.- Factor de Crecimiento Insulínico Tipo II (IGF II)	36
4.3.- Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF)	39
4.3.1.- Vía de Señalización: Receptor Tirosina Quinasa	43

Capítulo 2

1.- Delimitación del Problema, Tipo de Estudio, Hipótesis y Objetivos	45
1.1.- Delimitación del Problema	45

1.2.- Tipo de Estudio.....	45
1.3.- Hipótesis.....	45
1.4.- Variables.....	45
1.5.- Objetivo General.....	45
1.6.- Objetivos Específicos.....	46
2.- Material y Métodos	47
2.1.- Animales.....	47
2.2.- Procesamiento.....	47
3.- Métodos.....	48
3.1.- Características Histológicas.....	48
3.2- Protocolos Inmunohistoquímicas	48
4.- Limitantes del Estudio.....	51
Capítulo 3	
1.- Resultados.....	52
2.- Documentación Fotográfica	57
Capítulo 4	
1.- Discusión.....	71
2.- Conclusión y Sugerencias	78
Bibliografía.....	80
Anexos	85

Resumen

Introducción: El desarrollo pulmonar es un proceso complejo y altamente organizado, en el que se reconocen varias etapas. El éxito en el desarrollo de este órgano, está dado por una serie de condiciones fisiológicas reguladas entre otros por factores de crecimientos. La ramificación, morfogénesis y diferenciación celular del tejido pulmonar, junto con la distribución coordinada de elementos vasculares, nerviosos y tejidos de soporte ocurre en consecuencia de la respuesta celular a estos mediadores. **Objetivo:** Determinar por medio de técnicas inmunohistoquímicas la distribución temporo/espacial de los factores de crecimiento: Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF), Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF- β), Factor de Crecimiento semejante a la Insulina tipo II (IGF-II) en las etapas del desarrollo pulmonar en ratas. **Material y Métodos:** Muestras de 27 fetos de ratas cepa Wistar entre los días 14, 17 y 20 de gestación, correspondiente a la etapa pseudoglandular, canalicular y sáculo alveolar del desarrollo pulmonar. Los tejidos fueron procesados mediante técnicas de rutina para microscopía óptica para la descripción morfológica e inmunohistoquímica para la distribución de los factores de crecimiento. **Resultados:** La morfología observada en el desarrollo pulmonar de ratas evidenció modificación del epitelio a medida que transcurrían los días de gestación, aparición de vasos sanguíneos y cambios en el mesénquima. Se observaron modificaciones temporales y espaciales en la distribución de los factores de crecimiento a nivel epitelial, mesenquimal y endotelial. TGF- β mostró un peak los días 14 a 17 de gestación en epitelio pulmonar disminuyendo la marcación al día 20 de gestación. VEGF se mantuvo presente en el tejido pulmonar, en epitelio, mesénquima y endotelio los días 14 a 17 de gestación, decreciendo la inmunomarcación a medida que avanza la gestación, sin embargo se mantuvo presente en endotelio. IGF II presentó una innumeración positiva a lo largo de las etapas del desarrollo pulmonar en epitelio y mesénquima, mostrándose nula en endotelio. **Conclusión:** Existen diferencias temporo/espaciales en la distribución del Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF), Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF- β), Factor de Crecimiento semejante a la Insulina tipo II (IGF-II) a nivel epitelial, mesenquimal y endotelial en las etapas del desarrollo pulmonar de ratas cepa Wistar. Complejas interacciones ocurren entre los componentes del epitelio, mesénquima y Factores de Crecimiento ya mencionados, en consecuencia, cualquier alteración en la expresión normal de estos mediadores puede dar lugar a un desarrollo anormal de las vías respiratorias.

Abstract

Introduction: Lung development in human and other mammals is a complex and highly organised process comprising several stages. Success in this organ's development is driven by a series of physiological conditions regulated by growth factors among others. Ramification, morphogenesis and cell differentiation of the lung tissue, together with a coordinated distribution of vascular, nerve and supporting tissue elements, occur as a consequence of the cell response to these mediators. **Objective:** To determine the spatial-temporal distribution of some factors using immunohistochemical techniques in the different stages of rat lung development. The selected factors are: Vascular endothelial growth factor (VEGF), transforming growth factor beta (TGF- β). Insulin like growth factor II (IGF-II). **Material and methods:** Lung samples from 27 Wistar rat foetuses were used. Samples were collected at day 14, 17 and 20 of gestation, corresponding to the pseudo-glandular, canalicular, and alveolar sacculae of the lung development respectively. Tissues were processed by routine optical microscopy techniques to perform morphological description and immunohistochemistry for the identification of the growth factors distribution. **Results:** The morphology observed in the rat lung development showed epithelial modifications going on together with gestation time, blood vessel generation and changes in mesenchyme generation. Temporal and spatial modifications in the distribution of growth factors at epithelial, mesenchymal and endothelial levels of blood vessels were observed. TGF- β showed a bigger distribution at day 14 and 17 of gestation in lung epithelia decreasing its presence by day 20 of gestation. VEGF kept present in epithelia, mesenchyme and endothelia of the lung tissue at days 14 and 17 of gestation decreasing its presence by day 20 of gestation. However, in blood vessels epithelia no modifications in the presence of this factor were detected. IGF-II showed a positive immunostaining throughout all lung development both in epithelia and mesenchyme. On the other hand, this immunostaining was negative in endothelia. **Conclusion:** There are spatial-temporal differences in the distribution of VEGF, TGF- β and IGF-II at epithelial, mesenchyme and endothelial level in Wistar rat lung development stages. The presence of these growth factors might be an essential requirement for normal lung development and, in consequence, any alteration in the normal expression of these mediators might generate an abnormal development of the airways.

Introducción

El desarrollo pulmonar tanto en ratas como en humanos, es un proceso complejo y altamente organizado, en el que se reconocen varias etapas: embrionaria, pseudoglandular, canalicular y sáculo-alveolar. Dicho desarrollo es seguido estrechamente por la formación de la vasculatura pulmonar, para concluir en la formación de la unidad alvéolo-capilar. Todos estos, son procesos que se encuentran controlados por factores genéticos, tales como factores de crecimiento y otras moléculas, de acción sólo parcialmente comprendida. (Mager et al., 2007).

La ramificación, morfogénesis y diferenciación celular del tejido pulmonar, junto con la distribución coordinada de elementos vasculares, nerviosos, y tejidos de soporte ocurre en consecuencia de la respuesta celular a diferentes mediadores, principalmente factores de crecimiento y citocinas. Cualquier alteración en la expresión normal de estos mediadores puede dar lugar a un desarrollo anormal de las vías respiratorias. Además, existe evidencia creciente que sugiere un papel importante de los factores de crecimiento y sus receptores en el proceso de remodelación asociada con enfermedades respiratorias como el asma y displasia broncopulmonar (DBP) (Mager et al., 2007).

La principal motivación para llevar a cabo esta investigación está dada por la importancia de estudiar y comprender el complejo desarrollo pulmonar en humanos, sin embargo por razones éticas, las publicaciones e investigaciones nacionales e internacionales, respecto al tema en nuestra especie son escasas. Además, sólo en los últimos años se ha logrado evidenciar la importancia que tendrían factores moleculares y genéticos en el desarrollo normal del sistema respiratorio. Por lo tanto, nuevos antecedentes respecto al desarrollo morfológico, asociado a la participación de factores de crecimiento específicos podrán ampliar nuestro conocimiento y generar nuevas investigaciones y aplicaciones clínicas, especialmente en la neonatología y perinatología, como futuro profesional Matrona/matrón.

En esta investigación la especie animal utilizada que asemeja las condiciones humanas es el de ratas de la Cepa Wistar, ya que es un modelo estandarizado en laboratorios, se conoce su ciclo reproductivo, es fácil de manipular y además es la

utilizada en los proyectos del Centro de Investigación en Biología de la Reproducción de la Facultad de Medicina, Universidad Valparaíso.

Existe evidencia de que en algunas patologías pulmonares congénitas, tales como Hernia Diafragmática, Hipoplasia Pulmonar y Agenesia Pulmonar se pueden observar alteraciones temporo/espaciales en la expresión de factores de crecimiento, entre los cuales se ha observado una expresión tardía del factor de crecimiento insulínico (IGF) en el desarrollo pulmonar (Nagata et al., 2007). Lo anterior nos plantea la posible relación clínica de factores de crecimiento específicos asociados a patologías de recién nacidos que puedan conllevar a prematuridad, síndrome de distress respiratorio y/o muerte perinatal.

Definición de términos

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular, es una proteína señalizadora involucrada en el proceso de vasculogénesis y en angiogénesis. (Papaioannou et al., 2006)

TGF- β : Factor de Crecimiento Transformante- β , corresponde a una gran familia de proteínas de secreción que actúan como mediadores locales regulando una variedad de procesos celulares, incluyendo la proliferación, diferenciación, producción de matriz extracelular y muerte celular. (Alberts y col., 2004). En el pulmón, esta proteína tiene un efecto anti-proliferativo, controlando negativamente la morfogénesis de este órgano.

IGF II: Factor de crecimiento insulínico tipo II, es una hormona peptídica, perteneciente a la familia de los IGFs, de estructura similar a la de la insulina. El IGF-II tiene un papel importante en el crecimiento embriológico y fetal regulando la proliferación y diferenciación celular. (Nagata et al., 2007).

Hematoxilina-Eosina: La tinción hematoxilina-eosina (HE) es el método más utilizado en la tinción de tejidos para observar histología al microscopio. La hematoxilina tiñe estructuras ácidas (basófilas) en tonos azul, y la eosina tiñe componentes básicos (acidófilos) en tonos de color rosa, por lo que el núcleo celular se observa de color azul y el citoplasma de color rosa.

Inmunohistoquímica: Técnica morfológica que permite reconocer la presencia y distribución de una proteína específica mediante la reacción antígeno-anticuerpo.

Vasculogénesis: Es el proceso por el cual se forman nuevos vasos sanguíneos, por migración y diferenciación de las células progenitoras endoteliales para formar capilares interconectados. Es de importancia fundamental debido a que los organismos presentan requerimiento absoluto para el transporte efectivo del oxígeno respiratorio, de los nutrientes y de los productos de desecho hacia y desde sus células constituyentes.

Angiogénesis: Es la generación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes y puede suceder por una variedad de procesos diferentes que incluyen gemación, intususcepción y elongación por proliferación endotelial o intercalación de los progenitores endoteliales. La angiogénesis es un fenómeno normal durante el desarrollo embrionario, el crecimiento del organismo y en la cicatrización de las heridas.

Interacción Eitelio-Mesénquima: Las interacciones tisulares, especialmente la interacción entre epitelio y mesénquima embrionario, juegan un papel crucial en la iniciación del desarrollo y en la diferenciación de la mayoría de los órganos de los embriones de vertebrados. La naturaleza de estas interacciones es compleja y puede deberse a la comunicación célula-célula, entre los tejidos que interaccionan a través de la membrana basal del epitelio o a la intercomunicación por vía extracelular producida por uno o por ambos tejidos (Mérida and col., 1994)

CAPÍTULO: 1

1.- Sistema Respiratorio

1.1.- Desarrollo de vía respiratoria inferior

Los órganos respiratorios inferiores (laringe, tráquea, bronquios y pulmones) comienzan a formarse durante la cuarta semana de desarrollo embrionario. Alrededor del día 28, aparece el primordio respiratorio como una evaginación medial del extremo caudal de la pared ventral de la faringe primitiva, la hendidura laringotraqueal, que se desarrolla caudal al cuarto par de bolsas faríngeas. El endodermo que reviste la hendidura laringotraqueal da lugar al epitelio y las glándulas de la laringe, la tráquea, los bronquios y al epitelio pulmonar. El tejido conjuntivo, el cartílago y el músculo liso de dichas estructuras se desarrollan a partir del mesodermo esplácnico que rodea al intestino anterior (Moore y Persaud, 2003).

Entre los días vigésimo sexto a vigésimo octavo, la hendidura laringotraqueal se ha evaginado para formar un divertículo respiratorio (yema pulmonar), situado en posición ventral respecto a la parte caudal del intestino anterior (Larsen W, 2003).

Este divertículo se elonga, revistiéndose de mesénquima esplácnico y su extremo distal aumenta de tamaño y origina una yema traqueal globular. El divertículo respiratorio se separa tempranamente de la faringe primitiva; sin embargo, mantiene la comunicación con ella a través de la entrada de la laringe primitiva. Se desarrollan pliegues traqueoesofágicos longitudinales en el divertículo laringotraqueal, que se acercan entre sí y fusionan, dando lugar a una división conocida como tabique traqueoesofágico (Figura 1). Este tabique divide a la porción craneal del intestino anterior en una parte ventral, el tubo laringotraqueal (primordio de laringe, tráquea, bronquios y pulmones) y una parte dorsal (primordio de la orofaringe y el esófago). La abertura de este tubo en la faringe se convierte en la entrada laríngea primitiva (Moore y Persaud, 2003).

Traquea-bronquios

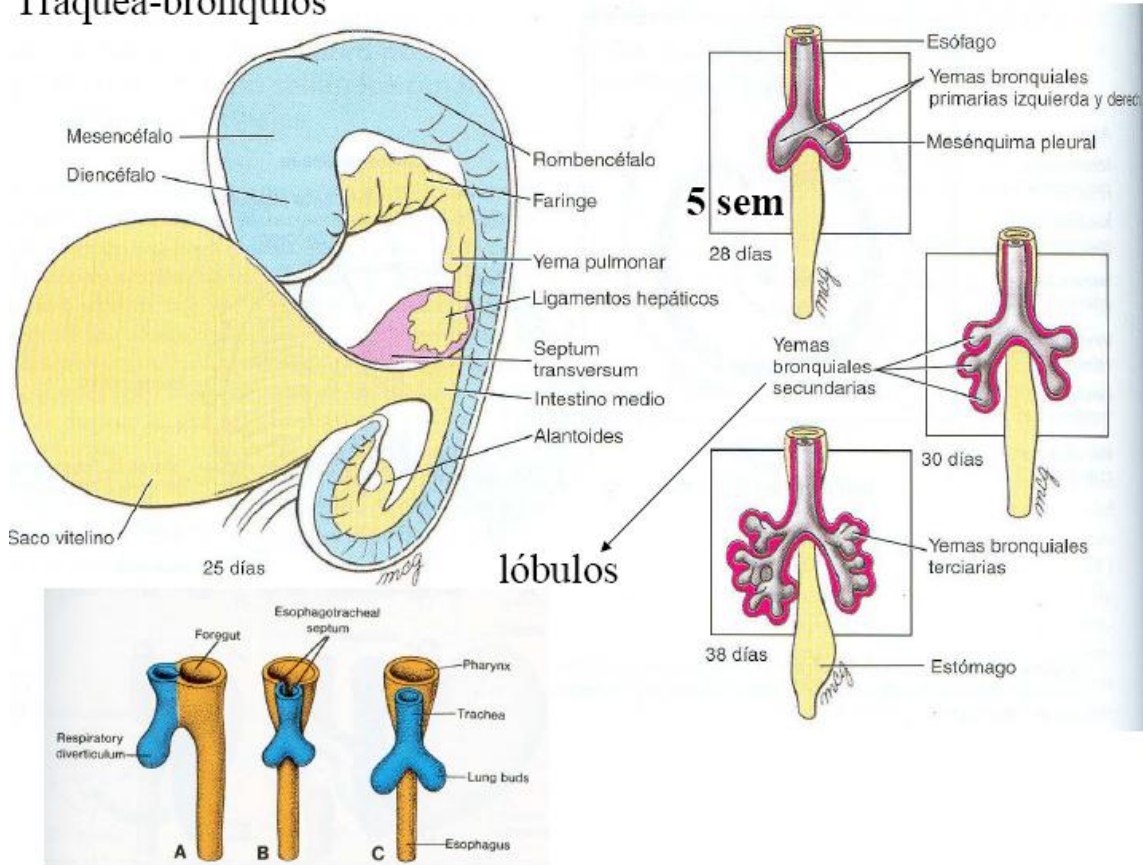


Figura1: Modelo esquemático que muestra los primeros cambios de la vía respiratoria inferior en el ser humano. (Larsen W, 2003)

1.2.- Desarrollo de la Laringe

El revestimiento epitelial de la laringe en la especie humana se desarrolla a partir del endodermo del extremo craneal del tubo laringotraqueal. Los cartílagos de la laringe derivan de los cartílagos del cuarto y sexto pares de arcos branquiales. Posteriormente, el mesénquima del extremo craneal del tubo laringotraqueal prolifera con rapidez para dar origen a las tumefacciones aritenoides en pares que crecen hacia la lengua, lo cual, convierte la hendidura laringotraqueal en una estructura llamada glotis primitiva, con un orificio laríngeo en forma de T (entrada) y transforma la luz laríngeo en una hendidura estrecha. El epitelio laríngeo prolifera con rapidez, lo que origina la oclusión temporal de la

luz laríngea durante la octava semana, ésta vuelve a recanalizarse aproximadamente en la décima semana (Moore y Persaud, 2003).

Durante este proceso, se forman los ventrículos laríngeos; los que están limitados por unos repliegues de mucosa que se convierten en los pliegues vocales (cuerdas vocales verdaderas) y los pliegues vestibulares (cuerdas vocales falsas). La epiglotis o glotis definitiva se desarrolla a partir de la parte caudal de la eminencia hipobranquial, como una saliente que se produce por la proliferación de mesénquima en los extremos ventrales del tercer y cuarto arcos branquiales. La parte rostral de esta eminencia es la porción faríngea de la lengua. Como los músculos laríngeos se desarrollan a partir de los mioblastos del cuarto y sexto arcos branquiales, son innervados por las ramas laríngeas del nervio vago. El crecimiento de la laringe y la epiglotis es rápido durante los primeros tres años de vida tras el nacimiento, momento en que la epiglotis ha alcanzado su forma adulta en el ser humano (Moore y Persaud, 2003).

1.3.- Desarrollo de la Tráquea

El revestimiento endodérmico del tubo laringotraqueal distal a la laringe se diferencia en epitelio y glándulas de tráquea y epitelio pulmonar. El cartílago, tejido conjuntivo y músculos de la tráquea derivan del mesénquima esplácnico que rodea al tubo laringotraqueal (Moore y Persaud, 2003).

1.4.- Desarrollo de los Bronquios

La yema pulmonar en forma de bulbo, que se desarrolla en el extremo caudal del divertículo respiratorio durante la cuarta semana, se divide dicotómicamente en dos yemas bronquiales derecha e izquierda (Larsen W, 2003) similares a una protuberancia. Estas yemas endodérmicas crecen hacia los conductos pericardioperitoneales, los primordios de las cavidades pleurales (Moore y Persaud, 2003).

Junto al mesénquima esplácnico que los rodea, las yemas bronquiales se diferencian en bronquios y en sus ramificaciones pulmonares. En los seres humanos, el bronquio derecho embrionario es más grande que el izquierdo y se orienta en sentido más vertical, condición que se mantiene después del nacimiento.

Los bronquios primarios o principales se subdividen en bronquios secundarios que originarán los lóbulos pulmonares: tres en el pulmón derecho y dos en el izquierdo. Durante la sexta semana, la cuarta generación de ramificaciones dará lugar a 10 bronquios terciarios en cada lado; estos se convertirán en los segmentos broncopulmonares del pulmón maduro (Larsen W., 2003).

En la parte derecha, el bronquio secundario superior forma el conducto del lóbulo superior del pulmón, mientras que el bronquio secundario inferior se subdivide en dos bronquios, uno para el lóbulo medio del pulmón derecho y otro para el lóbulo inferior. En la izquierda, los dos bronquios secundarios corresponden a los lóbulos superior e inferior del pulmón (Moore y Persaud, 2003).

Cada bronquio secundario origina una nueva generación de bronquios, los bronquios segmentarios o terciarios; diez en el pulmón derecho y ocho en el izquierdo al término de la séptima semana. Cada bronquio terciario, junto con la masa de mesénquima que lo circunda constituye el primordio de un segmento broncopulmonar. Alrededor de la vigésimo quinta semana se han formado cerca de 17 ramificaciones; los bronquiolos respiratorios. En la decimosexta semana, aproximadamente después de 14 ramificaciones más, el árbol respiratorio produce pequeñas ramas denominadas bronquiolos terminales (Larsen, W 2003).

Entre la decimosexta y vigésimo octava semanas, cada bronquiolo terminal se divide en dos o más bronquiolos respiratorios y el tejido mesodérmico que rodea a estas estructuras se vasculariza intensamente (Larsen W, 2003).

En la vigésimo octava semana, los bronquiolos respiratorios comienzan a producir una última generación de ramas, las que se desarrollan en progresión céfalocaudal, apareciendo primero en los bronquiolos terminales más cefálicos. En la trigésimo sexta semana, las ramas terminales se revisten de una densa red de capilares recibiendo la denominación de sacos terminales (alvéolos terminales) (Larsen W, 2003).

