



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**DIFERENCIACIÓN TÉMPORO-ESPACIAL DE ESTRUCTURAS
PULMONARES RELACIONADAS CON APOPTOSIS,
PROLIFERACIÓN, VASCULOGÉNESIS Y BMP-4 DE LA CEPA**
Sprague dawley

MARÍA CORINA PEÑA JIMÉNEZ

Memoria para optar al Título

Profesional de Médico Veterinario

Departamento de Ciencias Biológicas Animales

PROFESORA GUÍA: RAQUEL CEPEDA CANALES

SANTIAGO, CHILE
2007



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



DIFERENCIACIÓN TÉMPORO-ESPACIAL DE ESTRUCTURAS PULMONARES RELACIONADAS CON APOPTOSIS, PROLIFERACIÓN, VASCULOGÉNESIS Y BMP-4 DE LA CEPA *Sprague dawley*

MARÍA CORINA PEÑA JIMÉNEZ

Memoria para optar al Título

Profesional de Médico Veterinario

Departamento de Ciencias Biológicas Animales

NOTA FINAL:

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA	: RAQUEL CEPEDA C.
PROFESOR CONSEJERO	: RICARDO OLIVARES P-M.
PROFESOR CONSEJERO	: GUSTAVO FARIAS R.

SANTIAGO, CHILE
2007

ÍNDICE DE CONTENIDOS.

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	2-16
III.	OBJETIVOS	
1.	Objetivo General	17
2.	Objetivos Específicos	17
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS	18-19
V.	RESULTADOS	
1.	Estudio descriptivo:	
1.1	E12-E15.....	20-31
1.2	E16-E18.....	32-43
1.3	E19-E20.....	44-50
1.4	R.N.....	51-53
	Tabla Resumen.....	54-57
2.	Estudio morfométrico:	
2.1	Proliferación celular.....	58
2.2	Apoptosis celular.....	58
2.3	Expresión de BMP-4.....	59
2.4	Expresión de VEGF-A.....	59-60
2.5	Expresión de fvW.....	60-61
VI.	DISCUSIÓN	62-68
VII.	CONCLUSIONES	69-70
VIII.	BIBLIOGRAFÍA	71-74
IX.	ANEXOS	75-80

RESUMEN.

El desarrollo pulmonar es un proceso complejo y dinámico que implica una serie de interacciones entre los tejidos involucrados a través de la expresión de distintas moléculas que actúan promoviendo o inhibiendo los mecanismos del desarrollo implicados en este sistema.

Para lograr identificar la expresión témporo-espacial de moléculas que participan en la diferenciación de estructuras pulmonares se utilizaron embriones de rata de la cepa *Sprague dawley* de 12 días post-coito a recién nacido. Se obtuvieron cortes seriados que fueron tratados con técnicas inmunohistoquímicas para detectar proliferación celular (PCNA), apoptosis (TUNEL), diferenciación celular (BMP-4), desarrollo vascular (VEGF y fvW) y método histoquímico para identificar membrana basal y surfactante pulmonar (H-PAS).

El patrón de expresión de las moléculas estudiadas varió al avanzar el desarrollo, así, con PCNA se observó una gran proliferación de células mesenquimáticas y epiteliales en las etapas iniciales (E14); la diferenciación, a distintos tipos celulares observada después del pico de proliferación, es coincidente con el incremento de la inmunomarcación con BMP-4 (E16), cuya curva de expresión fue antagónica a la de PCNA, patrón que se repitió en edades más avanzadas (E18), indicando la participación de esta molécula en mecanismos de diferenciación celular. La inmunomarcación de la actividad apoptótica fue siempre menor a la de los otros anticuerpos, aumentando levemente en las últimas edades, coincidiendo con la remodelación pulmonar, lo que podría indicar que éste sería su rol principal en el desarrollo pulmonar.

En las etapas iniciales, junto con el desarrollo de los primeros conductos respiratorios, se observó con VEGF-A la formación de una red vascular por vasculogénesis paralela a estas estructuras. En edades más avanzadas se detectaron en la zona periférica del esbozo pulmonar, células endoteliales inmunomarcadas con fvW, formando por angiogénesis pequeños vasos sanguíneos relacionados estrechamente a los futuros alvéolos pulmonares. Al avanzar el desarrollo (E17) ambas redes se fusionaron para lograr al momento del nacimiento, un órgano capaz de realizar una adecuada función de hematosis.

La aplicación del método de PAS permitió observar, desde las primeras edades la relación de la membrana basal con la diferenciación y organización de células epiteliales de los conductos respiratorios y la desorganización de ésta en el extremo distal del conducto que se dividirá dicóticamente, así como también un aumento de la reacción PAS positiva en el mesénquima próximo a este punto de bifurcación.

La reacción de PAS permitió visualizar la actividad secretora de células diferenciadas, coincidiendo con la mayor expresión de BMP-4. Así, en E15 se detectó reacción PAS en células epiteliales de conductos respiratorios correspondientes a células caliciformes, coincidiendo con inmunomarcación con BMP-4 en las mismas células. También se encontró tinción PAS en AEC II lo que se corrobora con la fuerte reacción positiva en el interior de los sacos alveolares, desde E17 hasta el nacimiento, como consecuencia de la secreción de surfactante pulmonar por estos neumocitos.

Estas complejas interacciones dan como resultado un sistema respiratorio funcional que culmina después del nacimiento.

SUMMARY.

The pulmonary development is a complex and dynamic process that implies a series of interactions between the involved tissues across the expression of different molecules that act promoting or inhibiting the mechanisms of the development involved in this system.

To identify the temporo-spatial expression of molecules which take part in the differentiation of pulmonary structures, rat embryos of the *Sprague dawley* strain, from 12 days post-coitus to birth were used. Cuts were obtained in series that were treated with immunohistochemical techniques to detect cellular proliferation (PCNA), apoptosis (TUNEL), cellular differentiation (BMP-4), vascular development (VEGF and fvW) and histochemic method to identify basement membrane and lung surfactant (H-PAS).

The model of expression of the studied molecules changed as embryo development progressed. With PCNA a great proliferation in the initial stages (E14) was observed at both, mesenchymal and epithelial cells. The differentiation to different cellular types observed after proliferation peak, is coincidental with the increase of the immunostaining with BMP-4 (E16), where its expression curve was antagonistic to that of the PCNA model, pattern repeated at more advanced ages (E18) indicating the participation of this molecule in mechanism of cellular differentiation. The immunostaining of apoptotic activity was always lower than those of the other antibodies; slightly increasing in the last stages, coinciding with the pulmonary remodeling what might indicate that this would be its main role in the pulmonary development.

In the initial stages, together with the development of the first respiratory conduits, formation of a vascular network by vasculogenesis parallel to these structures was observed with VEGF-A. In more advanced embryo ages in the peripheral zone of the pulmonary sketch, fvW immunostained endothelial cells were detected, forming small blood vessels by angiogenesis narrowly related to the future pulmonary alveoli. As development progressed, both networks fused in under to attain at birth time, an organ capable of performing a suitable function of hematosi.

The application of the PAS method allowed to observe, from the first ages, the relationship of the basal membrane with the process of differentiation and organization of

epithelial cells from the respiratory ducts and its disorganization at the distal end of the conduit that will be dichotomically divided. An increase of the positive PAS reaction in the mesenchyma next to this bifurcation point of the airways was also observed.

The PAS method allowed to observe the secretory activity of differentiated cells, coinciding with the highest expression of BMP-4. Thus, in E15 PAS reaction in epithelial cells of respiratory ducts, corresponding to caliciforms cells was detected, coinciding with BMP-4 immunostaining in the same cells. Also PAS staining in AEC II was observed, which is corroborated by the strong positive reaction inside the alveolar sacks, from E17 to birth, as a consequence of surfactant secretion from these pneumocytes.

These complex interactions give as a result a functional respiratory system that culminates after birth.

I. INTRODUCCIÓN.

El sistema respiratorio está formado por los pulmones y una serie de vías respiratorias que hacen posible el intercambio gaseoso con el exterior, permitiendo el aporte de oxígeno a los tejidos y la eliminación del dióxido de carbono lo que implica una dramática remodelación del pulmón en formación para llegar a obtener la arquitectura óptima para lograr una hematosis adecuada.

En la formación de este sistema participan diferentes mecanismos del desarrollo, entre los que destacan proliferación celular, diferenciación y apoptosis, todos ellos implican la ocurrencia de interacciones de factores intracelulares y extracelulares secretados por los diferentes tipos celulares involucrados, que pueden actuar de manera endocrina o apocrina y su relación con la matriz extracelular. Estos factores cumplen roles importantes en la maduración pulmonar, ya sea guiando la migración celular, dando soporte a las células o induciendo cambios en los tejidos.

El desarrollo pulmonar es un proceso coordinado que permite dividirlo en cinco etapas para su estudio, logrando identificar en cada una de ellas la ocurrencia o no de los diferentes mecanismos del desarrollo a través de la aparición de estructuras específicas características de cada una de ellas, o por el marcaje de ciertas moléculas a través de anticuerpos que permiten identificar en forma más precisa y detallada la expresión de ciertas moléculas intrínsecas de cada mecanismo, sin embargo la magnitud de cada uno de estos procesos durante el desarrollo pulmonar aún no está totalmente cuantificada.

Por lo tanto cabe señalar que los factores involucrados en el desarrollo pulmonar, al igual que los mecanismos participantes, son hoy en día el foco primario de estudio en la organogénesis pulmonar.

En este estudio, se aplicaron técnicas inmunohistoquímicas con anticuerpos específicos, que permitieron visualizar, a través de microscopía óptica, la expresión de las moléculas mencionadas anteriormente y su relación con la diferenciación de estructuras pulmonares y la ocurrencia de mecanismos del desarrollo como proliferación y apoptosis.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

El aparato respiratorio comienza su desarrollo como una evaginación endodérmica de la pared ventral del intestino anterior, llamada surco laringotraqueal, el que luego se profundiza para formar el divertículo laringotraqueal (Carlson, 2000).

El extremo caudal ciego de este divertículo continúa creciendo caudalmente en el mesénquima, ventral al esófago y representa el esbozo pulmonar. A medida que se alarga, se bifurca para formar dos yemas bronquiales, que continúan creciendo y ramificándose, para originar los árboles bronquiales de los pulmones (Carlson, 2000). A medida que se desarrollan los bronquios se desarrollan placas cartilaginosas a partir del mesénquima circundante. Posteriormente se forman los bronquiolos terminales que suelen ramificarse tres veces para formar los bronquiolos respiratorios, los que en un principio poseen epitelio de revestimiento cúbico ciliado, que posteriormente con las ramificaciones se transforma a epitelio cúbico bajo simple y sin cilios (Moore, 1990).

Los bronquiolos respiratorios se continúan con los conductos alveolares. Poseen paredes interrumpidas por alvéolos, que corresponden a divertículos saculares revestidos por epitelio plano (Liu y Post, 2000).

Los conductos alveolares se ramifican dos o tres veces para terminar en cámaras pequeñas llamadas atrios. En estos espacios se originan los sacos alveolares o alvéolos que en un principio corresponden a cordones sólidos de células cúbicas y que con el tiempo la luz de los bronquios va penetrando en ellas y se adelgaza su epitelio. La morfología, función y fenotipo de las células del epitelio alveolar cambian continuamente durante el desarrollo (Liu y Post, 2000).

El endodermo del esbozo pulmonar sufre ramificaciones para dar origen al árbol tridimensional de las vías aéreas, mientras que a partir del mesodermo que rodea a este tubo endodérmico, se diferenciará el tejido conectivo, el músculo liso y los cartílagos de la pared de la tráquea y bronquios (Carlson, 2000), además de las células musculares lisas de la vasculatura pulmonar (Shu *et al.*, 2002).

Las interacciones inductivas entre epitelio y mesénquima son cruciales para la generación y modelación del pulmón de los mamíferos induciendo proliferación celular, diferenciación y migración y por lo tanto, activación transcripcional de genes específicos

del pulmón. Así como el mesénquima produce factores de crecimiento y señales moleculares que son necesarias para el desarrollo del epitelio de las vías aéreas, el epitelio también produce señales moleculares importantes para la diferenciación y proliferación mesenquimática, como la Proteína Morfogenética Ósea 4 (BMP-4) y *Sonic Hedgehog* (SHH) (Shu *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2003).

Ratones deficientes de SHH exhiben la fusión del tubo tráqueo-esofágico, pérdida de la asimetría pulmonar (aparece como un solo lóbulo) y disminuye la expansión de la región alveolar. Una correcta expresión de Proteína Morfogenética Ósea-4 (BMP-4), Factor de Crecimiento Hepático (HGF) y Factor de Crecimiento Fibroblástico-10 (FGF-10) son críticos en la regulación de la proliferación y migración de las células epiteliales pulmonares (Costa *et al.*, 2001).

Durante el desarrollo pulmonar se pueden distinguir las siguientes etapas:

1. **Etapa embrionaria:** Abarca desde la formación inicial del divertículo respiratorio hasta los principales segmentos broncopulmonares (Moore, 1990). Los vasos sanguíneos primitivos comienzan a formarse a partir de células mesenquimáticas, iniciándose el proceso de vasculogénesis (Bhatt *et al.*, 2000).
2. **Etapa pseudoglandular:** Es el período de mayor diferenciación 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 (Carlson, 2000). Durante esta etapa, se puede observar mayor cantidad de vasos sanguíneos primitivos, cuyos márgenes son demarcados por una delgada capa de células alargadas (Bhatt *et al.*, 2000).
3. **Etapa canalicular:** Se caracteriza por la formación de los bronquiolos respiratorios (Carlson, 2000). En esta etapa, se forman nuevos capilares mediante angiogénesis, los cuales se disponen en estrecha proximidad a las células cuboidales del epitelio alveolar (Bhatt *et al.*, 2000). El tejido intersticial disminuye y la barrera epitelial se adelgaza cuando los capilares comienzan a estar en estrecha aposición con el epitelio formando la barrera aire-sangre. Al final de esta etapa se completan las ramificaciones de las vías aéreas y las células epiteliales cuboidales comienzan a diferenciarse a Células Epiteliales Alveolares tipo I (AEC I) y Células Epiteliales Alveolares tipo II (AEC II) (Del Riccio *et al.*, 2004).

4. **Etapa sacular:** Los conductos alveolares originan sacos de aire terminales o alvéolos pulmonares primitivos (Moore, 1990). Esta etapa se caracteriza por una marcada expansión del área capilar, activa angiogénesis, remodelación de capilares alveolares y reducción del tejido mesenquimático (Bhatt *et al.*, 2000). Esto da como resultado que los tabiques interalveolares contengan dos redes capilares separadas por una base de tejido conectivo (Del Riccio *et al.*, 2004).
5. **Etapa alveolar:** Durante el periodo previo al nacimiento, el revestimiento de los sacos aéreos terminales se adelgaza marcadamente, hasta conformar los alvéolos pulmonares característicos y existe un aumento exponencial en la superficie respiratoria del pulmón (Carlson, 2000). La doble red capilar de los tabiques alveolares inmaduros es reducida a sólo una red capilar durante la fase final de la maduración microvascular pulmonar, la que culmina en la vida postnatal (Del Riccio *et al.*, 2004).

La maduración pulmonar fetal, es un proceso que requiere de la adecuada coordinación entre cada una de las etapas descritas, de la ocurrencia de una serie de interacciones entre células y tejidos y de una ordenada proliferación y diferenciación de células pulmonares epiteliales y mesenquimáticas (Moore, 1990; Carlson, 2000).

Pocos estudios han examinado el modelo normal de proliferación celular en el desarrollo pulmonar. Maniscalco *et al.*, (2002), señalan que la proliferación epitelial, en el pulmón, disminuye durante las etapas más tardías de la gestación de la rata, mientras que la proliferación de las células endoteliales aumenta durante este periodo.

A partir de células precursoras epiteliales, se generarían los tipos celulares necesarios para la respiración adulta: *i*) las AEC I o neumocitos membranosos, requeridas para formar el fino estrato difusible que existe entre el lumen de las vías aéreas y la red de capilares pulmonares y, *ii*) las AEC II o neumocitos granulosos, encargadas de la producción de surfactante para mantener la tensión propia de la superficie de las vías aéreas para la respiración (Maniscalco *et al.*, 2002). Las AEC I representan cerca del 40% de la población celular de los alvéolos, pero tapizan el 90% de la superficie de los sacos alveolares. Éstas se caracterizan por ser células muy planas con núcleos aplanados. Las AEC II representan el 60% de la población celular alveolar, pero sólo ocupan el 5 a 10% de la superficie alveolar. Corresponden a células redondeadas que normalmente están localizadas en ángulos obtusos

en los alvéolos poligonales. La diferenciación de AEC II a AEC I está asociada con la disminución de la proliferación de las células epiteliales (Stevens y Lowe, 1998).

Durante el desarrollo pulmonar fetal, la superficie del área de los espacios aéreos aumenta rápidamente y simultáneamente, los cuerpos lamelares de AEC II comienzan a verter su secreción en los espacios aéreos para disminuir la tensión superficial, este proceso coincide con la aparición de material surfactante en los espacios aéreos y fluido amniótico (Morikawa *et al.*, 1999).

Un rápido incremento en los lípidos totales ocurre cuando ya se ha completado la proliferación epitelial en E20, indicando un inicio más rápido de la síntesis de surfactante en ratas. Es en E21 que las AEC II con sus cuerpos lamelares se diferencian a AEC-1 en ratas (Morikawa *et al.*, 1999).

El epitelio del pulmón de rata sufre una lenta, pero continua renovación de sus ocho tipos de células diferenciadas: células ciliadas, células basales no ciliadas, células secretoras mucosas y serosas, células neuroendocrinas, células clara y AEC I y II. A pesar de su continua renovación, cada tipo celular es capaz de establecer y mantener una distribución regional característica a lo largo del eje tráqueo-alveolar del pulmón. Las células basales, secretoras, clara, AEC I y II son capaces de reingresar al ciclo celular para completar su programa de diferenciación, pero aún no está claro si el epitelio pulmonar contiene células troncales (*stem cells*) unipotentes o multipotentes que sostienen el proceso de una proliferación perpetua y una diferenciación espacial bien organizada como la que se observa en el epitelio intestinal de la rata (Randal *et al.*, 1993).

La proliferación celular es dependiente del contacto epitelial célula-célula, el potencial para formar una ramificación del brote pulmonar está restringido a las regiones más distales de los brotes del pulmón y por lo tanto está asociado con su habilidad para mantener y producir diferencias formativas en la composición de la membrana basal (Mollar y Dziadek, 1998).

El estudio de la proliferación celular se puede realizar mediante el uso de anticuerpos monoclonales (Acm), como Ki-67 y PCNA. PCNA (Antígeno Nuclear de Proliferación Celular) es una proteína nuclear no-histona de 36Kd, involucrada en la síntesis y reparación del ADN y cumple un rol fundamental en su replicación semiconservativa. Cofactor de la enzima polimerasa δ , su mayor concentración es en las

fases G1 tardía y S del ciclo celular. Posee una vida media aproximada de 20 hrs. (Maga y Hübscher, 2003). Por su parte, Ki-67 es una proteína nuclear no-histona que tiene un peso molecular de 345 y 395 Kd y es codificada por un gen del cromosoma 10. Tiene vida media corta de aproximadamente 60 a 90 min. y su concentración en las células declina rápidamente después de la fase mitótica (Maniscalco *et al.*, 2002).

Las complejas interacciones del control de la expresión temporal de genes, hormonas, factores de crecimiento, matriz extracelular y factores medioambientales pulmonares locales, como por ejemplo, el espacio torácico, participan en la proliferación y diferenciación celular y han sido los focos primarios de estudios de la organogénesis pulmonar. En otros sistemas de órganos y estructuras corporales, la apoptosis ha sido reconocida como un proceso característico de remodelación de órganos. Aunque generalmente se asume que la apoptosis participa en el desarrollo pulmonar, la información está limitada solamente a la ocurrencia y magnitud de la muerte celular programada. Recientes estudios de apoptosis en pulmón fetal de la rata, examinando el último tercio del desarrollo pulmonar (E16 a E21) confirman la ocurrencia de apoptosis en el desarrollo pulmonar fetal (Sanchez-Esteban *et al.*, 2002).

La mayoría de los estudios en células mamíferas se han enfocado en estudios en cultivos celulares donde las señales de muerte celular programada se inician con factores externos o cambios medioambientales. Hay evidencia que la expresión de los antagonistas y agonistas de la apoptosis varían en diferentes tejidos. Al parecer, probablemente la muerte celular programada que ocurre durante el desarrollo utiliza algunas de las mismas señales de inicio relacionadas con la presencia o la ausencia de factores de sobrevivencia, por ejemplo Factor I de crecimiento insulínico, o inductores de este proceso como los glucocorticoides. Sin embargo, en el pulmón fetal, este proceso es más complicado que en los sistemas de cultivo celular porque es un sistema celular tridimensional de tejidos donde células vecinas pueden producir factores que afectan la sobrevivencia de la célula, o factores humorales de sitios fetales distantes o de la circulación materna que también pueden afectar la sobrevivencia celular (Sanchez-Esteban *et al.*, 2002).

La actividad apoptótica ha sido observada en todas las etapas del desarrollo pulmonar: en el tejido mesenquimático durante las primeras etapas del desarrollo y en el tejido epitelial y mesenquimático a partir de la etapa canalicular (Scavo *et al.*, 1998).

La transición desde la etapa pseudoglandular tardía a la etapa sacular del desarrollo pulmonar se caracteriza por un modelo témporo-espacial específico de actividad apoptótica. Durante este periodo, la actividad apoptótica de las células intersticiales aumenta en el mesénquima periacinar, en capilares y epitelio próximos (Sanchez-Esteban *et al.*, 2002).

El incremento de la apoptosis de AEC II desde la etapa canalicular en adelante coincide con una disminución en la proliferación celular, lo que implica que la apoptosis epitelial contribuye a la remodelación del pulmón durante el desarrollo gestacional tardío. En la etapa embrionaria del desarrollo pulmonar, se observa apoptosis en regiones de formación de nuevos brotes o en el mesénquima subyacente a ramificaciones, que son los sitios donde ocurre una extensa morfogénesis y remodelación epitelial. Es interesante, que las células mesenquimáticas que sufren apoptosis estén junto a células mesenquimáticas en proliferación, sugiriendo que la coordinación de estos dos procesos es importante en las dinámicas celulares asociadas con la ramificación bronquial (Del Riccio *et al.*, 2004).

Es importante que las AEC II se encuentren en mayor cantidad, puesto que sirven como células troncales (*stem cells*) para AEC I. Posteriormente, AEC I constituirán la mayor línea celular de la superficie alveolar, imprescindibles para la maduración de la barrera aire-sangre durante la microvascularización. Después de la alveolarización, AEC II disminuyen, no sólo por diferenciación a AEC I, sino también por apoptosis, la que se extiende hasta el periodo postnatal incluyendo la fase final de la maduración microvascular, lo que da como resultado un adelgazamiento significativo del grueso tabique inter alveolar. Después del nacimiento, la apoptosis surge como un importante proceso luego de una extensa proliferación y subsiguiente transformación de los sáculos primarios a alvéolos funcionales (Del Riccio *et al.*, 2004). Un mecanismo alternativo para el adelgazamiento mesenquimático puede ser a través de una disminución en la proliferación celular del mesénquima (Stiles *et al.*, 2001).

En ratas, durante las primeras dos semanas de vida, ocurre una gran distensión de los espacios alveolares, además fibroblastos y AEC II son producidos en gran número ya que son necesarios para finalizar la alveolarización. Sin embargo, se ha descrito que estas células apoptóticas no exhiben la fragmentación nuclear típica en cuerpos apoptóticos, sugiriendo que AEC II pueden ser eliminadas por macrófagos alveolares en etapas tempranas del proceso apoptótico o por células vecinas, presumiblemente permitiendo

salvar los componentes celulares y evitar así una respuesta inflamatoria (Del Riccio *et al.*, 2004).

In útero, el pulmón es continuamente expuesto a una variedad de fuerzas físicas, incluyendo los movimientos respiratorios fetales (FBM) y distensión tónica. Los FBM son movimientos respiratorios intermitentes característicos que estimulan mecánicamente al pulmón y facilitan la fluidez de los cambios de presión. Esta actividad secretoria de fluidos por el epitelio fetal mantiene una presión pulmonar constante. Los FBM han sido observados en el feto humano a partir del primer trimestre y aumentando hacia el término. Durante el desarrollo del pulmón, como las fuerzas mecánicas aumentan vía secreción de líquidos y FBM, la proliferación de las células pulmonares aumenta, alcanzando el mayor nivel de proliferación en la etapa canalicular del desarrollo que disminuye en las siguientes etapas. Sin embargo, cuando los niveles de proliferación disminuyen, la actividad apoptótica aumenta. El mismo modelo es observado postnatalmente, durante la alveolarización, cuando el pulmón está experimentando altos niveles de distensión de los espacios aéreos como cuando el recién nacido está respirando por sí mismo. La distensión de los espacios alveolares aéreos resulta de la proliferación de fibroblastos y células epiteliales, seguido de la apoptosis de estas células (Bruce *et al.*, 1999).

