



**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE
GRAN CANARIA**

INSTITUTO UNIVERSITARIO DE
SANIDAD Y SEGURIDAD
ALIMENTARIA

PROGRAMA DE DOCTORADO: SANIDAD ANIMAL

TÍTULO DE LA TESIS

***“VALORACIÓN DEL TRATAMIENTO CON SELLANTES BIOLÓGICOS Y
TERAPIA CELULAR EN LA PREVENCIÓN DE LA FÍSTULA
BRONCOPEURAL EN UN MODELO EXPERIMENTAL IN VIVO”***

Tesis Doctoral presentada por:

D. PEDRO ROLANDO LLONTOP SANTISTEBAN

Dirigida por los doctores:

Dr. Norberto Santana Rodríguez.

Dr. Leandro Fernández Pérez.

Dr. Bernardino Clavo Varas.

El Director,

(firma)

El Director,

(firma)

El Director,

(firma)

El Doctorando,

(firma)

Las Palmas de Gran Canaria a, 14 de Mayo de 2010

*Con todo el sentimiento de amor
más puro que puede brotar de
mi ser... para mi querida
familia:*

*Pedro, Elsa, Maricelly,
Fernando, César, Annie, Primi,
Lela y Esther.*

*"La llave del éxito en la vida es el conocimiento del valor de las cosas".
O'Reilly.*

Anexo I

D^a BEGOÑA ACOSTA HERNÁNDEZ, SECRETARIA DEL INSTITUTO UNIVERSITARIO DE SANIDAD ANIMAL Y SEGURIDAD ALIMENTARIA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA,

CERTIFICA,

Que el Consejo de Doctores del Departamento en su sesión de fecha 29 de abril tomó el acuerdo de dar el consentimiento para su tramitación, a la tesis doctoral titulada: "VALORACIÓN DEL TRATAMIENTO CON SELLANTES BIOLÓGICOS Y TERAPIA CELULAR EN LA PREVENCIÓN DE LA FÍSTULA BRONCOPLEURAL EN UN MODELO EXPERIMENTAL EN VIVO" presentada por el doctorando D. Pedro Llontop Santisteban y dirigida por el Doctor D. Norberto Santana Rodríguez y codirigida por el Dr. D. Leandro Fernández Pérez y el Dr. D. Bernardino Clavo Varas.

Y para que así conste, y a efectos de lo previsto en el Artº 73.2 del Reglamento de Estudios de Doctorado de esta Universidad, firmo la presente en Las Palmas de Gran Canaria, a veintinueve de abril de dos mil diez.





Anexo II

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

Departamento: Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria

Programa de Doctorado: Sanidad Animal

Título de la Tesis

“VALORACIÓN DEL TRATAMIENTO CON SELLANTES BIOLÓGICOS Y TERAPIA CELULAR EN LA PREVENCIÓN DE LA FÍSTULA BRONCOPLEURAL EN UN MODELO EXPERIMENTAL EN VIVO”

Tesis Doctoral presentada por **D. Pedro Llontop Santisteban**

Dirigida por el **Doctor D. Norberto Santana Rodríguez** y codirigida por el **Dr. D. Leandro Fernández Pérez y Bernardino Clavo Varas.**

El/la Director/a,

Coodirectores

El/la Doctorando/a,

Las Palmas de Gran Canaria, a 29 de abril de 2010



Servicio
Canario de la Salud

HOSPITAL UNIVERSITARIO DE
GRAN CANARIA DOCTOR NEGRÍN



NORBERTO SANTANA RODRÍGUEZ, DOCTOR EN MEDICINA CON INTENSIFICACIÓN PARA LA ACTIVIDAD INVESTIGADORA EN EL SISTEMA NACIONAL DE SALUD DEL MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO, INSTITUTO DE SALUD CARLOS III.

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado **“Valoración del tratamiento con sellantes biológicos y terapia celular en la prevención de la fístula broncopleurales en un modelo experimental in vivo”** ha sido realizado por **D. PEDRO ROLANDO LLONTOP SANTISTEBAN**, en la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín y en el Laboratorio de Farmacología de la Universidad de las Palmas de Gran Canaria, bajo mi dirección y asesoramiento, una vez revisada la presente memoria la encuentro apta para su defensa como Tesis Doctoral, para optar al grado de doctor.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos extendiendo el presente certificado, en Las Palmas de Gran Canaria a siete de abril de dos mil diez.