Junto con el desarrollo de los bronquios, se forman placas cartilaginosas a partir del mesénquima esplácnico circundante, la musculatura lisa, el tejido conjuntivo bronquial y pulmonar y los capilares pulmonares (Moore y Persaud, 2003).

A medida que los pulmones se desarrollan adquieren una capa de pleura visceral del mesénquima esplácnico del celoma embrionario. Dada su expansión, los pulmones y cavidades pleurales crecen en sentido caudal hacia el mesénquima de la pared corporal y prontamente se encuentran cerca del corazón. La pared torácica del cuerpo se recubre de una capa de pleura parietal, que deriva del mesodermo somático (Moore y Persaud, 2003).

Algunas alteraciones clínicas se relacionan directamente con la alteración de la diferenciación de la yema pulmonar o de las yemas bronquiales. La más grave, la agenesia pulmonar, se produce cuando la yema pulmonar no se ramifica en bronquios derecho e izquierdo y no continúa creciendo. Los errores en el patrón de ramificación pulmonar (morfogénesis por ramificación) durante los períodos embrionario y fetal producen alteraciones que varían desde un número anormal de lóbulos pulmonares o segmentos bronquiales a la ausencia de un pulmón completo (Larsen W, 2003).

Las alteraciones pulmonares se deben a cambios moleculares y celulares intrínsecos de la morfogénesis por ramificación. Sin embargo, la causa primaria de la hipoplasia pulmonar (disminución el número de segmentos pulmonares o de sacos aéreos terminales) suele representar una respuesta a ciertas condiciones que disminuyen el volumen de la cavidad pleural, y por tanto restringen el crecimiento de los pulmones (Larsen W, 2003).

Otra alteración es la hernia diafragmática congénita, la cual consiste en una ausencia de cierre de los canales pericardioperitoneales que permite el paso de vísceras abdominales en desarrollo a la cavidad pleural. Si la masa de vísceras desplazadas es lo suficientemente grande, entorpecerá el crecimiento del pulmón del lado afectado. Las hernias diafragmáticas congénitas se producen en 1 de cada 2500 nacidos vivos (Larsen W, 2003).

1.5.- Desarrollo Pulmonar

El desarrollo del pulmón humano se extiende desde la etapa de organogénesis, durante el periodo embrionario, hasta aproximadamente los 8 años después del nacimiento (Periodo Postnatal). Tal desarrollo se divide en cinco fases; etapa embrionaria, etapa pseudoglandular, etapa canalicular, etapa sacular y etapa alveolar en las cuales se describen las características morfológicas del proceso de maduración de dicho órgano.

El desarrollo pulmonar de ratas ocurre de manera similar al desarrollo pulmonar humano, diferenciándose los días en que ocurren las etapas de éste (Tabla 1). Se inicia con la etapa embrionaria, hasta los 30 días postnatales aproximadamente (Warbuton et al., 2000). Dicho desarrollo se divide en las mismas fases mencionadas en el párrafo anterior, y las principales características de cada una de ellas se explican en la tabla número 1.

TABLA 1: ETAPAS DEL DESARROLLO PULMONAR EN RATAS Y HUMANOS.

FASE	PRINCIPALES EVENTOS EN RATAS	PRINCIPALES EVENTOS EN HUMANOS
<i>Embrionaria</i>	<p>0 – 13 días de gestación</p> <p>Desarrollo de Vías Aéreas mayores y lóbulos unilobular izquierdo y lóbulo tetralobular derecho.</p> <p>Aparición de arteria pulmonar</p>	<p>4 – 7 semanas de gestación</p> <p>Formación del divertículo respiratorio.</p> <p>Formación de lóbulos derecho e izquierdo.</p> <p>Formación de arterias, venas pulmonares y red capilar circundante a bronquiolos.</p>
<i>Pseudoglandular</i>	<p>9.5 – 16.6 días de gestación</p> <p>Desarrollo del árbol bronquial, ramificación de yemas bronquiales.</p> <p>El crecimiento vascular sigue al de la vía aérea.</p>	<p>7 – 17 semanas de gestación</p> <p>Ramificación de yemas bronquiales y formación de conductos de vía aérea.</p> <p>Crecimiento vascular continúa.</p>
<i>Canalicular</i>	<p>16.6 – 17.4 días de gestación</p> <p>Crecimiento de lecho capilar (angiogénesis).</p> <p>Diferenciación epitelial.</p> <p>Crecimiento considerable del pulmón.</p>	<p>17 – 27 semanas de gestación</p> <p>Diferenciación epitelial, formación de sacos alveolares.</p> <p>Producción de neumocitos tipo II</p>
<i>Sacular</i>	<p>17.4 – 5 días postnatal</p> <p>Formación de conductos y sacos alveolares en los bronquiolos terminales.</p> <p>Incremento de células tipo II.</p> <p>Establecimiento de barrera</p>	<p>28 – 36 semanas de gestación</p> <p>Formación de un mayor número de conductos y sacos alveolares en bronquiolos terminales.</p> <p>Aumento de la superficie de intercambio gaseoso.</p>

	intercambio gaseoso a nivel de sacos terminales.	Aparición de alveólos.
<i>Alveolar</i>	5 – 30 días postnatal Adelgazamiento barrera alveolo-capilar. Aumento en número y tamaño de alvéolos y capilares.	36 semanas de gestación – 2-3 años postnatal Aumento en el número de neumocitos tipo I y II. Aumento de la superficie de intercambio gaseoso. Aumento en tamaño de venas, arterias y lecho capilar.

Tabla 1. Representa una comparación de los eventos principales del desarrollo pulmonar de ratas y humanos. (Dr. Iñiguez y Sánchez, 2008), (Joshi and Kotecha, 2007), (Weng et al, 2006), (Warburton et al., 2000).

1.5.1.- Etapa Embrionaria (4-7 semanas)

La etapa embrionaria del desarrollo pulmonar abarca desde la formación inicial del divertículo respiratorio hasta la de los principales segmentos broncopulmonares. El brote pulmonar se origina a partir de células epiteliales del endodermo del intestino primitivo anterior, como un divertículo ventral alrededor del día 24-26 de gestación, que penetra hacia el mesénquima circundante y crece por divisiones dicotómicas en dirección caudal, estas células epiteliales endodermales del divertículo invaden el mesénquima circundante para formar diversas estructuras proximales del árbol traqueobronquial (Joshi and Kotecha, 2007).

El epitelio de todo el árbol respiratorio, desde las vías aéreas centrales hasta los neumocitos que recubren los alvéolos, deriva de este brote, mientras que el cartílago, músculo liso, tejido conectivo y vasculatura pulmonar tienen su origen en el mesénquima (Dr. Iñiguez y Sánchez, 2008).

Alrededor del día 33, ocurre la división en las dos ramas principales y los brotes pulmonares yacen a ambos lados del futuro esófago. De acuerdo a estudios existentes, es el mesoderma circundante el que regula la ramificación del árbol traqueobronquial. Los bronquios lobares inician su formación por el día 37 y hacia el fin de esta etapa (día 42) ya pueden ser reconocidos los 19 segmentos pulmonares. Durante este período, los pulmones en desarrollo crecen hacia el interior de las cavidades pleurales bilaterales y comienzan a llenarlas; éstas representan los principales componentes de la cavidad torácica del cuerpo por encima del pericardio (Dr. Iñiguez y Sánchez, 2008).

Las arterias y venas pulmonares se desarrollan como un brote vascular desde el 6to. arco aórtico y continúa creciendo por vasculogénesis a partir de las 4-16 semanas (Joshi and Kotecha, 2007). Para el día 34 de gestación, ya se ha formado una red de capilares alrededor de cada futuro bronquio principal, y este plexo se comunica en dirección cefálica con el saco aórtico mediante las arterias pulmonares y hacia caudal con el seno venoso (futura aurícula izquierda) mediante las venas pulmonares. En este momento ya hay evidencia de células sanguíneas circulantes. Los primeros vasos pulmonares se formarían desde el mesénquima subyacente por el proceso de

vasculogénesis, que corresponde a la diferenciación celular para formar células endoteliales únicas que se organizan en tubos capilares (Dr. Iñiguez y Sánchez, 2008).

Este primer tiempo del desarrollo del pulmón es determinante de la morbimortalidad posnatal. Anormalidades estructurales como la agenesia o estenosis traqueal o pulmonar pueden ser incompatibles con la vida, mientras que otras formas de anomalías tales como traqueo malacia o bronco malacia, lóbulos ectópicos y quistes lobulares congénitos pueden llevar a una significativa morbilidad respiratoria. Malformaciones arterio venosas también se pueden formar en esta etapa durante la vasculogénesis (Joshi and Kotecha, 2007).

De manera similar, el desarrollo pulmonar en ratas durante la etapa embrionaria que transcurre de los días 0 al 13, se caracteriza por la elongación de la pared ventral del esófago primitivo, alrededor de los días 9 a 9.5 que crece en sentido caudal hacia el mesénquima circundante para dar origen a la laringe, la tráquea (Warburton et al, 2000) y las yemas bronquiales derecha e izquierda que posteriormente se dicotomizan .Finalmente, el pulmón forma una estructura de tipo glandular (Weng et al, 2006).

El proceso de ramificación posterior en el ratón es diferente al de los seres humanos, dado que en ellos los brotes bronquiales darán origen a un lóbulo unilobular izquierdo, y un lóbulo tetralobular derecho (Figura 2) (Warburton et al., 2000). La arteria pulmonar durante este tiempo surge como una rama de la sexta pareja de arterias del arco branquial y desciende en los pulmones de los embriones (Warburton et al., 2000).

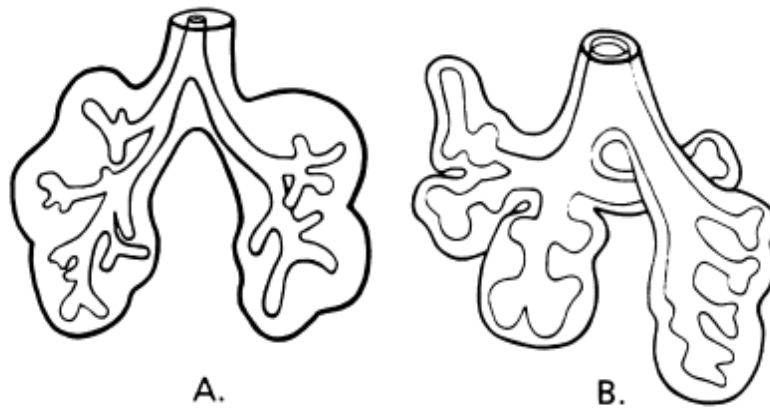


Figura 2. Diferencias en el Desarrollo Pulmonar entre especies de rata y humana (Warburton et al, 2000).

A. Especie Humana	B. Especie Rata
<p>Formación de pulmones de embriones humanos de 7 – 8 semanas de gestación. Los bronquios principales se ramifican en dos lóbulos y en bronquios segmentarios. Existen tres lóbulos en el pulmón derecho y dos en el pulmón izquierdo. (Warburton et al, 2000).</p>	<p>Formación de pulmones de embriones de ratas de 12 días de gestación. Existen cuatro lóbulos en el pulmón derecho y uno en el pulmón izquierdo. (Warburton et al, 2000).</p>

1.5.2.- Etapa Pseudoglandular (7 – 17 semanas)

Es el período de mayor formación y crecimiento del sistema de conductos en el interior de los segmentos broncopulmonares antes de que sus porciones terminales den lugar a los componentes respiratorios. En el ser humano, en esta etapa se desarrollan las vías aéreas principales, a través de sucesivas divisiones dicotómicas. El nombre de esta etapa deriva del aspecto glandular en los estudios histológicos, ya que los bronquiolos terminan en forma ciega en el estroma primitivo. Desde el mesénquima se desarrollan las células de la pared bronquial que darán origen al cartílago, músculo liso bronquial y glándulas submucosas. El número definitivo de bronquiolos terminales se ha completado al final de esta etapa (Dr. Iñiguez y Sánchez, 2008).

Durante este periodo, comienza la formación del sistema arterial pulmonar. Los vasos en su crecimiento corren paralelamente a los principales conductos en desarrollo. En la medida que cada nuevo brote penetra el mesénquima, un nuevo plexo capilar lo rodea como un halo para unirse luego con los vasos preexistentes, extendiendo así los vasos arteriales y venosos. La vasculogénesis continúa hasta la semana 17, al cabo de la cual todas las vías aéreas preacinares y sus respectivas venas y arterias ya se han formado, con poco mesénquima indiferenciado remanente entre estas estructuras (Dr. Iñiguez y Sánchez, 2008).

La etapa pseudoglandular está marcada por la bifurcación de los conductos bronquiales de la vía aérea, red capilar y diferenciación progresiva de células epiteliales para formar estructuras adultas del cartílago, glándulas submucosas, músculo liso bronquial y células epiteliales. Éste es el periodo de división más rápida de segmentos de la vía aérea. En la semana 14, el 70% del total de la vía aérea ya está formada y al final de la semana 17, la formación de conductos y bronquios terminales es completa (Joshi and Kotecha, 2007).

El patrón de división y ramificación de la vía aérea está determinado por la interacción epitelio-mesénquima. El mesénquima bronquial induce la ramificación de la tráquea, mientras que el mesénquima traqueal inhibe la ramificación del árbol bronquial. A medida que la etapa pseudoglandular progresa, el epitelio pseudoestratificado temprano es reemplazado por células columnares proximales y células cuboideas distales. Estas

últimas, son ricas en glicógeno y representa el tipo inmaduro de células tipo II. Así, durante la etapa pseudoglandular toda estructura preacinar, incluyendo la vía aérea preacinar, arterias pulmonares y venas son formados. La falta de división normal de las estructuras de la vía aérea puede generar hipoplasia pulmonar, malformación adenomatoide quística, mientras que la ausencia del cierre de la membrana pleuroperitoneal puede dar origen a una hernia diafragmática congénita (Joshi and Kotecha, 2007).

La etapa pseudoglandular en el Desarrollo Pulmonar en ratas ocurre dentro de los días 9.5 al 16.6 de gestación (Warburton et al., 2000), y en él se destaca el aumento de ramificaciones de las yemas bronquiales en el tejido mesenquimal, para formar los conductos de las vías respiratorias de los pulmones, los cuales aún tienen poco lumen (Weng et al., 2006).

1.5.3.- Etapa Canalicular (17 – 27 semanas)

Durante esta etapa en el ser humano, los bronquiolos terminales se dividen para formar los bronquiolos respiratorios y ductos alveolares en forma de sacos, los que constituyen las estructuras acinares. Ocurre un progresivo adelgazamiento del epitelio, con aproximación de los capilares que yacen por debajo de éste. El epitelio cuboidal se diferencia y los ductos alveolares están revestidos de células alveolares (neumocitos) tipo II - las que darán origen a los neumocitos tipo I - que recubrirán los sacos distales adelgazándose en la medida que se relacionan estrechamente con los capilares (Dr. Iñiguez y Sánchez, 2008).

Hacia las 24 semanas de gestación del desarrollo embrionario humano, ya se ha establecido la barrera alvéolo-capilar, con un grosor similar al del adulto y el área disponible para el intercambio gaseoso permite que algunos prematuros extremos puedan sobrevivir. Los neumocitos tipo II aumentan su maquinaria metabólica, preparándose para sintetizar surfactante y en este mismo periodo ya se pueden observar proteínas del surfactante en la forma de cuerpos lamelares en su citoplasma. Hacia el final de esta etapa, la periferia del pulmón está constituida por sáculos transitorios, de paredes finas, que se han formado gracias a la disminución en la cantidad de mesénquima. Los

capilares en esta etapa se forman por angiogénesis y las células en división se encuentran en los túbulos capilares más que en el mesénquima indiferenciado (Dr. Iñiguez y Sánchez, 2008).

Durante la etapa canalicular del Desarrollo Pulmonar en ratas que transcurre entre los 16.6 al 17.4 (Warburton et al., 2000) días de gestación, el pulmón crece considerablemente, dado los múltiples bronquiolos existentes a esta altura. Los capilares están muy organizados a nivel de bronquiolos respiratorios terminales, mientras que las células epiteliales experimentan cambios morfológicos para convertirse en células epiteliales cuboidales (Weng et al, 2006).

1.5.4.- Etapa Sacular (28 – 36 semanas)

En este período en el desarrollo humano, continúa la división de la vía aérea periférica. Cada bronquiolo terminal ha originado generaciones de bronquiolos respiratorios, de los cuales se produce una generación de ductos transitorios, los que a su vez generan 3 sáculos que desembocan en los sáculos terminales. De este modo, aumenta el tamaño de la vía aérea periférica y crece la superficie para el intercambio gaseoso en la medida que la pared continúa adelgazándose (Dr. Iñiguez y Sánchez, 2008).

Los neumocitos tipo II aumentan el número y continúa la diferenciación hacia neumocitos tipo I (Joshi and Kotecha, 2007). Las arterias que irrigan los ductos alveolares se desarrollan desde las 25 semanas hasta los 18 meses después del nacimiento. Los alvéolos comienzan a aparecer después de las 30 semanas y junto a ellos se van desarrollando los pequeños vasos pre y post capilares (Dr. Iñiguez y Sánchez, 2008).

La etapa Sacular en el Desarrollo Pulmonar de ratas corresponde a los días 17.4 hasta los 5 días postnatal, en la cual existe la formación de conductos y sacos alveolares en los bronquiolos terminales (Weng et al., 2006) y el incremento de las células tipo II (Warburton et al., 2000). Además, los conductos capilares establecen barreras de sangre-

1.5.5.- Etapa Alveolar (36 semanas a 2-3 años postnatal)

El inicio de esta etapa en el Desarrollo Pulmonar humano, se define por la aparición de pequeñas prominencias a ambos lados de las paredes saculares, en los puntos donde se depositaron fibras elásticas. Éstas crecen en forma perpendicular al espacio aéreo, dividiendo los sáculos en forma incompleta en unidades menores, los alvéolos, los que también se formarán en menor medida en bronquiólos respiratorios y en los ductos transitorios. Estos septos secundarios consisten en una doble asa capilar separada por una vaina de tejido conectivo (Dr. Iñiguez y Sánchez, 2008).

Este período tiene lugar a una marcada proliferación de todos los tipos celulares. Las células mesenquimáticas proliferan, depositando la matriz extracelular necesaria y los neumocitos tipo I y II aumentan su número para delinear las paredes alveolares, donde aproximadamente un 85-90% de la superficie estará recubierta de neumocitos tipo I (Dr. Iñiguez y Sánchez, 2008).

En la medida que se forman nuevos alvéolos, también se forman nuevos capilares por angiogénesis. Por otra parte, se incrementa el tamaño de las venas y arterias proximales, acomodando así el aumento de flujo y volumen sanguíneo al lecho capilar en crecimiento. Los procesos mencionados tienen como resultado un aumento en la superficie de intercambio gaseoso y una preparación de las células de la vía aérea que responderán al ambiente extrauterino (Dr. Iñiguez y Sánchez, 2008).

Durante el desarrollo pulmonar en ratas, la etapa alveolar ocurre desde el quinto al trigésimo día postnatal (Warburton et al., 2000). En esta etapa, la barrera alveolo-capilar se hace progresivamente más fina y delgada, con una capacidad cada vez mayor para el intercambio gaseoso a nivel alveolar. El número y el tamaño de los capilares y alveolos se incrementan notablemente (Weng et al., 2006).

La etapa de desarrollo alveolar al nacer varía ampliamente entre especies, en el ratón y la rata es en gran medida después del parto, mientras que en conejillo de indias, las ovejas y los humanos se inicia en el útero y está relativamente avanzado en el nacimiento (Warburton et al., 2000).

2.- Vasculogénesis

El desarrollo vascular en el pulmón ha sido mostrado como determinante en la maduración de la estructura pulmonar, y una correcta angiogénesis y vasculogénesis son necesarias para la construcción con éxito del órgano (Voelkel et al, 2006, Van et al, 2005).

Las interacciones entre las vías aéreas y los vasos sanguíneos son críticas para el desarrollo pulmonar normal, sugiriendo que una coordinada relación de factores de crecimiento vasculares por parte de las células epiteliales respiratorias promovía el desarrollo alveolar (Del Moral et al., 2006).

Según estudios de DeMello (1997), durante la fase pseudoglandular en el día 14 de gestación, el plexo vascular que se forma en el mesénquima pulmonar es aún escaso. A medida que los días de gestación pasan, puede observarse la presencia de grandes vasos centrales bien establecidos generando un circuito arterio-capilar-venosa, esto alrededor del día 18 correspondiente a la etapa canalicular del desarrollo pulmonar (DeMello et al, 1997).

Recientemente, se ha visto que el desarrollo vascular se produce durante todas las fases del desarrollo pulmonar y consta de tres procesos: la angiogenesis, que da lugar a los vasos centrales desde el brote de vasos preexistentes (Papaioannou et al., 2006, Acarregui et al., 1999); vasculogenesis, que da lugar a los vasos periféricos por diferenciación in situ de células mesenquimales en hemangioblastos (Hislop A., 2002) y fusión entre los sistemas central y periférico creando la circulación pulmonar (Papaioannou et al, 2006). Sumado a esto, análisis genéticos han demostrado que las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular, así como factores de crecimiento y de transcripción estaban implicados en el desarrollo vascular (Dr. Iñiguez y Sánchez, 2008).