La apoptosis y la proliferación están sujetas a reguladores del ciclo celular y estímulos como la distensión que afectan a ambos procesos. Inicialmente, en el desarrollo del pulmón, la distensión mecánica puede inducir a las células a ingresar a la fase S del ciclo celular para aumentar la síntesis de ADN y elevar los niveles de proliferación. Sin embargo, durante las etapas tardías del desarrollo pulmonar, futuros incrementos en la distensión o un mecanismo de retroalimentación podría interferir con la normalidad del ciclo celular, conduciendo a las células a las fases Gap 0 (Go) o G1 y eventualmente a la muerte celular (Sanchez-Esteban *et al.*, 2002).

La vía de señales que media la apoptosis de las células epiteliales fetales aún no es clara, pero si se sabe que la apoptosis es dependiente de caspasas. Un potencial candidato es el sistema Fas-Fas ligando (FasL), que podría jugar un rol en el control de la homeostasis de las células epiteliales. La expresión de FasL ha sido observada en las AEC II del pulmón. Por su parte, Fas, es continuamente expresado en el pulmón fetal y sus receptores apicales están presentes en las células bronquiales clara y AEC II. La regulación de FasL se

corresponde con el incremento de la apoptosis de AEC II y la máxima distensión de las vías aéreas, implicando a Fas-FasL como mediador de la apoptosis gestacional tardía, mediada por estiramiento (De Paepe *et al.*, 2000).

La apoptosis ocurre en respuesta a la activación de receptores de membrana específicos, llamados “receptores de muerte”, así como en respuesta a productos mitocondriales como el citocromo C. La familia de receptores de muerte incluye los receptores I y II de TNF, y el receptor de Fas (CD95), que es activado junto con Fas ligando (FasL) en la superficie de linfocitos citotóxicos, o por una forma soluble de FasL (sFasL), que puede ser fragmentada desde membranas celulares por la acción de proteasas específicas como lo son las metaloproteinasas de matriz 7 y 3 (MMP-7, MMP-3). La forma soluble FasL proviene de monocitos sanguíneos activados, pero no provienen de la activación de macrófagos alveolares. La activación de las vías mitocondriales y la del receptor de apoptosis han sido detectadas en el pulmón. Cuando Fas es capturado por FasL, proteínas de unión especializadas, incluyendo el dominio de muerte asociado a Fas (FADD), se agregan alrededor de fragmentos intracelulares de grupos de moléculas de Fas. Este complejo de iniciación de muerte (DISC) recluta moléculas de procaspasa-8, que sufren activación por fragmentación autocatalítica, resultando en la activación de una cascada de caspasas intracelulares. Esto eventualmente causa la activación de endonucleasas, con fragmentación del ADN nuclear y muerte celular (Martin *et al.*, 2005).

La apoptosis se caracteriza por cambios morfológicos rápidos (1 a 2 horas) que incluyen separación de células, contracción del citoplasma, condensación de la cromatina y fragmentación del ADN, dando como resultado la formación de cuerpos apoptóticos. La rapidez de este proceso imposibilita una detección confiable por métodos histológicos tradicionales, por lo que se han desarrollado marcadores específicos para detectar apoptosis, como el ensayo de TUNEL (Terminal deoxytransferase-mediated dUTP nick-end labeling), que permite reconocer, tempranamente, la fragmentación del ADN. En esta prueba, los extremos 3'-OH libres de las hebras de ADN son detectados con nucleótidos modificados y marcados con digoxigenina por medio de la enzima TdT (Terminal deoxynucleotidyl transferase) (Schittny *et al.*, 1998).

Esta técnica tiene la limitación de identificar sólo las células que tienen los fragmentos de ADN disponibles. Lo cual resulta en la identificación de una población de

células bajo apoptosis, pero subestima la magnitud del proceso de apoptosis por no detectar las células en otras etapas de la apoptosis. El examen de los tejidos presenta problemas debido a (1) las células en el tejido son poblaciones heterogéneas y es poco probable que se encuentren en sincronía en el ciclo celular o apoptosis, (2) diferencias geográficas en los tejidos en desarrollo en proliferación celular y apoptosis es probable, y (3) iniciadores de apoptosis identificados en cultivos celulares pueden o no ser los responsables primarios para la apoptosis en los tejidos (Blanco *et al.*, 1998).

La apoptosis en el pulmón es un área interesante en la cual trabajar, en parte porque es un área relativamente nueva que está en rápido desarrollo. Estudios recientes están comenzando a definir algunos roles para la apoptosis en la función pulmonar normal, así como también en la fisiopatología no relacionada a las neoplasias pulmonares. Por ejemplo, en el pulmón como en otros órganos, la apoptosis juega un rol crítico en el desarrollo postnatal (Fine *et al.*, 2000).

El camino que siga cada célula dependerá de su relación con la matriz extracelular, que resulta de vital importancia en el desarrollo, mantención y reparación de los tejidos y vasos sanguíneos. En estos últimos, regula su crecimiento, orientación e induce y mantiene la diferenciación de las células endoteliales (Barrios *et al.*, 2000).

La vascularización del pulmón ocurre a través de vasculogénesis y angiogénesis. La vasculogénesis es el proceso de diferenciación de precursores de angioblastos en el mesénquima para formar células endoteliales; los angioblastos se unen y desarrollan un lumen dando origen a vasos primitivos; mientras que la angiogénesis es la formación de nuevos vasos a partir del endotelio preexistente, la que se lleva a cabo a través de diferentes etapas: activación de la célula endotelial, degradación de la membrana basal, proliferación y migración de células endoteliales, formación de un nuevo capilar con su luz, síntesis de una nueva membrana basal, formación de asas capilares, intususcepción y organización de nuevos vasos sanguíneos (Barrios *et al.*, 2000).

Estos dos procesos dan como resultado la doble irrigación pulmonar formada por: (1) sistema vascular bronquial que proviene de las arterias bronquiales y ofrece sangre oxigenada que nutre a los componentes mayores del árbol bronquial, (2) sistema vascular pulmonar que contiene sangre desoxigenada proveniente de las arterias pulmonares y representa la circulación funcional para realizar el intercambio gaseoso. Las arterias

pulmonares ingresan en cada uno de los pulmones por el hilio y culminan en la extensa red de capilares de los tabiques interalveolares. Ésta vacía su sangre oxigenada en las vénulas y venas pulmonares (Stevens y Lowe, 1998).

Las células endoteliales tempranas se pueden identificar histológicamente utilizando anticuerpos monoclonales como CD 31, Factor de Crecimiento Endotelial Vascular-A (VEGF-A) y anticuerpo policlonal como Factor de Von Willebrand (fvW).

CD 31 es una glicoproteína de 130 Kd expresada en plaquetas, monocitos, granulocitos y células endoteliales (Bhatt *et al.*, 2000).

FvW es una proteína de la fase aguda de la coagulación, que transporta las moléculas del factor VIII, es sintetizada por el endotelio vascular y por lo tanto, está presente en la pared interna de los vasos sanguíneos. Debido a esto, su detección permite visualizar la formación y crecimiento del sistema vascular pulmonar (Barrios *et al.*, 2000).

VEGF-A, miembro de la familia VEGF (VEGF A-E), es una glicoproteína de 42 kD, es un mitógeno específico para las células vasculares endoteliales que aumenta su permeabilidad y también actúa como un factor quimiotáctico para estas células. La detección inmunohistoquímica de VEGF-A demuestra la localización de esta proteína en el epitelio de los espacios aéreos distales, en algunas células epiteliales de los conductos de las vías respiratorias y del tejido mesenquimático, además de encontrarse en las células musculares lisas de los vasos sanguíneos (Bhatt *et al.*, 2000).

La expresión de VEGF-A está relacionada espacial y temporalmente en la proliferación de vasos sanguíneos durante el desarrollo pulmonar embrionario temprano. Ratas deficientes en VEGF-A o sus receptores presentan severos defectos vasculares que son letales al día 8,5-9 de desarrollo embrionario. En órganos con gran desarrollo vascular como riñones y pulmones, VEGF-A puede ser expresado por varios tipos celulares, particularmente células epiteliales que están en estrecho contacto con la microvasculatura. Esta glicoproteína es expresada por células del epitelio bronquial en las primeras etapas del desarrollo embrionario pulmonar. Sin embargo, su expresión en etapas más tardías del desarrollo pulmonar se nota principalmente en las AEC (Bhatt *et al.*, 2000).

VEGF-A es expresado por el mesénquima y el epitelio. Después de E14,5 las células epiteliales de las vías aéreas periféricas son el sitio de expresión predominante de VEGF-A. Las marcadas diferencias en la respuesta a la expresión de esta glicoproteína por

el epitelio proximal versus el distal de las vías aéreas señalan que su efecto es restringido espacialmente al sitio de síntesis (Akeson *et al.*, 2003).

En la etapa pseudoglandular ocurre el aumento de VEGF-A en las células epiteliales respiratorias distales. Los túbulos epiteliales y la red vascular llegan a estar en estrecho contacto para formar la región de intercambio gaseoso, sugiriendo que la expresión epitelial de VEGF-A corresponde a una gradiente morfogénica alrededor de las puntas de las vías aéreas en desarrollo. Esta gradiente dirige la migración de las células endoteliales, el ensamblaje vascular y el alineamiento del epitelio distal y de la red vascular. Los efectos de VEGF-A en el ensamblaje de la red vascular son dependientes del tiempo y del lugar de la inducción (Akeson *et al.*, 2003).

En el pulmón, las AEC II (que secretan surfactante y mantienen la renovación epitelial alveolar) son la mayor fuente de VEGF-A. Se ha demostrado por microscopía electrónica que la expresión de VEGF-A en el desarrollo del epitelio pulmonar en ratones transgénicos tiene como resultado la pérdida de la diferenciación de AEC I, mientras que las características de AEC II permanecen normales, mientras su diferenciación a AEC I es inhibida (Raoul *et al.*, 2004).

Como posibles efectos de VEGF-A en cultivos fetales de pulmón o en pulmones de ratón en vivo se observan la estimulación de células mesenquimáticas y/o endoteliales produciendo mediadores que pueden, en algunas ocasiones, ejercer efectos estimulantes en la proliferación y maduración de AEC II. Por lo tanto, los efectos de VEGF-A son mayormente ejercidos indirectamente a través de interacciones recíprocas paracrinas involucrando otros tipos de células (Raoul *et al.*, 2004).

Utilizando VEGF-A como marcador, Akeson *et al.*, (2003) detectaron angiogénesis en el desarrollo del pulmón de ratón, por primera vez, al día 11 del desarrollo embrionario, como un brote de arterias pulmonares centrales a partir de las cuales se forma una red vascular primitiva; mientras que la vasculogénesis fue detectada desde el día 10,5 del desarrollo embrionario en el mesénquima distal del pulmón, dando origen al lecho capilar distal. En cambio, utilizando anticuerpos anti-factor de von Willebrand (fvW), el cual genera reacción positiva en células endoteliales ya maduras, se describió inmunomarcación sólo en el endotelio de los vasos sanguíneos de gran calibre ubicados en el mediastino en E12, indicando que aún no existen vasos sanguíneos completamente diferenciados en el

esbozo pulmonar, cuya presencia se detectó a partir de E13. La presencia a esta edad, de pequeños vasos cercanos a los mencionados anteriormente, sugeriría la formación de una red vascular a partir de estos vasos extrapulmonares mediante el proceso de angiogénesis (Toloza, 2005).

La rápida expansión de la red vascular ocurre en la etapa pseudoglandular de la morfogénesis del pulmón, de acuerdo a estudios realizados en cultivos celulares con inmunomarcadores para angioblastos (McGowan, 1992; Akeson *et al.*, 2003), lo que en el ratón *Mus musculus* se corresponde con el período que va entre los días E12 y E14 del desarrollo intrauterino (Toloza, 2005). Sin embargo, al utilizar anticuerpos anti-fvW en cortes histológicos de embriones de esa misma especie, se observa recién a partir de E17 una reacción positiva en todo el tejido pulmonar (Toloza, 2005).

El patrón de desarrollo del sistema vascular coincide con el observado en las vías aéreas, sugiriendo la presencia de interacciones entre endotelio y epitelio alveolar, las que serían necesarias para establecer la circulación pulmonar funcional y mediar la hematosis (McGowan, 1992).

Desde estudios previos, se conoce que importantes genes son expresados por el mesénquima pulmonar, algunos de éstos son FGF-10, Spry4, patched, smoothened, WNT y miembros de la familia Hox (Hoxa-3 a Hoxa-5 y Hoab-3 a Hoab-6), mientras que BMP-4, SHH, mSpry2, Smads 2, 3 y 4 y VEGF-A son expresados en el epitelio adyacente. Las interacciones de subgrupos de estas señales, particularmente SHH, BMP-4 y FGF-10 están siendo recientemente estudiadas para proponer modelos que logren explicar como ellas pueden interactuar para inducir y por lo tanto, regular la morfogénesis epitelial de las ramificaciones de las vías aéreas (Warburton *et al.*, 2005).

BMPs pertenecen a la superfamilia del Factor de Crecimiento Transformante- β (TGF- β), que consiste en un grupo de péptidos relacionados con factores de crecimiento. Actualmente, 15 BMPs han sido identificadas y están divididas en subfamilias de acuerdo a su secuencia terminal aminoacídica. Estudios de expresión de BMPs en ratones, han mostrado que presentan un amplio rango de actividades biológicas: regulan la proliferación y diferenciación celular, quimiotaxis, apoptosis, modelamiento mesodérmico y desarrollo de órganos, entre ellos, el pulmón (Groeneveld y Burger, 2000).

Varios BMPs, incluyendo BMP-4, 5 y 7, son expresados durante el desarrollo pulmonar embrionario. La expresión de BMP-5 y BMP-7 ha sido detectada en el mesénquima y en el endodermo pulmonar embrionario respectivamente, mientras la expresión de BMP-4 está restringida a las células epiteliales distales y al mesénquima adyacente (Warburton *et al.*, 2005).

BMP-4 juega un rol en el desarrollo pulmonar a través de potenciales interacciones con otras señales moleculares como SHH, que se expresa a través del endodermo del pulmón con mayores niveles hacia los extremos de las yemas epiteliales y su expresión sugiere una función en los patrones de comunicación desde el epitelio hacia el mesénquima, induciendo la expresión de BMP-4 y reprimiendo a FGF-10, regulando así el crecimiento pulmonar embrionario y su diferenciación (Van Tuyl y Post, 2000).

BMP-4 y SHH son expresados en altos niveles en el epitelio distal, con algunas diferencias significativas en sus patrones de expresión. En particular, BMP-4 está presente también en el mesénquima adyacente, sin embargo, SHH parece estar confinado a las células epiteliales. SHH secretado por el epitelio distal activa a BMP-4 en el mesénquima adyacente. Finalmente, la proteína BMP-4 producida en el mesénquima distal actúa en el epitelio circundante para activar la expresión de BMP-4. Esto establece un circuito autorregulador similar a lo propuesto en el desarrollo del brote dental del ratón. Para que BMP-4 pueda inducir su expresión, es necesario que las células blanco expresen los receptores apropiados. Es así, que el epitelio pulmonar y el mesénquima distal expresan el receptor tipo 1 transmembrana serina-treonina kinasa que se puede unir a BMP-2 y BMP-4 (Bmpr/Trk-11/Brk-1) (Bellusci *et al.*, 1997).

En cultivos de tejido pulmonar embrionario, se ha descrito que BMP-4 controla la diferenciación próximo-distal del endodermo. Cuando no existe la expresión de BMP-4, los brotes pulmonares aparecen como masas de células mesenquimáticas desorganizadas en el extremo distal de la tráquea. Esto porque BMP-4 tiene diferentes efectos en células epiteliales y mesenquimáticas, inhibiendo la proliferación y diferenciación en las primeras y estimulando la proliferación o la apoptosis en las últimas. El tipo de respuesta dependería, por una parte, del tipo celular, como también de la concentración de la molécula (Van Tuyl y Post, 2000).

Para explicar los efectos que ejerce BMP-4 en el mesénquima, cabe la posibilidad que existan dos poblaciones celulares diferentes, que responden de distinta forma a BMP-4. Por ejemplo, las células endoteliales pueden proliferar y las células intersticiales o del estroma pueden morir en respuesta a BMP-4. Alternativamente, distintos niveles de BMP-4 inducen diferentes respuestas en el mesénquima, de modo que las células cercanas al epitelio sufren muerte celular (Bellusci *et al.*, 1996).

BMP-4 es expresado predominantemente en el epitelio y aumenta en las puntas de los nuevos brotes respiratorios. Recientemente, se determinó que BMP-4 regula la supresión localizada de la proliferación epitelial, proporcionando así una influencia moduladora negativa en las señales FGF regulando el arresto de la extensión de las ramificaciones y por lo tanto instalando nuevos puntos de ramificación (Warburton *et al.*, 2005).

A través de estudios realizados en cultivos de células pulmonares se ha visto que BMP-4 es un potente estimulador de la ramificación cuando está presente en el mesénquima en concentraciones fisiológicas. Los efectos de BMP-4 son modulados negativamente por proteínas que se unen a BMP como lo son Gremlin y Noggin. La inhibición de las funciones de Gremlin da como resultado la formación de un pulmón anormal en ratones neonatos nulos para este gen. Además, BMP-4 controla la diferenciación del endodermo a lo largo del eje próximo-distal. La inhibición de las señales en las puntas de los brotes pulmonares por la expresión en el epitelio distal de Noggin o por la expresión de una forma de un dominio negativo del receptor BMP tipo I, como lo es Alk6 (activin receptor-like kinase 6), da como resultado un epitelio distal que exhibe una diferenciación característica, tanto a nivel molecular y celular, que lo identifica del epitelio proximal (Bellusci *et al.*, 1996).

El hecho que la expresión de BMP-4 inhiba la proliferación celular promueve la posibilidad que, durante el desarrollo pulmonar normal, donde BMP-4 es expresada en un dominio muy restringido, elevados niveles locales de esta proteína acumulados en la punta de las ramificaciones, suprimen gradualmente el crecimiento del epitelio distal. Un nuevo crecimiento sólo puede ocurrir desde las regiones proximales y laterales de las puntas distales, resultando en ramificaciones dicotómicas (Bellusci *et al.*, 1996).

En base a los antecedentes expuestos, esta memoria propone detectar en conjunto distintas moléculas que se expresan durante el desarrollo embrionario pulmonar, además de

algunos de los mecanismos del desarrollo involucrados como lo son proliferación y apoptosis celular, utilizando para su detección técnicas inmunohistoquímicas con anticuerpos específicos. Esto nos permitió visualizar, a nivel de microscopía óptica, la asociación témporo-espacial de los procesos biológicos necesarios para el desarrollo del aparato respiratorio durante la diferenciación de las estructuras pulmonares. Es necesario destacar, que la gran mayoría de los estudios referentes al desarrollo pulmonar, han sido realizados en cultivos celulares, a diferencia de lo que se propuso en esta memoria, en la cual se estudió el desarrollo del pulmón en cortes histológicos, lo cual permitió una mejor aproximación a los acontecimientos que ocurren en forma dinámica durante la gestación.

Para este trabajo, se escogió utilizar la cepa *Sprague dawley* como modelo de estudio, debido a que permite una fácil manipulación, por su alta tasa reproductiva, camada abundante y por poseer una gestación de corta duración (21 días aproximadamente), haciendo más factible la obtención de muestras en las distintas edades gestacionales.

III. OBJETIVOS.

- **OBJETIVO GENERAL:**

Estudiar la diferenciación témporo-espacial de estructuras pulmonares relacionadas con apoptosis, proliferación, vasculogénesis y BMP-4 de la cepa “*Sprague dawley*”.

- **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- 1.) Detectar y cuantificar inmunohistoquímicamente la expresión de las moléculas BMP-4, VEGF-A y fvW durante el desarrollo pulmonar de *Sprague dawley*.
- 2.) Detectar y cuantificar células en apoptosis y proliferación durante el desarrollo pulmonar de la cepa mencionada.
- 3.) Relacionar témporo-espacialmente los resultados de los objetivos 1 y 2 con la diferenciación de estructuras pulmonares.

MATERIALES Y MÉTODOS.

1. Se utilizaron embriones de rata de la cepa *Sprague dawley* de 12 a 20 días de desarrollo y recién nacidos (1 ejemplar por cada día de edad).

2. Los embriones fueron fijados en formalina al 10% e incluidos en parafina, de los cuales se obtuvieron cortes seriados desde cefálico a caudal de 5 μm de grosor. Los cortes fueron montados en:

a.) Portaobjetos albuminados: para realizar técnicas convencionales: Hematoxilina-Eosina (H-E) y PAS (ácido periódico-reactivo de Schiff), para la descripción histológica general (López *et al.*, 1985).

La capacidad de la fucsina básica decolorada (reactivo de Schiff) de reaccionar con los grupos aldehídos trae como consecuencia la aparición de un color rojo distintivo y es la base de las reacciones PAS. Ésta tiñe carbohidratos y macromoléculas. Se usa para detectar mucus en diversos tipos celulares y tisulares, la membrana basal subyacente a los epitelios y fibras reticulares del tejido conjuntivo. La reacción PAS tiene como fundamento los siguientes hechos:

-Los anillos de las hexosas (carbohidratos) poseen carbonos adyacentes, cada uno de ellos con un grupo hidroxilo (-OH).

-Las hexosaminas de los glicosaminoglicanos también poseen carbonos adyacentes, pero con alternancia de grupos hidroxilo (-OH) y grupos amino (-NH₂).

-El ácido periódico rompe la unión entre estos átomos de carbono adyacentes y forma grupos aldehído.

-Estos grupos aldehído reaccionan con el reactivo de Schiff para dar un color púrpura intenso distintivo.

La tinción PAS de la membrana basal y fibras reticulares tiene su fundamento en el contenido o la asociación de proteoglicanos (Ross, 2004).

b.) Portaobjetos silanizados: (Anexo 1) para técnicas inmunohistoquímicas.

3. Se utilizaron las siguientes técnicas inmunohistoquímicas, previamente estandarizados los tiempos y concentración de cada anticuerpo:

3. 1 Para la detección de apoptosis se utilizó ApopTag® Peroxidase Kits S7100 (Anexo 2).

3.2 Para la detección de proliferación celular se utilizó el Acm primario anti-PCNA (SIGMA P-8825) (Anexo 3).

3.3 Para la detección de células endoteliales primitivas se utilizaron:

El Acm primario anti-VEGF-A (CHEMICON Code No MAB 3734) y el Ac primario policlonal anti-fvW (DAKO Code No A 0082) (Anexo 4).

3.4 Para la detección de BMP-4 se utilizó el Acm primario anti-BMP-4 (NOVOCastra™, NCL-BMP-4, clon 3H2) (Anexo 5).

4. Para los anticuerpos monoclonales se usaron Ac secundarios biotinilados anti-inmunoglobulinas de ratón (DAKO E 0354, Dinamarca) y para el anticuerpo policlonal se utilizó el Ac secundario biotinilado anti-inmunoglobulinas de conejo (DAKO E 0353, Dinamarca).

5. Para amplificar la reacción, se agregó un conjugado estreptavidina-peroxidasa (DAKO Code No P0397).

6. La reacción enzimática se reveló con sustrato/cromógeno DAB (DAKO K 3465, USA).

ANÁLISIS DE RESULTADOS.

- Con los resultados de todas las técnicas utilizadas, convencionales e inmunohistoquímicas, se realizó una descripción histológica del desarrollo embrionario del pulmón de rata, a través de las edades estudiadas.

- En las muestras tratadas con técnicas inmunohistoquímicas, la inmunomarcación se cuantificó empleando un programa de análisis morfométrico computacional (Image Pro-Plus Media Cybernetics, USA), en cinco campos obtenidos al azar, por cada edad, con aumento de 40x, en un microscopio óptico Nikon Eclipse E 600, el cual está conectado a una cámara de video digital Cool-Snap Pro (Media Cybernetics, USA). De la lectura de los 5 campos, se obtuvo el área promedio inmunomarcada para cada edad y Ac utilizado.

IV. RESULTADOS.

El análisis de los resultados se realizó mediante un estudio descriptivo señalando las características morfológicas y expresión de los diferentes anticuerpos en cada edad del desarrollo pulmonar embrionario y un estudio morfométrico computacional, que permitió cuantificar el área inmunomarcada de cada anticuerpo para cada edad comprendida en esta memoria.

1. ESTUDIO DESCRIPTIVO:

1.1 Desarrollo pulmonar entre E12 y E15.

E12: El pulmón en desarrollo presenta una forma triangular de aspecto compacto muy celular, formado por células grandes. En el centro del esbozo pulmonar aparece un único y gran conducto respiratorio con un lumen amplio, revestido por un epitelio pseudoestratificado en el que se encuentran restos celulares. Este conducto, se caracteriza por tener una débil reacción PAS positiva sólo en la zona apical de las células que forman esta estructura (Fig. 1). En cambio, con el anticuerpo anti PCNA la inmunorreacción se observa en la zona basal y borde luminal de las células que se ubican sólo hacia ventral de éste conducto único (Fig. 2). El marcaje con el anticuerpo anti BMP-4 se restringe al borde luminal del conducto respiratorio, no observándose inmunomarcación en el resto del esbozo pulmonar (Fig. 3). Es posible observar marcaje positivo para apoptosis en escasas células epiteliales de la zona ventral del conducto respiratorio, contrastando con la fuerte reacción positiva en células de la epidermis del embrión (Fig. 6).