Fdo.: Norberto Santana Rodríguez



Servicio
Canario de la Salud

HOSPITAL UNIVERSITARIO DE
GRAN CANARIA DOCTOR NEGRÍN



BERNARDINO CLAVO VARAS, DOCTOR EN MEDICINA CON INTENSIFICACIÓN PARA LA ACTIVIDAD INVESTIGADORA EN EL SISTEMA NACIONAL DE SALUD DEL MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO, INSTITUTO DE SALUD CARLOS III.

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado **“Valoración del tratamiento con sellantes biológicos y terapia celular en la prevención de la fístula broncopleurales en un modelo experimental in vivo”** ha sido realizado por **D. PEDRO ROLANDO LLONTOP SANTISTEBAN**, en la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín y en el Laboratorio de Farmacología de la Universidad de las Palmas de Gran Canaria, bajo mi dirección y asesoramiento, una vez revisada la presente memoria la encuentro apta para su defensa como Tesis Doctoral, para optar al grado de doctor.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos extendiendo el presente certificado, en Las Palmas de Gran Canaria a siete de abril de dos mil diez.

Fdo.: **Bernardino Clavo Varas**

**LEANDRO FRANCISCO FERNÁNDEZ PÉREZ, PROFESOR TITULAR DE LA
UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA.**

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado **“Valoración del tratamiento con sellantes biológicos y terapia celular en la prevención de la fístula broncopleurales en un modelo experimental in vivo”** ha sido realizado por **D. PEDRO ROLANDO LLONTOP SANTISTEBAN**, en la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín y en el Laboratorio de Farmacología de la Universidad de las Palmas de Gran Canaria, bajo mi dirección y asesoramiento, una vez revisada la presente memoria la encuentro apta para su defensa como Tesis Doctoral, para optar al grado de doctor.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos extendiendo el presente certificado, en Las Palmas de Gran Canaria a siete de abril de dos mil diez.



Fdo.: **Leandro Francisco Fernández Pérez**

AGRADECIMIENTOS

Hacer una Tesis Doctoral es sumergirse en un aventura llena de vicisitudes, donde se mezclan un sinfín de experiencias que nos llevan a conocer y a pasar, al mismo tiempo, de la desesperación a la alegría, del error a la verdad y del desánimo a la esperanza. Esto requiere dedicación, constancia, tenacidad y sobre todo un gran esfuerzo para confiar en uno mismo. Creo sinceramente que, sin todo el apoyo que he recibido no hubiera podido superar los muchos obstáculos que se me han presentado, y ahora no estaría escribiendo estas líneas de agradecimientos.

A mi director de Tesis, el *Dr. Norberto Santana*, no sólo le agradezco su apoyo tanto científico como moral, sino también, servirme de guía a la hora de orientar mi carrera científica, que espero sólo acabe de empezar. Siguen en mí esas palabras que se “grabaron a fuego” en las profundas fibras de mi corazón: “¡los amigos de mis amigos, son mis amigos!” fueron las primeras palabras en escuchar antes de conocerte en persona. Gracias Norbe, por ayudarme a conseguir una beca, por acompañarme a Extranjería, pero sobre todo, por ser amigo y uno de los responsables de que haya terminado ésta Tesis.

A mis directores de Tesis, *Dr. Leandro Fernández* y *Dr. Bernardino Clavo* por su gran calidad científica y profesional, por su apoyo, confianza, enseñanza y por haber contribuido con su esfuerzo y trabajo para que ésta Tesis se haya hecho realidad.

A la *Dra. M^a Dolores Fiuza*, no sólo por sus sabios consejos sino también por su dedicación y apoyo incondicional en la parte estadística. Siempre, ese primer saludo al entrar a la Unidad de Investigación, lo llevaré impreso en mi mente y en mi corazón. Desde estas líneas le digo ¡muchas gracias por todo!.

Un agradecimiento muy especial también para el *Dr. Rafael Camacho* por su dedicación incondicional y aporte importantísimo en la valoración de la parte histológica; y a *Lourdes Ramírez* por su siempre disposición a colaborar con el grupo de Cirugía Experimental y en especial en esta Tesis.