Se han identificado muchos factores que bien favorecen o inhiben la angiogénesis (Pusztaszeri et al., 2006). Algunos de los principales reguladores pro-angiogénicos incluyen factores de crecimiento tales como el VEGF, el factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF) y los factores de crecimiento transformante alfa y beta (TGF- α y TGF- β). Otros factores proangiogénicos incluyen la interleuquina-8 (IL-8), la leptina, la

angiogenina y el marcador CD31. Este último, es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas, es una glicoproteína de transmembrana designado como pecam-1 (plaquetas de adherencia de la célula endotelial molecular 1), el cual, recientemente ha sido reconocido por su desempeño angiogénico (Pusztaszeri et al., 2006).

Entre los factores que limitan la angiogénesis se encuentran la angiostatina, la endostatina, la trombospondina-1, la angiopoyetina-2, el interferón-alfa y la IL-12. No está claro el papel exacto de muchos de estos factores, si bien se ha identificado la función de algunos de ellos parece que el VEGF es el principal motor de la vasculogénesis y la angiogénesis (Gerecht-Nir et al., 2004).

Su expresión en la embriogénesis es esencial para el desarrollo de la vasculatura: la alteración de ambos alelos del VEGF es letal y da lugar a una ausencia casi completa de vasculatura; la supresión de uno de los genes del VEGF provoca anomalías vasculares letales (Ferrara et al., 1997).

En ausencia de VEGF, los vasos inmaduros involucionan. Otros factores con papeles decisivos en la regulación de la angiogénesis incluyen la Ang1 y la efrina-B2, que son necesarias para la posterior remodelación y maduración de los nuevos vasos (Gerecht-Nir et al 2004).

Estudios recientes han puesto de manifiesto que uno de los factores más importantes relacionado con el proceso descrito anteriormente era claramente el VEGF (Del Moral et al., 2006).

En ratas de aproximadamente 10.5 días se ha descrito una apariencia similar a una circulación terminal, aparentemente los vasos pulmonares son formados en el mesénquima mediante un proceso de vasculogénesis (Hislop A., 2005). Estos capilares se unen para formar una red de vasos sanguíneos junto a las vías respiratorias. A medida que se producen nuevos brotes en el mesénquima, se forma un nuevo plexo como un halo y se añade a la circulación periférica para la ampliación de las arterias y las venas, esta formación de los vasos se produce hasta la semana 17 de gestación (Hislop A., 2005).

En la fase canalicular, la división de las vías respiratorias para formar los bronquiolos respiratorios y el saco alveolar en forma de los conductos alveolares se acompaña de adelgazamiento del epitelio, provocando que los capilares lleguen a estar inmediatamente por debajo de éste (Hislop A., 2005). En el pulmón humano, hay un sistema circulatorio en segundo lugar, la circulación bronquial, que lleva la sangre sistémica a las paredes de las vías respiratorias y los grandes vasos pulmonares. Se identificó por primera vez en los pulmones alrededor de 8 semanas de gestación (Hislop A., 2005).

El control del desarrollo de las vías respiratorias obedece a un grupo de genes Hox, factores de transcripción y factores de crecimiento. Este tema ha sido poco estudiado, pero hay evidencias de la interacción entre epitelios, el mesénquima y la formación de vasos sanguíneos (Hislop A., 2005).

La formación de nuevos capilares por vasculogénesis se produce durante todas las edades de gestación, lo cual sugiere algún tipo de control por parte de las células endoteliales. El Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) es conocido por ser un factor implicado en la angiogénesis y vasculogénesis y ha sido demostrado en las células epiteliales de 12 fetos humanos y 13 pulmones de ratón en cultivo (Hislop A., 2005).

Los receptores de VEGF (FLT-1 y Flk-1) se expresan en el endotelio a los 38 días de gestación en el hombre. Los ratones deficientes en Flk-1 no tienen presentan un desarrollo normal de los vasos sanguíneos. Estudios demuestran que 15 ratones con déficit de VEGF no logran llegar a término, incluso en presencia de un alelo (Hislop A., 2005).

3.- Interacción epitelio mesénquima.

La matriz extracelular (MEC) del tejido pulmonar, está compuesto por mesénquima, siendo éste el origen embriológico del tejido conjuntivo presente en todos los órganos, incluyendo al pulmón. (Warburton et al., 1999).

Dentro de su rol principal, la MEC está encargada de regular el desarrollo y la función de la mayoría de las células de nuestro organismo. Provee orden en el espacio

extracelular y está involucrada en varios ámbitos, relacionados con el establecimiento, separación y mantenimiento de tejidos y órganos. Destacan también la presencia de ligandos, encargados de activar cascadas de señalización hacia las células, regulando procesos como proliferación, supervivencia y diferenciación celular (Kneis and Vale, 1999).

Es sabido que para la excreción, absorción de nutrientes y el intercambio de gases, en animales vertebrados, se requiere de amplias superficies epiteliales especializadas de diversa índole. Muchas de estas superficies adoptan la forma de estructuras tubulares generadas por la *morfogénesis ramificada*, en la cual un epitelio invade el tejido conjuntivo embrionario (mesénquima), formando un órgano compuesto a través de interacciones recíprocas entre el epitelio y su mesénquima, el pulmón representa un claro ejemplo de ello (Alberts y col., 2004).

El proceso global del desarrollo pulmonar humano, depende de intercambios de señales en ambas direcciones entre los brotes del epitelio en crecimiento y el mesénquima que van invadiendo (Alberts y col., 2004), esta interacción es altamente específica debido a que sólo el mesénquima pulmonar puede inducir al desarrollo pulmonar (Warburton et al., 1999).

Para el normal funcionamiento de tal interacción, es necesario contar con una alta organización a nivel celular, en la cual histológicamente se describen distintos elementos. Los estudios de las últimas seis décadas han demostrado que la morfogénesis por ramificación del primordio respiratorio se regula por la interacción entre el primordio y el mesodermo que lo rodea (Larsen W, 2003).

Estudios recientes demuestran que varios factores moleculares producidos únicamente por el mesénquima y el revestimiento endodérmico en crecimiento, desempeñan un esencial papel en el patrón de la ramificación en zonas proximales del árbol respiratorio, de tal forma que, si el mesénquima en la región de la bifurcación de la yema bronquial se reemplaza con mesénquima traqueal se verá inhibida la posterior ramificación. Contrariamente, cuando se reemplaza el mesénquima traqueal con el de la región de las yemas bronquiales en ramificación se estimula la ramificación de la tráquea (Larsen W, 2003).

Basado en estos experimentos, se han visto implicados los elementos de la matriz extracelular en la estimulación y la inhibición de la ramificación. Por ejemplo, se piensa que el colágeno tipo IV y V, la laminina, la fibronectina y la tenascina desempeñan un papel permisivo o estimulador en la ramificación de las ramas bronquiales (Larsen W, 2003).

Varios factores de crecimiento se han implicado en la regulación de la morfogénesis por ramificación pulmonar, incluido el ácido retinoico, el factor de crecimiento epitelial (EGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el FGF, el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), el factor fibroblasto neumocítico (FPF), el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), el factor transformador de crecimiento- α (TGF- α),) y el Wnt-2. Estos factores de crecimiento y sus receptores se expresan durante diferentes fases del crecimiento pulmonar y de la ramificación, lo que está en consonancia con la función que se atribuye en este complejo proceso (Larsen W, 2003).

En los últimos años, varios actores claves, en particular los miembros de las principales vías de señalización que median esta interacción, se han identificado.

El mesodermo que rodea al endodermo controla el grado de ramificación en el tracto respiratorio. Diversos experimentos de recombinação de tejidos han demostrado que el mesodermo que rodea a la tráquea inhibe la ramificación, en tanto el que rodea a las yemas bronquiales la favorece. Si se combina endodermo traqueal con mesodermo bronquial, se produce una gemación anómala. A la inversa, si se coloca mesodermo traqueal alrededor del endodermo bronquial se inhibe la gemación bronquial. El mesodermo de otros órganos, por ejemplo las glándulas salivales, puede inducir la gemación del endodermo bronquial, pero se induce un patrón de ramificación característico del mesodermo: un mesodermo capaz de promover o sostener la gemación tiene que mantener una alta tasa de proliferación de las células epiteliales (Carlson et al, 2003).

En general, el patrón del órgano epitelial está determinado en su mayor parte por el mesodermo. La diferenciación estructural y funcional del epitelio es una propiedad específica de las células epiteliales, pero el fenotipo epitelial coincide con la región de procedencia del mesodermo (Carlson et al, 2003).

4.- Factores de crecimiento

El desarrollo pulmonar es un proceso complejo que implica ramificación, morfogénesis y diferenciación celular, junto con la distribución coordinada de elementos vasculares, nerviosos, y tejidos de soporte. Un factor integral en el establecimiento y mantenimiento de esta organización estructural es la respuesta de las células a diferentes mediadores, principalmente factores de crecimiento y citocinas. (Mager et al., 2007). Complejas interacciones ocurren entre los componentes de la matriz extracelular, epitelio y mesénquima, las células madre proliferan y se diferencian a células distintas, lo que da como resultado formación de tejido pulmonar conjunto. (Weng et al., 2006).

En consecuencia, cualquier alteración en la expresión normal de estos mediadores puede dar lugar a un desarrollo anormal de las vías respiratorias. Además, existe evidencia creciente que sugiere un papel importante de los factores de crecimiento y sus receptores en el proceso de remodelación asociada con enfermedades respiratorias como el asma y displasia broncopulmonar (DBP). (Mager et al., 2007).

Aunque existe una multitud de factores de crecimiento, muchos focos se han centrado particularmente en un subconjunto relacionados con el desarrollo pulmonar, incluidos el factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), los cuales ejercen un efecto positivo sobre la morfogénesis del pulmón (Tabla 2). En contraste, el factor de crecimiento transformante Beta (TGF- β), ejerce un efecto inhibitor sobre la proliferación de células epiteliales del pulmón y por lo tanto regulan negativamente la morfogénesis de éste. (Warburton et al., 2003)

TABLA 2. PRINCIPALES FACTORES DE CRECIMIENTO Y SUS FUNCIONES

Ligando Señalizador	Receptores	Algunas respuestas
Factor de Crecimiento semejante a la insulina (IGF I e IGF II)	Receptor de IGF I	Estimula el crecimiento y la supervivencia celular
Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF)	Receptor de VEGF	Estimula la angiogénesis
Factor de Crecimiento derivados de plaquetas (PDGF AA,BB,AB)	Receptores de PDGF (α y β)	Estimulan la supervivencia, crecimiento y proliferación de varios tipos celulares
Insulina	Receptor de Insulina	Estimula la utilización de carbohidratos y la síntesis proteica

Tabla original de principales factores de crecimiento (Alberts et al., 2004)

4.1 Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF- β)

El Factor de Crecimiento Transformante- β , corresponde a una gran familia de proteínas diméricas de secreción con gran similitud estructural que actúan como mediadores locales regulando una variedad de procesos celulares, incluyendo la proliferación, diferenciación, producción de matriz extracelular y muerte celular (Alberts y col., 2004).

La forma monomérica de los factores de crecimiento TGF- β contiene 110 - 140 aminoácidos y tiene una estructura compacta con cuatro hebras β antiparalelas y tres enlaces disulfuro intramoleculares. Estas forman una estructura denominada nudo de cistina. Una cisterna N-terminal adicional en cada monómero une los monómeros del TGF- β en homodímeros y heterodímeros, las diferentes combinaciones pueden incrementar la diversidad funcional de estas proteínas (Lodish y col., 2005).

El TGF- β es considerado como una proteína multifuncional debido a los efectos que tiene sobre los diferentes tipos celulares. Es el inhibidor más potente de proliferación en células mieloides, mesenquimales, epiteliales, linfoides, endoteliales y en varios tipos de células malignas. Es un fuerte estimulador de la síntesis y depósito de proteínas de matriz extracelular por parte de fibroblastos, osteoblastos y células endoteliales; además, induce la expresión de integrinas y receptores que median las interacciones celulares con proteínas de matriz extracelular. (Gálvez-Gastélum y col., 2004).

En los mamíferos la superfamilia del TGF- β se puede dividir en tres subfamilias principales: TGF- β , activina / inhibina / nodal y la proteína morfogenética ósea (BMP) (Lin et al., 2006). Todos ellos se han detectado en los pulmones embrionarios de ratón (Warburton et al., 2003).

La proteína morfogenética ósea (BMP), se identificó por su capacidad para inducir la formación ósea en células cultivadas. De las numerosas proteínas BMP reconocidas posteriormente, muchas ayudan a inducir pasos fundamentales en el desarrollo, así como la formación de células mesodérmicas y las células formadoras de tejido sanguíneo. Sin embargo, las tres isoformas humanas de TGF- β son conocidas por poseer efectos antiproliferativos potentes en muchos tipos de células de los mamíferos (Lodish y col., 2005). TGF- β , estimula además, la expresión de moléculas de adhesión celular y moléculas de la matriz extracelular. Durante el desarrollo pulmonar, este factor de crecimiento ejerce un efecto inhibitorio en la proliferación de células epiteliales y por lo tanto regula negativamente la morfogénesis de este órgano. (Warburton et al., 2003)

En mamíferos TGF- β posee 3 isoformas proteicas: TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, cada una codificada por un gen singular, expresado de una manera específica para el tejido y regulado por el desarrollo. Durante el desarrollo pulmonar de rata, la expresión de ARN mensajero (ARNm) de TGF- β 1 es muy importante en el mesénquima, (Liu et al., 2000), particularmente en el mesénquima subyacente del epitelio distal de los puntos de ramificación, (Warburton et al., 2003). Mediante el uso de transcripción inversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 eran fácilmente detectables en los primordios de pulmón a los 12-14 días de gestación. (Liu et al., 2000). El ARNm de TGF- β 2 se localiza principalmente en el epitelio de las vías aéreas distales en desarrollo. Las transcripciones TGF- β 3, se encuentran inicialmente en el

mesénquima traqueal, pero las señales TGF- β 3 son visibles en el epitelio de los bronquiolos crecientes durante la etapa pseudoglandular (día 14.5) del desarrollo pulmonar de rata. (Liu et al., 2000).

Las ratas que carecen de TGF- β 1 se desarrollan con normalidad, pero mueren en el primer o segundo mes de vida por una patología pulmonar agresiva (Warburton et al., 2003). Pulmón embrionario y cultivos celulares de tejido pulmonar revelan que TGF- β 2 juega un rol clave en la morfogénesis del proceso de ramificación, mientras que TGF- β 3 desempeña un papel clave en la regulación de la proliferación de células epiteliales alveolares durante la respuesta inmune (Warburton et al., 2003). Por lo que, finamente regulado, con concentraciones fisiológicas correctas y una adecuada distribución temporo-espacial de TGF- β , se concluye que TGF- β 1, 2 y 3 son esenciales para la morfogénesis pulmonar normal (Warburton et al., 2003).

Cada una de las isoformas de TGF- β , se sintetiza como parte de un precursor más grande que contiene un prodominio, este dominio es cortado a partir del precursor, pero permanece asociado de manera no covalente con el dominio maduro después de la secreción de la proteína (Lodish y col., 2005). La mayor parte de este factor de crecimiento se encuentra almacenado en la matriz extracelular como un complejo latente inactivo que contiene el precursor de TGF- β y una proteína de fijación al TGF- β unida en forma covalente, *proteína de fijación al TGF- β latente (LTBP)*. La fijación de LTBP por las proteínas de matriz extracelular como trombospondina o por ciertas integrinas de la superficie celular induce un cambio conformacional en LTBP que causa la liberación del TGF- β dimérico activo y maduro (Lodish y col., 2005).

4.1.1.- Señalización de TGF- β

La activación de TGF- β está dada por varios factores, entre ellos, un mecanismo particular de activación, iniciado por la unión del complejo latente del TGF- β 1 a la glucoproteína de matriz extracelular llamada trombospondina 1. (Gálvez-Gastélum y col., 2004).

TGF- β actúa mediante receptores asociados a enzimas que atraviesan una vez la membrana con dominios serina/treonina quinasa sobre la cara citosólica de la membrana

plasmática. Existen dos clases de receptores serina/ treonina quinasa tipo I y tipo II, las cuales son similares estructuralmente (Alberts y col., 2004.). Cada miembro de la superfamilia de TGF- β posee una combinación característica de receptores I y II, siendo ambos necesarios para la señalización. El ligando se une primero y activa un homodímero de receptores de tipo II, el cual recluta, fosforila y activa un homodímero del receptor tipo I, formando así un complejo receptor tetramérico.

Una vez activado el complejo receptor, para transmitir la señal rápidamente al núcleo, utiliza una estrategia de señalización similar a la vía Jak-STAT. El receptor tipo I se une directamente y activa una proteína reguladora de la expresión génica en estado latente de la familia Smad (figura 4) (Alberts y col., 2004). Existen ocho proteínas diferentes Smad, que constituyen las tres categorías funcionales: el receptor regulador Smad (R-Smad), el co-mediador Smad (co-Smad), y el Smad inhibitorias (I-Smad), R-Smads (Smad1, Smad5, y Smad8 de BMP, y Smad2 y Smad3, de otros ligandos de TGF- β), las cuales son directamente fosforiladas y activadas por las kinasas del receptor de tipo I. (Lin y col., 2006). Los receptores de TGF- β y activina, activados fosforilan Smad2 o Smad3, mientras que los receptores de BMP fosforilan Smad1, Smad5, y Smad8. Cuando una de las Smad ha sido fosforilada, se disocia del receptor y se une a Smad4, el cual puede formar un complejo con cualquiera de las 5 anteriores. Luego el complejo Smad se transloca al núcleo, donde se disocia con otras proteínas reguladoras de la expresión génica, desencadenando su respuesta (Alberts y col., 2004).

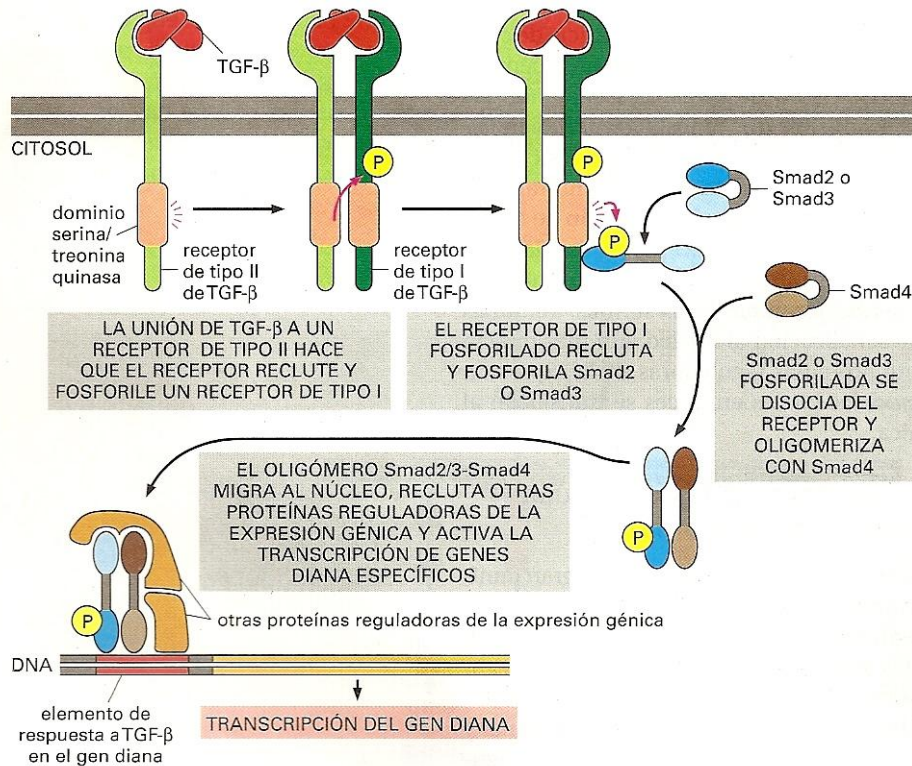


Figura 3. Esquema de Vía de Señalización de TGF-β-Smad. (Alberts et al., 2004)

4.2.- Factor de crecimiento insulínico tipo II (IGF II)

IGFs son importantes factores de crecimiento celular. Se ha descrito que todos los tipos celulares requieren de más de un factor de crecimiento para su normal desarrollo. Por ejemplo, las células epiteliales requieren el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), las neuronas requieren el Factor de Crecimiento Neuronal (NGF), el Factor de Crecimiento Hepático es para los hepatocitos, y cada línea celular hematopoyética en particular posee un factor de crecimiento específico. La excepción es IGF-I, que es un segundo factor de crecimiento común para la mayor parte de los tipos celulares incluyendo fibroblastos, células epiteliales, condrocitos, mioblastos, miocitos, neuronas, células del músculo liso, células endoteliales, linfocitos T (Baserga et al., 1998).