En la zona periférica del esbozo y en el mesénquima que rodea al conducto respiratorio se distinguen escasas células de gran tamaño, aisladas, de forma esférica con núcleo central, que presentan reacción positiva con el anticuerpo anti VEGF-A (Fig. 4).

La inmunorreacción del anticuerpo anti fvW se detecta en la zona periférica de células que se disponen formando pequeños cordones que rodean al conducto central (Fig. 5).

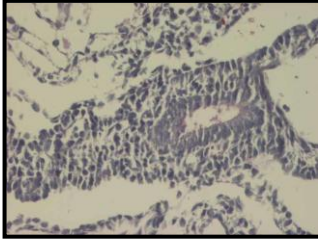


Fig. 1: PAS-H.E12. Conducto respiratorio en el blastema pulmonar. **20x.**

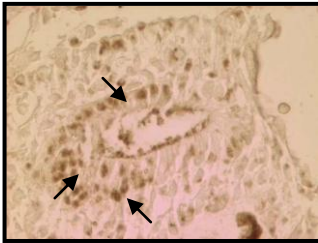


Fig. 2: Acm anti PCNA. E12. Inmunorreacción en células epiteliales del conducto respiratorio y en algunas células sanguíneas. **40x.**

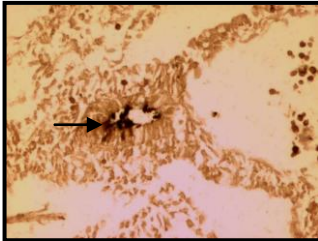


Fig. 3: Acm anti BMP-4. E12. Inmunorreacción en borde luminal del conducto respiratorio. **20x.**

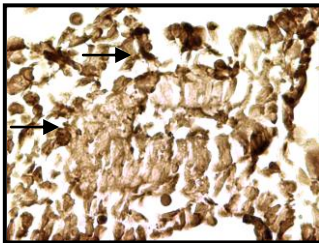


Fig. 4: Acm anti VEGF-A. E12. Inmunorreacción en algunas células mesenquimáticas. **40x.**

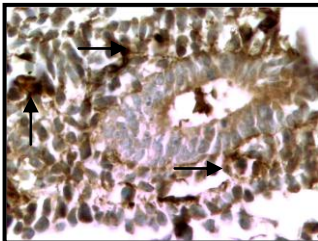


Fig. 5: Ac anti fvW. E12. Inmunorreacción en grupos celulares que rodean al conducto respiratorio. **40x.**

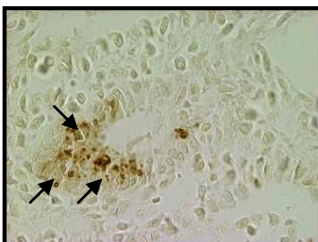


Fig. 6: Apoptosis. E12. Inmunomarcación en células epiteliales en la zona ventral del conducto respiratorio. **40x.**

E13: Se mantiene la forma del blastema pulmonar con el conducto respiratorio central revestido por epitelio pseudoestratificado, siendo el lumen más estrecho que en E12. Al observar cortes seriados, este conducto adquiere una forma triangular (Fig. 7a y 7b), para finalmente dar origen a dos conductos más pequeños de forma cilíndrica, que se dirigen uno a derecha y el otro hacia la izquierda, coincidiendo con la separación parcial de cada esbozo pulmonar (Fig. 7c). Las células mesenquimáticas, próximas al o los conductos respiratorios, adquieren aspecto fusiforme y se disponen concéntricamente a estas estructuras.

Las células epiteliales de los conductos respiratorios presentan una fuerte reacción PAS positiva en la zona basal de las células ubicadas en la región ventral de los conductos, siendo PAS negativa la zona dorsal de éstos. Hacia la zona luminal las células presentan débil reacción positiva (Fig. 7a, 7b y 7c).

La inmunomarcación del anticuerpo anti PCNA es intensa en las células del epitelio de los conductos respiratorios, mientras que en el mesénquima la reacción se presenta en pequeños grupos de células ubicados en la zona periférica (Fig. 8a y 8b).

Se detecta inmunorreacción del anticuerpo anti BMP-4 en un escaso número de células epiteliales de los conductos respiratorios y en algunas células del mesénquima dispuestas en cordones (Fig. 9a y 9b).

La inmunorreacción del anticuerpo anti VEGF-A se presenta en una escasa cantidad de células epiteliales y en el borde luminal de los conductos (Fig. 10); mientras que, el anticuerpo anti fvW se visualiza en la zona basal de estos conductos. Este anticuerpo también se detecta en pequeños vasos sanguíneos ubicados en la zona pulmonar periférica, varios de ellos con grandes células nucleadas en su interior (Fig. 11).

La reacción positiva para apoptosis fue posible detectarla en escaso número de núcleos ubicados a distintas alturas del epitelio de los conductos respiratorios. Además se observa reacción positiva en algunas células mesenquimáticas que rodean al conducto respiratorio izquierdo (Fig. 12).

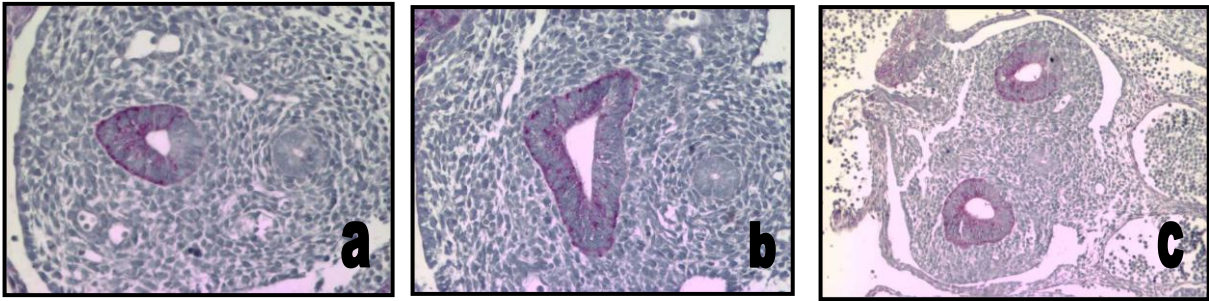


Fig. 7 : PAS-H. E13. a: Conducto respiratorio en blastema pulmonar. 20x. b: Conducto con forma triangular. 20x. c: Dos conductos respiratorios, uno a cada lado pulmonar. 10x.

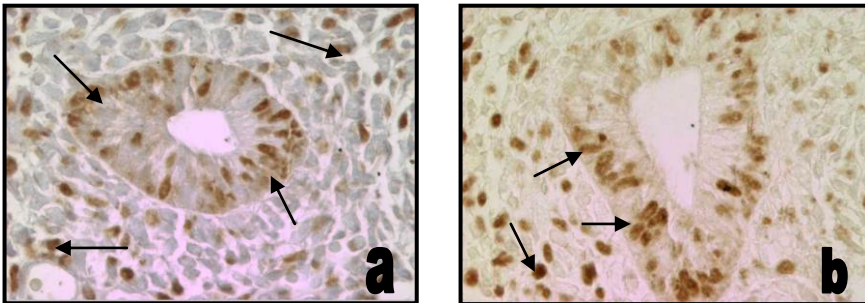


Fig. 8: Acm anti PCNA. E13. a y b: Inmunorreacción en células epiteliales y mesenquimáticas. 40x

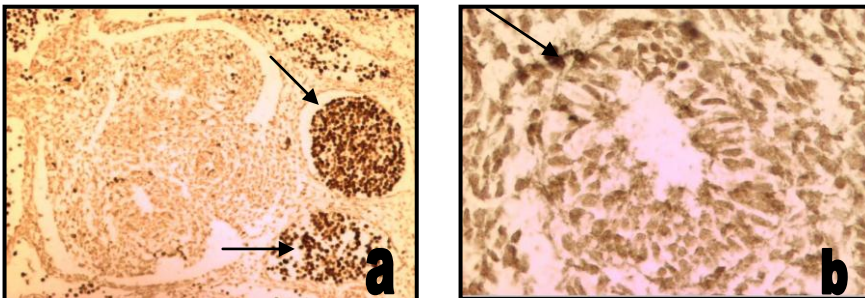


Fig. 9: Acm anti BMP-4. E13. a: Intensa reacción con células sanguíneas. 10x. b: Inmunorreacción en muy pocas células epiteliales. 40x.

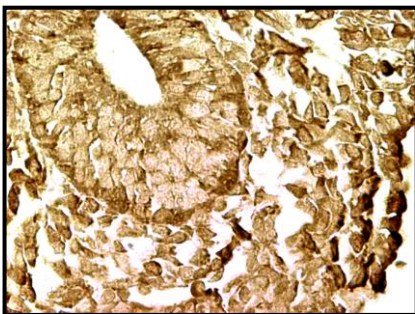


Fig. 10: Acm anti VEGF-A. E13. Reacción en células ubicadas en la zona pulmonar periférica. 40x.

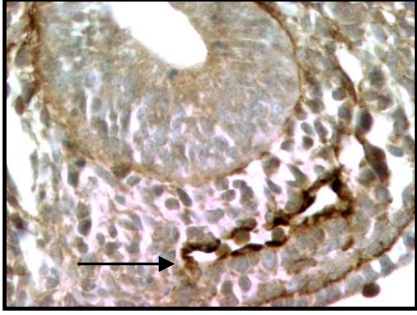


Fig. 11: Ac anti fvW. **E13.** Inmunomarcación de pequeños vasos sanguíneos principalmente en zona pulmonar periférica. **40x.**

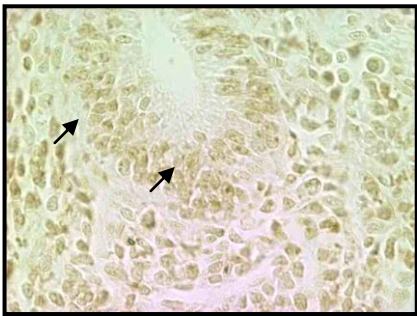


Fig. 12: Apoptosis. **E13.** Reacción en escasas células epiteliales del conducto respiratorio. **40x.**

E14: En los primeros cortes transversales de cefálico a caudal del embrión, se observa, tanto en el esbozo derecho, como en el izquierdo y hacia medial un conducto de lumen amplio y alargado con epitelio pseudoestratificado (Fig. 13a); en el pulmón derecho, hacia dorsal de éste, se destaca otro más pequeño y redondo con un estrecho lumen. Siguiendo la secuencia de cortes, en el pulmón derecho se desarrolla un nuevo conducto a partir del central, completándose así, un total de tres conductos respiratorios en el lado derecho y uno en el izquierdo (Fig. 13b). El mesénquima conserva el aspecto compacto, con células redondas las que se hacen fusiformes y se disponen concéntricamente en las proximidades de los conductos respiratorios.

La reacción con PAS-H fue fuertemente positiva en la membrana basal de los conductos, pero débil en el borde de la zona luminal. En los puntos de ramificación de los conductos respiratorios esta reacción se hace más intensa (Fig. 13c).

La proliferación celular observada con PCNA es notoria en el epitelio de los conductos respiratorios y en cúmulos y cordones celulares del mesénquima (Fig. 14a, 14b y 14c).

Se observó reacción positiva del anticuerpo anti BMP-4 en delgadas células cilíndricas en el epitelio de los conductos respiratorios, entre otras células de mayor tamaño e inmunonegativas, dando el aspecto rueda de carreta. La reacción en el mesénquima es notoria y abundante (Fig. 15).

La inmunomarcación con anticuerpo anti VEGF-A fue intensa en células globosas dispuestas alrededor de pequeños espacios que surcan la zona periférica del esbozo, siendo más débil en estructuras similares ubicadas en la zona ventromedial del pulmón. También, se detectó una tenue reacción positiva pero bien definida en escasas células epiteliales y en todo el borde luminal de los conductos respiratorios (Fig. 16). Por otra parte, sólo se visualizan algunas células endoteliales inmunomarcadas con anticuerpo anti fvW en pequeños vasos sanguíneos ya diferenciados dispersos en el mesénquima (Fig. 17).

Se detectó apoptosis en algunas células epiteliales del conducto respiratorio y en un número reducido de células mesenquimáticas periféricas, pero sólo en el pulmón izquierdo. Sin embargo, la inmunomarcación fue intensa y abundante en otros órganos y zonas del embrión como hígado y epidermis, similar a lo observado en edades anteriores (Fig. 18).

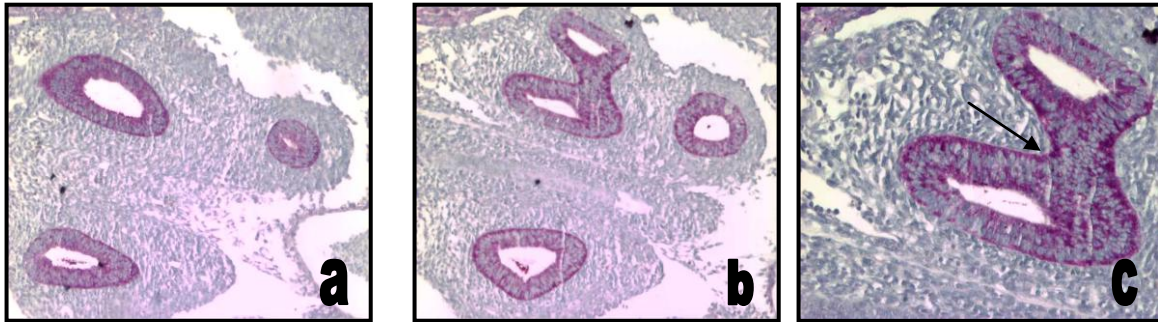


Fig. 13: PAS-H. E14. a: Se aprecian tres conductos respiratorios, dos en pulmón derecho y uno en pulmón izquierdo. **10x.** b: Ramificación de conducto en pulmón derecho. **10x.** c: Mayor tinción PAS-H positiva en bifurcación de conductos respiratorios. **20x.**

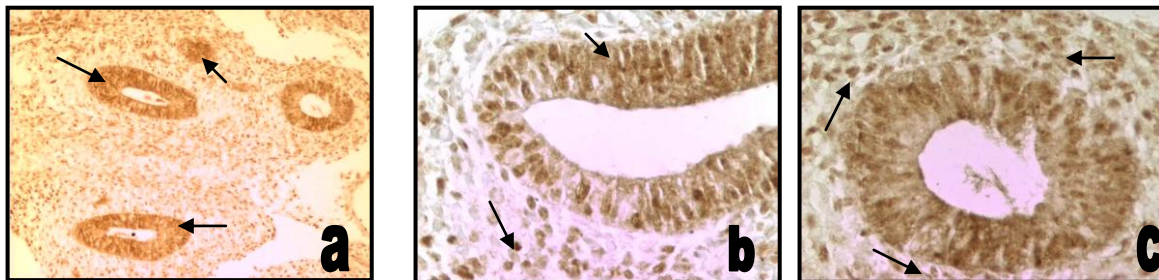


Fig. 14: Acm anti PCNA. E14. a: Inmunorreacción en epitelio y mesénquima pulmonar. **10x.** b: Reacción definida en epitelio y células mesenquimáticas que rodean los conductos **40x.** c: Marcaje en epitelio y células mesenquimáticas de disposición concéntrica a ellos. **40x.**

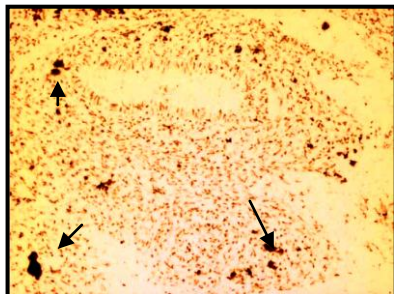


Fig. 15: Acm anti BMP-4. E14. Inmunomarcación de algunas células epiteliales de los conductos respiratorios. Reacción en mesénquima es más intensa y abundante. **10x.**

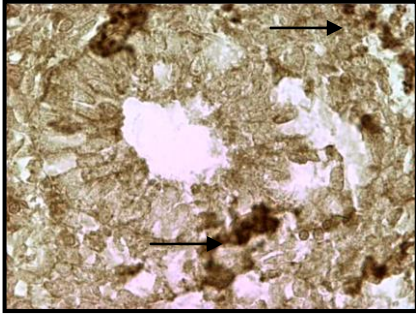


Fig. 16: Acm anti VEGF-A. E14. Inmunorreacción en cordones o grupos celulares que rodean a los conductos respiratorios. **40x.**

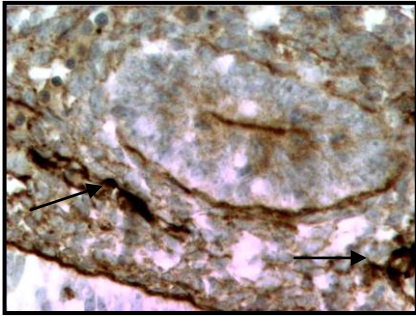


Fig. 17: Ac anti fvW. E14. Reacción en algunas células endoteliales de pequeños vasos sanguíneos dispersos en el mesénquima. **40x.**

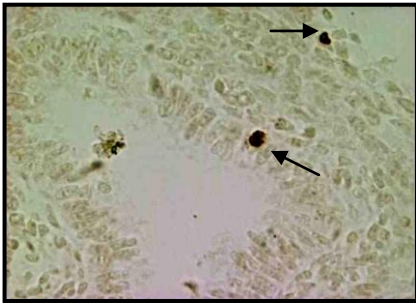


Fig. 18: Apoptosis. E14. Marcaje positivo en escasas células epiteliales del conducto respiratorio izquierdo. **40x.**

E15: En relación a los conductos respiratorios estos conservan las mismas características descritas en E14, pero con un mayor número de células fusiformes que se disponen formando varias capas concéntricas a éstos.

El tejido mesenquimático es más laxo que el observado en la edad anterior, surcado por pequeños y numerosos vasos sanguíneos bien diferenciados y con presencia de grupos de cuatro a siete células nucleadas en el interior.

La tinción con PAS-H se observa intensa en la membrana basal y borde luminal de los conductos respiratorios (Fig. 19a y 19b), siendo más difusa en el conducto de lumen más pequeño (Fig. 19c). Además se presenta reacción positiva en el mesénquima en forma difusa.

La inmunomarcación para el anticuerpo anti PCNA es notoria y abundante en el epitelio de los conductos respiratorios y presenta el mismo patrón de marcaje en rueda de carreta descrito en E14 para BMP-4 (Fig. 20a y 20c). En el mesénquima pulmonar el marcaje es notorio y difuso y también hay escasa reacción en células sanguíneas al interior de pequeños vasos (Fig. 20b).

La reacción inmunohistoquímica para el anticuerpo anti BMP-4 en el epitelio de los conductos respiratorios es similar a lo descrito en E14 (Fig. 21b). Esta inmunomarcación es muy notoria e intensa en células grandes y globosas que se encuentran al interior de vasos o en pequeños cúmulos que rodean los conductos respiratorios (Fig. 21a y 21c).

El anticuerpo anti VEGF-A dio una reacción definida en células grandes y redondas ubicadas en el interior de vasos sanguíneos ya diferenciados y en cúmulos de células globosas en el mesénquima, con un patrón característico de marcaje en forma arriñonada o en un polo celular (Fig. 22b y 22c). En los conductos respiratorios se sigue manteniendo una débil inmunomarcación en la zona basal y luminal, como lo observado en E14 (Fig. 22a).

El anticuerpo anti fvW presenta reacción intensa en células fusiformes que rodean a pequeños vasos sanguíneos ubicados en la periferia del órgano y en aquellos que rodean a los conductos en la zona central del pulmón, observando además marcaje positivo en las células que se encuentran en el interior de estos vasos (Fig. 23a y 23c). También existe reacción positiva en la membrana basal de los conductos respiratorios (Fig. 23b).

La reacción positiva para apoptosis se presenta en algunas células mesenquimáticas ubicadas en la periferia de ambos pulmones, no es posible detectar marcaje positivo en células epiteliales de los conductos respiratorios (Fig. 24a y 24b).

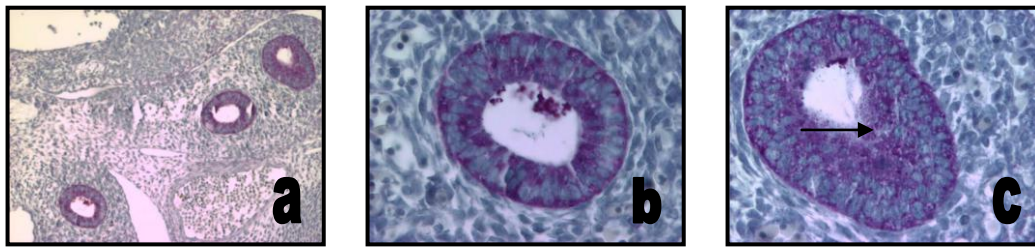


Fig. 19. PAS-H. E15. a: Se observan tres conductos respiratorios, dos en pulmón derecho y uno en pulmón izquierdo. **10x.** b: Tinción PAS-H positiva en membrana basal y borde luminal de conducto respiratorio con lumen amplio. **40x.** c: Tinción PAS-H positiva en membrana basal y difusa en grupos de células epiteliales más cercanas al borde luminal del conducto respiratorio de lumen estrecho. **40x.**

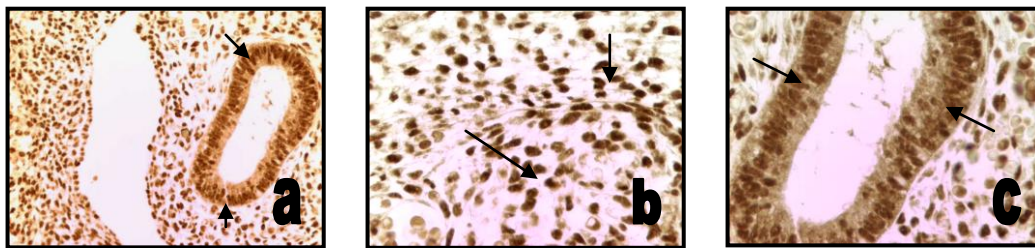


Fig. 20: Acm anti PCNA. E15. a: Inmunomarcación notoria y abundante en epitelio de conductos respiratorios y mesénquima. **20x.** b: Reacción positiva en células mesenquimáticas y sanguíneas al interior de pequeños vasos. **40x.** c: Marcaje positivo en células epiteliales, mayor detalle de reacción en el núcleo de estas células. **40x.**

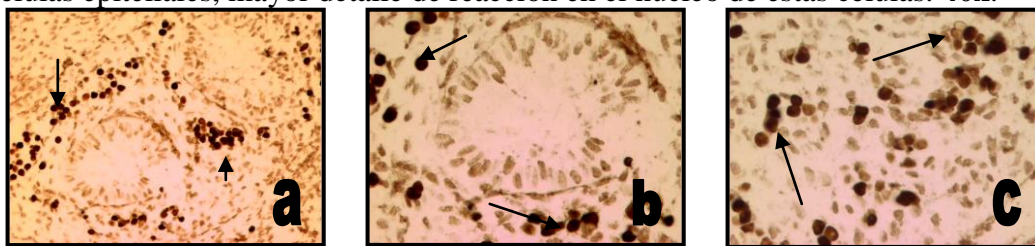


Fig. 21: Acm anti BMP-4. E15. a: Inmunorreacción muy notoria en células sanguíneas. **20x.** b: Reacción tenue en células epiteliales de conducto respiratorio y muy intensa en células sanguíneas. **40x.** c: Mayor detalle de inmunomarcación positiva en células algunas células sanguíneas ubicadas en cordones o grupos celulares. **40x.**

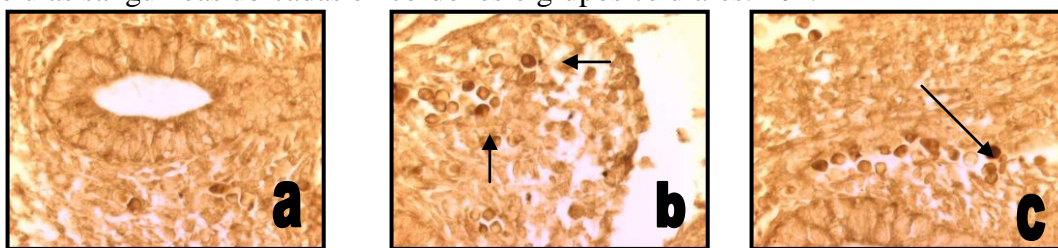


Fig. 22: Acm anti VEGF-A. E15. a: Inmunorreacción débil en la zona basal y borde luminal de los conductos respiratorios. **40x.** b y c: Marcaje positivo en células sanguíneas que forman grupos o cordones celulares con diferentes patrones de marcaje. **40x.**

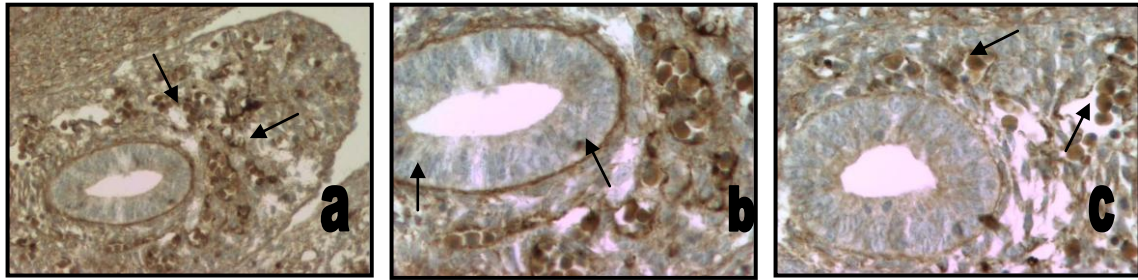


Fig. 23: Ac anti fvW. **E15.** a: Inmunorreacción intensa en la periferia pulmonar. **20x.** b y c: Marcaje positivo en la zona basal de los conductos respiratorios y en células endoteliales que delimitan pequeños vasos y también en las células sanguíneas al interior de éstos. **40x.**

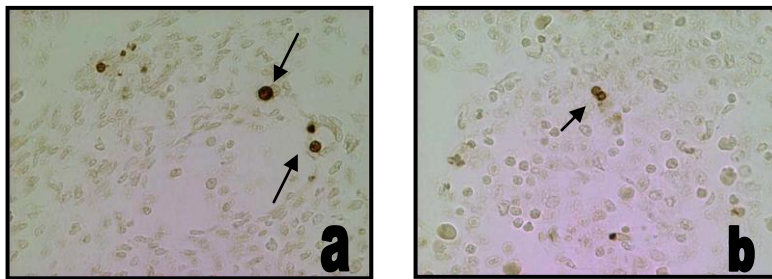


Fig. 24: Apoptosis. **E15.** a y b: Reacción positiva sólo en células mesenquimáticas pulmonares. **40x.**

1.2 Desarrollo pulmonar entre E16 y E18.

E16: Se observó un notorio aumento del tamaño pulmonar. En ambos pulmones se han desarrollado gran cantidad de conductos, simples y otros con bifurcaciones, presentando algunos un lumen amplio y otros muy pequeños (Fig. 25a). El tejido mesenquimático es cada vez más laxo en relación a las edades anteriores, surcado por vasos sanguíneos que presentan una capa bien diferenciada de células fusiformes y concéntricas, tanto en los vasos ubicados en la zona periférica, como en los de la zona central del pulmón. Células similares se encuentran rodeando a los conductos respiratorios y sus ramificaciones.