Se considera que los diferentes factores de crecimiento juegan un papel importante durante el proceso de la organogénesis pulmonar in vivo e in Vitro (Nagata et

al., 2007). En cuanto a los factores de crecimiento semejante a insulina (IGFs) se han observado durante el período perinatal y puede desempeñar un papel importante en el desarrollo pulmonar. (Nagata et al., 2007).

El eje IGFs está compuesto por los ligandos IGF I, IGF II e Insulina, tres tipos de receptores: IGF-IR, IGF-IIR/M6F (receptor manosa 6 fosfato) y el receptor de la insulina, además de seis proteínas transportadoras conocidas como IGFbps, proteínas transportadoras de los factores de crecimiento tipo insulínicos en el plasma sanguíneo las que están numeradas de la 1 a la 6. (Nagata et al., 2007).

Los IGF son factores de crecimiento polipeptídicos con homología estructural a la insulina, de cadena única de 70 (IGF-1) y 67 (IGF-2) aminoácidos, respectivamente, y aproximadamente 7,5 kD de tamaño (Pavelic, Matijevic y Knezevic, 2007). La expresión de ARNm de IGF-I se encuentra en las células mesenquimales y de IGF-II en el epitelio pulmonar durante el período fetal. Estos IGF se unen con sus receptores y regulan la proliferación de células y la diferenciación durante la embriogénesis (Nagata et al., 2007). En estudios en los que se utilizaron pacientes con Hernia Diafragmática Congénita y en un modelo experimental en roedores, IGF se identificó en la etapa tardía del desarrollo. (Nagata et al., 2007).

El 62% de todas las secuencias de IGF son idénticas a las de la proinsulina, y son producidos por casi todas las células en el cuerpo. Estas actúan de forma paracrina o bien por vía autocrina, mediando así, el rápido crecimiento de pulmón durante el período fetal (Nagata et al., 2007). La supresión de cualquiera de los IGF o IGFrs en ratones transgénicos produce ya sea hipoplasia pulmonar o retraso en la maduración del pulmón que lo induce a insuficiencia respiratoria y muerte perinatal. En la interrupción selectiva de IGF-I, el fenotipo característico demuestra un menor volumen de la vía aérea, un crecimiento epitelial retardado y una falta de remodelación capilar (Nagata et al., 2007).

El desarrollo estructural y funcional del sistema pulmonar depende de la eficacia de una vascularización temprana en el pulmón embrionario, estudios in vitro en un modelo de rata indican que IGF-I es un potente agente angiogénico de las células endoteliales del pulmón fetal, revelando que la inactivación de IGF- IR dio lugar a pérdidas de células

endoteliales, acompañado de cambios importantes en la morfología pulmonar fetal. (Han et al., 2003)

Diversos estudios sugieren que IGF-I juega un rol importante como factor de crecimiento en las últimas etapas del desarrollo fetal del pulmón, mientras que IGF-II juega un papel fundamental en el desarrollo embrionario y fetal del pulmón (Nagata et al., 2007). La expresión del ARNm de IGF-I se encuentra en las células mesenquimales, sobre todo en las zonas que rodean el epitelio de las vías respiratorias (Silva et al. 2006) y de IGF-II se expresa en el epitelio pulmonar durante el período fetal.

Los transcritos de IGF II han sido detectados tempranamente en humanos, alrededor del día 18 de gestación y de IGF I en la mitad de la gestación. Otros estudios sugieren que la síntesis de IGF puede comenzar antes. Los receptores de IGF también han sido identificados a partir de la 9ª semana de gestación humana. De esta forma, todos estos resultados apoyan la hipótesis de que los IGFs están presentes durante todo el desarrollo humano (Lallemand et al., 1995). En ratón, IGF-I ha sido detectado en pulmones embrionarios en su día 15 (E15), la expresión disminuye al día 17 (E17) y se mantiene en niveles bajos hasta el día 21 de gestación. Por el contrario, IGF-II se expresa predominantemente en las células epiteliales del pulmón, principalmente en las vías aéreas de conducción, su expresión no alcanza un peak hasta el día 19-21 de gestación. (Silva et al. 2006). Lo anterior también se demuestra con un estudio realizado mediante la técnica de hibridación in situ, en pulmones fetales de ratas de 18 días de gestación, en el cual la distribución de IGFBP-2 se limita estrictamente a estructuras epiteliales. A esta edad gestacional las células mesenquimales del pulmón fetal de rata no parecen tener una importante expresión génica de IGFB-2. La intensidad parece aumentar a partir del día 16 al 18 de gestación y el día 20 ya no se limita al epitelio, parece estar presente también en mesénquima. (Klempt et al., 1992)

Lallemand y colaboradores en 1995, realizaron un estudio de una amplia gama de etapas de desarrollo pulmonar, con el fin de localizar el ARNm de IGF I y IGFII y evaluar si podrían existir cambios dependientes del tiempo de crecimiento y la maduración del pulmón humano. Se analizó la expresión génica de ambos IGF I e IGF II en el tracto de las vías respiratorias del feto humano entre 10ª y 35ª semanas de gestación. Para cada caso, los transcritos para IGF se observaron en primer lugar en estructuras de origen

mesodermico (lámina propia de la vías respiratorias, cartílago, músculo liso, tejido conectivo de la tabiques interlobulares o la pleura, el mesénquima indiferenciado de la las zonas distales, vasos sanguíneos) y luego en el epitelio endodérmico de los diferentes niveles de las vías respiratorias (tráquea, yemas pulmonares y las vías respiratorias,). Finalmente, se demostró una síntesis generalizada de IGF en el pulmón fetal, sobre todo en los componentes de origen mesodérmico.

Estos resultados han demostrado que en el pulmón fetal humano la síntesis más importante de IGF se produjo en el mesénquima indiferenciado que rodea el epitelio en expansión y no en el tejido conjuntivo denso de los tabiques. La expresión génica disminuyó en el mesénquima y en el tejido conjuntivo después de la semana 20 de gestación.

Los IGFs regulan su señalización a través de la unión de IGF-I e IGF-II al receptor IGF-IR, dando por resultado el estímulo de varias vías de señalización relacionados con el desarrollo pulmonar. (Nagata et al., 2007).

Las proteínas de unión (IGFBPs) se sintetizan en el feto humano de manera específica en un tejido (Lallemant et al., 1995). Pannier et al., (1994) demostraron que el ARNm de IGFBP se expresa de forma abundante en el pulmón fetal. Se cree que IGF actúa en sus células diana mediante su unión a receptores específicos de la célula.

4.3.- Factor de Crecimiento endotelial vascular (VEGF)

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es el prototipo de factor de crecimiento de las células endoteliales, pero también tiene una amplia repercusión sobre las funciones de éstas. Fue descubierto hace más de 15 años atrás, y a pesar de esto, VEGF sigue siendo una citoquina central para el crecimiento de las células endoteliales y es foco de intensa investigación en los últimos 5 años (Voelkel et al., 2006), debido a que la formación de la red microvascular en el pulmón durante el período fetal, es crucial para el buen funcionamiento del pulmón como órgano de intercambio gaseoso. (Marszalek et al., 2001).

Una amplia gama de factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), factor de crecimiento tipo insulínico I (IGF-I), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), y el factor de crecimiento de queratinocitos estimulan la síntesis de VEGF (Voelkel et al., 2006).

VEGF-A, es el primer miembro de esta familia en ser descubierto. Éste se caracteriza por aumentar la permeabilidad vascular y el crecimiento de las células endoteliales. Los demás miembros de la familia incluyen, el VEGF B, C, y D, y el factor de crecimiento placentario (PlGF). La forma activa de VEGF es un homodímero, la isoforma más frecuente posee 165 aminoácidos, además, es la más mitogénica de todas las isoformas del VEGF (Voelkel et al., 2006).

PlGF es un homólogo del VEGF y consta de tres isoformas que surgen a través de “*splicing alternativo*”, PlGF-1, PlGF-2, y PlGF-3. Este factor de crecimiento señala exclusivamente a través VEGFR-1 (FLT) y regula los eventos entre el VEGFR-2 y VEGFR-1. PlGF estimula la formación de vasos sanguíneos, monocitos, músculo liso y la movilización de los precursores de la médula ósea y de la circulación (Voelkel et al., 2006).

El hecho de que los tubos endoteliales se forman a una distancia constante de la yema terminal sugiere un factor que lleva a su formación. Hay un aumento de la multiplicación de células mesenquimales en la región que rodea la vía aérea más distal del brote, sugiriendo que es un efecto periférico impulsado. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es conocido por estar involucrado en la angiogénesis y vasculogénesis. En los pulmones del ratón, VEGF se encuentra en los puntos de ramificación de las vías aéreas periféricas y el injerto de VEGF en pulmones de ratón cultivados, conduce a la producción aumentada de la cama capilar. Por el contrario los ratones deficientes en el receptor de VEGF, Flk 1, no tienen el desarrollo de los vasos sanguíneos (Hislop A., 2005).

Los seres humanos y los ratones tienen tres diferentes isoformas del VEGF: VEGF-120, el VEGF-164 y VEGF 188, todos se expresan en ratones durante el desarrollo, pero la isoforma VEGF 164 es la más altamente expresada y activa durante la

embriogénesis. VEGF señala a través de los receptores: *Fetal liver kinase-1* (FLK-1) and *Fetal liver tyrosinase-1* (FLT-1), siendo responsable de la diferenciación de células mesenquimales embrionarias en células endoteliales. Las interacciones entre el epitelio y el mesénquima contribuyen a la neovascularización de pulmón, proceso crucial en la formación normal de éste órgano. De hecho, las células epiteliales de las vías respiratorias son positivas para el factor de crecimiento endotelial vascular, el cual se expresa aún más en las regiones de ramificación de la vía aérea distal. (Warburton et.al, 2003). Flt - 1 juega un papel importante en la diferenciación de los precursores vasculares en etapas tempranas del desarrollo fetal, mientras que Flk - 1 fue descrito como un receptor de VEGF implicado en la angiogénesis y proliferación endotelial. Después que la diferenciación endotelial es completa, la expresión de la FLT-1 disminuye notablemente (Marszalek et al., 2006)

La formación de la vasculatura pulmonar incluye tres procesos: la angiogénesis, proceso que da lugar a los vasos centrales a través del surgimiento de nuevos vasos a partir preexistentes; vasculogénesis, que proporciona los vasos periféricos a través de la formación de capilares sanguíneos de los lagos, y la fusión entre los sistemas central y periférico para crear la circulación pulmonar. Un posible candidato como regulador para la formación de vasos del pulmón en las tres fases es VEGF. Los altos niveles de la proteína VEGF y ARNm se han detectado en el pulmón en desarrollo, lo que sugiere que el VEGF juega un papel central en la formación de la vasculatura pulmonar y también en las interacciones epitelio-endotelial que son críticos para el desarrollo normal del pulmón. (Papaioannou et al., 2006)

Este factor de crecimiento se expresa en el endodermo o ectodermo y actúa de manera paracrina en los tejidos adyacentes al mesodermo para inducir la proliferación, migración celular, la diferenciación y la angiogénesis. (Costa et al., 2001).

En un estudio realizado por Marszalek et al., 2006, en ratas, un análisis por hibridación in situ reveló que las transcripciones Flk-1, son abundantes en la proliferación de células endoteliales, y que sus niveles disminuyen drásticamente después de la formación de la vasculatura pulmonar. Además se comprobó que la expresión de VEGF y sus receptores no se limita a los tejidos del feto y del recién nacido, aunque sus niveles de expresión son significativamente más altos antes del nacimiento y durante los primeros

días de vida extrauterina que en otras etapas del desarrollo, posteriormente los niveles de expresión de estos antígenos son bajos, pero todavía están presentes, estas observaciones sugieren que VEGF y sus receptores podrían ser importantes reguladores del crecimiento y la remodelación de los vasos sanguíneos durante toda la vida. En este estudio, se describe que la expresión de VEGF y Flk - 1 decrecen con la edad del feto y el recién nacido. Este fenómeno es paralelo a la actividad proliferativa de los capilares, disminuyendo en el desarrollo de los pulmones con el aumento de la edad fetal.

Una gran cantidad de los efectos fisiológicos de VEGF pertenecen particularmente al pulmón, el cual es uno de los órganos con la expresión más alta de VEGF, dentro de los sistemas animales (Hislop, 2005). Las acciones de VEGF en el pulmón en general afectan al desarrollo y al mantenimiento estructural de la vida adulta (Hislop, 2005). La formación de nuevos capilares por vasculogénesis se produce paralelamente a la formación de las yemas epiteliales en todas las edades. Esto sugiere algún tipo de control por las células epiteliales, dado principalmente por la interacción con el factor de crecimiento vascular endotelial (Hislop, 2005).

La pérdida de un alelo de VEGF, da como resultado en un fenotipo letal alrededor del día E 11,5 del desarrollo embrionario de ratón, asociado con defectos en la formación de los vasos del saco vitelino y de la aorta dorsal. El aumento de expresión de VEGFA se ha demostrado que interrumpe el desarrollo embrionario, resultando en defectos cardíacos letales alrededor E14 de desarrollo, por lo que se sugiere que existe una relación dosis/dependiente de VEGF en la vasculogénesis (Del Moral et al, 2006). La ausencia de las isoformas del VEGF perjudica el desarrollo pulmonar microvascular y provoca retrasos en la maduración del espacio aéreo de los fetos de ratones, lo que refleja el papel esencial de VEGF para el desarrollo pulmonar normal (Trotter et al., 2009).

El desarrollo de vasos en el pulmón tempranamente determina la estructura y la maduración de este órgano, siendo los procesos de vasculogénesis y angiogénesis necesarios para la exitosa construcción del pulmón. De lo contrario se expresarían diferentes patologías, tales como: Hipertensión Pulmonar, Enfisema, Asma, Displasia Broncopulmonar entre otras (Voelkel et al., 2006).

4.3.1.- Vía de señalización: receptores tirosina quinasa

Tras la unión del ligando, VEGFRs debe experimentar la dimerización para finalmente desatar una cascada de señalización (Voelkel et al., 2006, para ello utiliza los receptores tirosina quinasa, los cuales se pueden clasificar en más de 16 subfamilias estructurales, cada una de las cuales está relacionada con su familia complementaria de proteínas ligando (Alberts y col., 2004).

La unión de una proteína señal al dominio de unión del ligando en el exterior de la célula, activa el dominio tirosina quinasa intracelular (figura 5). Una vez activado, el dominio quinasa transfiere un grupo fosfato del ATP a determinadas cadenas laterales de tirosina, tanto de la propia proteína receptora como de otras proteínas de señalización intracelular, las cuales se unirán a los receptores fosforilados (Alberts y col., 2004).

Los receptores de insulina y de IGF- I también actúan a través de receptores tirosina quinasa, pero de una forma diferente, ya que los receptores son tetrámeros y se cree que la unión del ligando induce una reorganización de las cadenas transmembranas de los receptores, de modo que los dos dominios quinasa quedan muy juntos. La mayoría de las fosfotirosinas generadas por la unión del ligando y que harán de lugares de unión de alta afinidad no se localizan en el propio receptor sino en una proteína de unión especializada denominadas, sustrato- 1 del receptor de insulina (IRS-1). (Alberts y col., 2004).El receptor activado, primero autofosforila sus dominios quinasa, las cuales posteriormente fosforilan a IRS-1 en múltiples residuos de tirosina, con lo que generan muchos más lugares del alta afinidad que los que podrían darse solo en el receptor (Alberts y col., 2004).

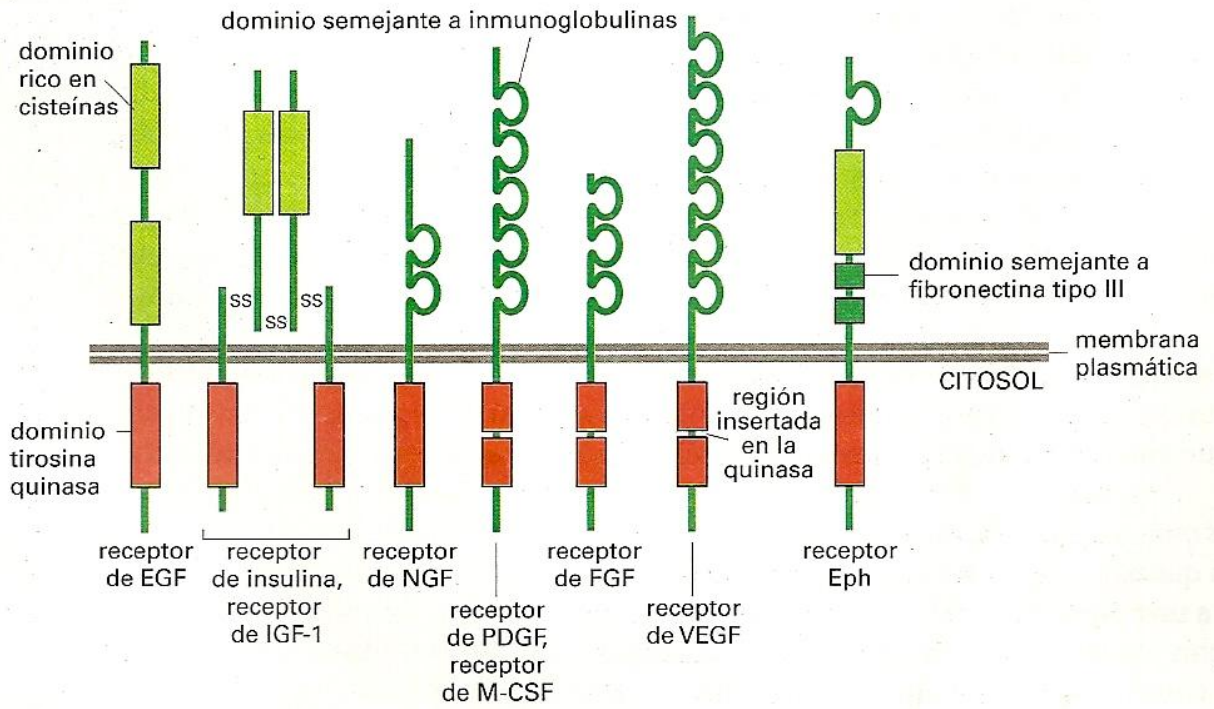


Figura 4. Esquema que representa siete de las subfamilias de receptores tirosina quinasa. (Alberts et. al, 2000)

CAPITULO: 2

1.- Delimitación del problema, tipo de estudio, hipótesis y objetivos.

1.1.- Delimitación de problema

La población a estudiar corresponde a fetos de ratas de la cepa Wistar de 14, 17 y 20 días de gestación, correspondiente a las etapas pseudoglandular, canalicular y sáculo-alveolar del desarrollo pulmonar. En los cuales se determinará la distribución del factor de crecimiento vascular endotelial, insulínico tipo II y transformante Beta en mesénquima, epitelio y endotelio pulmonar. El instrumento a utilizar es mediante la aplicación de protocolos experimentales estandarizados en tejido pulmonar de ratas, para técnica inmunohistoquímica de los factores de crecimiento descritos anteriormente, los cuales serán evidenciados en cortes histológicos de los pulmones de ratas, en los diferentes momentos del desarrollo, durante los años 2009-2010 en el Centro de Investigación en Biología de la Reproducción de la Escuela de Medicina de la Universidad de Valparaíso.

1.2.- Tipo de estudio

Descriptivo observacional de corte vertical

1.3.- Hipótesis

Durante el desarrollo pulmonar en ratas de la cepa Wistar, a nivel epitelial, mesenquimal y endotelial, existen modificaciones temporales y espaciales en la distribución de los factores de crecimiento VEGF, TGF- β , IGF II.

1.4.- Variables

Variable independiente: Desarrollo Pulmonar de ratas de la cepa Wistar.

Variable dependiente: Distribución de Factores de Crecimiento

1.5.- Objetivo General

- Determinar por medio de técnicas inmunohistoquímicas la distribución temporo/espacial de los factores de crecimiento en las etapas del desarrollo pulmonar en ratas.

1.6.- Objetivos Específicos

- Identificar, a través de técnicas inmunohistoquímicas, la distribución del factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF), en el desarrollo pulmonar de ratas durante los días 14, 17 y 20 de gestación.
- Identificar, a través de técnicas inmunohistoquímicas, la distribución del factor de Crecimiento Factor Transformante Beta (TGF- β), en el desarrollo pulmonar de ratas durante los días 14, 17 y 20 de gestación.
- Identificar, a través de técnicas inmunohistoquímicas, la distribución del Factor de crecimiento semejante a la Insulina tipo II (IGF-II), en el desarrollo pulmonar de ratas durante los días 14, 17 y 20 de gestación.
- Describir, a través de tinción Hematoxilina Eosina (HE) la morfología durante las diferentes etapas del desarrollo pulmonar en ratas.