La tinción con PAS-H es leve, tanto en el epitelio como en el borde luminal de los conductos respiratorios bien diferenciados (Fig. 25c), en contraste con las neo ramificaciones, en que la reacción es muy intensa y definida en la membrana basal y en el borde luminal de aquellos que poseen lumen (Fig. 25b). Además, se ven acúmulos celulares, que no presentan lumen, intensamente PAS positivos. En el mesénquima la reacción es difusa, destacándose una mayor reacción en las células ubicadas entre los conductos respiratorios más cercanos a la periferia pulmonar.

La proliferación celular detectada con el anticuerpo anti PCNA fue muy intensa en el epitelio de todos los conductos respiratorios simples y ramificados, con y sin lumen (Fig. 26b). En el mesénquima la inmunorreacción se presenta en grupos celulares que rodean en forma concéntrica a los conductos respiratorios y sus ramificaciones (Fig. 26a), además, es posible observar marcaje positivo en las células que delimitan a vasos sanguíneos (Fig. 26c).

La inmunorreacción para el anticuerpo anti BMP-4 se observó en forma tenue en la zona basal de los conductos respiratorios y en algunas células epiteliales con el patrón de marcaje observado en edades anteriores (Fig. 27a y 27b). En el tejido mesenquimático la inmunomarcación se visualizó en algunas células formando cordones celulares y en células globosas en el interior de vasos. El patrón de marcaje es variado, presentándose en algunas ocasiones en toda la célula, otras veces sólo en una mitad y en otras ocasiones sólo en el borde de la célula (Fig. 27c).

Se destacan vasos sanguíneos inmunomarcados con anticuerpo anti VEGF-A distribuidos en la zona periférica y central del pulmón en estrecho contacto con conductos

respiratorios (Fig. 28a). La reacción también es intensa en células ubicadas en el interior de vasos sanguíneos (Fig. 28b y 28c).

El anticuerpo anti fvW presenta reacción positiva y notoria en las células que delimitan la gran cantidad de vasos sanguíneos que ocupan la superficie pulmonar (Fig. 29a y 29c). Además, se observa reacción en la zona basal de los conductos respiratorios y sus ramificaciones (Fig. 29b).

En la detección de apoptosis es posible observar reacción positiva en un número muy escaso (menor que en E15) de células del epitelio de las vías aéreas (Fig. 30). En el mesénquima pulmonar no se observa reacción positiva.



Fig. 25: PAS-H. E16. a: Aparición de gran cantidad de conductos simples y con ramificaciones, tinción notoria en su epitelio. 4x. b: Notorio marcaje sectorizado del epitelio de las ramificaciones de los conductos respiratorios e intenso en las zonas de bifurcación. 20x. c: En conductos más diferenciados reacción sólo en algunas zonas del borde luminal de los conductos respiratorios. 20x.

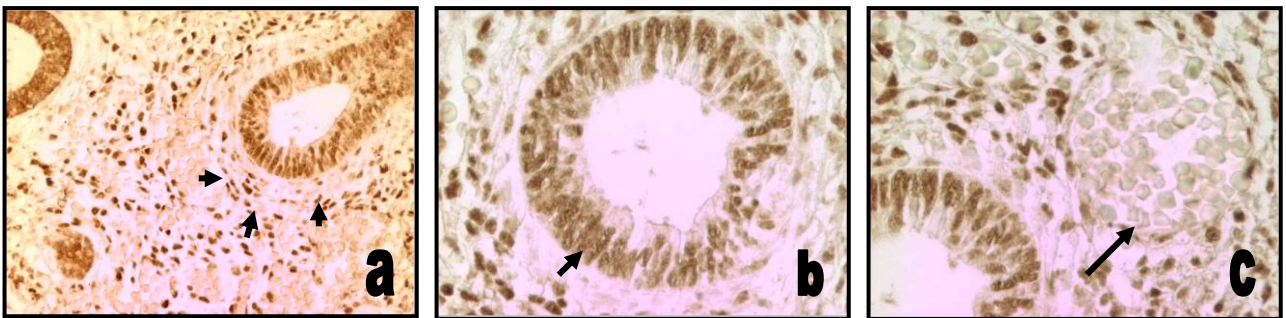


Fig. 26: Acm anti PCNA. E16. a: Inmunorreacción intensa y definida en epitelio de conductos respiratorios, reacción en células mesenquimáticas dispuestas en forma concéntrica alrededor de conductos respiratorios. 20x. b: Marcaje intenso y definido en células del epitelio de los conductos. 40x. c: Reacción positiva en células endoteliales que rodean a vasos sanguíneos en formación. 40x.

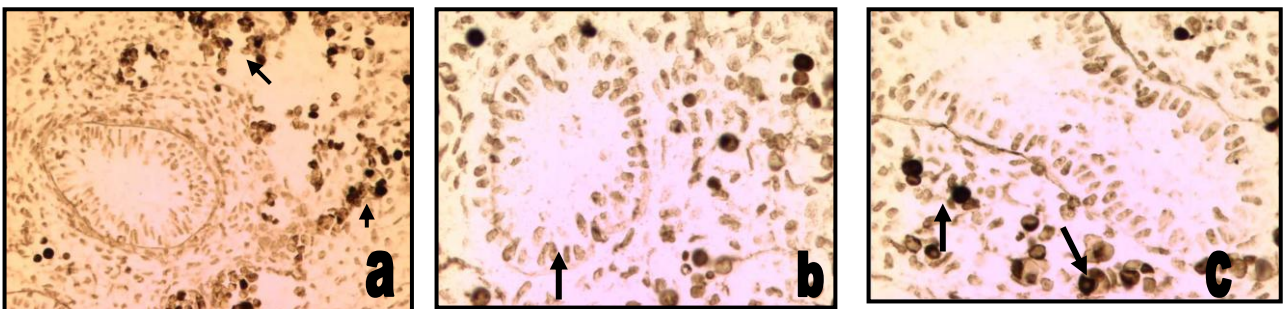


Fig. 27: Acm anti BMP-4. E16. a: Inmunomarcaje en epitelio de conductos respiratorios, intensa reacción en células del mesénquima. 20x. b: Reacción positiva en las células epiteliales de los conductos respiratorios. 40x. c: Células mesenquimáticas globosas con distintos patrones de marcaje. 40x.

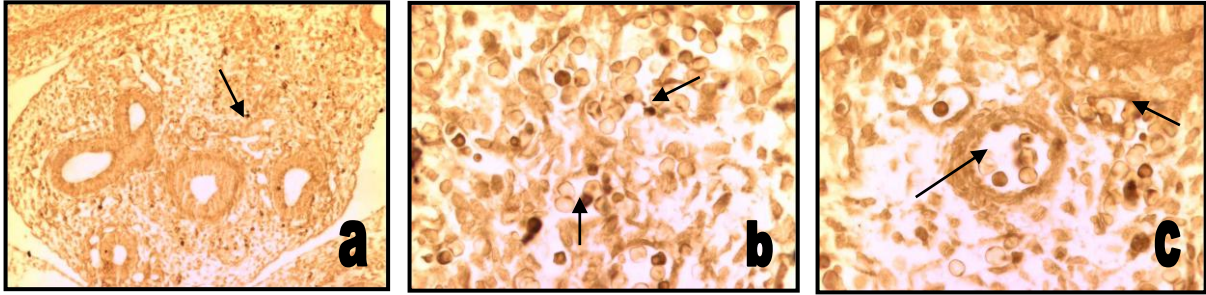


Fig. 28: Acm anti VEGF-A. **E16.** a: Inmunorreacción intensa en células sanguíneas dispersas en el mesénquima pulmonar. **10x.** b: Reacción en células globosas con distintos patrones de marcaje. **40x.** c: Marcaje de células de aspecto globoso al interior de vasos ya formados y otros menos definidos. **40x.**

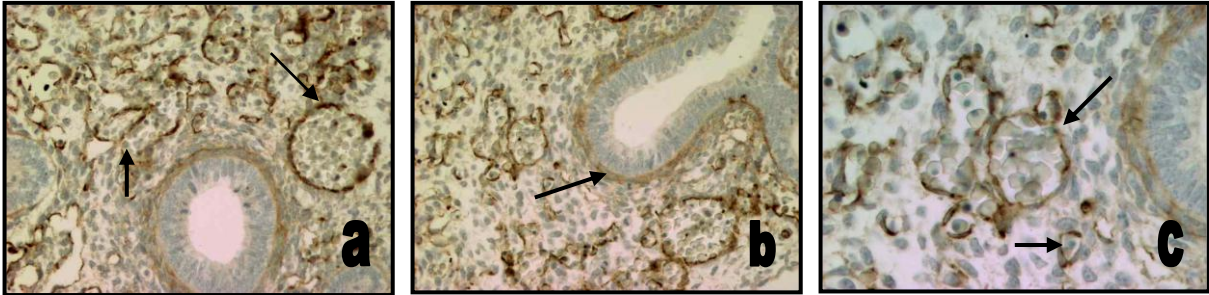


Fig. 29: Ac anti fvW. **E16.** a: Inmunomarcación en células endoteliales de pequeños y grandes vasos. **20x.** b: Reacción positiva en zona basal de conductos respiratorios y sus bifurcaciones. **20x.** c: Detalle de marcaje positivo en células endoteliales en vasos sanguíneos formados y en algunas pequeñas yemas sanguíneas que recién aparecen. **40x.**

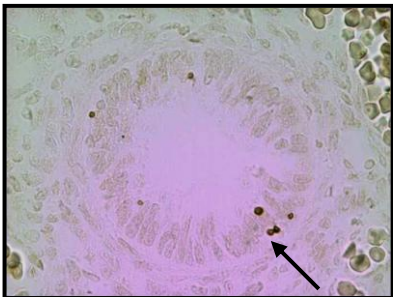


Fig. 30: Apoptosis. **E16.** Inmunomarcación positiva escasa sólo en células epiteliales de los conductos respiratorios. **40x.**

E17: A esta edad del desarrollo embrionario se distingue la formación de los lóbulos pulmonares y el número de conductos respiratorios, con o sin ramificaciones, se incrementa en relación a E16 (Fig 31a), destacándose en el tercio superior de cada pulmón un gran conducto, que presenta epitelio cúbico y está rodeado por una delgada capa de células fusiformes (Fig. 31b). El tejido mesenquimático es cada vez más laxo, surcado por gran cantidad de vasos sanguíneos y conductos respiratorios con sus ramificaciones. Los vasos sanguíneos de mayor tamaño están delimitados por una delgada capa de células fusadas y los vasos de la zona pulmonar periférica confluyen hacia los conductos respiratorios más diferenciados. En el interior de los vasos hay células sanguíneas con y sin núcleo.

La tinción con PAS-H es positiva en todas las células epiteliales de los conductos pequeños con lumen estrecho, en los conductos de tamaño intermedio se presenta en la membrana basal y borde luminal, no obstante la reacción característica PAS positiva en la membrana basal de cada conducto se mantiene, todos ellos presentan reacción positiva en su interior, dándoles un aspecto sucio a estos conductos (Fig. 31c).

La inmunorreacción para el anticuerpo anti PCNA se observa muy nítida e intensa en las células epiteliales de los conductos respiratorios simples y aquellos con ramificaciones (Fig. 32c). Además, se presenta reacción en casi todo el mesénquima, siendo muy notoria en células que se disponen en forma concéntrica a los conductos respiratorios. Por otra parte, se visualiza reacción en células que delimitan los vasos sanguíneos (Fig. 32a y 32b).

La inmunomarcación para el anticuerpo anti BMP-4 es tenue y débil en el epitelio y zona basal de los conductos respiratorios y sus ramificaciones (Fig. 33b). Todas las células del mesénquima presentan reacción positiva de aspecto difuso (Fig. 33a).

El marcaje que presenta el anticuerpo anti VEGF-A es similar a lo observado en E16 en pequeños vasos sanguíneos en la zona pulmonar periférica, también se presenta en brotes de vasos que se dirigen a la zona pulmonar central, los que rodean a los conductos respiratorios de mayor tamaño (Fig. 34a y 34b).

El anticuerpo anti fvW marca las células endoteliales que delimitan los vasos sanguíneos de pequeño tamaño ubicados en la zona pulmonar periférica y aquellos de una mayor extensión que rodean los conductos respiratorios de mayor tamaño (Fig. 35a y 35b).

También es posible visualizar reacción en la zona basal de los conductos respiratorios, como en E16 (Fig. 35c).

La reacción de apoptosis es detectable sólo en pocas células mesenquimáticas ubicadas en la periferia pulmonar (Fig. 36c) y en escasas células que rodean a los conductos respiratorios (Fig. 36a y 36b).

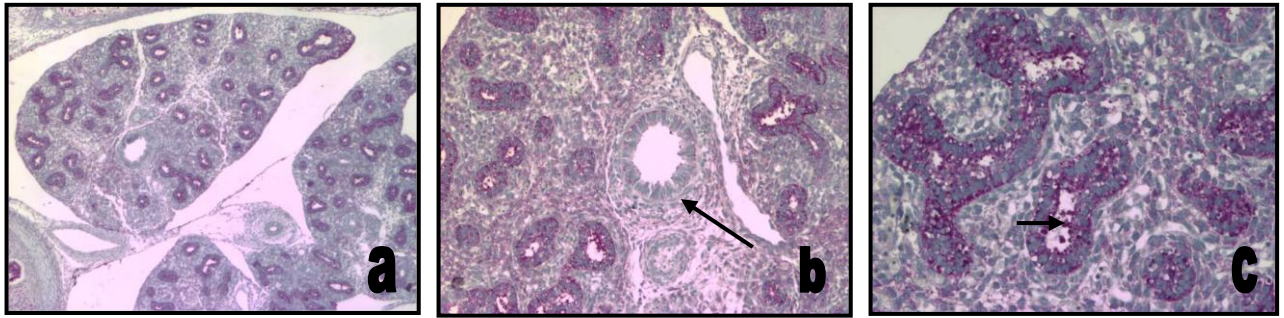


Fig. 31: PAS-H. E17. a: Presencia de lobos pulmonares con gran número de conductos respiratorios, marcaje PAS-H positivo en membrana basal y borde luminal. 4x. b: Conducto más diferenciado con reacción positiva sólo en membrana basal. 10x. c: Membrana basal, borde luminal e interior de los conductos son PAS positivos adquiriendo aspecto “sucio”. 20x.

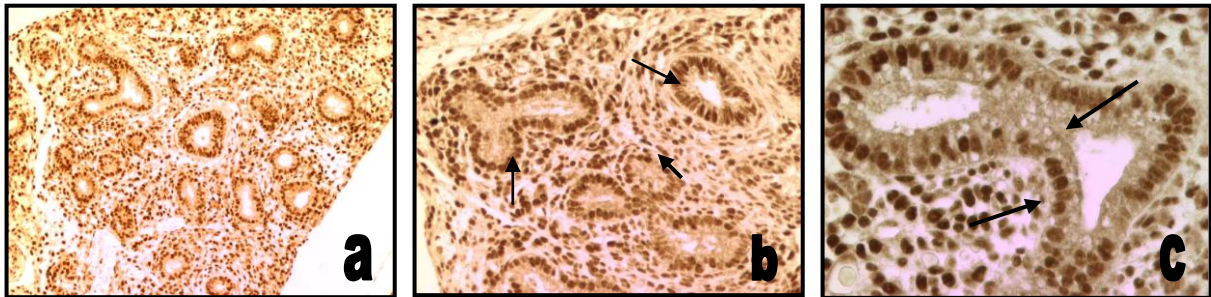


Fig. 32: Acm anti PCNA. E17. a: Inmunorreacción en núcleos de las células epiteliales de los conductos respiratorios y mesénquima pulmonar. 10x. b: Marcaje positivo en epitelio de conductos y de células dispuestas concéntricamente alrededor de éstos. 20x. c: Detalle de marcaje nítido de las células epiteliales de los conductos respiratorios. 40x.

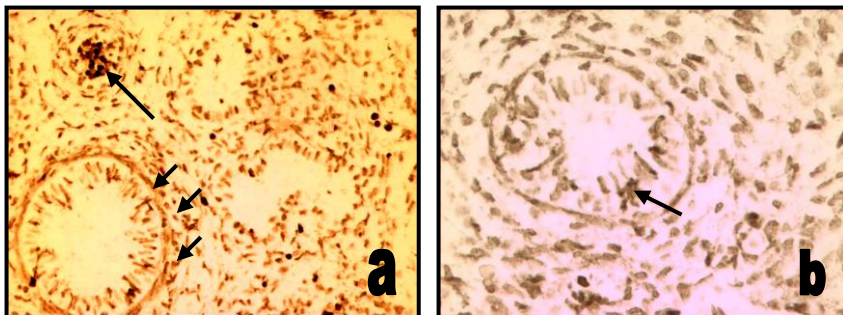


Fig. 33: Acm anti BMP-4. E17. a: Inmunomarcación notoria en células de disposición concéntrica a los conductos respiratorios, acúmulo de células mesenquimáticas intensamente positivas. 20x. b: Inmunorreacción en algunas células epiteliales de los conductos respiratorios. 40x.

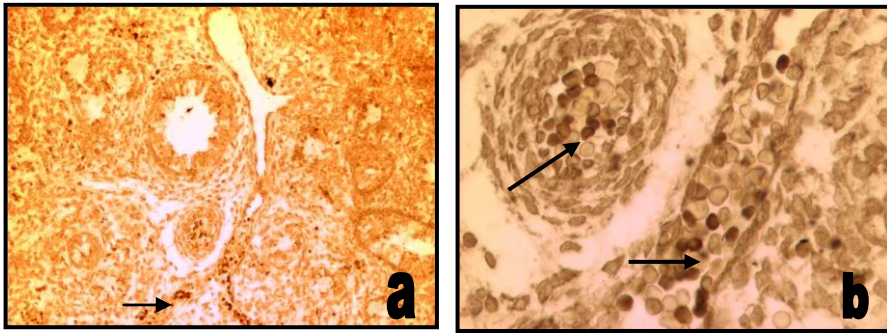


Fig. 34: Acm anti VEGF-A. E17. a 10x y b 40x: Inmunorreacción positiva en pequeños acúmulos celulares periférica y brotes de vasos sanguíneos que se dirigen a la zona pulmonar central.

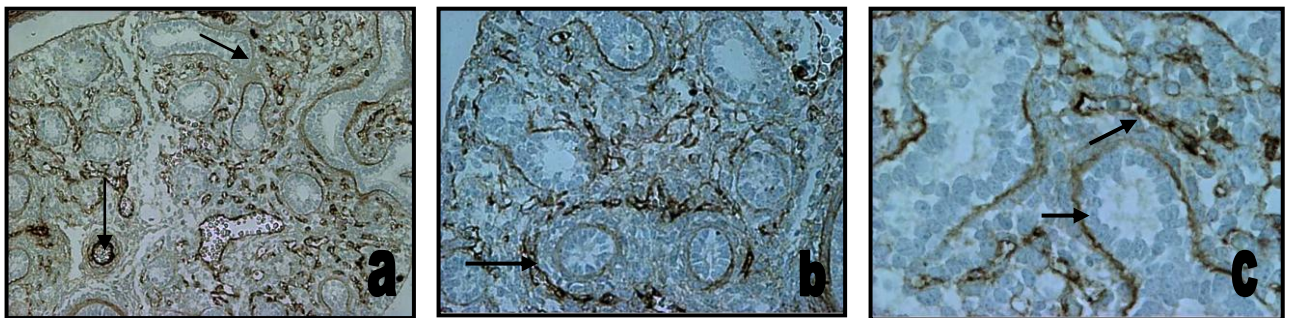


Fig. 35: Ac anti fvW. E17. a: Inmunorreacción en vasos sanguíneos pulmonares periféricos y centrales. 10x. b: Marcaje positivo de células endoteliales de pequeños vasos y sus ramificaciones. 20x. c: Reacción positiva en la zona basal de los conductos respiratorios y en células endoteliales que delimitan vasos sanguíneos. 40x.

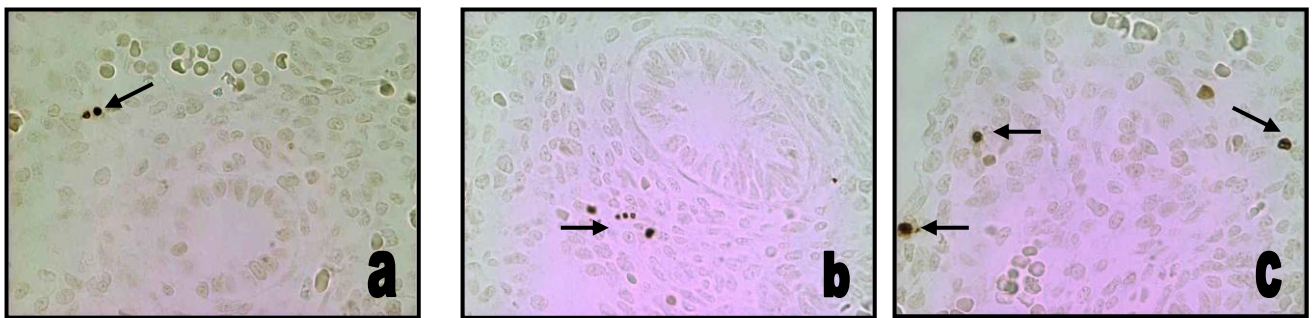


Fig. 36: Apoptosis. E17. a y b: Inmunomarcación positiva en células mesenquimáticas que rodean a los conductos respiratorios. 40x. c: Reacción positiva en células mesenquimáticas de la periferia pulmonar. 40x.

E18: Se observa gran número de conductos respiratorios, muy similares a la edad anterior, pero disminuyen las ramificaciones, las que presentan epitelio cúbico con un lumen pequeño y otros amplios. En el tercio superior de cada pulmón se mantiene el conducto diferenciado de mayor tamaño descrito en E17 (Fig. 37b). El tejido mesenquimático es cada vez más laxo, surcado por conductos respiratorios con sus ramificaciones y por vasos sanguíneos de mayor tamaño que se encuentran en la zona pulmonar central y están delimitados por una delgada capa de células fusiformes para confluir hacia los conductos respiratorios más diferenciados. Los vasos sanguíneos de menor tamaño están ubicados en la zona pulmonar periférica y confluyen hacia los vasos de mayor tamaño formando una única red vascular que se logra visualizar desde la edad anterior. En esta edad las células que existen al interior de los vasos sanguíneos ya no presentan núcleo.

La tinción con PAS-H es similar a lo descrito en E17 (Fig. 37a y 37b). Se puede apreciar reacción positiva al interior de los lúmenes de la mayor parte de los conductos respiratorios, manteniendo el aspecto sucio observado en E17 (Fig. 37c).

La inmunomarcación para el anticuerpo anti PCNA se localiza en los núcleos de las células epiteliales y es más abundante en las zonas de bifurcación (Fig. 38a y 38b). La inmunomarcación es positiva tanto en células mesenquimáticas que se disponen en forma concéntrica alrededor de conductos respiratorios y vasos sanguíneos, manteniendo el mismo patrón de reacción descrito en la edad anterior (Fig. 38c).

La inmunorreacción que presenta el anticuerpo anti BMP-4 es muy débil y en escasa cantidad en células epiteliales de los conductos respiratorios (Fig. 39a), en cambio se destaca en la zona basal de éstos (Fig. 39b). Además, existe marcaje de células al interior de vasos sanguíneos con patrones de reacción similares a E16 y E17 (Fig. 39a y 39c).

Los vasos sanguíneos pequeños ubicados en la periferia pulmonar, presentan inmunomarcación con anticuerpo anti VEGF-A. Estos vasos se ramifican y sus yemas se dirigen hacia la zona central del pulmón, rodeando a los conductos respiratorios de mayor tamaño (Fig. 40a, 40b y 40c).

El anticuerpo anti fvW presenta reacción positiva en numerosos vasos pequeños ubicados, tanto en la zona pulmonar periférica, como en la zona central y algunas células globosas que rodean a los conductos respiratorios y sus ramificaciones (Fig. 41a y 41b).

También existe marcaje positivo en la zona basal de los conductos respiratorios de mayor tamaño (Fig. 41c).

Reacción positiva para apoptosis es posible detectar en algunas células mesenquimáticas ubicadas en la periferia pulmonar donde el tejido mesenquimático es más laxo (Fig. 42a y 42b).

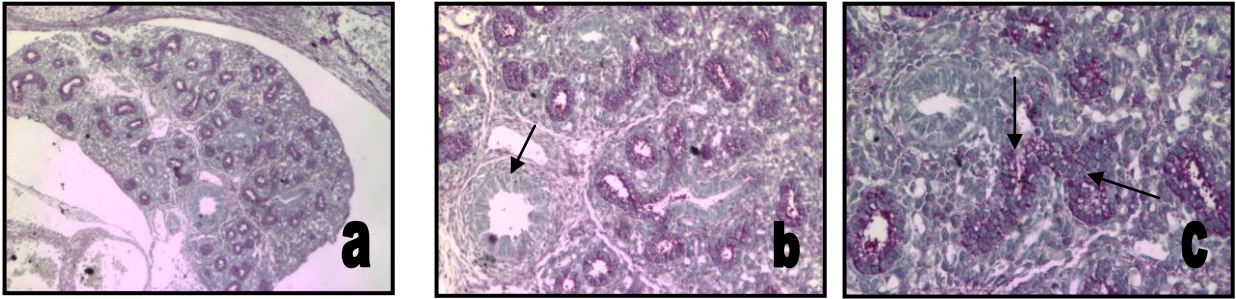


Fig. 37: PAS-H. E18. a: Gran número de conductos respiratorios ramificándose. **4x.** b: Conducto más diferenciado sólo con marcaje en su membrana basal. **10x.** c: Reacción positiva tanto en membrana basal y zona luminal de conductos respiratorios, además se presenta al interior de los lúmenes otorgándoles un aspecto “sucio”. Marcaje positivo en mesénquima. **20x.**

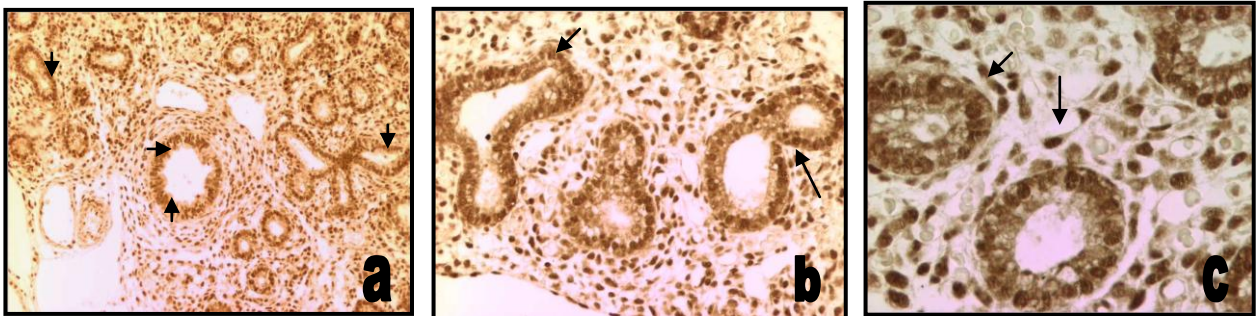


Fig. 38: Acm anti PCNA. E18. a: Inmunomarcación positiva abundante en epitelio de conductos respiratorios y mesénquima pulmonar. **10x.** b: Marcaje definido en células epiteliales de conductos respiratorios y sus ramificaciones. **20x.** c: Reacción en células endoteliales que delimitan vasos sanguíneos que rodean los conductos respiratorios. **40x.**

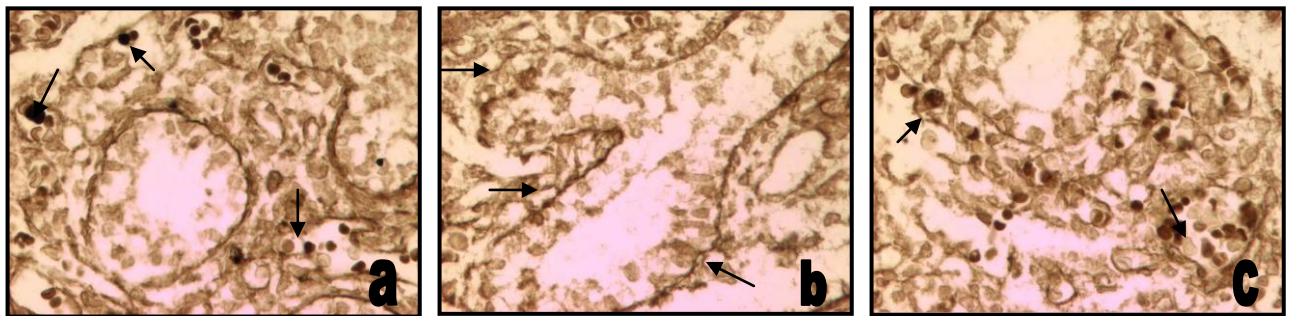


Fig. 39: Acm anti BMP-4. E18. a :Inmunorreacción débil en células del epitelio de conductos respiratorios, pero intensa en células sanguíneas. **40x.** b: Marcaje definido en la zona basal de conductos respiratorios y sus ramificaciones. **40x.** c: Inmunomarcación positiva en células sanguíneas al interior de vasos ya formados y en pequeños vasos que rodean a los conductos respiratorios. **40x.**

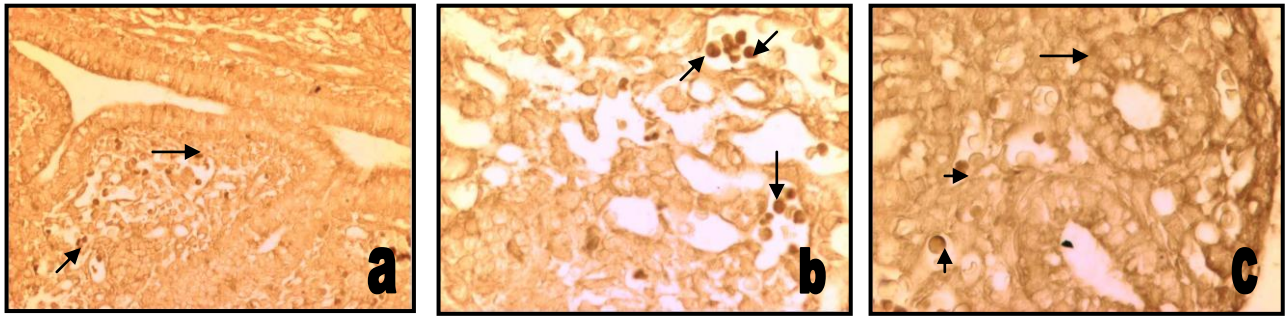


Fig. 40: Acm anti VEGF-A. **E18.** a: Reacción positiva en células sanguíneas y en zona luminal de los conductos respiratorios. **20x.** b: Inmunomarcación en grupos de células sanguíneas con distintos patrones de marcaje. **40x.** c: Marcaje en zona luminal de los conductos respiratorios y células sanguíneas que los rodean. **40x.**

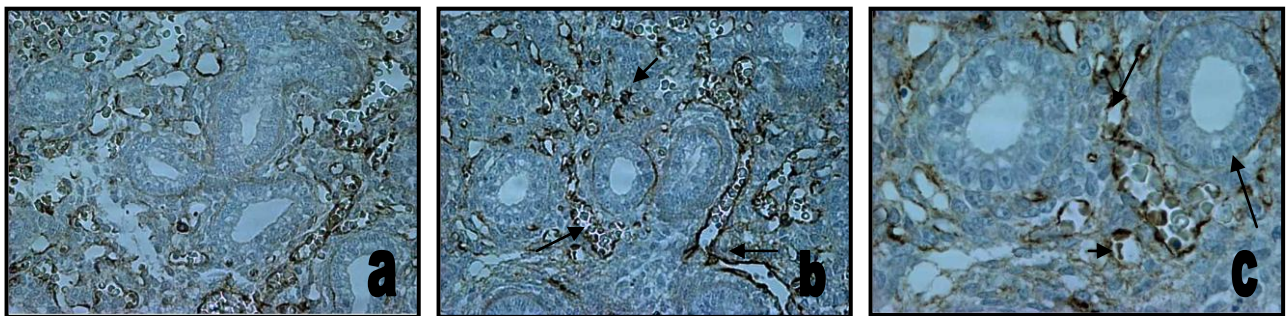


Fig. 41: Ac anti fvW. **E18.** a y b: Reacción positiva en células endoteliales que delimitan pequeños y grandes vasos que rodean a los conductos respiratorios. **40x.** c: Inmunomarcaje en células endoteliales y algunas células sanguíneas al interior de vasos sanguíneos. Reacción tenue en zona basal de los conductos respiratorios. **40x.**

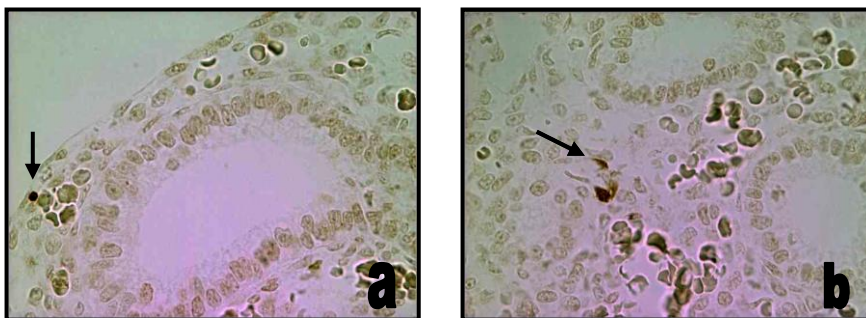


Fig. 42: Apoptosis. **E18.** a y b: Inmunomarcación positiva en células mesenquimáticas ubicadas en la periferia pulmonar. **40x.**

1.3 Desarrollo pulmonar entre E19 y E20.

E19: Se observa mayor tamaño pulmonar que la edad anterior y una notoria ramificación de los conductos, los que alcanzan una gran extensión. Se pueden visualizar fácilmente células fusiformes (que podrían corresponder a células musculares) que adoptan disposición concéntrica en torno a los vasos sanguíneos y vías respiratorias de mayor tamaño. Hay pequeños vasos sanguíneos ubicados en la zona pulmonar periférica y otros más extensos que rodean a los conductos respiratorios de la zona pulmonar central que están en estrecho contacto. Las células que se encuentran al interior de los vasos no presentan núcleo. El mesénquima a diferencia de E18 presenta una mayor celularidad, otorgándole a éste un aspecto muy compacto (Fig. 43a y 43b).

En los conductos respiratorios más pequeños todas las células presentan tinción PAS-H, así como también en el interior del lumen, mientras que en los conductos respiratorios de mayor tamaño se visualiza tinción tenue sólo en la zona luminal de las células. En el mesénquima se observa reacción PAS positiva difusa en la matriz y en el interior del lumen de los conductos respiratorios, dándoles un aspecto sucio al igual en que en E17 y E18 (Fig. 43c).

La inmunorreacción para el anticuerpo anti PCNA se observa en algunos sectores del epitelio de las ramificaciones de los conductos respiratorios sobre todo en su porción distal (Fig. 44b y 44c). En el mesénquima la reacción es notoria sobre todo en células cercanas a conductos respiratorios y vasos sanguíneos, también se presenta marcaje positivo en las células fusiformes que delimitan a los vasos sanguíneos de mayor calibre (Fig. 44a).

La inmunomarcación del anticuerpo anti BMP-4 se visualiza en la región basal de los conductos respiratorios (Fig. 45a). Además existe reacción en las células sanguíneas al interior de los vasos que presentan distintos patrones de marcaje, iguales a los descritos desde E16 (Fig. 45b).

El anticuerpo anti VEGF-A da reacción en las células endoteliales de vasos sanguíneos de mayor calibre (Fig. 46a) y en células que se encuentran al interior tanto de pequeños y grandes vasos (Fig. 46b).

La inmunorreacción del anticuerpo anti fvW es muy notoria y restringida sólo a las células endoteliales que delimitan los pequeños y grandes vasos sanguíneos ubicados en la periferia y zona pulmonar central (Fig. 47a y 47b).

En la detección de apoptosis es posible observar reacción positiva en células mesenquimáticas aisladas, principalmente ubicadas en la periferia pulmonar (Fig. 48a y 48b) y en algunas que rodean a los conductos respiratorios ya diferenciados (Fig. 48c). No hay detección de apoptosis en el epitelio de los conductos respiratorios.

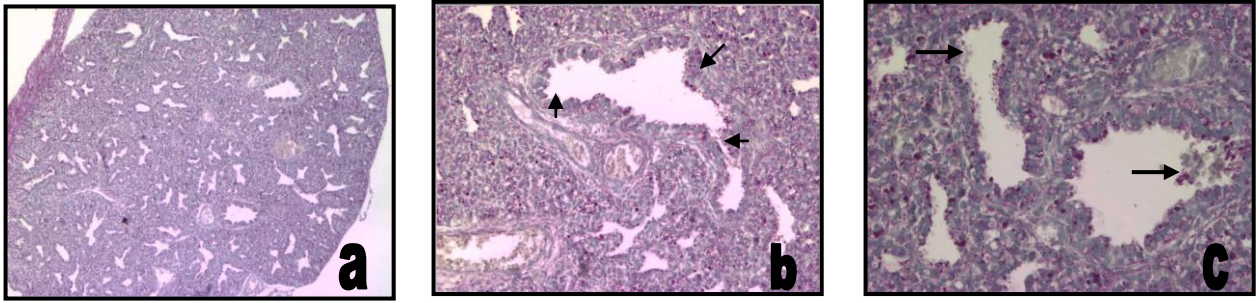


Fig. 43: PAS-H. **E19.** a: El mesénquima a diferencia de edades anteriores es muy compacto, a pesar de poseer mayor cantidad de conductos respiratorios y vasos sanguíneos. **4x.** b: Marcaje PAS-H positivo en bordes luminales de los conductos respiratorios y algunas células mesenquimáticas. **10x.** c: Detalle del marcaje de los bordes luminales y al interior de los lúmenes de los conductos respiratorios otorgándoles un aspecto “sucio”. **20x.**

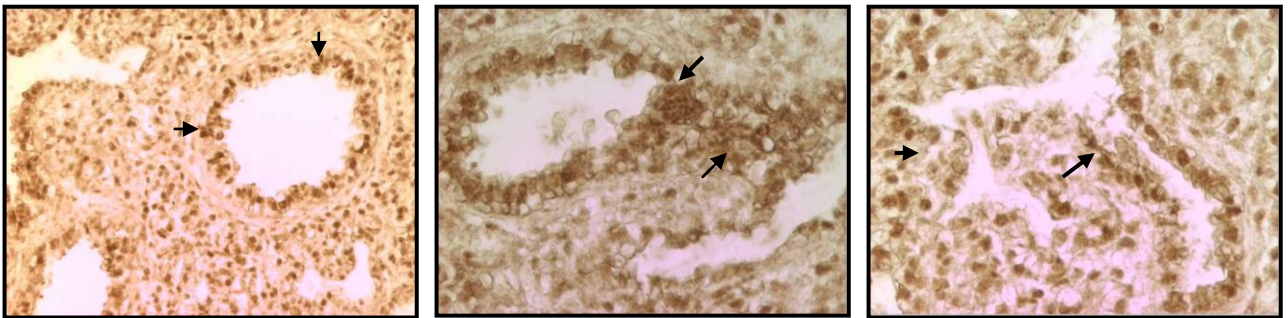


Fig. 44: Acm anti PCNA. **E19.** a: Inmunorreacción notoria en epitelio de conductos respiratorios y en mesénquima. **20x.** b: Marcaje positivo en epitelio y en mesénquima de los conductos mientras se bifurcan. **40x.** c: Detalle de reacción en algunas zonas epiteliales de las ramificaciones de los conductos respiratorios, principalmente su porción más distal. **40x**

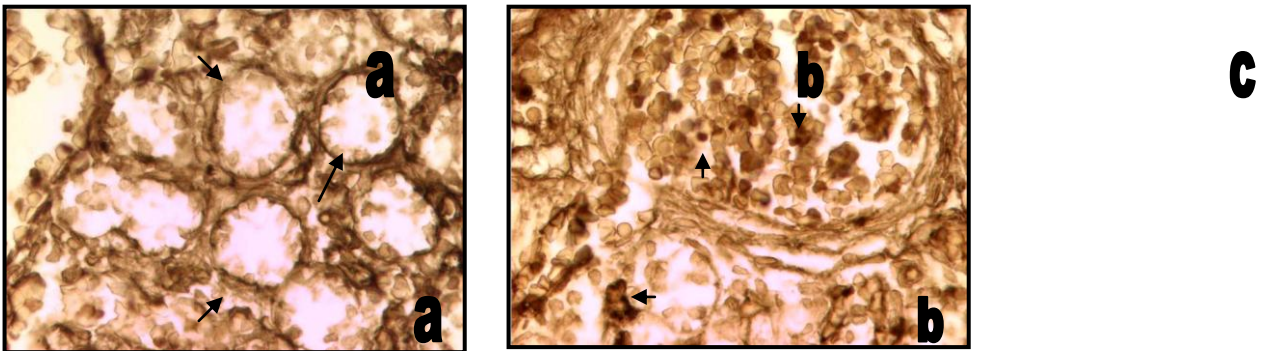


Fig. 45: Acm anti BMP-4. **E19.** a: Marcaje en la zona basal de los conductos respiratorios y en algunas células mesenquimáticas. **40x.** b: Inmunorreacción en células sanguíneas con distintos patrones de marcaje. **40x.**

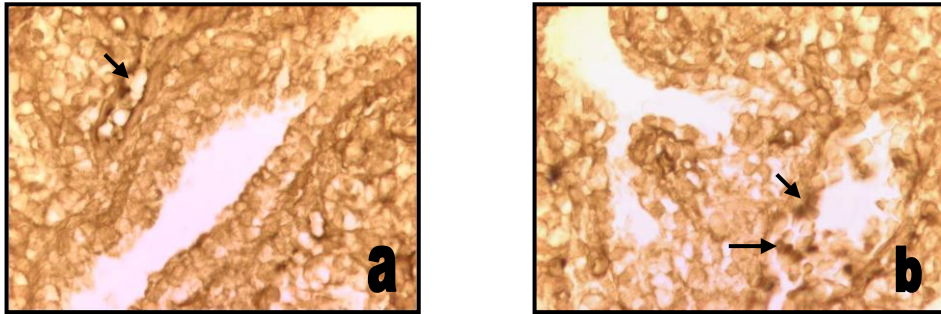


Fig. 46: Acm anti VEGF-A. **E19.** a: Inmunorreacción positiva en células endoteliales que delimitan vasos sanguíneos que rodean a conductos respiratorios. **40x.** b: Marcaje de algunas células sanguíneas al interior de pequeños y grandes vasos. **40x.**

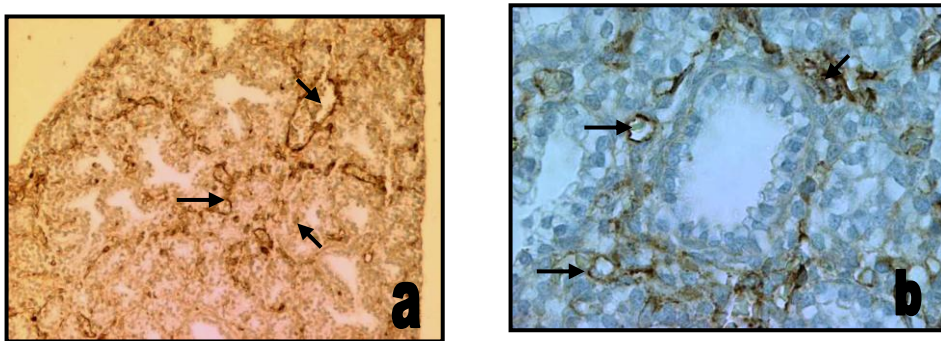


Fig. 47: Ac anti fvW. **E19.** a: Inmunorreacción en células endoteliales de pequeños y grandes vasos distribidos en el mesénquima pulmonar. **10x.** b: Detalle de marcaje positivo de las células endoteliales. **40x.**

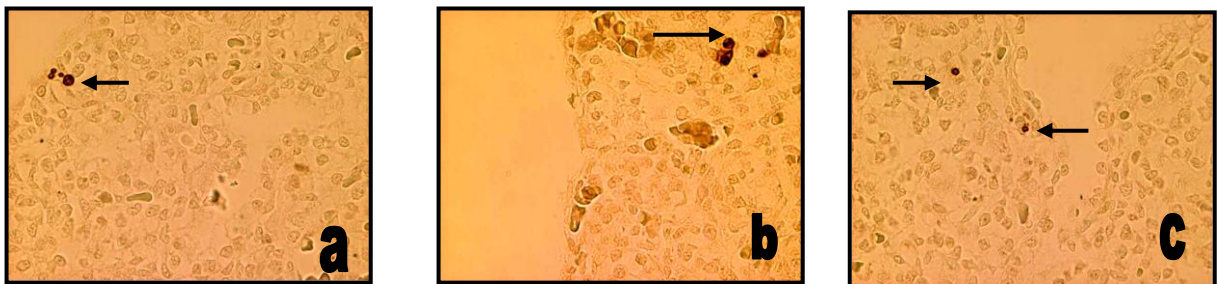


Fig. 48: Apoptosis. **E19.** a y b: Inmunomarcación positiva en células mesenquimáticas periféricas. **40x.** c: Inmunorreacción positiva en células que rodean a los conductos respiratorios. **40x.**

E20: La estructura pulmonar es muy similar a la edad anterior, manteniendo los patrones de las ramificaciones de los conductos respiratorios y la distribución de los vasos sanguíneos, ubicándose siempre en la zona central los de mayor tamaño, mientras que los de menor calibre se mantienen en la zona pulmonar periférica, ambos en estrecho contacto con los conductos respiratorios. Se sigue observando la mayor celularidad del mesénquima observada en la edad previa y se observa muy nítida la disposición concéntrica de células fusiformes que rodean tanto a los vasos sanguíneos como a los conductos respiratorios.

La tinción con PAS-H se observa en el borde luminal y en el interior del lumen de las vías respiratorias (Fig. 49a y 49b), manteniendo el aspecto sucio observado desde E17 (Fig. 49c).

La inmunorreacción del anticuerpo anti PCNA se observa en el epitelio sólo de los extremos más distales de las ramificaciones de los conductos respiratorios (Fig. 50a y 50c). En el mesénquima existe reacción en toda la superficie (Fig. 50b). Se mantiene la reacción positiva en las células fusiformes que se disponen concéntricamente a los vasos sanguíneos de mayor calibre.

El anticuerpo anti BMP-4 da reacción positiva sólo en algunas células epiteliales de los conductos respiratorios. En el mesénquima sólo hay reacción positiva muy leve en algunas células aisladas (Fig. 51a y 51b).

La inmunorreacción para el anticuerpo anti VEGF-A se observa en pocas células dispersas en el mesénquima (Fig. 52a) y en algunas células al interior de vasos sanguíneos que conservan el patrón de marcaje de las edades descritas anteriormente (Fig. 52b).

El anticuerpo anti fvW da reacción notoria en las células endoteliales que delimitan los vasos sanguíneos de mayor tamaño. Además existe marcaje de pequeños vasos que se encuentran en la periferia pulmonar y aquellos que rodean las ramificaciones de los conductos respiratorios (Fig. 53a y 53b).

En la detección de apoptosis es posible observar marcaje positivo en un número pequeño de células aisladas del tejido mesenquimático que se encuentran ubicadas mayormente en la periferia pulmonar (Fig. 54b y 54c). También se observa reacción positiva en algunas células epiteliales de los conductos respiratorios, éstas son redondas, de gran tamaño, las que serían coincidentes con AEC II (Fig. 54a).