2.- Material y Métodos

2.1.- Animales

Fueron utilizadas en este estudio, ratas hembras de la cepa Wistar. Con 9 semanas de edad (edad en la cual estas ratas presentan madurez desde el punto de vista reproductivo). Estos animales provinieron del Bioterio Central de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Los protocolos para el uso de animales en experimentación han sido aprobados por el Comité de Bioética y Bioseguridad de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso, respecto del Proyecto de Investigación DIPUV 07/2008 del cual el Dr. Sebastián San Martín es el investigador responsable.

Estas ratas se mantuvieron en la Unidad de Mantención de Animales del Centro de Investigación Biología de la Reproducción de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso, bajo un ambiente controlado con periodos de día y noche a temperatura ambiente; alimento y agua a libre demanda.

Las ratas hembras fueron cruzadas con ratas machos de la misma cepa, en una proporción de 3 hembras en contacto con un macho reproductor durante toda la noche. En la mañana del día siguiente a la cruce, se realizó un frotis vaginal para verificar la presencia de espermatozoides al microscopio, considerándose este hallazgo como día 1 de Gestación (DG). La gestación en ratas consta de un periodo de 20 días, en este estudio se eutanzaron 11 ratas hembras gestantes, en los días 14, 17 y 20 de gestación. De estas ratas se obtuvieron un total de 27 fetos, divididos en 3 grupos (9 respectivamente), para cada etapa del desarrollo pulmonar.

2.2.- Procesamiento de los tejidos

Los materiales utilizados en esta investigación corresponden a fetos de Ratitas Wistar, de 14, 17 y 20 días de gestación, los cuales fueron recolectados entre los meses de Diciembre del 2009 a Marzo de 2010. Las hembras preñadas fueron sacrificadas mediante sobredosis de vapores anestésico.

Una vez obtenidos los fetos fueron pesados y posteriormente fijados aleatoriamente en paraformaldehído por un período de 48 horas y Methacarn por 4 horas, a 4°C.

Se utilizaron los fetos fijados en paraformaldehído, los que posteriormente fueron deshidratados en alcohol absoluto, aclarados en xilol y embebidos en parafina a 60°C. Los bloques obtenidos fueron cortados a 5 micras en un micrótomo (Leitz) tomando diversos planos en cada muestra. Los cortes fueron adheridos a portaobjetos pretratados con Poly- Lysine y luego secados por una hora en una estufa de 60°C.

3.- Métodos

3.1.- Caracterización Histológica

De las muestras se obtuvieron cortes de 5 micras, uno de los cuales fue destinado para hacer un estudio morfológico descriptivo del tejido pulmonar, utilizando la técnica de tinción hematoxilina-eosina. Los demás cortes fueron destinados para las técnicas de inmunohistoquímica.

Para la tinción hematoxilina-eosina los cortes fueron desparafinados e hidratados en una batería de xiloles y alcoholes descendentes, por 10 minutos respectivamente, para terminar en agua destilada por 10 minutos. Posteriormente se llevó a cabo la tinción con hematoxilina de Mayer. El viraje se realizó en agua corriente por 5 minutos, seguido de un lavado de 2 minutos en alcohol de 95°, para luego realizar la tinción con eosina, aplicada por 10-30 segundos. Por último, se procedió con la deshidratación y montaje de las placas, en una batería de alcoholes ascendentes y xiloles, con 5 minutos cada uno (ver anexos).

3.2.- Protocolos Inmunohistoquímicos

Cortes seriados fueron desparafinados e hidratados en una batería de xiloles y alcoholes descendentes por 20 minutos cada uno, para terminar en agua destilada por un período de 15 minutos.

El paso de recuperación de los sitios antigénicos fue realizado sometiendo las muestras por 15 minutos a una solución de buffer citrato pH: 6.0 a 90° C (en vaporera). Luego de un reposo de 15 minutos y tres lavados de PBS (buffer fosfato salino 0.01 M pH: 7.24) de 5 minutos cada uno, se llevó a cabo el bloqueo de la peroxidasa endógena con la aplicación de una solución de peróxido de hidrógeno al 3% en buffer PBS por 30 minutos. Nuevamente se aplicaron tres lavados en buffer PBS de 5 minutos cada uno.

Con el objetivo de evitar una tinción inespecífica fueron aplicadas dos soluciones de bloqueo, una solución comercial de Cas-Block y una solución de Suero Normal de cabra (VEGF y TGF- β) y suero normal de conejo (IGF II) los bloqueos fueron aplicados por un período de 30 minutos respectivamente, a temperatura controlada de 25° C. Los anticuerpos primarios (tabla 3) fueron aplicados y mantenidos durante la noche a 4° C en cámara húmeda. Como control negativo, el anticuerpo primario fue reemplazado por una solución de PBS Tween 20.

Al día siguiente, las placas fueron lavadas en tres baños de buffer PBS 0,1M de 5 minutos cada uno. Posterior a ello se aplicó el anticuerpo secundario Anti conejo hecho en cabra + HRP (VEGF y TGF- β), Anti cabra hecho en conejo biotinilado (IGF II) durante 1 hora a 25° C en cámara húmeda, seguido de tres lavados de buffer PBS 0,1M de 5 minutos cada uno. Las muestras con el anticuerpo biotinilado, fueron sometidas a una nueva incubación, ésta vez con el complejo estreptoavidina-peroxidasa, el que fue aplicado también por una hora a 25°C.

Nuevamente se realizaron tres lavados en buffer PBS 0,1M de 5 minutos cada uno, para eliminar los complejos que no se encuentran unidos de manera específica. Mientras tanto, se preparaba la solución de revelado con cromógeno (Kit de revelado Vectastain, Vector), el que fue aplicado por 1.5 minutos aproximadamente para VEGF y 2 minutos para TGF- β e IGF II. Se continuó con un lavado con agua destilada de 5 minutos y una tinción de contraste nuclear con hematoxilina de Mayer durante 10 a 20 segundos. El viraje posterior en agua corriente fue por 5 minutos, para seguir la deshidratación, aclaramiento y montaje en una batería de alcoholes ascendentes y xiloles con un tiempo de 5 minutos cada uno (ver anexos).

Los protocolos fueron estandarizados y aplicados en el laboratorio de Ciencias morfológicas del Centro de Investigación en Biología de la Reproducción de la Universidad de Valparaíso (CIBR).

Los resultados fueron visualizados en un microscopio Olympus CX81, con una cámara fotográfica Olympus DP71, que permitió la captura de los resultados obtenidos para cada determinación inmunohistoquímica.

TABLA 3. ANTICUERPOS Y ENZIMAS

Anticuerpo	Pre-tratamiento	Dilución anticuerpo en PBS Tween 20 al 0.3%	Anticuerpo secundario y dilución
Anti VEGF hecho en conejo Anticuerpo policlonal Abcam AB-46154	Recuperación antigénica: Buffer Citrato de Sodio	1:250	Anti IgG conejo hecho en cabra + HRP Dilución: 1:500
Anti TGF-B 1/2/3 (Santa Cruz) Monoclonal chemicon AB-1032	Recuperación antigénica: Buffer Citrato de Sodio	1:50	Anti IgG conejo hecho en cabra + HRP Dilución: 1:500
Anti IGF II	Recuperación antigénica: Buffer Citrato de Sodio	1:150	Anti IgG cabra hecho en conejo biotinilado 1:5000

4.-Limitantes del estudio

El presente estudio se limita a analizar el desarrollo pulmonar en ratas sólo los días 14, 17 y 20 de gestación, impidiendo de esta forma obtener una investigación más acabada en la totalidad del desarrollo pulmonar.

Otro aspecto limitante fue utilizar sólo 3 factores de crecimiento (VEGF, TGF- β , IGFII), debido a la disponibilidad existe en el Centro de Investigación en Biología de la Reproducción de la Facultad de Medicina, Universidad Valparaíso.

No se realizó un estudio comparativo con humanos, por las razones éticas que conlleva el tema, debido a la penalización de aborto en Chile (Decreto Ley N° 18.826 de 1989), lo cual imposibilita la realización de estudios en embriones y fetos humanos.

CAPITULO: 3

1.- Resultados

Caracterización Morfológica de observaciones de Desarrollo Pulmonar

En el transcurso del estudio del desarrollo pulmonar en ratas, el epitelio de las ramificaciones bronquiales presentó una disminución progresiva en su altura y en el tipo de células que lo componen. En la etapa pseudoglandular del desarrollo pulmonar (E 14 días), se observó un epitelio de tipo pseudoestratificado cilíndrico alto en los primordios bronquiales. A nivel del epitelio traqueal, se distinguen las células caliciformes en regular cantidad, caracterizadas por la presencia de un gran citoplasma en forma de copa alargado, las cuales disminuyen a medida que avanza el desarrollo pulmonar, hasta desaparecer en los bronquiolos terminales distales.

Se logró observar a lo largo de todo el desarrollo pulmonar en estudio, la presencia de lámina propia, la cual limita con el tejido muscular liso. Este último se hace cada vez más prominente a medida que disminuye el diámetro de la vía aérea.

El mesénquima circundante presenta una distribución bastante regular y organizada en torno al bronquio en formación mientras que el mesénquima periférico se observó de forma irregular y desorganizado. Se logran visualizar fibroblastos en toda la extensión del mesénquima.

Tanto en el mesénquima circundante como en el mesénquima periférico, se observó una gran cantidad de células en fases de mitosis, lo que nos indica un proceso de replicación y crecimiento celular. Se observó también, la presencia de vasos sanguíneos de gran cercanía a los primordios bronquiales con presencia de eritroblastos en vías de maduración. Se distinguen vénulas con un endotelio característico, con células que presentan su núcleo orientado hacia el lumen de éstas.

En la etapa canalicular (E 17 días) se evidenció un epitelio en transición de epitelio pseudoestratificado a epitelio cúbico simple en las zonas más distales de los bronquiolos en formación. Al igual que en la etapa pseudoglandular (E 14 días), el mesénquima que circunda se observó de manera organizada, mientras que el periférico se manifiesta más

bien desorganizado y con abundante presencia de fibroblastos y células en diversas fases mitóticas. Dicho mesénquima va haciéndose cada vez más denso. El lumen de los bronquiolos en formación presenta secreciones de regular cantidad. Se observó además, gran cantidad de vasos sanguíneos muy cercanos a los bronquiolos en formación, con presencia cuantiosa de eritrocitos.

En la etapa saculo-alveolar del desarrollo pulmonar en ratas (E 20 días) se observó una gran cantidad de bronquiolos terminales, en los que el cambio epitelial es bastante notorio, transformándose en un epitelio cúbico simple que facilita el intercambio gaseoso. Se observó además, la presencia de mayor secreción de tipo mucinosa en el lumen de las estructuras tubulares en formación.

El mesénquima es mucho más denso y organizado tanto a nivel circundante como periférico de los bronquiolos terminales, existe menos tejido conectivo y una tendencia a una población celular en aumento, a diferencia de etapas anteriores. En el mesénquima se observó gran cantidad de células con núcleos bien definidos y en diferentes etapas mitóticas, presencia de fibroblastos y linfocitos y gran cantidad de formación de vasos sanguíneos con eritrocitos en su espacio luminal.

Adyacente al epitelio basal del bronquiolo en formación se observó claramente la presencia de tejido muscular liso bien definido y continuo en torno al diámetro de dicho bronquiolo terminal.

No se observaron sacos alveolares debido a que éstos aparecen dentro de los primeros 10 días postnatales del desarrollo pulmón de ratas.

Caracterización Inmunohistoquímica del Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF- β), Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF), Factor de Crecimiento de Tipo Insulínico II (IGF II) en el desarrollo pulmonar de fetos de ratas.

Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF- β):

En el estudio, la identificación de TGF- β para el pulmón de 14 días de gestación, evidenció una marcación positiva en el epitelio pseudoestratificado cilíndrico en la zona luminal de los túbulos respiratorios en formación, mientras que en la zona epitelial basal no se observó inmunomarcación. El mesénquima que circunda a dichos túbulos es denso, mantiene una disposición cilíndrica en torno a su diámetro, evidenció una inmunomarcación celular cualitativamente más intensa. No se observa inmunoreacción en vasos sanguíneos.

En el transcurso del desarrollo pulmonar durante la etapa canalicular, correspondiente a los 17 días de gestación, se pudo observar una marcación positiva de este factor de crecimiento en el epitelio de los bronquiolos respiratorios en evolución, se observó tanto en el epitelio basal como en el epitelio luminal, sin embargo en este último se observó cualitativamente mayor. En el mesénquima no se evidenció inmunomarcación, lo mismo ocurre con la red capilar.

En fetos de 20 días de gestación, no fue posible evidenciar marcación del Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF- β) en ninguno de los tres compartimentos analizados.

Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF):

El resultado obtenido a través de la técnica de Inmunohistoquímica para VEGF, en fetos de 14 días de gestación, dejó en evidencia una intensa inmunoreacción en el mesénquima circundante al epitelio pseudoestratificado cilíndrico de los bronquios en formación. Se observó además, inmunomarcación de vasos sanguíneos correspondientes a la etapa de vasculogénesis. A nivel del epitelio basal del bronquio se observó marcación positiva.

En fetos de ratas de 17 días de gestación, en etapa canalicular del desarrollo pulmonar, se observó que existe una inmunoreacción cualitativamente intensa a nivel del epitelio luminal y del epitelio basal de los bronquiolos respiratorios en formación. Durante la misma etapa se pudo apreciar una marcación positiva cualitativamente moderada a nivel de mesénquima, en donde se logra observar vasos sanguíneos elongados y ramificándose hacia la periferia de éste con inmunoreacción positiva.

Se observaron también, vénulas con su lumen vacío aún, pero con intensa marcación del factor de crecimiento vascular endotelial.

En el transcurso de la gestación, a los 20 días de desarrollo pulmonar, existe un cambio importantísimo y notorio a nivel epitelial. Se pudo describir una marcación negativa a nivel del mesénquima circundante a bronquiolos terminales, lo mismo ocurre en el epitelio cúbico simple de éstos. Se observó además, la elongación de vasos sanguíneos con una inmunomarcación cualitativamente intensa. En síntesis, dicho factor de crecimiento vascular endotelial, presenta una inmunoreacción negativa a nivel de epitelio y mesénquima, mientras que a nivel de vasos sanguíneos va en ascenso a medida que transcurren los días de gestación.

Factor de Crecimiento Tipo Insulínico II (IGF II):

Producto de la técnica de inmunohistoquímica de IGF II, se pudo observar que en la etapa pseudoglandular del desarrollo pulmonar de fetos de ratas (E14), la inmunomarcación es positiva de tipo granular en el epitelio pseudoestratificado de los túbulos respiratorios en formación, tanto a nivel del lumen como en la membrana basal. También se apreció inmunomarcación positiva en células mesenquimales. No se observó marcación a nivel vascular.

En fetos de ratas de 17 días de gestación, se pudo establecer una reacción positiva cualitativamente intensa a IGF II en el epitelio luminal de los bronquiolos respiratorios. A nivel mesenquimal, se observó una marcación celular cualitativamente más débil. No se evidenció inmunomarcación en vasos sanguíneos.

A medida que avanza el desarrollo pulmonar, en fetos de 20 días de gestación, se puede apreciar que la inmunomarcación de IGF II continúa a nivel epitelial de los bronquiolos terminales, sin embargo cualitativamente es más débil. Del mismo modo se observa en células mesenquimales. No se observó marcación en vasos sanguíneos.

TABLA 4. PRESENCIA/AUSENCIA DE FACTORES DE CRECIMIENTO DURANTE EL DESARROLLO PULMONAR EN RATAS.

	TGF- β			VEGF			IGF-II		
	Ep	Me	Ed	Ep	Me	Ed	Ep	Me	Ed
14 días	+	+	-	+	+	+	+	+	-
17 días	+	-	-	+	+ \downarrow^*	+	+	+	-
20 días	-	-	-	-	-	+	+ \downarrow^*	+ \downarrow^*	-

Resumen de resultados obtenidos a través de técnicas inmunohistoquímicas de la distribución de los factores de crecimiento TGF- β , VEGF, IGF II, en epitelio pulmonar (Ep), mesénquima (Me) y endotelio (Ed), indicando la presencia (+) o ausencia (-) de éstos, en las etapas pseudoglandular (14 días), canalicular (17 días), sáculo-alveolar (20 días) del desarrollo pulmonar de ratas.

(+ \downarrow^) representa inmunomarcación en descenso*

2.- Documentación Fotográfica

Figura 1- Tinción Hematoxilina Eosina: 14 días

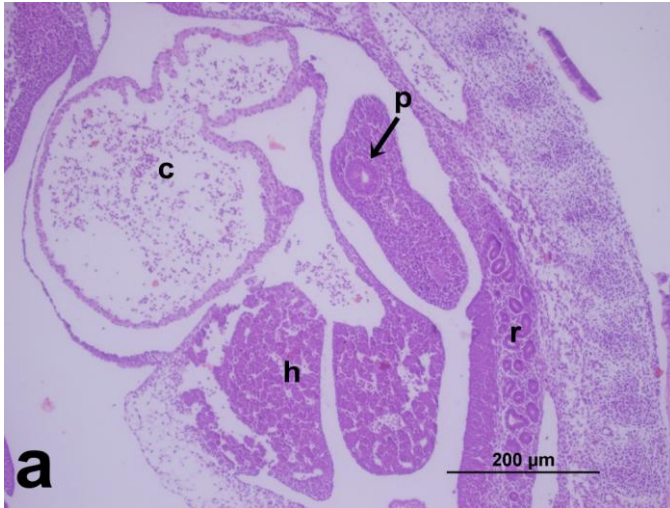


Figura 1.1 a: Corte transversal de feto de rata en el día 14 de gestación. Imagen panorámica en donde se aprecia un primordio bronquial (p), con su cercanía al corazón (c) en donde este órgano aún es mayor que el pulmón, hígado (h) y túbulos renales (r) en formación.

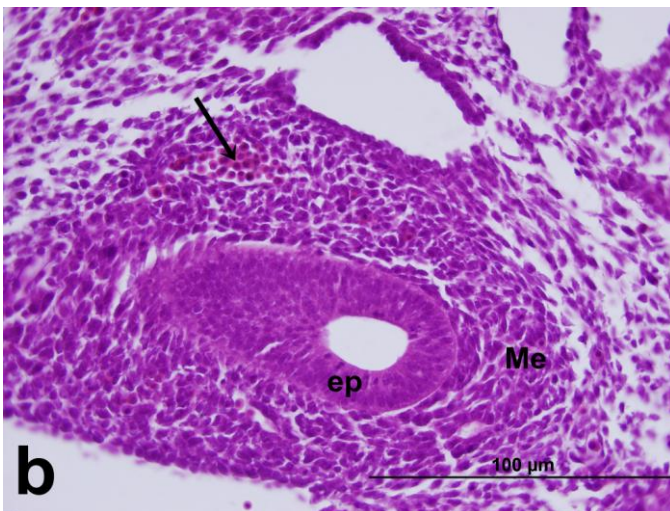


Figura 1.1 b: Corte transversal de pulmón de rata en el día 14 de gestación, en etapa pseudoglandular, en donde se observa primordio bronquial (Ep). Un mesénquima (Me) que circunda al epitelio respiratorio manteniendo la misma disposición de éste. Además se observa un vaso sanguíneo con eritroblastos (flecha).

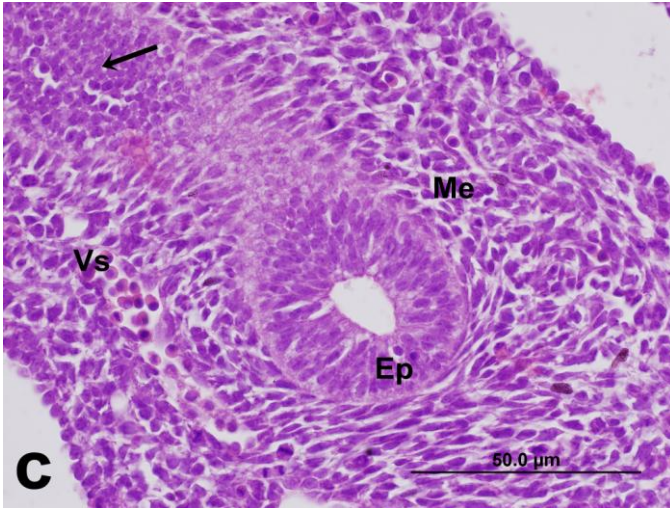


Figura 1.1 c: Corte transversal de pulmón de rata en el día 14 de gestación, en etapa pseudoglandular, en donde se observan primordios bronquiales (Ep) ramificándose (flecha). Un mesénquima (Me) que circunda al epitelio respiratorio manteniendo la misma disposición de éste, se aprecia un vaso sanguíneo con presencia de eritroblastos (Vs).