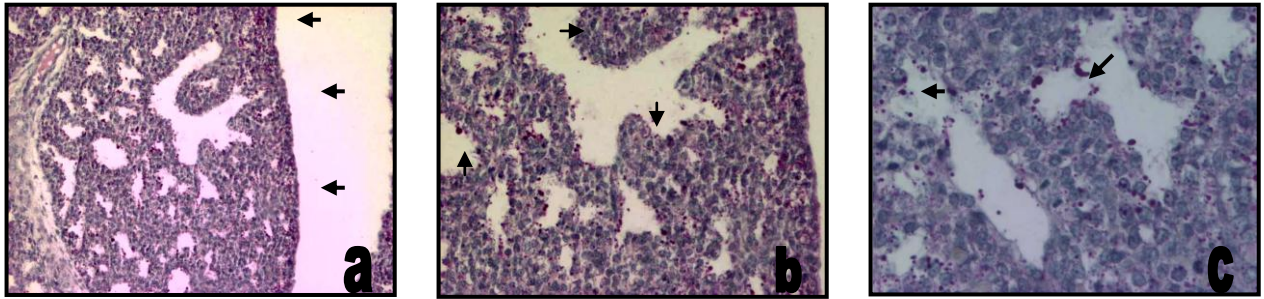


Fig. 49: PAS-H. E20. Marcaje en células mesenquimáticas sobre todo de la periferia pulmonar. **10x.** b: Reacción en borde luminal de conductos respiratorios y células mesenquimáticas que rodean a los conductos. **20x.** c: Marcaje al interior de los lúmenes de los conductos respiratorios, otorgándoles un aspecto “sucio”. **40x.**

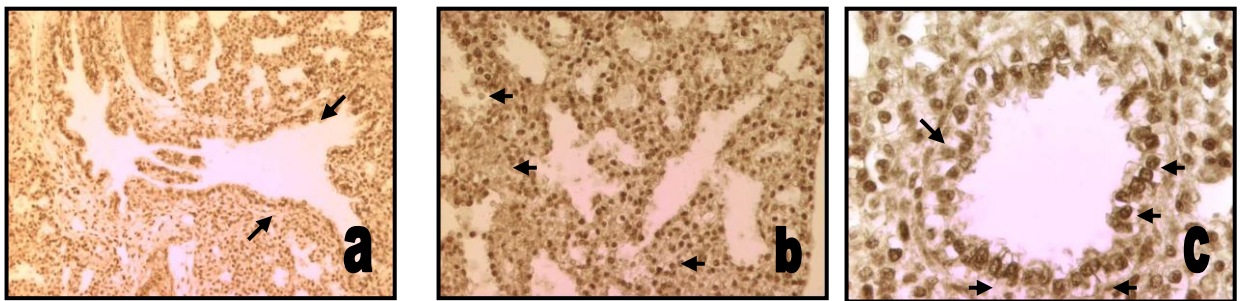


Fig. 50: Acm anti PCNA. E20. a: Reacción positiva en epitelio de conductos respiratorios y sus ramificaciones sobre todo en sus extremos más distales. **10x.** b: Marcaje definido y abundante en células mesenquimáticas. **20x.** c: Inmunomarcación nítida en células epiteliales y zona basal de los conductos respiratorios. **40x.**

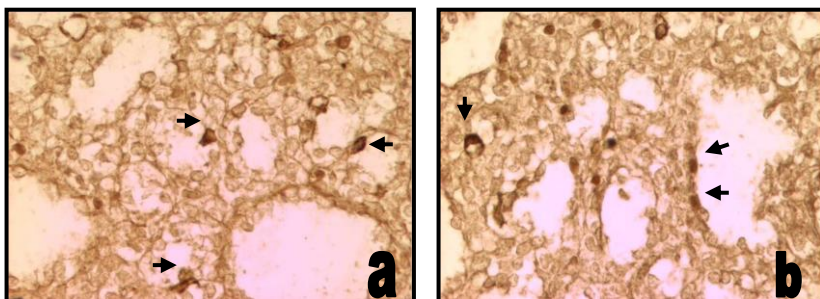


Fig. 51: Acm anti BMP-4. E20. a y b: Inmunorreacción en algunas células mesenquimáticas y sanguíneas alrededor de los conductos respiratorios. **40x.**

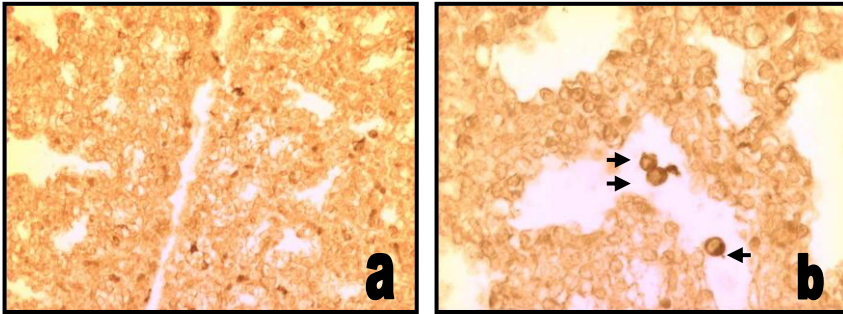


Fig. 52: Acm anti VEGF-A. **E20.** a: Inmunomarcaje positivo en pocas células del mesénquima y en algunas células sanguíneas. **20x.** b: Reacción positiva en células sanguíneas con diferentes patrones de marcaje. **40x.**

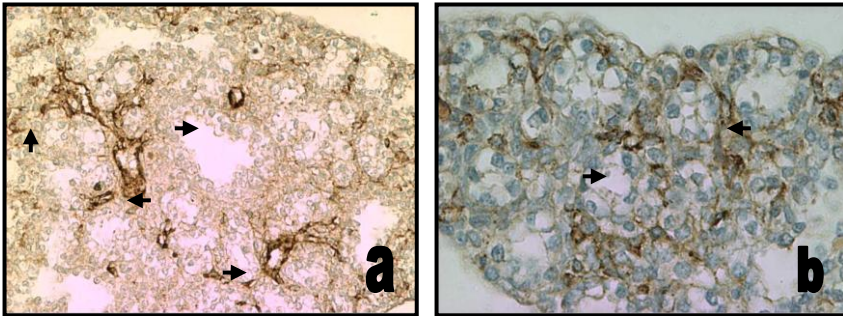


Fig. 53: Ac anti fvW. **E20.** a: Inmunorreacción positiva en pequeños vasos ubicados en la periferia pulmonar y en los de mayor tamaño que se encuentran en la zona pulmonar central. **20x.** b: Marcaje de células endoteliales que delimitan pequeños y grandes vasos sanguíneos que rodean a los conductos respiratorios. **40x.**

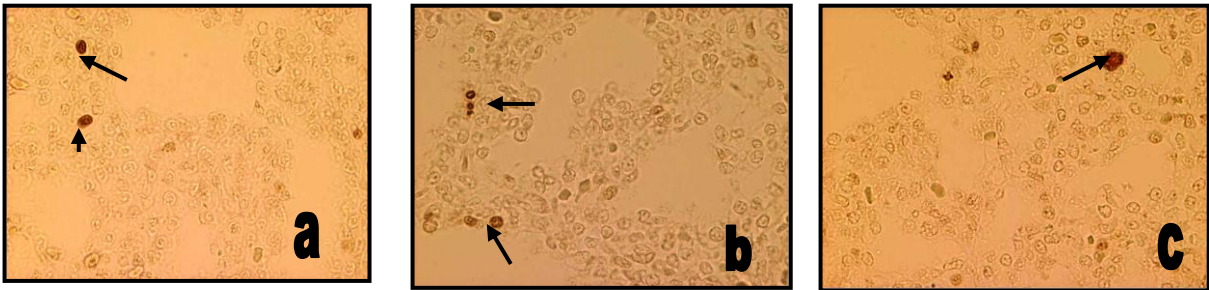


Fig. 54: Apoptosis. **E20.** a: Inmunomarcación positiva en escasas células epiteliales de los conductos respiratorios la periferia pulmonar. **40x.** b y c: Marcaje positivo en algunas células del mesénquima pulmonar. **40x.**

1.4 Descripción del desarrollo pulmonar al nacimiento.

Notoria expansión de las vías respiratorias, tabiques interalveolares muy delgados. Disminución considerable del tejido mesenquimático, el que se restringe solamente a formar los tabiques. Los vasos sanguíneos son muy delgados los que serían coincidentes con capilares sanguíneos que se encuentran en estrecho contacto con los alvéolos respiratorios.

La tinción con PAS-H es muy difusa en los tabiques interalveolares y notoria en el interior de los alvéolos (Fig. 55a y 55b).

La reacción para el anticuerpo anti PCNA da marcaje positivo en algunas células alveolares que forman los tabiques (Fig. 56).

El marcaje que se puede observar con el anticuerpo anti BMP-4 es notorio en algunas células que forman los tabiques (Fig. 57a) y reacciona notoriamente con el contenido del interior de los alvéolos pulmonares (Fig. 57b).

La inmunomarcación del anticuerpo anti VEGF-A se observa difusa en los tabiques interalveolares (Fig. 58a y 58b), pero presenta reacción muy intensa con el contenido del interior de los alvéolos (Fig. 58a).

La reacción que se observa con el anticuerpo anti fvW es notoria en pequeños vasos sanguíneos que se mantienen en zonas más gruesas de los tabiques interalveolares, además presenta reacción débil con el contenido existente al interior de los alvéolos (Fig. 59a y 59b).

En la detección de apoptosis es posible distinguir inmunorreacción positiva en células ubicadas en los tabiques interalveolares sobre todo aquellos de mayor grosor, dando reacción positiva en células grandes, de aspecto globoso que serían coincidentes con AEC II, al igual que en E20 (Fig. 60a y 60b).

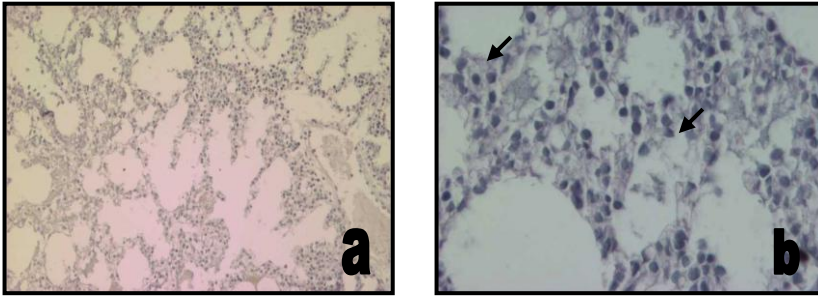


Fig. 55: PAS-H. R.N. a **10x** y b **40x**: Marcaje difuso de los tabiques interalveolares y reacción notoria con el surfactante al interior de los alvéolos.

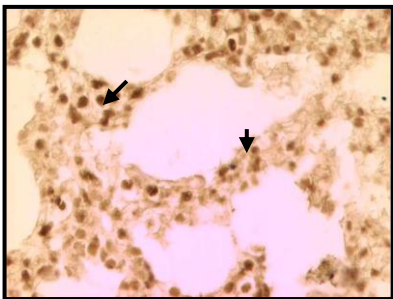


Fig. 56: Acm anti PCNA. R.N. Inmunorreacción positiva en las células que conforman el tabique interalveolar y algunas células que conforman el mesénquima. **40x**.

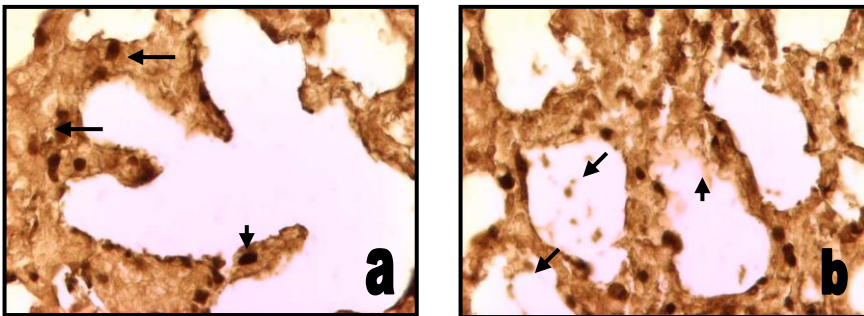


Fig. 57: Acm anti BMP-4. R.N. a: Inmunomarcación notoria en algunas células que conforman los tabiques interalveolares. **40x**. b: Reacción con el surfactante al interior de los alvéolos. **40x**.

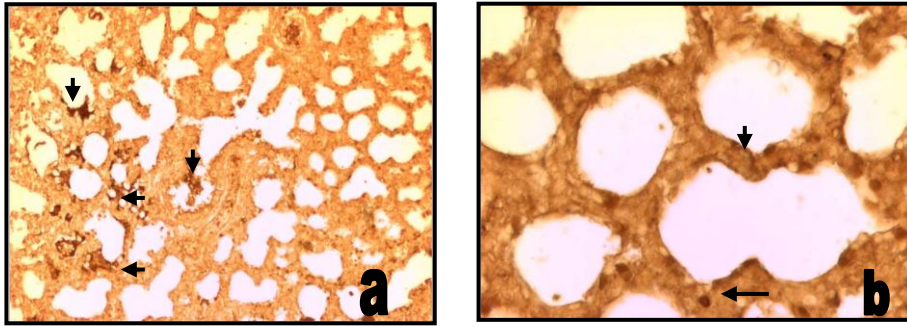


Fig. 58: Acm anti VEGF-A. R.N. a: Inmunomarcaje positivo en algunas células de los tabiques interalveolares y marcaje muy intenso del surfactante pulmonar al interior de los alvéolos. 10x. b: Reacción en algunas células que forman los tabiques interalveolares. 40x.

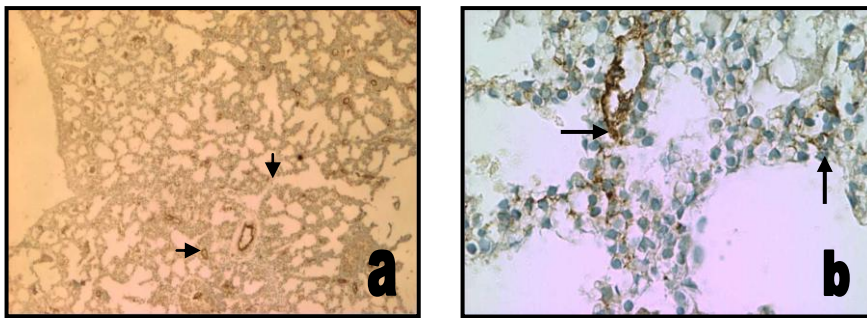


Fig. 59: Ac anti fvW. R.N. a y b: Inmunorreacción notoria en pequeños vasos sanguíneos ubicados en las zonas más gruesas de los tabiques interalveolares. 4x y 20x.

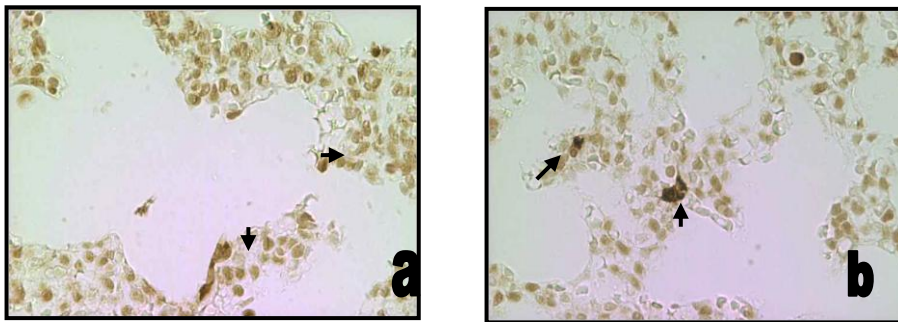


Fig. 60: Apoptosis. R.N. a y b: Inmunomarcación positiva en células de aspecto globoso ubicadas en los tabiques interalveolares. 40x.

Tabla 1: Descripción del desarrollo pulmonar en *Spague Dawley* desde E12 al nacimiento.

EDAD	ENDODERMO	MESÉNQUIMA	VASCULATURA	PAS-H	PCNA	BMP-4	VEGF-A	FVW	APOPTOSIS
E12	1 gran conducto central de lumen amplio	Tejido mesenquimático compacto formado por células grandes y globosas	Pocas células sanguíneas aisladas, nucleadas	Marcaje débil en la zona apical del conducto central	Marcaje en el conducto central hacia ventral, además se marca el borde luminal. En mesénquima reacción en algunas células sanguíneas	Marcaje en el borde luminal del conducto central	Reacción en pocas células mesenquimáticas de gran tamaño que rodean al conducto central	Marcaje en zona periférica de células que forman cordones alrededor del conducto	Reacción en escasas células epiteliales de la zona ventral del conducto
E13	3 conductos: 1 dorsal redondo con lumen estrecho 1 a cada lado pulmonar	Tejido mesenquimático compacto, algunos grupos celulares de forma fusiforme rodean los conductos respiratorios	Pequeños vasos sanguíneos, con células nucleadas de gran tamaño en su interior. Algunas células sanguíneas forman cordones	Marcaje notorio en la M.B de los conductos. Hacia el lumen reacción sólo en la zona basal de células ubicadas a ventral de los conductos	Marcaje abundante en el epitelio de ambos conductos pulmonares. En el mesénquima es notorio el marcaje en zonas periféricas y cordones celulares	Marcaje escaso en células epiteliales de los conductos. Algunas células del mesénquima que forman cordones dan reacción positiva	Marcaje en escaso número de células epiteliales de los conductos y en su borde luminal. Reacción de pequeños vasos sanguíneos en la zona pulmonar periférica	Marcaje en zona basal de los conductos, también en cordones y grupos celulares de la periferia pulmonar	Marcaje escaso en células epiteliales de los conductos. Además reacción positiva en células mesenquimáticas del conducto izquierdo
E14	4 conductos: 3 pulmón derecho 1 pulmón izquierdo	Tejido mesenquimático compacto con grupos celulares de aspecto fusiforme rodeando a los conductos respiratorios	Mayor cantidad de cúmulos celulares en zona periférica formando pequeños vasos	Marcaje intenso en M.B de los conductos, débil reacción en el borde de la zona luminal	Marcaje en el epitelio de todos los conductos. En el mesénquima marcaje abundante y uniforme, reacción positiva además en cúmulos y cordones celulares	Marcaje de células epiteliales en forma alargada ubicadas entre células negativas dando el aspecto de "rueda de carreta". Reacción intensa en mesénquima	Marcaje tenue, pero definido en escasas células epiteliales y borde luminal de los conductos. Tinción de células en el mesénquima, globosas de gran tamaño	Marcaje en células endoteliales de pequeños vasos sanguíneos	Reacción positiva en células epiteliales y muy escasas células del mesénquima pulmonar

EDAD	ENDODERMO	MESÉNQUIMA	VASCULATURA	PAS-H	PCNA	BMP-4	VEGF-A	FVW	APOPTOSIS
E15	3 conductos: 2 pulmón derecho 1 pulmón izquierdo	Tejido mesenquimático menos compacto que edad anterior, surcado por pequeños vasos sanguíneos	Pequeños vasos sanguíneos y cúmulos celulares de 4 a 7 células nucleadas	Marcaje intenso en la M.B y borde luminal de los conductos respiratorios. Reacción difusa en mesénquima	Marcaje en el epitelio de los conductos presentando el patrón de "rueda de carreta". Reacción positiva en el mesénquima, en células globosas al interior de vasos sanguíneos y algunas que forman cordones	Marcaje en el epitelio de los conductos manteniendo el patrón de "rueda de carreta" de E14. También presente en el mesénquima y en algunas células al interior de vasos sanguíneos	Marcaje débil de la M.B y zona luminal de los conductos. Reacción notoria y definida en cordones celulares en la periferia pulmonar y algunos que rodean a los conductos	Marcaje intenso en cúmulos y cordones celulares en la zona pulmonar central. Reacción en células que delimitan pequeños vasos sanguíneos. Tinción de la M.B de los conductos	Reacción positiva en escasas células mesenquimáticas de la periferia pulmonar
E16	Gran aumento en el número de conductos en ambos pulmones, varios de lumen amplio Mayor tamaño pulmonar	Tejido mesenquimático menos compacto que edad anterior, células en disposición circular rodeando los conductos	Vasos sanguíneos de mayor tamaño delimitados por células fusiformes. Estos vasos están más próximos a conductos respiratorios	En conductos que presentan ramificaciones hay zonas epiteliales donde no hay marcaje. En las nuevas ramificaciones reacción intensa en M.B y zona luminal	Reacción intensa en epitelio de todos los conductos respiratorios. Marcaje positivo en células mesenquimáticas que rodean a conductos y delimitan vasos sanguíneos	Marcaje tenue de la zona basal de los conductos respiratorios. Reacción en algunas células del mesénquima y en células globosas al interior de vasos sanguíneos	Marcaje muy notorio en vasos sanguíneos dispuestos estrechamente a los conductos respiratorios	Reacción notoria en células que delimitan vasos sanguíneos. Reacción en la zona basal de conductos respiratorios y ramificaciones	Reacción en muy escasas células ubicadas en el epitelio de los conductos respiratorios
E17	Formación de lóbulos pulmonares. Gran número de conductos respiratorios. En cada pulmón uno más diferenciado y de mayor tamaño	Tejido mesenquimático más laxo, interrumpido por mayor número de conductos respiratorios y vasos sanguíneos	Vasos delimitados por células fusiformes. Cordones celulares confluyen a conductos respiratorios	Marcaje en M.B de todos los conductos respiratorios. Reacción en epitelio de casi todos los conductos, menos en aquellos más diferenciados. Marcaje al interior de los conductos respiratorios dándoles "aspecto sucio"	Marcaje definido en células epiteliales de conductos simples y también en los con ramificaciones. Reacción en todo el mesénquima, muy notorio en células que rodean vasos sanguíneos y conductos respiratorios	Marcaje tenue y débil en epitelio y zona basal de conductos respiratorios y sus ramificaciones. Reacción positiva en el mesénquima	Marcaje de pequeños vasos sanguíneos en la periferia pulmonar. Reacción en brotes de vasos que se dirigen hacia la zona pulmonar central, que están en estrecho contacto con los conductos respiratorios	Notoria reacción en pequeños vasos sanguíneos que ocupan mayor superficie en el mesénquima. Reacción en zona basal de los conductos respiratorios	Reacción positiva en muy pocas células mesenquimáticas ubicadas en la periferia pulmonar y también en escasas células epiteliales de los conductos respiratorios

EDAD	ENDODERMO	MESÉNQUIMA	VASCULATURA	PAS-H	PCNA	BMP-4	VEGF-A	FVW	APOPTOSIS
E18	Gran número de conductos respiratorios. Presencia de conducto más grande y diferenciado en cada pulmón	Tejido mesenquimático más laxo surcado por conductos respiratorios y vasos sanguíneos	Gran cantidad de pequeños vasos en periferia pulmonar, vasos más grandes en zona central rodeados por células fusiformes, presencia de células globosas sin núcleo en su interior	En los conductos de mayor tamaño marcaje tenue en su M.B. En los conductos pequeños hay reacción en toda su superficie. Se conserva aspecto sucio al interior de conductos respiratorios como en E17	Marcaje de conductos más diferenciados muy definido en epitelio. Mesénquima presenta marcaje uniforme, también en células de disposición concéntrica que rodean a los conductos respiratorios y sus ramificaciones	Marcaje débil en epitelio y notorio en zona basal de los conductos, lo mismo en células globosas y sin núcleo al interior de vasos sanguíneos	Marcaje de pequeños vasos sanguíneos en la periferia y zona central pulmonar	Reacción positiva en vasos sanguíneos centrales y periféricos. Marcaje de la zona basal de conductos respiratorios de mayor calibre	Reacción positiva en algunas células mesenquimáticas ubicadas en la periferia pulmonar
E19	Mayor tamaño pulmonar y aumento notorio del número de conductos respiratorios y sus ramificaciones	Se distinguen fácilmente células fusiformes que rodean tanto a vasos sanguíneos y vías aéreas de mayor tamaño. Se aprecia aspecto más compacto del mesénquima	Estrecho contacto de vasos sanguíneos con vías respiratorias. Vasos de menor tamaño en zonas pulmonares periféricas	Marcaje difuso en toda la superficie de pequeños conductos, en los de mayor tamaño marcaje sólo en el borde luminal. En el mesénquima marcaje difuso	Marcaje en algunos sectores del epitelio de los conductos ramificados. En los conductos no ramificados se presenta en toda la superficie. Reacción intensa en el mesénquima	En la zona basal de los conductos respiratorios la reacción es notoria y muy definida. Reacción en células grandes y globosas sin núcleo al interior de vasos sanguíneos	Reacción en el endotelio de vasos sanguíneos de mayor calibre y en células grandes, globosas y sin núcleo al interior de los vasos sanguíneos	Marcaje muy definido en células endoteliales que rodean a vasos sanguíneos de mayor calibre. Reacción en pequeños vasos en la zona pulmonar periférica	Reacción en algunas células mesenquimáticas de la periferia pulmonar
E20	Notoria ramificación de los conductos. Se mantiene mayor celularidad del mesénquima	Disminución del tejido mesenquimático. Notoria disposición de células fusiformes que rodean tanto a vasos sanguíneos y conductos respiratorios	Vasos sanguíneos de mayor calibre se disponen rodeando a conductos respiratorios de gran calibre. Pequeños vasos rodean a porciones terminales de conductos respiratorios más pequeños	Marcaje en el borde luminal de los conductos aéreos y también en el lumen de las vías respiratorias manteniendo el "aspecto sucio" de las edades previas	Marcaje en el epitelio distal de las ramificaciones de los conductos. En el mesénquima reacción intensa y bien definida.	Marcaje en algunas células epiteliales de conductos respiratorios. Disminuye el marcaje en el mesénquima	Reacción en algunas células del mesénquima y en algunas células grandes, globosas y sin núcleo en vasos sanguíneos	Marcaje en células endoteliales que delimitan pequeños vasos sanguíneos de la periferia pulmonar	Reacción positiva en escasas células mesenquimáticas de la periferia pulmonar. También en algunas células epiteliales de gran tamaño (AEC II)

EDAD	ENDODERMO	MESÉNQUIMA	VASCULATURA	PAS-H	PCNA	BMP-4	VEGF-A	FVW	APOPTOSIS
R.N	Notoria dispersión de las vías aéreas, tabiques interalveolares muy delgados	Disminución considerable del tejido mesenquimático, casi sólo se restringe a formar los tabiques interalveolares	Gran número de capilares en estrecho contacto con las vías respiratorias formando la unión alveolo-capilar	Reacción positiva con el surfactante. Marcaje difuso en los tabiques interalveolares	Marcaje de los tabiques interalveolares, marcando específicamente algunas células alveolares	Marcaje difuso en los tabiques interalveolares. Reacción positiva con el surfactante	Marcaje de los tabiques interalveolares proporcional a su grosor. Reacción intensa con el surfactante al interior de los alvéolos	Marcaje difuso en los tabiques interalveolares. Reacción en pequeños vasos que se mantienen en zonas más gruesas de los tabiques. Reacción con el surfactante pulmonar que se ubica en los alvéolos	Reacción positiva en células de gran tamaño, globosas ubicadas en los tabiques interalveolares (AEC II)

2. ESTUDIO MORFOMÉTRICO:

2.1 Proliferación celular:

La cuantificación del área inmunomarcada con PCNA indica un aumento sostenido desde E12, que mostró el menor valor $92,208 \mu\text{m}^2$ hasta E18 que alcanza la mayor área $4.852 \mu\text{m}^2$ marcada. Las edades restantes (E19, E20 y R.N) muestran una disminución gradual, llegando en RN a un valor de $163,090 \mu\text{m}^2$ (Gráfico N° 1).

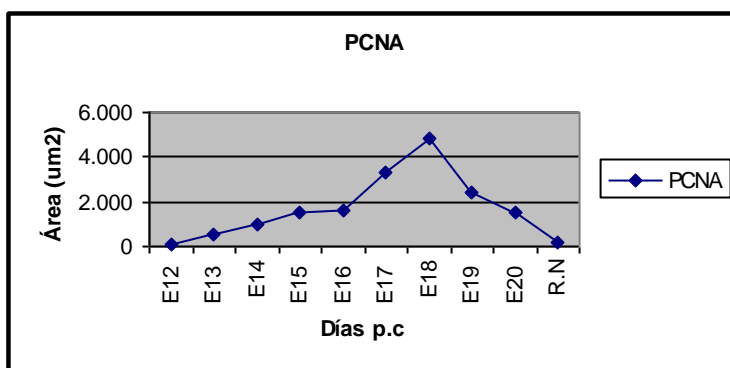


Gráfico N° 1: Proliferación celular inmunomarcada con PCNA.

2.2 Apoptosis celular:

Como se indica en el gráfico N° 2 el área inmunomarcada de células apoptóticas se incrementa desde E12 a E20 donde alcanza el máximo valor $28,134 \mu\text{m}^2$. Sin embargo, el área apoptótica disminuye en E16 $14,668 \mu\text{m}^2$ y en RN dando una curva bimodal.

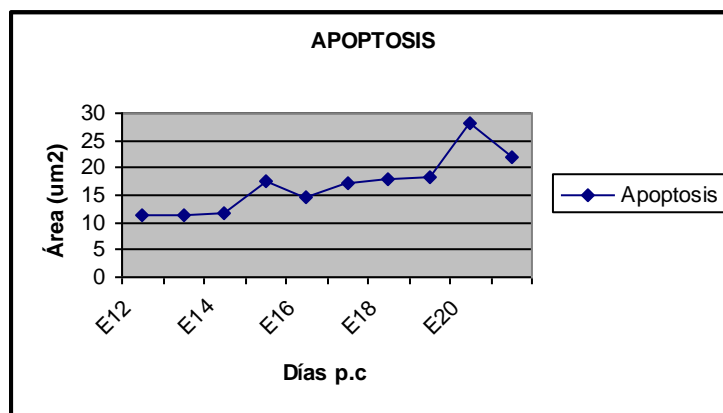


Gráfico N° 2: Apoptosis celular inmunomarcada con ApopTag® Peroxidase Kits S7100.

2.3 Expresión de BMP-4:

Existe inmunomarcación positiva para BMP-4 en todas las edades estudiadas para el desarrollo pulmonar embrionario, presentando una distribución bastante heterogénea partiendo en E12 con bajos niveles de inmunomarcación $135,446 \mu\text{m}^2$, teniendo varios quiebres en la curva llegando en E16 a presentar uno de los valores más altos de marcaje positivo $257,381 \mu\text{m}^2$ para luego disminuir hasta E18 donde se alcanza el valor más bajo de reacción $88,862 \mu\text{m}^2$, aumentando los valores hasta R.N edad en que se alcanza el valor más alto de inmunorreacción $259,338 \mu\text{m}^2$ (Gráfico N° 3).

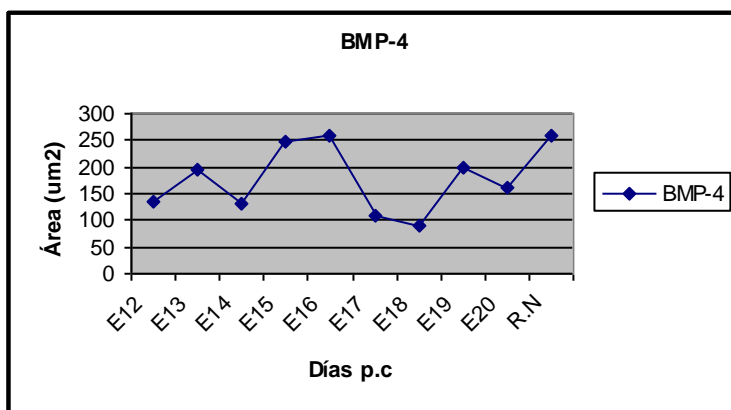


Gráfico N° 3: Diferenciación celular inmunomarcada con BMP-4.

2.4 Expresión de VEGF-A:

En las edades iniciales se presenta la mayor inmunomarcación, alcanzando la máxima expresión en E12 $569,404 \mu\text{m}^2$, luego la que va declinando al avanzar en las edades en estudio hasta llegar a E16 donde se obtiene el menor valor de inmunorreacción positiva $100,806 \mu\text{m}^2$, en las edades siguientes aumentan los valores de marcaje positivo obteniendo en E19 un segundo peak de inmunomarcación $233,537 \mu\text{m}^2$ declinando en E20 y RN (Gráfico N° 4).

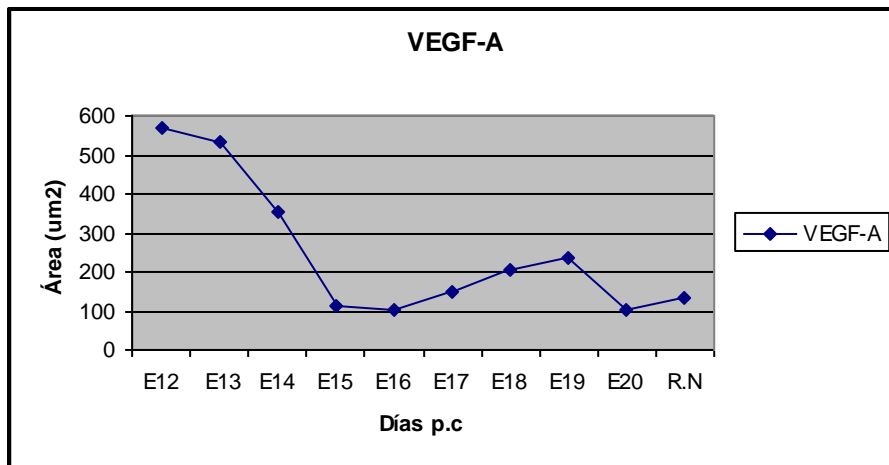


Gráfico N° 4: Inmunomarcación de precursores de células endoteliales con VEGF-A.

2.5 Expresión de fvW:

Expresión de fvW en niveles basales en las edades iniciales del desarrollo embrionario pulmonar E12: 225,253 μm^2 la que aumenta al avanzar en las edades en estudio, alcanzando la mayor inmunomarcación en E20 868,334 μm^2 para disminuir abruptamente en R.N alcanzando los valores más bajos de inmunorreacción positiva 104,571 μm^2 (Gráfico N° 5).

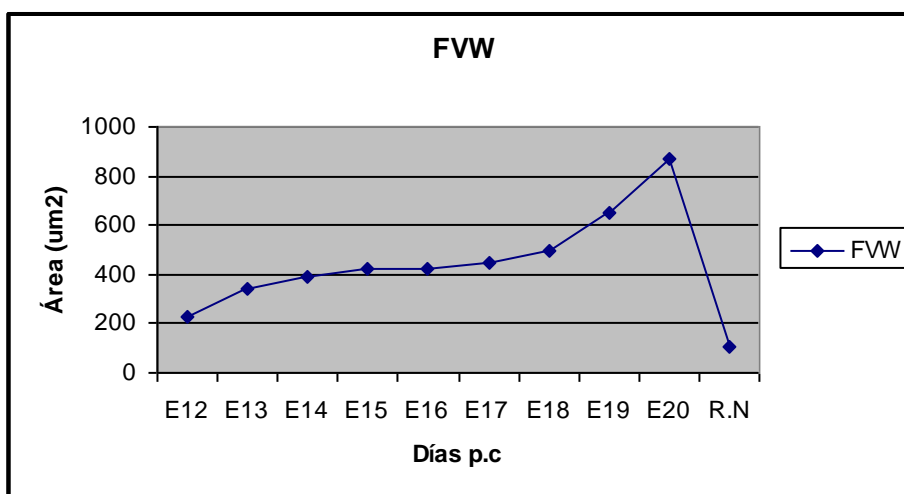


Gráfico N° 5: Inmunomarcación de células endoteliales con fvW.

Tabla N° 2: Área inmunomarcada (μm^2) para cada anticuerpo en cada edad del desarrollo.

<i>Edad</i>	Proliferación	Apoptosis	BMP-4	VEGF-A	FVW
<i>E12</i>	92,20820	11,243384	135,44694	569,40431	225,25300
<i>E13</i>	506,25911	11,264414	194,36958	533,49398	343,84610
<i>E14</i>	1.029,80836	11,785584	130,53482	353,07198	393,43996
<i>E15</i>	1.548,47296	17,546604	247,93924	112,20769	424,19573
<i>E16</i>	1.620,26282	14,668504	257,38120	100,80666	426,118670
<i>E17</i>	3.285,51514	17,260487	109,47658	151,11786	443,48876
<i>E18</i>	4.852,96198	17,973517	88,86268	204,62849	497,21973
<i>E19</i>	2.413,91854	18,351880	198,38921	233,53703	651,04963
<i>E20</i>	1.558,64204	28,134528	161,74223	103,43216	868,33437
<i>R.N</i>	163,09054	22,060472	259,33824	133,36835	104,57120

V. DISCUSIÓN

En este trabajo se aplicaron técnicas inmunohistoquímicas con diferentes anticuerpos, para lo cual se requirió obtener cortes seriados de pulmón en desarrollo lo que fue posible lograr sólo a partir de E12, a diferencia de otros trabajos similares que han observado el desarrollo pulmonar en edades más precoces, pero utilizando cultivos celulares, como Mollard y Dziadek (1998), Scavo *et al.*, (1998), Pantelidis *et al.*, (2002), Akeson *et al.*, (2003), Liu *et al.*, (2003) y Stenmark y Gebb (2003).

Esta metodología difiere de los eventos naturales durante el desarrollo, en que las células que forman el tejido son poblaciones heterogéneas sometidas a diferentes señales, en cambio, en cultivos celulares éstas son controladas por el investigador y los iniciadores de los diferentes mecanismos del desarrollo identificados en estas condiciones pueden o no ser los responsables primarios para estos mecanismos (Blanco *et al.*, 1998).

El desarrollo pulmonar embrionario se efectúa en etapas, que en el caso de la rata van desde los pocos días post-coito hasta aproximadamente un mes después del nacimiento. En esta memoria se lograron identificar 4 etapas (pseudoglandular, canalicular, sacular y alveolar) de las 5 totales que se describen, todo esto debido a las edades utilizadas en este estudio. Cada una de estas etapas se diferencia de las otras, por la aparición de nuevas estructuras tanto del componente respiratorio como del vascular que le acompaña y las modificaciones que van sufriendo a través de los diferentes mecanismos del desarrollo, para lograr la formación de la barrera sangre-aire para efectuar la adecuada hematosis. En el caso de *Sprague dawley*, la estructura pulmonar consiste en dos pulmones que provienen de un blastema único que se divide en E16 y la formación de los lobulaciones se inicia en E17 para terminar en E19, con la formación de 4 lobos en el pulmón derecho y 1 en el izquierdo.

La actividad proliferativa, inmunomarcada con PCNA, fue positiva en células epiteliales y mesenquimáticas en todas las edades analizadas, la que fue aumentando constantemente hasta E18, edad que mostró el mayor valor, coincidiendo con la presencia de células epiteliales de aspecto globoso que corresponderían a la diferenciación de neumocitos tipo II (AEC II), productores de surfactante pulmonar y con células planas compatibles con neumocitos tipo I (AEC I) relacionadas con el intercambio gaseoso. Desde

E19 en adelante, la actividad proliferativa, en estas células disminuyó considerablemente, coincidente con la diferenciación de estructuras pulmonares prefuncionales, lo que implica que la porción distal de los conductos respiratorios, que se ramificaron progresivamente en las edades anteriores, adquieren una forma sacular de paredes epiteliales delgadas estrechamente relacionados con vasos sanguíneos, compatibles con los futuros alvéolos. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos con Ki-67, otro marcador nuclear de proliferación celular utilizado por Maniscalco *et al.*, (2002), quienes señalaron que la proliferación de las células epiteliales en el pulmón es elevada en las primeras edades del desarrollo, la que disminuye durante las etapas más tardías de la gestación de la rata, mientras que la proliferación de las células endoteliales aumenta durante el último periodo. También, son consistentes con Morikawa *et al.*, (1999), quienes sostienen que las células PCNA positivas son más abundantes en el intersticio y en el epitelio de los espacios aéreos en E18 y E19 y además, sugieren que el periodo desde E20 a E21 es un tiempo crítico para el desarrollo del pulmón fetal y que a partir de E21 ocurre la diferenciación funcional del pulmón, lo que implica la especialización del epitelio de los futuros espacios aéreos. Nuestros resultados también son similares a lo observado por Stiles *et al.*, (2001), utilizando la técnica BrdU (5-bromo-2' deoxiuridina) que se incorpora al ADN de aquellas células que se encuentran en la fase S del ciclo celular quienes describen una disminución considerable de la proliferación celular en las últimas edades gestacionales de la rata.

La escasa actividad apoptótica cuantificada en esta memoria durante las distintas etapas del desarrollo pulmonar presentó dos ondas, la primera en E15 y la segunda en E20, edad donde se registra el valor más alto de inmunomarcación. La primera onda es coincidente con los resultados obtenidos en los estudios realizados por Stiles *et al.*, (2001), quienes también detectaron con la técnica de TUNEL una onda en E15. Sin embargo, la segunda onda que ellos describen fue antes (E18) que la observada por nosotros. Habría que considerar que estos autores sólo trabajaron a partir de E15, por lo que no reportan esta actividad celular en edades anteriores.

Las células que mostraron apoptosis en esta memoria correspondieron a células epiteliales de los conductos respiratorios y células del mesénquima, estando particularmente asociadas con el proceso de divisiones dicotómicas de los bronquios. El incremento de la apoptosis en células epiteliales y mesenquimáticas en el desarrollo,

coexiste con una activa proliferación celular pulmonar, lo que implicaría que la apoptosis es un mecanismo que contribuiría a la remodelación de las estructuras pulmonares, para permitir la actividad funcional en el recién nacido, con diferenciación de los dos tipos de células alveolares, como ya se mencionó. Esto es consistente con lo descrito en otros trabajos por Kresch *et al.* (1998), Nishino *et al.*, (1999) y Del Riccio *et al.*, (2004), en los que se discute que hay un equilibrio entre la proliferación celular y la apoptosis, lo que permitiría llevar a cabo la remodelación pulmonar logrando la formación de la arquitectura básica de los árboles bronquiales en las primeras etapas del desarrollo pulmonar, para posteriormente en E20, alcanzar la mayor área inmunomarcada tanto en AEC II y células mesenquimáticas, lo que se debería a una activa remodelación en las vías aéreas distales las que comienzan a segmentarse formando los sáculos terminales y el mesénquima se adelgaza, para permitir la aproximación de los capilares a las vías respiratorias, para que ocurra la futura hematosis que sucede en los alvéolos pulmonares. Este adelgazamiento observado en el mesénquima durante este periodo, puede ser relacionado con la muerte celular programada consistente con la gran proporción de células TUNEL positivas, observadas entre los días E17-E20 en los estudios realizados por Stiles *et al.*, (2001).

El desarrollo vascular pulmonar fue detectado a través de la inmunomarcación positiva para VEGF y fvW. En este trabajo fue posible detectar la expresión positiva de VEGF, en las células pulmonares epiteliales y mesenquimáticas, logrando identificar neovascularización en el mesénquima pulmonar distal en E12, mientras que Akeson *et al.*, (2003) en cultivo pulmonar, observaron este proceso en E10.5. La inmunomarcación para fvW, detectada en escasos vasos sanguíneos mediastínicos - entre los dos blastemas pulmonares- en E12 y la presencia, en E13, de pequeños vasos en el interior del esbozo muy cercanos a los vasos centrales, sugeriría la formación de una red vascular intrapulmonar, a través del proceso de angiogénesis, a partir de estos vasos mediastínicos. Estos eventos, son compatibles con los resultados obtenidos por Akeson *et al.*, (2003), quienes describen la primera formación vascular en el pulmón de ratón a partir de vasos mayores, pero a una edad más temprana (E11), en cultivo.

La diferencia en edades, en que se detectó inmunomarcación positiva para VEGF y fvW, se debería a que VEGF permite detectar hemangioblastos, mientras que el fvW

reacciona positivamente con células endoteliales ya diferenciadas, similar a lo observado por De Mello *et al.*, (1997) y Warburton *et al.*, (2000) en pulmón de ratón.

Es a partir de E16 donde se observa una marcada vascularización, lo que se debería a la diferenciación de una gran cantidad de capilares ubicados mayoritariamente en la periferia pulmonar, este aumento en el número de vasos sanguíneos y su ubicación coincide con lo observado por Bhatt *et al.*, (2000) y Warburton *et al.*, (2000). Investigaciones posteriores efectuadas por Stenmark y Gebb (2003), también señalan que existe un incremento en el número de células endoteliales que expresan fvW en el inicio de la etapa canalicular, conocida también como etapa vascular pulmonar.

En esta memoria, a partir de E17 el fvW reaccionó positivamente en todo el tejido pulmonar, sugiriendo que las redes vasculares central y periférica formadas por vasculogénesis y angiogénesis respectivamente, se fusionarían entre E16 y E17, originando el circuito vascular completo permitiendo la circulación pulmonar definitiva lo que es corroborado por lo planteado por Toloza (2005), pero difiere de lo planteado por Akeson *et al.*, (2003), quienes utilizando VEGF, describen esta fusión en edades anteriores (etapa pseudoglandular) en cultivos celulares. Los dos procesos involucrados en el desarrollo vascular pulmonar, vasculogénesis y angiogénesis descritos en esta memoria, son corroborados con lo informado por De Mello *et al.*, (1997) y Warburton *et al.*, (2000) quienes sugirieron que la formación de los vasos centrales es realizada por vasculogénesis, mientras que los vasos periféricos son formados por angiogénesis, logrando a través de ambos procesos, igualar el rápido crecimiento del árbol respiratorio hasta formar una completa red vascular al inicio de la etapa de sacos terminales. Sin embargo, nuestro estudio no coincide con la edad planteada posteriormente por De Mello y Reid, (2000) quienes describen esta unión de las dos redes en E13,5.

La reacción positiva para VEGF, a partir de E16 (etapa canalicular) en células fusiformes de disposición concéntrica, tanto en conductos respiratorios como en vasos sanguíneos en formación, correspondería a células musculares lisas, indicando maduración del árbol bronquial y de componentes vasculares. Estas células musculares, se diferencian a partir de células mesenquimáticas locales y el número de capas que se desarrollan alrededor de los vasos se incrementan en la medida que se diferencian a conductos mayores, indicando así, que la expresión de VEGF es fundamental para la diferenciación de estas

células, entre otros factores como TGF- β y PDGF. Akeson *et al.*, (2003), señalan que durante esta etapa, células musculares lisas se ensamblan alrededor de los grandes vasos sanguíneos y alrededor de los conductos respiratorios.

La vascularización pulmonar, detectada en las últimas edades de este estudio a través de la expresión de fvW al interior de los tabiques interalveolares, sugeriría la formación de pequeños capilares que se originarían a partir de la red vascular periférica, formando así la microvascularización alveolar coincidiendo con lo señalado por Toloza (2005) en *Mus musculus*. Esto es consistente con el considerable adelgazamiento de los tabiques interalveolares, observando un estrecho contacto entre las AECs y células endoteliales, similar a lo descrito por Morikawa *et al.*, (1999).

En las primeras edades en estudio, VEGF es expresado por células del epitelio bronquial, mientras que en etapas más tardías del desarrollo (E19 y E20) la mayor fuente de expresión de este factor fue en AEC II, células secretoras de surfactante, sustancia tensoactiva, que también presenta inmunomarcación positiva pero ya a partir de E17. Esto sugiere que VEGF sería necesario para la diferenciación de estas células alveolares, lo que es coincidente con lo observado por Bhatt *et al.*, (2000), para las mismas edades, tanto en epitelio bronquial, como alveolar.

La expresión de BMP-4, observada en las primeras etapas del desarrollo pulmonar en el epitelio de las vías respiratorias y en mesénquima adyacente es corroborado por los resultados obtenidos por Bellusci *et al.*, (1997a), quienes observaron que esta molécula, al igual que SHH es expresado en altas concentraciones en el epitelio de las vías respiratorias y en menor concentración en el mesénquima adyacente.

El aumento de la expresión de BMP-4 entre E12 y E13 coincide con una baja expresión de PCNA la cual aumenta rápidamente después de una brusca disminución en la inmunomarcación para BMP-4, situación similar a lo observado en E18, donde se obtiene el máximo registro para la actividad proliferativa y el menor valor de BMP-4. Esta disociación entre las curvas de ambas moléculas podría ser explicado por los roles intrínsecos de BMP-4, que se refieren a favorecer la diferenciación celular y disminuir la proliferación, coincidiendo nuestras observaciones con lo descrito por Groeneveld *et al.*, (2000). Esto es consistente con lo observado en E16 donde se aprecia la diferenciación de una gran cantidad de ramificaciones de los conductos respiratorios, correspondiendo al final

de la etapa canalicular e inicio de la etapa sacular, siendo coincidente con lo descrito por Del Riccio *et al.*, (2004). El proceso de ramificación de las vías respiratorias estaría regulado entre otros factores por BMP-4 de acuerdo con lo señalado por Warburton *et al.*, (2005), quienes postularon que esta proteína junto con otras moléculas regula la supresión localizada de la proliferación epitelial, proporcionando así una señal moduladora negativa en las señales de FGFs, que hacen que se detenga la extensión de los conductos y se instalen puntos de ramificaciones dicotómicas. También, Bellusci *et al.*, (1996), sugieren que BMP-4 juega un rol en el desarrollo pulmonar a través de potenciales interacciones con otras señales moleculares, regulando así, el crecimiento pulmonar embrionario y su diferenciación.

La considerable disminución de la proliferación epitelial y mesenquimática detectada con PCNA entre E19 y R.N y el aumento de la diferenciación de las estructuras respiratorias funcionales, coincide con un incremento en la expresión de BMP-4 como lo observado en edades anteriores, lo que nos permite concluir que BMP-4 inhibe la proliferación y aumenta la diferenciación de las células epiteliales de las vías respiratorias, concordando con lo descrito por Van Tuyl y Post (2000), referente a que el tipo de respuesta para BMP-4 dependería, por una parte, del tipo celular y por otra de la concentración de la molécula en las distintas etapas del desarrollo pulmonar.

La reacción PAS positiva observada en las membranas basales de los conductos respiratorios pequeños y de gran tamaño en todas las edades estudiadas y en la zona epitelial y mesénquima subyacente de los brotes respiratorios que están en etapa inicial de bifurcación, indicaría la necesidad de la interacción de moléculas y factores generados por ambos tejidos para permitir los mecanismos de proliferación, crecimiento y diferenciación celular, dando como resultado la división y progreso de conductos dicotómicos. Esto es consistente con lo descrito por otros autores (McGowan, 1992; Hilfer *et al.*, 1996; Parera *et al.*, 2005), que señalan que los componentes específicos de la membrana basal como: proteoglicanos, glucoproteínas (entactina y fibronectina), laminina y colágeno IV y VII juegan un rol dinámico como barrera y reservorio de factores de crecimiento y regulan la proliferación celular epitelial y mesenquimática.