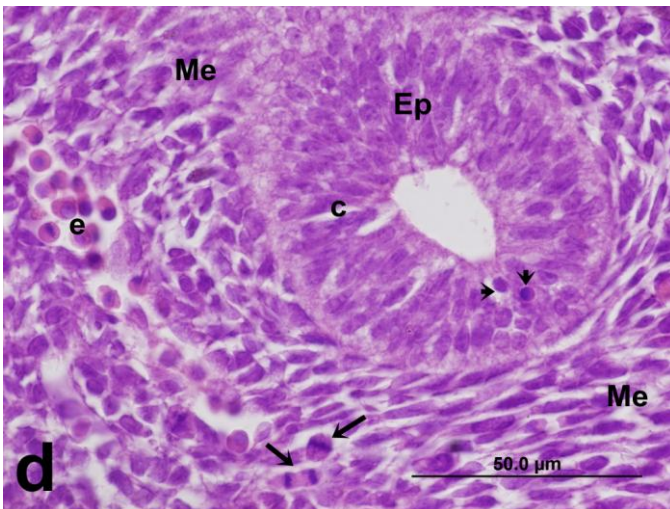


Figura 1.1 d: Corte transversal de pulmón de rata en el día 14 de gestación, en etapa pseudoglandular, en donde se observa primordio bronquial (Ep) en formación. Un mesénquima (Me) que circunda al epitelio respiratorio manteniendo la misma disposición de éste, se aprecia un vasos sanguíneos con presencia de eritroblastos (e) linfocitos (cabezas de flechas) y figuras mitóticas (flechas).

Figura 1.2.- Tinción Hematoxilina Eosina: 17 días



Figura 1.2 a: Corte transversal de feto de rata de 17 días de gestación. Imagen panorámica en donde se diferencia cavidad torácica y abdominal separadas por el músculo diafragmático (flecha), se observan estructuras tales como pulmón (p), corazón con aurícula (a) y ventrículo (v), e hígado (h).

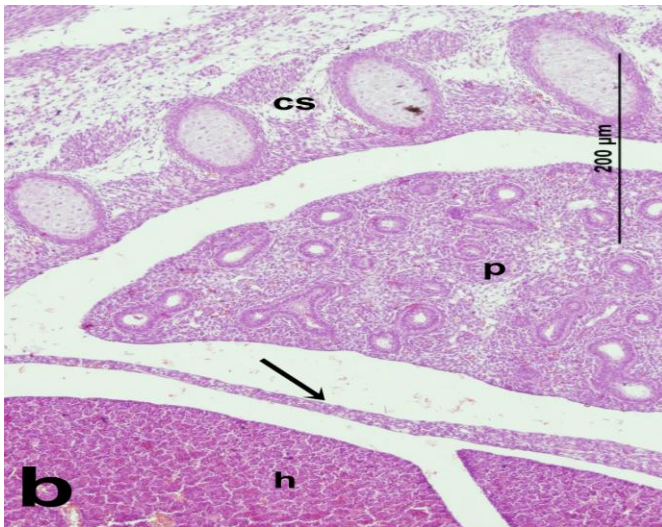


Figura 1.2 b: Corte transversal de pulmón de rata de 17 días de gestación. Imagen ampliada en donde se diferencia la cavidad torácica y abdominal separadas por el músculo diafragmático (flecha), se observan estructuras tales como pulmón (p), costillas (cs) e hígado (h).

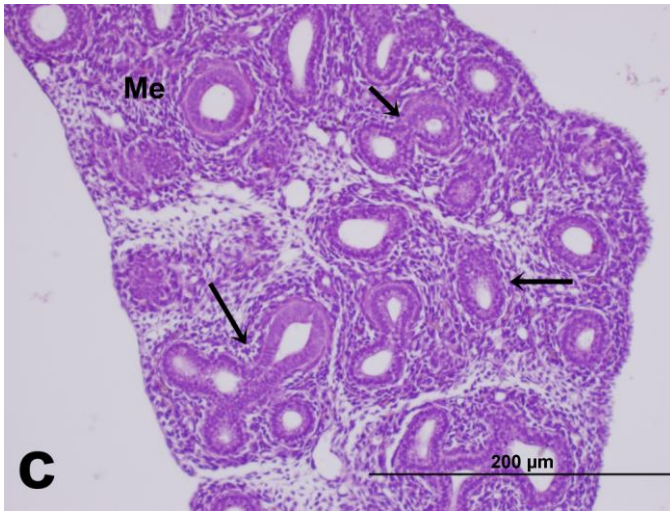


Figura 1.2 c: Corte transversal de pulmón de rata de 17 días de gestación. Imagen ampliada donde se observan bronquiolos respiratorios (flechas) en formación, rodeado por mesénquima (Me) con distribución más densa.

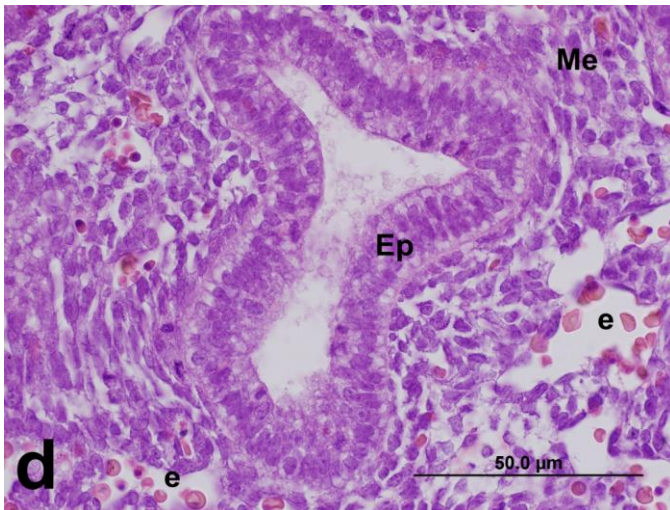


Figura 1.2 d: Corte transversal de pulmón de rata de 17 días de gestación, en el cual se observa un túbulo respiratorio ramificándose, con una transición epitelial (Ep) de tipo pseudoestratificado cilíndrico a cúbico simple, con secreción en su interior. Mesénquima (Me) circundante al túbulo respiratorio, más denso en los puntos de ramificación y más laxo en la periferia, se observan vasos sanguíneos con eritrocitos (e) en su interior.

Figura 1.3.- Tinción Hematoxilina Eosina: 20 días

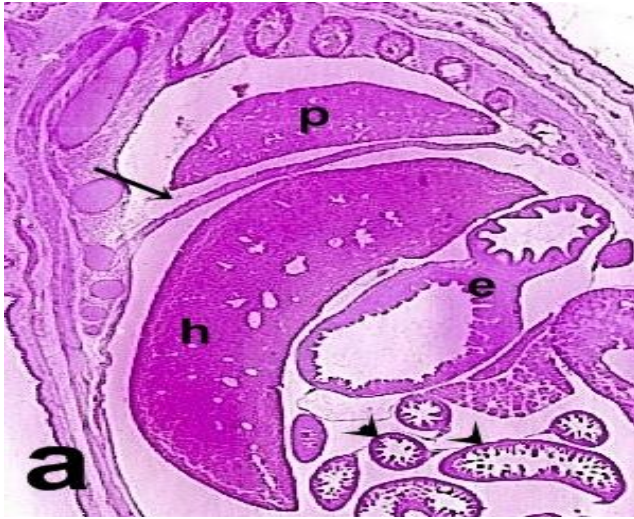


Figura 1.3 a: Corte transversal de feto de rata de 20 días de gestación. Imagen panorámica en donde se diferencia la cavidad torácica y abdominal separadas por el músculo diafragmático (flecha), se observan estructuras tales como pulmón (p), hígado (h), estómago (e) y asas intestinales (cabeza de flecha).

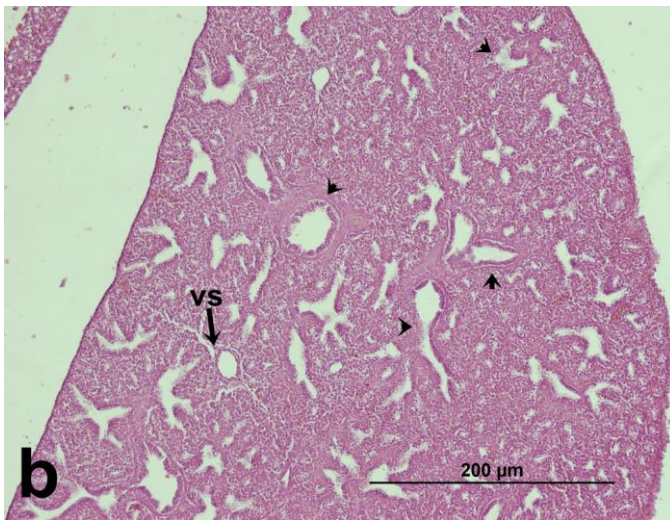


Figura 1.3 b: Corte transversal de pulmón de rata de 20 días de gestación. Cursando la etapa saculo-alveolar del desarrollo pulmonar. Se aprecian bronquiolos terminales (cabezas de flecha) y un vaso sanguíneo (vs).

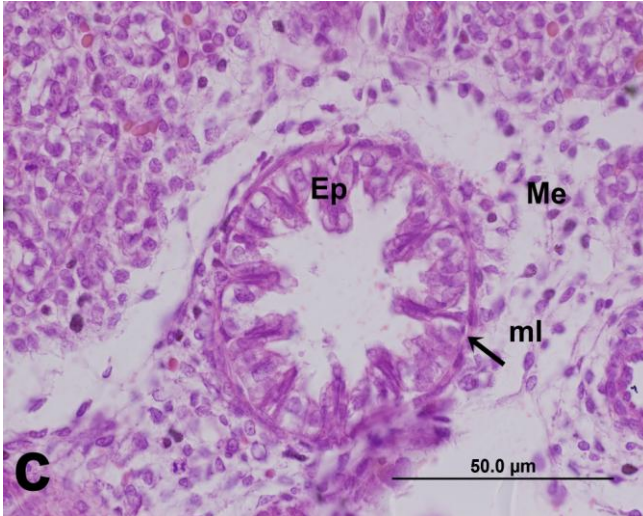


Figura 1.3 c: Corte transversal de pulmón de rata de 20 días de gestación. Cursando la etapa saculo-alveolar del desarrollo pulmonar. Imagen ampliada de un bronquiolo respiratorio con epitelio cúbico simple (Ep), rodeado de tejido muscular liso (ml) y mesénquima (Me) con distribución más densa.

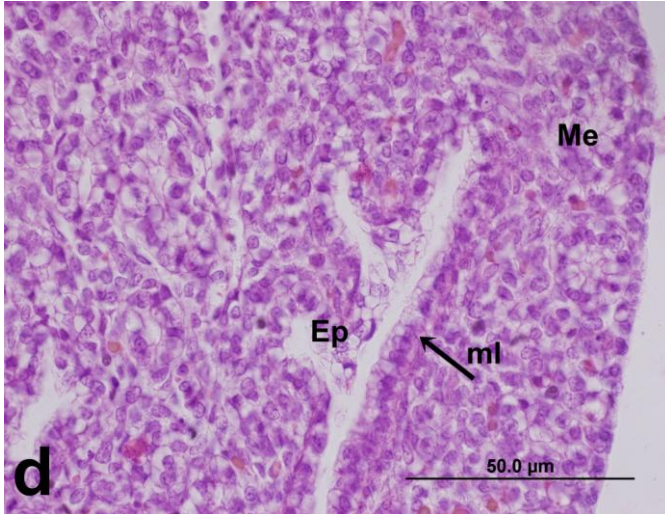


Figura 1.3 d: Corte transversal de pulmón de rata de 20 días de gestación, en etapa saculo-álveolar. Se aprecia un bronquiolo respiratorio ramificado con epitelio cúbico simple (Ep), rodeado de tejido muscular liso (ml) (flecha) y mesénquima (Me) con distribución más regular y densa.

Figura 2.- Inmunomarcación de TGF- β

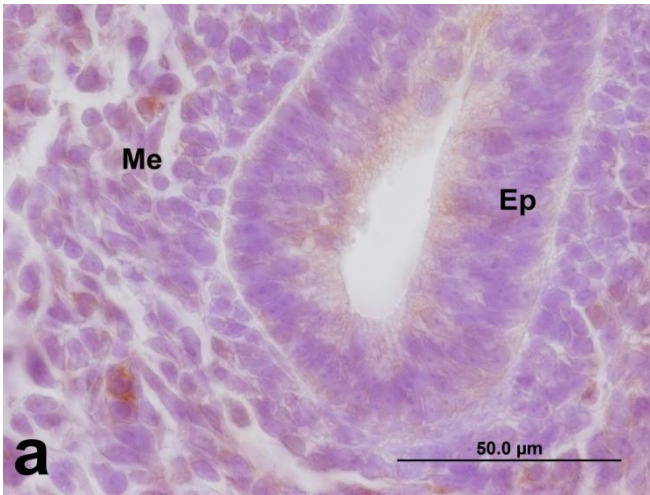


Figura 2a: Corte transversal de pulmón de rata en el día 14 de gestación, en etapa pseudoglandular, en donde se observa un túbulo respiratorio en formación, con un epitelio pseudoestratificado cilíndrico (Ep). Un mesénquima (Me) que circunda al epitelio respiratorio manteniendo la misma disposición de éste. Se aprecia una inmunomarcación positiva en el epitelio respiratorio (Ep) y una marcación cualitativamente más intensa en el mesénquima (Me).

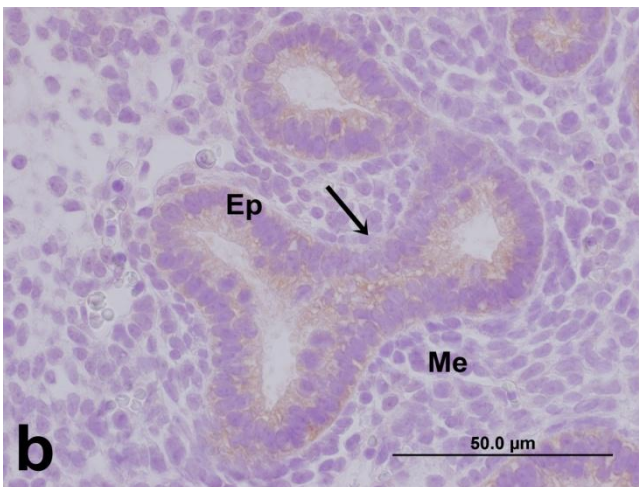


Figura 2b: Corte transversal de pulmón de rata de 17 días de gestación, en el cual se observa un túbulo respiratorio en formación, con un epitelio (Ep) en transición, en donde se aprecia una intensa inmunomarcación epitelial en los puntos de ramificación (flecha). El mesénquima (Me) circundante al túbulo respiratorio es más denso en los puntos de ramificación y más laxo en la periferia, no se observa marcación en él.

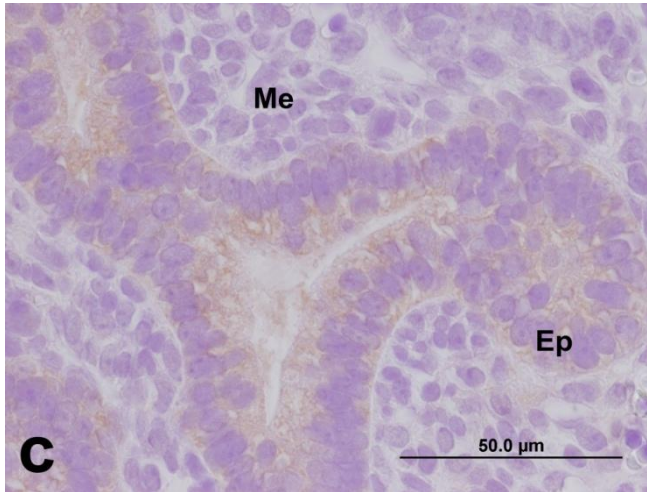


Figura 2c: Corte transversal de pulmón de rata de 17 días de gestación, imagen ampliada en la cual se aprecia un túbulo respiratorio ramificándose, con un epitelio (Ep) en transición, de tipo pseudoestraticado cilíndrico a cúbico simple, con una inmunomarcación cualitativamente intensa. Se observa mesénquima (Me) circundante al túbulo respiratorio más denso en los puntos de ramificación y más laxo en la periferia sin inmunomarcación.

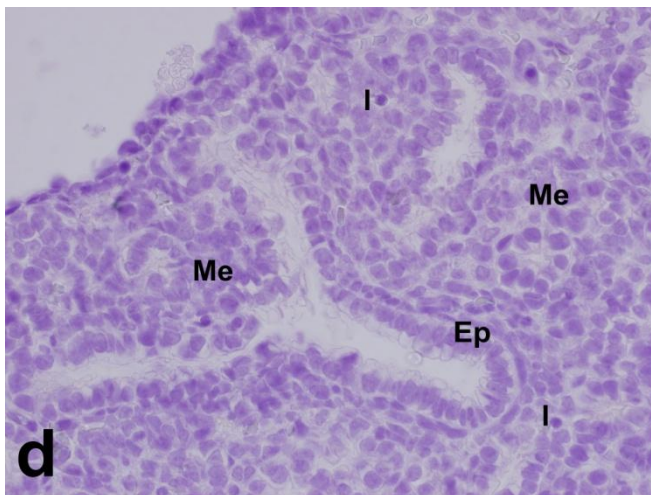


Figura 2d: Corte transversal de pulmón de rata de 20 días de gestación, en etapa saculo-álveolar. Se aprecia un bronquiolo respiratorio ramificado con epitelio cúbico simple (Ep), alrededor mesénquima (Me) con distribución más regular y densa, además se logra visualizar linfocitos (l). Se observa inmunomarcación negativa a nivel epitelial y en células mesenquimales.

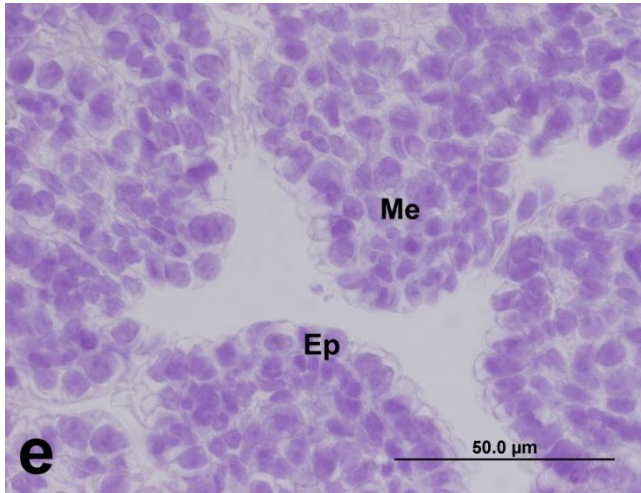


Figura 2e: Corte transversal de pulmón de rata de 20 días de gestación. Imagen ampliada en donde se aprecia el cambio epitelial a tipo cúbico simple (Ep) del túbulo respiratorio, alrededor mesénquima (Me) con distribución densa en las zonas de ramificación. No se observa inmunomarcación para TGF- β .

Figura 3.- Inmunomarcación de VEGF

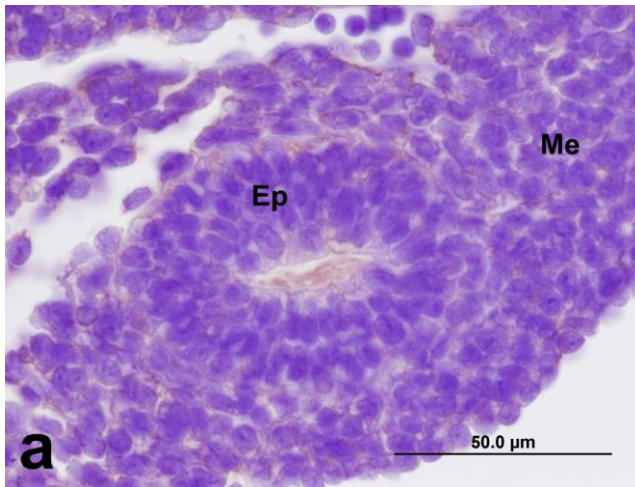


Figura 3a: Corte transversal de pulmón de rata en el día 14 de gestación, en etapa pseudoglandular, en donde se observa un túbulo respiratorio en formación, con un epitelio pseudoestratificado cilíndrico (Ep) con inmunomarcación positiva a nivel de epitelio basal. Se aprecia mesénquima (Me) circundante con distribución densa e inmunomarcación positiva.

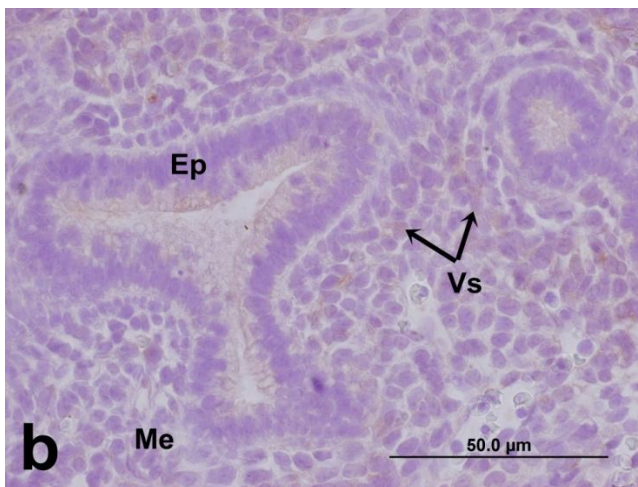


Figura 3b: Corte transversal de pulmón de rata de 17 días de gestación, en el cual se observa un túbulo respiratorio ramificándose, con una transición epitelial (Ep) de tipo pseudoestratificado cilíndrico a cúbico simple, se observa una inmunomarcación positiva a nivel del epitelio luminal. El mesénquima (Me) circundante al túbulo respiratorio se aprecia con una distribución densa en los puntos de ramificación e irregular en las zonas distales,

con inmunomarcación cualitativamente más débil. Se observan vasos sanguíneos (Vs) circundantes al túbulo respiratorio (flechas).