La leve reacción PAS positiva en el borde luminal de los conductos respiratorios durante E13 a E16, para presentarse nuevamente en E19 y E20 podrían indicar dos fases de

diferenciación de células con capacidad secretora, que corresponderían a células caliciformes y AEC II funcionales, estas últimos en las edades más avanzadas, información no consignada en otros trabajos. La intensidad de la reacción de PAS observada en estas edades, que es coincidente con la amplitud de la curva de expresión de BMP-4, indicaría que en estas etapas se favorece la diferenciación celular disminuyendo la proliferación, lo que es corroborado por lo observado con PCNA cuya curva es inversa a BMP-4.

La funcionalidad de AEC II sería coincidente con la secreción de surfactante pulmonar, en el lumen de las vías respiratorias ya a partir de E17, así como el incremento de la intensidad de la reacción PAS positiva en R.N, en el interior de los alvéolos. El aumento del surfactante, en las últimas edades en estudio, sería similar a lo descrito en las vías aéreas humanas cuatro semanas antes del parto (Carlson, 2000). La presencia de componentes glicoproteicos sulfatados de esta sustancia tensoactiva pueden ser reconocidos por la reacción de Schiff (PAS) de acuerdo a los estudios realizados por Pantelidis *et al.*, (2002).

La etapa alveolar del desarrollo pulmonar concluye posterior al nacimiento (P30), según lo informado por Stiles *et al.*, (2001) y Del Riccio *et al.*, (2004). Aunque los cambios que ocurren durante los siguientes días de nacimiento no pudieron ser observados en este trabajo, se comprobó el aumento considerable del espacio aéreo con un notorio adelgazamiento de la pared alveolar, como consecuencia del ingreso de aire a los pulmones en el R.N.

Estimamos que nuestro modelo constituye un aporte que permite comprender mejor la complejidad del desarrollo pulmonar *in situ*, a través de cortes seriados de embriones de rata *Sprague dawley* de distintas edades, diferenciándolo de la mayoría de los trabajos los cuales utilizan métodos de cultivos y/o participación de moléculas y mecanismos del desarrollo por separado. En esta memoria se detectó, mediante métodos inmunohistoquímicos la expresión témporo-espacial de BMP-4, VEGF y fvW, de proliferación y apoptosis celular con anticuerpo PCNA y ensayo de TUNEL respectivamente, permitiendo observar las interacciones de las moléculas y su rol en los mecanismos que participan en este proceso, logrando tener una visión más completa e integral de la diferenciación de las estructuras pulmonares funcionales *in situ*, cambios que son consistentes con los valores obtenidos a través del análisis morfométrico computacional

VI. CONCLUSIONES.

1. En cortes seriados de embriones de rata de la cepa *Sprague dawley* se identificaron las siguientes etapas del desarrollo pulmonar entre E12 y RN:

- Etapa pseudoglandular entre los días 12-15 p.c
- Etapa canalicular entre los días 16-18 p.c
- Etapa sacular: 19-20 p.c
- Etapa alveolar 20p.c – RN

2. Las diferentes curvas de expresión de los anticuerpos específicos estudiados se relacionan estrechamente con la formación y diferenciación de las estructuras pulmonares, así se puede concluir que:

- Durante las primeras edades del desarrollo (E14) la curva de marcación para PCNA refleja la intensa actividad proliferativa que ocurre en células epiteliales y mesenquimáticas.

- Cuando disminuye PCNA, aumenta la expresión de BMP-4 coincidente con la diferenciación de células epiteliales y mesenquimáticas de las principales vías del sistema respiratorio.

- La actividad apoptótica, detectada con la técnica de TUNEL, en las etapas iniciales es escasa, mientras que en las finales adquiere un rol relevante relacionado con la remodelación pulmonar. Ésto permite además concluir, que el desarrollo es un proceso eficiente, generando células pluripotentes, que proliferan y son inducidas a diferenciarse a distintos tipo celulares específicos y sólo una pequeña cantidad de células sufren el proceso de apoptosis.

- La formación de la red vascular coincide con las curvas de VEGF y fvW, la que se establece mediante dos mecanismos:

- Vasculogénesis de los vasos extrapulmonares que ingresan al blastema, coincidiendo con la curva de VEGF-A y correspondería a la irrigación nutricia.

- Angiogénesis, por diferenciación de células endoteliales ubicadas en la periferia pulmonar, coincidiendo con la curva de fvW. Esta red capilar se encuentra en estrecho contacto con estructuras respiratorias.

- Ambas redes se fusionan en E17 para formar la red vascular definitiva visualizada con fvW.

3.- La integridad de la membrana basal, identificada con la técnica de PAS, tiene un rol relevante en la organización de los epitelios de las vías respiratorias y su degradación facilita la división dicotómica de las nuevas ramificaciones de los conductos.

4.- La técnica de PAS permitió identificar:

- En E15 la presencia de células caliciformes funcionales en el epitelio respiratorio y
- A partir de E17 la presencia de surfactante pulmonar secretado por las células epiteliales alveolares tipo II.

5.- La división de los dos esbozos pulmonares, a partir de un blastema, ocurre en E16 y la formación de la lobulación se inicia en E17 para terminar en E19 con la formación de 4 lobos en el pulmón derecho y uno en el izquierdo.

6.- El desarrollo del sistema respiratorio es un proceso complejo, dinámico y eficiente que implica la interacción epitelio-mesénquima, permitiendo la expresión de diferentes moléculas que participan, ya sea estimulando o inhibiendo diferentes mecanismos del desarrollo que culminan después del nacimiento.

VII. BIBLIOGRAFÍA.

- 1. Akeson, A. L.; Greenberg, J. M.; Cameron, J. E.; Thompson, F. Y.; Brooks, S. K.; Wiginton, D.; Whitsett, J. A.** 2003. Temporal and spatial regulation of VEGF-A controls vascular patterning in the embryonic lung. *Dev. Biol.* 264 (2): 443-455.
- 2. Barrios, G.; Del Portillo, H.; De los Ríos, M.; León, J.; Rodríguez, F.** 2000. Embriología y neoformación de vasos sanguíneos y célula endotelial. *Revista Endotelio y Ciencia.* 1 (4): 0124-0603.
- 3. Bellusci, S.; Henderson, R.; Winnier, G.; Oikawa, T.; Hogan, B. L. M.** 1996. Evidence from normal expression and targeted misexpression that Bone Morphogenetic Protein-4 (BMP-4) plays a role in mouse embryonic lung morphogenesis. *Development,* 122: 1693-1702.
- 4. Bellusci, S.; Furuta, Y.; Rush, M. G.; Henderson, R.; Winnier, G.; Hogan, B.** 1997. Involvement of Sonic Hedgehog (Shh) in mouse embryonic lung growth and morphogenesis. *Development,* 124: 53-63.
- 5. Bhatt, A.; Amin, S.; Chess, P.; Watkins, R.; Maniscalco, W.** 2000. Expression of vascular endothelial growth factor and Flk-1 in developing and glucocorticoid-treated mouse lung. *Pediatr. Res.* 47 (5): 606-613.
- 6. Blanco, F. L.; Gonzales-Reyes, J.; Banjul, L. F.; Ruiz de Galarreta, C. M.; Aguiar, J. Q.** 1998. Chemiluminescence-based detection of minute amounts of apoptotic DNA. *Biotechniques,* 24: 354-358.
- 7. Bruce, M. C.; Honaker, C. E.; Cross, R. J.** 1999. Lung fibroblast undergo apoptosis following alveolarization. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 20: 228-236.
- 8. Carlson, B. M.** 2000. Embriología humana y biología del desarrollo. 5ª edición. Editorial Harcovert, S.A. Madrid-España: pp. 344-352.
- 9. Costa, R.; Kalinichenko, V.; Lim, L.** 2001. Transcription factors in mouse lung development and function. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 280: L823-L838.
- 10. De Mello, D. E.; Sawyer, D.; Galván, N.; Reid, L. M.** 1997. Early fetal development of lung vasculature. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 16 (5): 568-581.
- 11. De Mello, D. E.; Reid, L. M.** 2000. Embryonic and early fetal development of human lung vasculature and its functional implications. *Pediatr. Dev. Pathol.* 3 : 439-449.

12. **De Paepe, M. E.; Rubin, L. P.; Jude, C.; Lesieur-Brooks, A. M. ; Mills, D. R. ; Luks, F. I.** 2000. Fas ligand expression coincides with alveolar cell apoptosis in late-gestation fetal lung development. *Am. J. Physiol.* 279: L967-L976.
13. **Del Riccio, V.; Van Tuyl, M.; Post, M.** 2004. Apoptosis in lung development and neonatal lung injury. *Pediatr. Res.* 55 (2): 183-189.
14. **Fine, A.; Janssen-Heininger, Y.; Soultanakis, R. P.; Swisher, S. G.; Uhal, B. D.** 2000. Apoptosis in lung pathophysiology. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 279: L423-L427.
15. **Groeneveld, E. H. J.; Burger, E. H.** 2000. Bone Morphogenetic Proteins in human bone regeneration. *Eur. J. Endocr.* 142: 9-21.
16. **Hilfer, J.; Chow, W. H.; Ducheine, Y.; Brandstetler, R. D.** 1996. Chronic pneumonia. Primary malignant non-Hodgkin's lymphoma of the lung arising in mucosa-associated lymphoid tissue. *Chemistry* 110: 838-840.
17. **Kresch, M. J.; Christian, C.; Lu, H.** 1998. Isolation and partial characterization of a receptor to surfactant protein A expressed by rat type II pneumocytes. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 19: 216-225.
18. **Liu, M.; Post, M.** 2000. Cellular responses to mechanical stress. Invited Review: Mechanochemical signal transduction in the fetal lung. *J. Appl. Physiol.* 89: 2078-2084.
19. **Liu, Y.; Jiang, H.; Crawford, H. C.; Hogan, B .L. M.** 2003. Role for ETS domain transcription factors Pea3/Erm in mouse lung development. *Dev. Biol.* 261: 10-24.
20. **López, M.; Leyton, C.; Graf, M.** 1985. *Técnicas de Histología y Citología*. Editado por Universidad de Chile, Facultad de Medicina. 2ª edición. Santiago-Chile: 242pp.
21. **Maga, G.; Hübscher, U.** 2003. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J. Cell Sci.* 116: 3051-3060.
22. **Maniscalco, W. M.; Watkins, R. H.; O'Reilly, M. A.; Shea, C. P.** 2002. Increased epithelial cell proliferation in very premature baboons with chronic lung disease. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 283: L991-L1001.
23. **Martin, T. R.; Hagimoto, N.; Nakamura, M.; Matute- Bello, G.** 2005. Apoptosis and epithelial injury in the lungs. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2: 214-220.
24. **McGowan, S. E.** 1992. Extracellular matrix and the regulation of lung development and repair. *FASEB J.* 6: 2895-2904.

- 25. Mollar, R.; Dziadek, M.** 1998. A correlation between epithelial proliferation rates, basement membrane component localization patterns, and morphogenetic potential in the embryonic mouse lung. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 19: 71-82.
- 26. Moore, K. I.** 1990. *Embriología Básica*. 3ª edición. Editorial Interamericana. Ciudad de México-México: pp. 173-179.
- 27. Morikawa, Y.; Fujii, K.; Okada, T.; Kiso, Y.; Sasaki, F.** 1999. Quantitative changes of lung tissue components during perinatal period in rats. *J. Vet. Med. Sci.* 61 (11): 1229-1233.
- 28. Nishino, H.; Nemoto, N.; Lu, W.; Sakurai, I.** 1999. Significance of apoptosis in morphogenesis of human lung development: light microscopic observation using in situ DNA end-labeling and ultrastructural study. *Med. Electron Microsc.* 32: 57-61.
- 29. Pantelidis, P.; Veeraraghavan, S.; du Bois, R. M.** 2002. Surfactant gene polymorphisms and interstitial lung diseases. *Respir. Res.* 3: 14-22.
- 30. Parera, M. C.; van Dooren, M.; van Kempen, M.; de Krijger, R.; Grosveld, F.; Tibboel, D.; Rottier, R.** 2005. Distal angiogenesis: a new concept for lung vascular morphogenesis. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 288: L141-L149.
- 31. Randal, J.; Fine, S.; Gordon, J.** 1993. A transgenic mouse for studying the lineage relationships and differentiation program of type II pneumocytes at various stages of lung development. *J. Biol. Chest.* 268 (13): 9762-9770.
- 32. Raoul, W.; Chailley-Heu, B.; Barlier-Mur, A. N.; Delacourt, C.; Maître, B.; Bourbon, J. R.** 2004. Effects of vascular endothelial growth factor on isolated fetal alveolar type II cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 286: L1293-L1301.
- 33. Ross, M. H.** 2004. *Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular*. 4ª edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Argentina. pp. 2-18.
- 34. Sanchez-Esteban, J.; Wang, Y. ; Cicchiello, L. ; Rubin, L.** 2002. Cyclic mechanical stretch inhibits cell proliferation and induces apoptosis in fetal rat lung fibroblast. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 282: L448-L456.
- 35. Scavo, L. M.; Ertsey, R.; Chapin, Ch. J.; Allen, L.; Kitterman, J. A.** 1998. Apoptosis in the development of rat and human fetal lungs. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 18: 21-31.

36. **Schittny, J. C.; Djonov, V.; Fine, A.; Burri, P. H.** 1998. Programmed cell death contributes to postnatal lung development. *Am. J. Respir. Cell Mol Biol.* 18: 786-793.
37. **Shu, W.; Jian, Q.; Lu, M. M.; Morrisey, E. E.** 2002. *Wnt7b* regulates mesenchymal proliferation and vascular development in the lung. *Development*, 129: 4831-4842.
38. **Stenmark, K. R.; Gebb, S. A.** 2003. Lung vascular development: breathing new life into an old problem. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 28: 133-137.
39. **Stevens, A.; Lowe, J.** 1998. *Histología Humana*. 2ª edición. Editorial Harcourt Brace. . Madrid-España. pp. 159-175.
40. **Stiles, A. D.; Chrysis, D.; Jarvis, H. W.; Brighton, B.; Moats-Staats, B.M.** 2001. Programed cell death in normal fetal rat lung development. *Exp. Lung Res.* 27: 569-587.
41. **Tolozá, J.** 2005. Determinación témporo-espacial de la expresión de laminina, actina y Factor de von Willebrand en el desarrollo pulmonar de *Mus musculus*. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 67 pp.
42. **Van Tuyl, M.; Post, M.** 2000. From fruitflies to mammals: mechanisms of signalling via the Sonic hedgehog pathway in lung development. *Resp. Res.* 1: 30-35.
43. **Warburton, D.; Schwarz, M.; Tefft, D.; Flores-Delgado, G.; Anderson, K. D.; Cardoso, W. V.** 2000. The molecular basis of lung morphogenesis. *Mech. Dev.* 92 (1): 55-81.
44. **Warburton, D.; Bellusci, S.; De Langhe, S.; Del Moral, P. M.; Fleury, V.; Mailleux, A.; Tefft, D.; Unbekandt, M.; Wang, K. ; Shi, W.** 2005. Molecular mechanism of early lung specification and branching morphogenesis. *Pediatr. Res.* 57: 26R-37R.

VIII. ANEXOS.

ANEXO 1: Silanización de portaobjetos.

1. Limpiar los portaobjetos con solución alcohol-clorhídrico (etanol de 95% con 0.5% de HCl) y secar con papel absorbente.
2. Enjuagar con acetona p.a. por un min.
3. Sumergir los portaobjetos en solución de 3-aminopropyltriethoxysilane al 2% en acetona p.a. durante 3 min.
4. Enjuagar en acetona p.a. por 15 seg.
5. Secar rápidamente utilizando aire caliente.
6. Dejar secar durante una hora a 60°C o toda la noche a temperatura ambiente, en canastillo o caja. Durante el secado, los portaobjetos deben permanecer separados entre sí.

ANEXO 2: Protocolo para detección inmunohistoquímica de apoptosis.

1. Desparafinar cortes histológicos.
 - Sumergir las muestras en xiloles y luego en alcoholes de concentraciones decrecientes (100%-95%-70%).
 - Lavado en PBS.
2. Recuperación de inmunoreactividad.
 - Aplicar Proteinasa K a cada corte por 15 minutos a temperatura ambiente.
 - Lavado en agua destilada.
3. Agregar H₂O₂ al 3% enPBS, durante 5 minutos a temperatura ambiente.
 - Lavado en agua destilada.
 - Lavado con PBS.
4. Aplicar Tampón Equilibrante.
 - Aspirar el exceso de líquido que se encuentra sobre el corte.
 - Aplicar inmediatamente 75 µl de buffer equilibrante directamente en cada corte.
 - Incubar por 10 seg. a temperatura ambiente.
6. Aplicar Enzima TdT.
 - Aspirar el exceso de líquido que se encuentra sobre el corte.

- Aplicar inmediatamente Working Strength TdT Enzyme.
 - Incubar en cámara húmeda a 37°C por 1 h.
7. Aplicar Stop/Wash Buffer.
- Aplicar Working Strength Stop/Wash Buffer, agitar por 15 seg. e incubar por 10 min. a temperatura ambiente.
 - Preparar la Anti-Digoxigenin Peroxidase Conjugate y dejarla a temperatura ambiente.
8. Aplicar el conjugado Anti-Digoxigenina.
- Lavar con PBS.
 - Aspirar el exceso de líquido que se encuentra sobre el corte.
 - Aplicar a temperatura ambiente el conjugado Anti-Digoxigenin hasta que cubra completamente el corte.
 - Incubar en cámara húmeda por 30 min. a temperatura ambiente.
9. Lavado en PBS.
- Mientras se realizan los lavados, preparar Working Strength Peroxidase Substrate.
10. Revelado en Peroxidase Substrate.
- Aspirar el exceso de líquido que se encuentra sobre el corte.
 - Aplicar Peroxidase Substrate hasta cubrir completamente el corte.
 - Dejar actuar por 3 a 6 min.
11. Lavado en agua destilada.
12. Contratación con hematoxilina.
- Sumergir 1 seg. en hematoxilina.
 - Lavar en agua corriente.
 - Sumergir en carbonato de litio durante 2 min.
 - Lavado en agua corriente.
13. Deshidratar, aclarar y montar:
- Deshidratar en alcoholes de 96% (1 lavado) y de 100% (3 lavados) por 5 min. cada uno.
 - Montar cubreobjeto con un medio de montaje (Flotex®).

ANEXO 3: Protocolo inmunohistoquímico para PCNA.

1. Desparafinar cortes histológicos.
 - Sumergir las muestras en xiloles y luego en alcoholes de concentraciones decrecientes (100%-95%-70%).
 - Lavado en agua destilada.
2. Recuperación de inmunoreactividad con calor en microondas:
 - Colocar las muestras en tampón citrato en compartimiento interno de vaso de recuperación y rellenar con agua destilada el compartimiento externo.
 - Irradiar en horno microonda a máxima potencia hasta alcanzar 92-94°C.
 - Mantener la temperatura durante 10-20 min. (meter y sacar por 5 min.) usando la mínima potencia de irradiación del horno.
 - Dejar reposar a temperatura ambiente durante 30 min.
 - Lavado en agua destilada.
3. Bloqueo de peroxidasa endógena.
 - Agregar H₂O₂ al 3% en agua destilada, durante 10 min. a temperatura ambiente.
 - Lavado en agua destilada.
 - Lavado con PBS.
4. Bloqueo de proteínas:
 - Agregar BSA al 2% en PBS durante 10 min.
5. Incubación con Acm Mouse anti-PCNA humano, diluido 1:1500 en PBS más BSA, durante toda la noche a 4°C.
6. Lavado con PBS.
7. Incubación con anticuerpo secundario.
 - Anticuerpo biotinilado de conejo anti- inmunoglobulina de ratón (DAKO E 0354, Dinamarca) diluido 1:200 en PBS más BSA, durante 60 min. a temperatura ambiente.
8. Lavado con PBS.
9. Incubación con conjugado Estreptavidina/Peroxidasa (DAKO P0397, Dinamarca) diluido 1:200 en PBS más BSA durante 60 min. a temperatura ambiente.
10. Lavado con PBS.
11. Revelado con DAB (DAKO K3465, USA) durante 3 a 5 min.

12. Lavado con PBS.
13. Contraintinción con Hematoxilina:
 - Sumergir 1 seg. en Hematoxilina.
 - Lavar con agua corriente.
 - Sumergir en carbonato de litio durante 2 min.
 - Lavado en agua corriente.
14. Deshidratar, aclarar y montar:
 - Deshidratar en alcoholes de 96% (1 lavado) y de 100% (3 lavados) por 5 min. cada uno.
 - Montar cubreobjeto con un medio de montaje (Flotex®).

ANEXO 4: Protocolo inmunohistoquímico para detección de células endoteliales:

1. Desparafinar cortes histológicos.
 - Sumergir las muestras en xiloles y luego en alcoholes de concentraciones decrecientes (100%-95%-70%).
 - Lavado en agua destilada.
2. Recuperación de inmunoreactividad.
 - Aplicar Proteinasa K a cada corte por 15 min. a temperatura ambiente.
 - Lavado en agua destilada.
3. Bloqueo de peroxidasa endógena.
 - Agregar H₂O₂ al 3% en agua destilada, durante 10 min. a temperatura ambiente.
 - Lavado en agua destilada.
 - Lavado con PBS.
4. Bloqueo de proteínas:
 - Agregar BSA al 2% en PBS durante 10 min.
5. a) Incubación con Acm anti-VEGF-A: para determinar la inmunomarcación más adecuada se ensayaron las siguientes concentraciones: 1:20, 1:50, 1:100, diluido en PBS más BSA, durante toda la noche a 4°C.
- b) Incubación con Ac policlonal anti-fvW: para determinar la inmunomarcación más adecuada se ensayaron las siguientes concentraciones: 1:1000, 1:1500, 1:2000, diluido en PBS más BSA, durante toda la noche a 4°C.

6. Lavado con PBS.
7. Incubación con anticuerpo secundario.
 - Para los anticuerpos monoclonales se utilizó: Anticuerpo biotinilado de conejo anti-inmunoglobulina de ratón (DAKO Code No E0354, Dinamarca), diluido 1:200 en PBS más BSA, durante 60 min. a temperatura ambiente.
 - Para el anticuerpo policlonal se usó: Anticuerpo biotinilado de cerdo anti-inmunoglobulina de conejo (DAKO Code No E0353, Dinamarca), diluido 1:200 en PBS más BSA, durante 60 min. a temperatura ambiente.
8. Lavado con PBS.
9. Incubación con conjugado Estreptavidina/Peroxidasa (DAKO P0397, Dinamarca), diluido 1:200 en PBS más BSA durante 60 min. a temperatura ambiente.
10. Lavado con PBS.
11. Revelado con DAB (DAKO K3465, USA) durante 3 a 5 min.
12. Lavado con PBS.
13. Contratación con Hematoxilina:
 - Sumergir 1 seg. en Hematoxilina.
 - Lavar con agua corriente.
 - Sumergir en carbonato de litio durante 2 min.
 - Lavado en agua corriente.
14. Deshidratar, aclarar y montar:
 - Deshidratar en alcoholes de 96% (1 lavado) y de 100% (3 lavados) por 5 min. cada uno.
 - Montar cubreobjeto con un medio de montaje (Flotex®).

ANEXO 5: Protocolo inmunohistoquímico para BMP-4.

1. Desparafinar cortes histológicos.
 - Sumergir las muestras en xiloles y luego en alcoholes de concentraciones decrecientes (100%-95%-70%).
 - Lavado en agua destilada.
2. Recuperación de inmunoreactividad.

- Aplicar Proteínasa K a cada corte por 15 min. a temperatura ambiente.
- Lavado en agua destilada.
- 3. Bloqueo de peroxidasa endógena.
 - Agregar H₂O₂ al 3% en agua destilada, durante 10 min. a temperatura ambiente.
 - Lavado en agua destilada.
 - Lavado con PBS.
- 4. Bloqueo de proteínas:
 - Agregar BSA al 2% en PBS durante 10 min.
- 5. Incubación con anticuerpo primario anti BMP-4: para determinar la inmunomarcación más adecuada se ensayaron las siguientes concentraciones: 1:10, 1:20, 1:50, diluido en PBS más BSA, durante toda la noche a 4°C.
- 6. Lavado con PBS.
- 7. Incubación con anticuerpo secundario.
 - Anticuerpo biotinilado de conejo anti- inmunoglobulina de ratón (DAKO E 0354, Dinamarca), diluido 1:200 en PBS más BSA, durante 60 min. a temperatura ambiente.
- 8. Lavado con PBS.
- 9. Incubación con conjugado Estreptavidina/Peroxidasa (DAKO P0397, Dinamarca), diluido 1:200 en PBS más BSA durante 60 min. a temperatura ambiente.
- 10. Lavado con PBS.
- 11. Revelado con DAB (DAKO K3465, USA) durante 3 a 5 min.
- 12. Lavado con PBS.
- 13. Contratinción con Hematoxilina:
 - Sumergir 1 seg. en Hematoxilina.
 - Lavar con agua corriente.
 - Sumergir en carbonato de litio durante 2 min.
 - Lavado en agua corriente.
- 14. Deshidratar, aclarar y montar:
 - Deshidratar en alcoholes de 96% (1 lavado) y de 100% (3 lavados) por 5 min. cada uno.
 - Montar cubreobjeto con un medio de montaje (Flotex®).