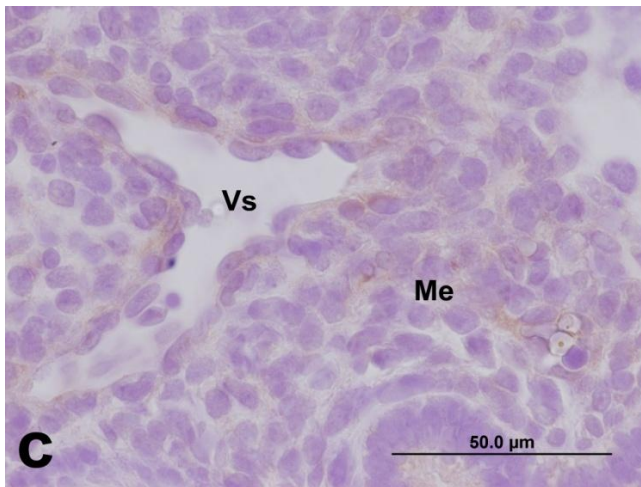


Figura 3c: Corte transversal de pulmón de rata de 17 días de gestación. Imagen ampliada de una vaso sanguíneo (Vs) con inmunomarcación positiva, rodeado de mesénquima (Me) con distribución densa.

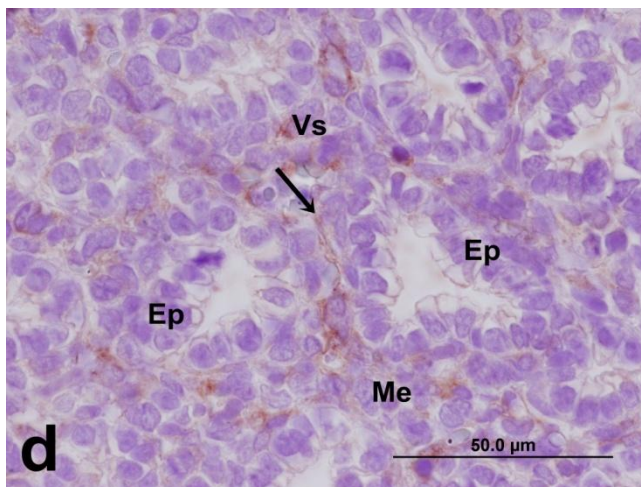


Figura 3d: Corte transversal de pulmón de rata de 20 días de gestación. Se aprecian bronquiolos respiratorios con epitelio (Ep) de tipo cúbico simple, rodeados (flechas) de vasos sanguíneos (Vs) con intensa inmunomarcación y un mesénquima (Me) circundante con distribución más regular y densa en el cual no se observa inmunomarcación.

Figura 4.- Inmunomarcación de IGF II

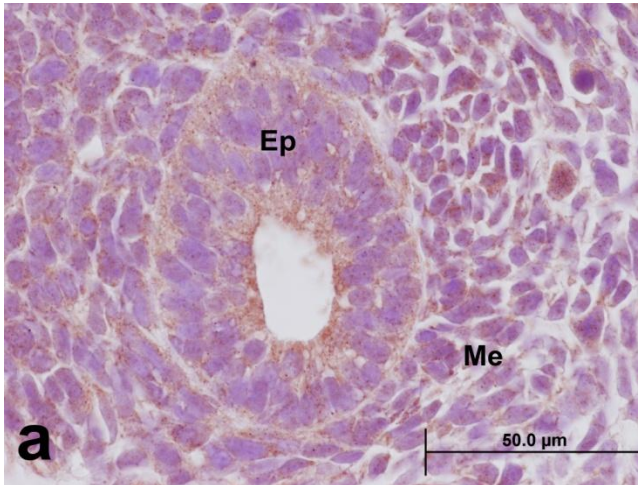


Figura 4a: Corte transversal de pulmón de rata en el día 14 de gestación, en etapa pseudoglandular, en donde se observa un túbulo respiratorio en formación, con un epitelio pseudoestratificado cilíndrico (Ep). Un mesénquima (Me) que circunda al epitelio respiratorio con distribución regular en su diámetro, e irregular en la periferia. Se aprecia una inmunomarcación positiva de tipo granular en el epitelio respiratorio (Ep) y cualitativamente más intensa en células mesenquimales.

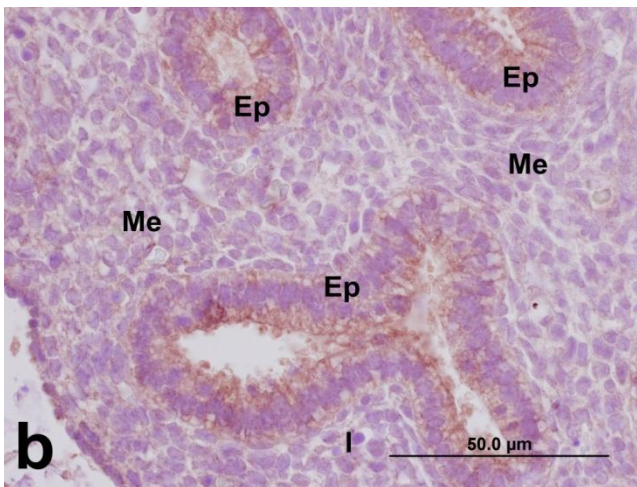


Figura 4b: Corte transversal de pulmón de rata de 17 días de gestación, en el cual se observa un túbulo respiratorio ramificándose, con un epitelio (Ep) en transición, en donde se aprecia una intensa inmunomarcación epitelial en los puntos de ramificación. El mesénquima (Me) circundante al túbulo respiratorio es más denso en los puntos de

ramificación y más laxo y regular en la periferia, sin embargo en su totalidad se expresa una marcación positiva cualitativamente más débil. Se evidencian células con núcleos más definidos y linfocitos (l).

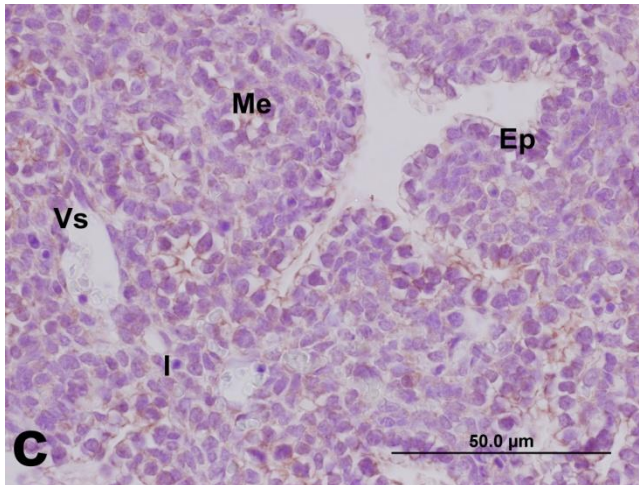


Figura 4c: Corte transversal de pulmón de rata de 20 días de gestación. Se observa un bronquiolo ramificado, con un epitelio (Ep) en transición, de tipo cúbico simple, con inmunomarcación positiva cualitativamente débil, de la misma forma se expresa en el mesénquima (Me), en donde se observa un circundante denso y regular. Además se distinguen vasos sanguíneos (Vs) sin marcación endotelial y linfocitos (l).

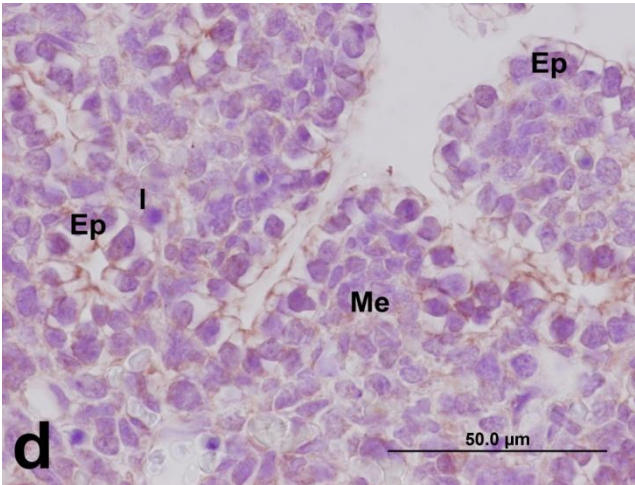


Figura 4d: Corte transversal de pulmón de rata de 20 días de gestación. Imagen ampliada en donde se aprecia el cambio epitelial a tipo cúbico simple (Ep) del túbulo respiratorio y alrededor mesénquima (Me) con distribución densa en las zonas de ramificación. Se observa una inmunomarcación cualitativamente débil tanto en epitelio como en células mesenquimales.

CAPITULO: 4

1.- Discusión

Morfología del Desarrollo Pulmonar

El estudio morfológico del Desarrollo Pulmonar en ratas cepa Wistar de días 14, 17 y 20 de gestación es homologable a los descritos por la literatura.

Cada tipo de vía aérea tiene sus propias características estructurales e histológicas. La transición epitelial de un tipo a otro a lo largo de la totalidad del aparato es más gradual que brusca.

En la etapa canalicular del desarrollo pulmonar de ratas, los capilares están muy organizados a nivel de bronquiolos respiratorios terminales, mientras que las células epiteliales experimentan cambios morfológicos para convertirse en células epiteliales cuboidales (Weng et al., 2006). Se evidenció una disminución a nivel del epitelio a medida que transcurrían los días de gestación. El epitelio respiratorio se transformó progresivamente desde el tipo cilíndrico pseudoestratificado alto y ciliado de la laringe o la tráquea a un tipo cúbico, simple y no ciliado en las vías de menor calibre, lo cual corrobora la literatura ya existente.

Las células epiteliales experimentan cambios morfológicos para convertirse en células epiteliales cuboidales, mientras que los capilares están muy organizados a nivel de bronquiolos respiratorios terminales (Weng et al., 2006). Claramente se pudo identificar la aparición de vasos sanguíneos y redes capilares de manera paralela a la formación de primordios bronquiales, bronquios y bronquiolos. Se observó también la presencia de lámina propia, fibroblastos y tejido muscular liso (salvo en la tráquea) que controla el diámetro de las vías respiratorias, tal como lo relata la literatura.

Durante el desarrollo pulmonar en ratas, la etapa alveolar ocurre desde el quinto al trigésimo día postnatal (Warburton et al., 2000). En esta etapa, la barrera alveolo-capilar se hace progresivamente más fina y delgada, con una capacidad cada vez mayor para el intercambio gaseoso a nivel alveolar. El número y el tamaño de los capilares y alveolos se incrementan notablemente (Weng et al., 2006). Debido a que este proceso ocurre en los

días señalados, no se pudo evidenciar la presencia de sacos alveolares en el desarrollo pulmonar de las ratas en estudio.

La etapa de desarrollo alveolar al nacer varía ampliamente entre especies, en el ratón y la rata es en gran medida después del parto, mientras que en conejillo de indias, las ovejas y los humanos se inicia en el útero y está relativamente avanzado en el nacimiento (Warburton et al., 2000). Esto nos permite inferir que las ratas son animales relativamente lábiles al nacimiento, a diferencia del ser humano que ya está adaptado a la vida extrauterina en condiciones fisiológicas.

Factor de crecimiento Transformante Beta (TGF- β)

Los resultados obtenidos para TGF- β en el presente estudio demuestran la presencia de este factor de crecimiento en el mesénquima y en el epitelio bronquial en etapas tempranas del desarrollo pulmonar (E14), sin embargo, a pesar de no diferenciar la isoforma de TGF- β presente, se logra evidenciar inmunomarcación cualitativamente mas intensa en el mesénquima durante esta etapa, por lo se puede inducir la hipótesis de Warburton et al., (2003) que revela que TGF- β estimula la expresión de moléculas de la matriz extracelular.

Durante el desarrollo pulmonar, este factor de crecimiento ejerce un efecto inhibitorio en la proliferación de células epiteliales y por lo tanto regula negativamente la morfogénesis de este órgano (Warburton et al., 2003). En la investigación se logra observar en la etapa pseudoglandular (E14) y mayormente en la canalicular (E17) que existe una marcación intensa de TGF- β en el epitelio respiratorio, principalmente en la zona del lumen de los puntos de ramificación. Esto podría sugerir que TGF- β podría tener un efecto antiproliferativo que mediaría la ramificación de los túbulos respiratorios. No obstante, al observar con mayor intensidad en el lumen bronquial, podemos sugerir la hipótesis que tal efecto antiproliferativo de este factor de crecimiento se realizaría desde la luz del tubo en formación hacia la periferia regulando negativamente la morfogénesis pulmonar.

Mediante el uso de transcripción inversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 fueron fácilmente detectables en los

primordios de pulmón a los 12-14 días de gestación de ratas (Liu et al., 2000). Durante el desarrollo pulmonar de esta especie, la expresión de ARN mensajero (ARNm) de TGF- β 1 es evidente en el mesénquima, mientras que el ARNm de TGF- β 2 se localiza principalmente en el epitelio de las vías aéreas distales en desarrollo. Los transcritos de TGF- β 3, se encuentran inicialmente en el mesénquima traqueal, pero las señales para TGF- β 3 es visible en el epitelio de los bronquiolos crecientes durante la etapa pseudoglandular (día 14.5) (Liu et. al 2000). A pesar de no distinguir isoformas de TGF- β , del mismo modo a través de la técnica de inmunohistoquímica se revelaron en estas zonas, la presencia de este factor de crecimiento.

Durante la etapa sáculo-alveolar (E 20) en la presente investigación no se observó inmunomarcación, por lo que se puede inferir que TGF- β , solo tiene acción en las etapas de mayor ramificación pulmonar por ser un mediador de la antiproliferación de este órgano, por lo mismo durante esta etapa no se presenta, ya que el pulmón estaría ya desarrollado.

Según lo observado en esta investigación y lo expuesto en la literatura TGF- β es un potente mediador antiproliferativo del desarrollo del árbol respiratorio, evidenciado en la etapa pseudoglandular (E14) y mayormente en la canalicular (E17) en donde existe una marcación intensa de este factor de crecimiento en el epitelio respiratorio, principalmente en la zona del lumen de los puntos de ramificación. Durante la etapa sáculo-alveolar (E 20) en la presente investigación no se observó inmunomarcación, Esto podría sugerir que la función de este factor de crecimiento (TGF- β), tiene acción en las etapas del desarrollo pulmonar en donde existe mayor proliferación celular.

Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEFG)

La técnica histoquímica realizada para la detección de VEGF en el pulmón de rata evidenció inmunoreacción a nivel de epitelio basal y epitelio luminal de los bronquios y bronquiolos en formación, el mesénquima circundante y periférico de estos últimos y en vasos sanguíneos en etapas tempranas y tardías (E 14,17 y 20 días de gestación).

El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) se caracteriza por aumentar la permeabilidad vascular y el crecimiento de las células endoteliales (Voelkel et al., 2006).

Estudios sugieren que el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es conocido por estar involucrado en la angiogénesis y vasculogénesis. En los pulmones del ratón, VEGF se encuentra en los puntos de ramificación de las vías aéreas periféricas (Hislop A., 2005), esto se pudo corroborar mediante la inmunoreacción de dicho factor en el mesénquima circundante a los bronquios y bronquiolos en formación mediante la técnica de inmunohistoquímica.

En el estudio, la reacción a VEGF a nivel epitelial fue en disminución, a diferencia de la zona mesenquimal, en donde se pudo distinguir un aumento de vasos sanguíneos y fusión de éstos, principalmente en áreas cercanas a los bronquiolos. Investigaciones previas, refieren que existe un aumento de la proliferación de células mesenquimales en la región que rodea la vía aérea más distal del brote, sugiriendo que es un efecto periférico impulsado de la vasculogénesis (Hislop A., 2005), lo cual se apoyaría con este estudio, al evidenciarse la presencia de vasos sanguíneos en dicha zona.

Es notoriamente visible la aparición de vasos sanguíneos en mayor cantidad en el área del mesénquima circundante distal, en etapas tempranas del desarrollo pulmonar de ratas, de hecho, las células epiteliales de las vías respiratorias son positivas para el factor de crecimiento endotelial vascular, el cual se expresa más en las regiones de ramificación de la vía aérea distal (Warburton et al., 2003). Esto último queda en evidencia a los 20 días de gestación, en donde se pudo apreciar un mayor aumento de inmunoreacción a nivel de mesénquima en comparación con el epitelio del bronquiolo.

En la actualidad, estudios sugieren que VEGF y sus receptores podrían ser importantes reguladores del crecimiento y la remodelación de los vasos sanguíneos durante toda la vida (Marszalek et al., 2006), motivo por el cual la inmunomarcación es mayor a nivel de mesénquima, lugar en donde ocurre la vasculogénesis de nuevos vasos sanguíneos.

La formación de nuevos capilares por vasculogénesis se produce paralelamente a la formación de las yemas epiteliales en todas las edades. Esto sugiere algún tipo de control por las células epiteliales, dado principalmente por la interacción con el factor de crecimiento vascular endotelial (Hislop, 2005).

Se podría ratificar dicha información de la literatura mediante las inmunomarcaciones positivas obtenidas durante este estudio que manifiestan la aparición de capilares junto con los nuevos primordios bronquiales, tanto de manera circundante como periférica.

Factor de Crecimiento Insulínico Tipo II (IGF-II)

La técnica histoquímica realizada para la detección de IGF II en el pulmón de rata, mostró diferencias en cuanto a su distribución en las diferentes etapas del desarrollo de éste órgano.

Estudios sugieren que IGF-I juega un rol importante como factor de crecimiento en las últimas etapas del desarrollo fetal del pulmón, mientras que IGF-II juega un papel fundamental en el desarrollo embrionario y fetal del pulmón (Nagata et al., 2007). La expresión del ARNm de IGF-I se encuentra en las células mesenquimales, sobre todo en las zonas que rodean el epitelio de las vías respiratorias, mientras que IGF-II se expresa en el epitelio pulmonar durante el período fetal (Silva et al., 2006).

A pesar que en nuestra investigación solo se evidencia la presencia del factor de crecimiento de tipo insulínico II (IGF II) y no se logra establecer una distribución comparativa ante IGF I, si se hizo posible observar la distribución de IGF II durante el periodo fetal del desarrollo pulmonar en el epitelio de los túbulos respiratorios y en el mesénquima. Lo que permite corroborar los resultados a nivel de expresión génica observados por Silva y colaboradores (2006). Se visualizó una marcación positiva en la etapa pseudoglandular (E14), canalicular (E17) y un tanto más débil cualitativamente en la etapa saculo alveolar (E20), esto obedecería a la hipótesis de estudios realizados por Lallemand et al., (1995) que sugieren que los IGFs están presentes durante todo el desarrollo pulmonar.

Lallemand y colaboradores en 1995, realizaron un estudio mediante la técnica de hibridación in situ, la cual se aplicó a una amplia gama de etapas del desarrollo pulmonar, con el fin de localizar el ARNm de IGF I y IGFII, y así evaluar si podrían existir cambios dependientes del tiempo, crecimiento y la maduración del pulmón humano. Se observó IGF en primer lugar en estructuras de origen mesodermico (lámina propia de la vías

respiratorias, cartílago, músculo liso, tejido conectivo de la tabiques interlobulares o la pleura, el mesénquima indiferenciado de las zonas distales, vasos sanguíneos) y luego en el epitelio endodérmico de los diferentes niveles de las vías respiratorias (tráquea, yemas pulmonares y las vías respiratorias). Finalmente, se demostró una síntesis generalizada de IGF en el pulmón fetal, sobre todo en los componentes de origen mesodérmico.

De acuerdo a la técnica inmunohistoquímica para la detección de IGF II en la presente investigación, se puede establecer la presencia de IGF II tanto en tejido de origen mesodérmico como endodérmico, sin embargo se observa la ausencia de este factor de crecimiento en vasos sanguíneos durante todo el periodo de desarrollo incluido (E14 -20), lo cual podría sugerir que IGF-I tendría mayor participación en el desarrollo vascular que IGF-II. Sin embargo, IGF-II se expresa con mayor intensidad en etapas fetales tempranas tanto en mesénquima como en epitelio respiratorio, lo que podría apoyar la hipótesis de Nagata et al., (2007) que revelan la importancia de este factor de crecimiento en la proliferación celular para el desarrollo pulmonar en estadíos tempranos.

Silva et al., (2006) detectaron IGF-I en pulmones embrionarios de ratón en el día 15 (E15), la expresión disminuyó al día 17 (E17) y se mantuvo en niveles bajos hasta el día 21 de gestación. Mientras que IGF-II se expresa predominantemente en las células epiteliales del pulmón, principalmente en las vías aéreas de conducción y su expresión no alcanza un peak hasta el día 19-21 de gestación (Silva et al., 2006). No obstante en este estudio, podría hacer un alcance en cuanto a la diferenciación morfológica entre especies (rata/ratón), ya que se observó un mayor nivel de marcación de IGF-II en etapas fetales tempranas del desarrollo pulmonar de ratas (pseudoglandular y canalicular). Estas diferencias podrían estar dadas por modificaciones propias de cada especie, asociadas al desarrollo del árbol respiratorio. Por otro lado, ambos estudios corroborarían la presencia de IGF II en células del epitelio de los túbulos respiratorios en desarrollo, indicando que la presencia de este factor de crecimiento podría ser importante para la vía área durante su desarrollo.

De acuerdo a los resultados de esta investigación mas los datos bibliograficos expuestos, la función probable de IGF II en el árbol respiratorio es la proliferación celular para el desarrollo pulmonar en estadíos tempranos, ya que se expresa con mayor

intensidad en etapas fetales tempranas tanto en mesénquima como en epitelio respiratorio.

2.- Conclusiones y Sugerencias

Conclusiones:

- Las modificaciones temporo/espaciales de la distribución de los factores de crecimiento es paralela a lo descrito en la literatura respecto a la expresión génica de dichos factores durante el desarrollo pulmonar en ratas.
- Existe diferencias temporo/espaciales en la distribución del Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF- β) en las etapas del desarrollo pulmonar de ratas de la cepa Wistar. A nivel epitelial se observa la presencia de este, los días 14 y 17 de gestación, lo cual apoya a la literatura que refiere ser un factor con efectos antiproliferativos en el desarrollo. Lo anterior explicaría la ausencia de este factor en el día 20 de gestación debido a que en esta etapa culmina la formación estructural de este órgano. En mesénquima se observa en etapas tempranas del desarrollo ya que este TGF- β estimula la expresión de moléculas de la matriz extracelular, mientras que en el endotelio la inmunomarcación es negativa.
- Existe diferencias temporo/espaciales en la distribución del Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF) en las etapas del desarrollo pulmonar de ratas de la cepa Wistar. A nivel epitelial, se observa la presencia de éste, los días 14 y 17 de gestación, mientras que el día 20 de gestación la inmunomarcación desaparece. En la zona mesenquimática se observa inmunomarcación el día 14 de la gestación, y a medida que avanza ésta disminuye notoriamente. Esto se puede explicar por el supuesto control que ejercen las células epiteliales en el proceso de vasculogénesis dado por la interacción con el factor de crecimiento vascular endotelial. Contrario a lo descrito anteriormente sucede a nivel endotelial, pues al ser un factor de crecimiento vascular endotelial , induce la proliferación y crecimiento de vasos sanguíneos y red capilar según la teoría, quedando de manifiesto al expresarse de manera más notable a medida que transcurren los días.
- Existe diferencias temporo/espaciales en la distribución del Factor de Crecimiento de tipo insulínico II (IGF II), a nivel epitelial y mesenquimal se observa la presencia

de este factor de crecimiento durante todas las etapas del desarrollo pulmonar estudiadas, mientras que en endotelio no se observó. La función probable de IGF II en el árbol respiratorio es la proliferación celular para el desarrollo pulmonar en estadios tempranos, ya que se expresa con mayor intensidad en etapas fetales tempranas tanto en mesénquima como en epitelio respiratorio.

- Los resultados morfológicos son homologables a los descritos previamente en la literatura. Proceso dinamica,

Sugerencias:

- Realizar estudios de la distribución y/o presencia/ausencia de factores de crecimientos en patologías pulmonares congénitas e incentivar el conocimiento científico para el avance de los tratamientos.
- Realizar estudios complementarios que establezcan la intensidad de la inmunomarcación de los factores de crecimiento de acuerdo a metodologías ya establecidas.
- Realizar estudios de la distribución de factores de crecimiento en las diferentes etapas del desarrollo pulmonar humano, debido a la similitud con el desarrollo pulmonar de ratas.
- Aportar con esta investigación a la formación de pregrado de la carrera de Obstetricia y Puericultura en la cátedras de ciencias básicas en los laboratorios prácticos de histología, embriología, biología celular.
- Incorporar al profesional matrona/matrón al trabajo en equipo multidisciplinario de neonatólogos, pediatras, cirujanos infantiles, patólogos, entre otros, en el manejo de situaciones clínicas que requieran investigaciones científicas.

Bibliografía

Publicación de revistas:

Baserga R, Morrione A, Prisco M. (1998) *“Growth Factors, Cell Proliferation, and Apoptosis”* Heart Failure Rev. Vol. 3, 5–14.

Costa R., Kalinichenko V. and Lim L. (2001) *“Transcription factors in mouse lung development and function”* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol Vol 280, 823-838.

Del Moral P., Sala F., Tefft D., Shi W., Keshet E., Bellusci S., Warburto D. (2006) *“VEGF-A signaling through Flk-1 is a critical facilitator of early embryonic lung epithelial to endothelial crosstalk and branching morphogenesis”* Developmental Biology Vol 290, 177 – 188.

DeMello D. and col. (1997) *“Early Fetal Development of lung vasculature”*. Am journal Respiratory Cell. Mol. Biol., Vol. 16, 568 - 81

Ferrara N. and Davis-Smyth T. (1997) *“The Biology of Vascular Endothelial Growth Factor”* Endocrine Reviews Vol. 18, 4-25.

Gálvez Gastélum F., Sandoval A., Armendáriz J. (2004) *“Factores de Crecimiento Transformante B Como Blanco Terapéutico”*. Instituto Nacional Salud Pública de México, Vol. 46, número 004.

Gerecht Nir S., Osenberg S., Nevo O., Ziskind A., Coleman R. and Itskovitz-Eldor J. (2004) *“Vascular Development in Early Human Embryos and in Teratomas Derived from Human Embryonic Stem Cells”* Department of Obstetrics and Gynecology, Rambam Medical Center, Haifa, Israel Biology of Reproduction Vol.71, 2029–2036.

Han R., Post M., Tanswell A. and Lye S. (2003) *“Insulin-Like Growth Factor-I Receptor–Mediated Vasculogenesis/ Angiogenesis in Human Lung Development”*.

Hislop A. (2002) *“Airway and blood vessel interaction during lung Development”* Review Anatomical Society of Great Britain and Ireland Vol 201, 325–334.

Hislop A. (2005) *“Developmental biology of the pulmonary circulation”* Reviews Paediatric Respiratory Vol 6, 35–43.

Iñiguez y col., (2008) *Revista Neumología Pediátrica, Sociedad Chilena de Neumología Pediátrica.* Vol,3, 148-155.

Joshi S., Kotecha S. (2007) *“Lung growth and development”* Early Human Development Vol 83, 789–794.

Klempt M., Hutchins A., Gluckman P. and Skinner S. (1992) *“IGF binding protein-2 gene expression and the location of IGF-I and IGF-II in fetal rat lung”* Developmental Biochemistry and Molecular Endocrinology Laboratories, Department of Paediatrics, School of Medicine, University of Auckland, Private Bag, Auckland, New Zealand. Development Vol. 115, 765-772

Lallemant A., Ruocco A., Philippe M, Jolyz and Dominique A., Gaillard (1995) *“In vivo localization of the insulin-like growth factors I and II (IGF I and IGF II) gene expression during human lung development”* Int. Journal. De, Bioi. Vol. 39, 529-537.

Lin S., Lerch T., Cook R., Jardetzky T. and Woodruff T. (2006) *“Focus on TGF- β Signalling: The structural basis of TGF- β , bone morphogenetic protein, and activin ligand binding”* Society for Reproduction and Fertility Vol. 132, 179–190.

Liu J., Tseu I, Wang J., Tanswell K. and Post M. (2000) *“Transforming Growth Factor β 2, But Not β 1 and β 3, Is Critical for Early Rat Lung Branching”* Developmental Dynamics Vol 217, 343–360.

Mager E., Renzetti G., Auais A., Piedimonte G. (2007) *“Growth factors gene expression in the developing lung”* Acta Pediátrica Vol 96, 1015–1020.

Marszalek A., Daa T., Kashima K. (2001) *“Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Its Receptors in the Developing Rat lung”* Review Japanese Journal of Physiology Vol 51. 313 – 318.

Mérida-Velasco JA, Sánchez-Montesinos I, Espín Ferra J, et al. (1994) *“Development of the human lower deciduous teeth: an example of epithelial-mesenchymal interaction”* Biomed Res; Vol 5/1, 47 - 56

Nagata K., Masumoto K., Uesugi T., Yamamoto S., Yoshizaki K., Fukumoto S., Nonaka K., Taguchi T. (2007) *“Effect of insulin-like-growth factor and its receptors regarding lung development in fetal mice”*.

Open Access

Pannier E., Irwin J., Giudice L. (1994) *“Insulin-like growth factor-binding proteins in the human fetus: tissue-specific protein secretion, immunologic characterization, and gene expression”*. Department of Gynecology and Obstetrics, Stanford University Medical Center, Journal Obstet Gynecol. Vol 171, 746-52.

Papaioannou A., Kostikas K., Kollia P. and Gourgoulisanis K. (2006) *“Clinical implications for Vascular Endothelial Growth Factor in the lung: friend or foe?”* Review Respiratory Research Vol 7, 1-13.

Pavelic J., Matijevic T., Knezevic J. (2007) *“Biological & physiological aspects of action of insulin-like growth factor peptide family”*.

Pusztaszeri M., Seelentag W. and Bosman F. (2006) *“Immunohistochemical Expression of Endothelial Markers CD31, CD34, von Willebrand Factor, and Fli-1 in Normal Human Tissues”* Review Journal of Histochemistry & Cytochemistry Vol. 54, 385–395.

Silva D., Venihaki M., Guo W. and Lopez M. (2006) *“Igf2 Deficiency Results in Delayed Lung Development at the End of Gestation”* Endocrinology Vol. 12, 5584–5591.

Trotter A., Kipp M., Schrader R, and Beyer C. (2009) *“Combined Application of 17β-Estradiol and Progesterone Enhance Vascular Endothelial Growth Factor and Surfactant*

Protein Expression in Cultured Embryonic Lung Cells of Mice” International Review Journal of Pediatrics. Vol. 2009, 1–8.

Voelkel N., Vandivier R. and Tuder R. (2006) “*Vascular endothelial growth factor in the lung*” Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol Vol. 290, 209-221.

Warburton D, Zhao J, Berberich MA, Bernfield M. (1999) “*Molecular embryology of the lung: then, now, and in the future*”

Warburton D., Bellusci S., Del Moral P., Kaartinen V., Lee M., Tefft D. and Shi W. (2003) “*Growth factor signaling in lung morphogenetic centers: automaticity, stereotypy and symmetry*” Review Respiratory Research Vol 4, 1-17.

Warburton D., Schwarz M., Tefft D., Flores Delgado G., Anderson K., Cardosod W. (2000) “*The molecular basis of lung morphogenesis*” Mechanisms of Development Vol 92, 55 – 81.

Weng T., Chen Z., Jin N., Gao L. and Liu L. (2006) “*Gene expression profiling identifies regulatory pathways involved in the late stage of rat fetal lung development*” Review Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol Vol 291, 1027-1037.

Publicación de libros:

Alberts B., and col. (2000) “*The Molecular Biology of the Cell*” 4ª Edición.

Alberts B., and col. (2004) “*Biología Molecular de la Célula*” 4ª Edición.

Carlson Bruce M, (2003) “*Embriología Humana y Biología del Desarrollo*” 2ª Edición.

Carlson Bruce M, (2009) “*Embriología Humana y Biología del Desarrollo*” 4ª Edición.

Keins T. and Vale R. (1999) “*Extracellular Matrix, Anchor and Adhesion Proteins*” 2ª Edición.

Larsen William J., (2003) “*Embriología Humana*” 3ª Edición.

Lodish Harvery and col. (2005) “*Biología Celular y Molecular*” 5ª Edición.

Moore Keith L., and col. (2003) “*Embriología Clínica, El Desarrollo del Ser Humano*” 7ª Edición.

Sitios web:

Sociedad Iberoamericana de Información Científica (SIIC) (2002)
<http://www.siicsalud.com/>

ANEXOS

ANEXO A: Protocolo de tinción Hematoxilina-Eosina

Desparafinación:

Xilol I:	10 minutos
Xilol II:	10 minutos
Xilol III:	10 minutos

Hidratación:

Alcohol 100° I:	5 minutos
Alcohol 100° II:	5 minutos
Alcohol 95°:	5 minutos
Alcohol 70°:	5 minutos
Agua destilada:	5 minutos

Coloración con hematoxilina de Mayer:

	Dipping
Viraje en agua corriente:	5 minutos
Agua destilada:	5 minutos
Alcohol de 95°:	Dipping

Coloración con Eosina Alcohólica:

10 segundos

Deshidratación y Montaje

Alcohol de 100° I:	2.5 minutos
Alcohol de 100° II:	2.5 minutos
Alcohol / Xilol:	2.5 minutos
Xilol I:	5 minutos
Xilol II:	5 minutos

ANEXO B: Protocolo Inmunohistoquímica de VEGF

Desparafinación:

Xilol I: 20 minutos

Xilol II: 20 minutos

Hidratación:

Alcohol 100% I: 20 minutos

Alcohol 100% II: 20 minutos

Alcohol 95 %: 20 minutos

Alcohol 70%: 20 minutos

Agua destilada: 15 minutos

Recuperacion antigénica en Vaporera:

15 minutos, 90^a

(Buffer Citrato de sodio 10 mM, PH 6)

Reposo en buffer citrato de Sodio: 15 minutos, T^o ambiente

Agua destilada: 10 minutos

3 baños en PBS 0.1 M: 5 minutos c/u

Bloqueo peroxidasa endógena :

30 minutos, T^o ambiente

H2O2 3% en PBS: 3 ml H2O2

97 ml PBS 0.1 M

3 baños en PBS 0.1 M: 5 minutos c/u

Bloqueo suero normal de cabra:

30 minutos

Dako, 5% en PBS-Tween 20)

Bloqueo de sitios inespecíficos:

30 minutos

(Cas Block)

Incubación Anticuerpo 1^o:

Overnigth, 4^oC

Anti VEGF hecho en conejo

(Dilución 1: 250)

3 baños en PBS 0.1 M: 5 minutos c/u

Incubación Anticuerpo 2º:

1 hora a T° ambiente (25°C)

Anti IgG conejo hecho en cabra + HRP

Dilución: 1:500

3 baños en PBS 0.1 M: 5 minutos c/u

Revelacion Peroxidasa:

1.5 minutos

(Sustrato cromógeno Nova-Red, Vector)

H2O destilada +	1	+	2	+	3	+	H2O2
2.5 ml	75 ul		50 ul		50 ul		50 ul

Agua destilada: 5 minutos, T° ambiente

Contraste coloración Hematoxilina:

10- 20 segundos

Viraje en agua corriente: 5 minutos

Deshidratación

Alcohol 95%: 5 minutos

Alcohol 100% I: 5 minutos

Alcohol 100% II: 5 minutos

Alcohol/ Xilol: 5 minutos

Aclaración y montaje

Xilol I: 5 minutos

Xilol II: 5 minutos

ANEXO C: Protocolo Inmunohistoquímica de IGF II

Desparafinación:

Xilol I: 20 minutos

Xilol II: 20 minutos

Hidratación:

Alcohol 100% I: 20 minutos

Alcohol 100% II: 20 minutos

Alcohol 95 %: 20 minutos

Alcohol 70%: 20 minutos

Agua destilada: 15 minutos

Recuperación antigénica en Vaporera:

20 minutos, 90%

(Buffer Citrato de sodio 10 mM, PH 6)

Reposo en buffer citrato de Sodio: 20 minutos, T^o ambiente

Agua destilada: 15 minutos

3 baños en PBS 0.1 M: 5 minutos c/u

Bloqueo peroxidasa endógena:

30 minutos, T^o ambiente

H₂O₂ 3% en PBS: 3 ml H₂O₂

97 ml PBS 0.1 M

3 baños en PBS 0.1 M: 5 minutos c/u

Bloqueo suero normal de conejo:

30 minutos

Dako, 5% en PBS-Tween 20)

Bloqueo de sitios inespecíficos:

30 minutos

(Cas Block)

Incubación Anticuerpo 1^o:

Overnigth, 4°C

Anti IGF I y II hecho en cabra

(Dilución 1: 150)

3 baños en PBS 0.1 M: 5 minutos c/u

Incubación Anticuerpo 2º: 1 hora a T° ambiente

Anti Ig G cabra hecho en conejo, biotinilado

Dilución: 1:5000

3 baños en PBS 0.1 M: 5 minutos c/u

Incubación Streptoavidina-peroxidasa (vector): 1 hr, T° ambiente (25°)

A + B + PBS

10 ul 10 ul 980 ml

3 baños en PBS 0.1 M: 5 minutos c/u

Revelación Peroxidasa: 2 minutos

(Sustrato cromógeno Nova-Red, Vector)

H2O destilada + 1 + 2 + 3 + H2O2
2.5 ml 75 ul 50 ul 50 ul 50 ul

Agua destilada: 5 minutos, T° ambiente

Contraste coloración Hematoxilina: 10- 20 segundos

Viraje en agua corriente: 5 minutos

Deshidratación

Alcohol 95%: 2.5 minutos

Alcohol 100% I: 2.5 minutos

Alcohol 100% II: 2.5 minutos

Alcohol/ Xilol: 2.5 minutos

Aclaración y montaje

Xilol I: 5 minutos

Xilol II: 5 minutos

ANEXO D: Protocolo Inmunohistoquímica TGF-B 1, 2,3

Desparafinación:

Xilol I: 20 minutos

Xilol II: 20 minutos

Hidratación:

Alcohol 100% I: 20 minutos

Alcohol 100% II: 20 minutos

Alcohol 95 %: 20 minutos

Alcohol 70%: 20 minutos

Agua destilada: 15 minutos

Recuperación antigénica en Vaporera: 15 minutos, 90%

(Buffer Citrato de sodio 10 mM, PH 6)

Reposo en buffer citrato de Sodio: 15 minutos, T° ambiente

Agua destilada: 15 minutos

3 baños en PBS 0.1 M: 5 minutos c/u

Bloqueo peroxidasa endógena: 30 minutos, T° ambiente

H2O2 3% en PBS: 3 ml H2O2

97 ml PBS 0.1 M

3 baños en PBS 0.1 M: 5 minutos c/u

Bloqueo suero normal de cabra: 30 minutos

Dako, 5% en PBS-Tween 20)

Bloqueo de sitios inespecíficos: 30 minutos

(Cas Block)

Incubación Anticuerpo 1°: Overnigth, 4°C

Anti TGF-B 1, 2, 3 hecho en conejo

(Dilución 1: 50)

3 baños en PBS 0.1 M: 5 minutos c/u

Incubación Anticuerpo 2º:

1 hora a T° ambiente (25°C)

Anti Ig G conejo hecho en cabra + HRP

Dilución: 1:500

3 baños en PBS 0.1 M: 5 minutos c/u

Revelación Peroxidasa:

1 minuto, 30 segundos

(Sustrato cromógeno Nova-Red, Vector)

H2O destilada +	1	+	2	+	3	+	H2O2
2.5 ml	75 ul		50 ul		50 ul		50 ul

Agua destilada: 5 minutos, T° ambiente

Contraste coloración Hematoxilina:

10- 20 segundos

Viraje en agua corriente: 5 minutos

Deshidratación

Alcohol 95%: 5 minutos

Alcohol 100% I: 5 minutos

Alcohol 100% II: 5 minutos

Alcohol/ Xilol: 5 minutos

Aclaración y montaje

Xilol I: 5 minutos

Xilol II: 5 minutos

ANEXO E: Protocolo de fijación de Paraformaldehído

Paraformaldehído:	24 a 48 horas
Etanol 50°:	30 minutos
Etanol 70°:	30 minutos
Etanol 80°:	30 minutos
Etanol 96°:	30 minutos
Etanol 95°:	30 minutos
Etanol 100° I:	30 minutos
Etanol 100° II:	30 minutos
Etanol 100° III:	30 minutos
Xilol I:	15 minutos
Xilol II:	15 minutos
Xilol III:	15 minutos
Parafina I:	30 minutos
Parafina II:	30 minutos
Parafina III:	30 minutos

ANEXO F: Protocolo de fijación de Methacarn

Methacarn:	4 a 8 horas
Etanol 100° I:	30 minutos
Etanol 100° II:	Overnigth a 4°C
Etanol 100° III:	30 minutos
Xilol I:	15 minutos
Xilol II:	15 minutos
Xilol III:	15 minutos
Parafina I:	30 minutos
Parafina II:	30 minutos
Parafina III:	30 minutos