A *Ardiel Quintana*, *Patricia Martín* y *Yanira Brito* por todo su esfuerzo y apoyo en el laboratorio con la parte genómica, motivándome de esta forma a seguir adelante.

Al *Dr. Alfredo Santana* por sus opiniones y consejos, así también por su colaboración en la parte de células madre; y al *Dr. José Luis Martín*, por su enseñanza en el bienestar animal y ayuda en el quirófano.

Al *Dr. José Carlos Rodríguez*, por permitirme realizar esta Tesis Doctoral en las instalaciones de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín.

Al artífice y mediador de mi estancia en esta hermosa isla, el *Dr. José A. Ibancovich*, que estuvo conmigo en el momento propicio para indicarme una puerta, que se abría en el camino de mi vida.

Mis agradecimientos también van dirigidos a mis compañeros y amigos de la unidad de investigación con los que he compartido excelentes momentos de trabajo, cafés y sano esparcimiento: *Yanira Brito, Patricia Martín, Yeray Gonzales, Ricardo García, Keyla Zerecero, Nisa Buset, Esther Chapinal, Ardiel Quintana*, todos ellos han permitido que sea más agradable el trabajo diario y sean mi “pequeña familia”. Otros compañeros como: *Inma, Ramoni, Yoli, Alejandro, Clara, Octavio, Raquel, Rubén, Elisa, Osmel, José Manuel, Ana, Milena, Ángela, Rosa, Charline, Arantzazu, Ainara, Fran, Yaridé, Erika, Lidia...* merecen también mi agradecimiento por sonreír los lunes, por hablar los martes, por saludar los miércoles, por ayudarme los jueves, por reír conmigo los viernes o, simplemente, por desearme un buen fin de semana.

A *Juan Verona* y *Ramón Saavedra* del departamento de Ilustración por su aportación en el diseño de la portada y presentación de la Tesis.

A mis profesores y compañeros de la facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo de Lambayeque-Perú.

No puedo olvidar de agradecer a *Marcia Torres, Juan Vera, Laura Fernández*, por su apoyo en el día a día de todo éste tiempo. Así también darme ánimos en los momentos más difíciles.

Finalmente, mi más cariñoso y sincero agradecimiento va dirigido a mis padres *Pedro* y *Elsa*, mis hermanos *César, Fernando*, a *Annie*. A mi hermana *Maricelly* por animarme y ayudarme a cumplir un sueño y ser la gran responsable de iniciar este objetivo. A mi familia más próxima que siempre han sido mis mayores fans pero sobre todo, los pilares de mi vida. A mis padres, porque desde pequeño han apoyado mis decisiones y han confiado muchísimo, más que yo, en mí. Gracias “*Primi*” y “*Lela*”, de ustedes he aprendido el valor del esfuerzo y trabajo, así como el afán de la autosuperación. Además, he recibido mucho amor y cariño, lo que me ha convertido en la persona que soy. Por todo ello, muchas gracias... Los quiero mucho!

Pedro R. Llontop Santisteban

RESUMEN

En la actualidad, la fístula broncopleural (FBP) continúa siendo una temible complicación postquirúrgica, a pesar de los avances experimentados en los cuidados perioperatorios y postoperatorios, así como de las técnicas quirúrgicas empleadas en Cirugía Torácica. Las FBP postquirúrgicas son una de las causas que originan más reingresos hospitalarios, tienen una alta mortalidad perioperatoria y comprometen de una forma seria la vida del paciente. A pesar de que en la práctica clínica y de forma preventiva, los cirujanos realizan coberturas del muñón bronquial para protegerlo de la isquemia y la necrosis con pleura, grasa pericárdica, colgajos musculares y algunos sellantes biológicos de uso comercial, ninguno de los tratamientos ha demostrado ser óptimo y eficaz para prevenir la FBP.

En este sentido, se ha desarrollado la presente Tesis Doctoral en la que nos propusimos valorar en ratas Sprague-Dawley (n=...), la capacidad de cicatrización del muñón bronquial tras una neumonectomía, mediante la aplicación local de un sellante de fibrina (Tissucol®), plasma autólogo (PPP) y el trasplante de células madre (ADSC), directo o vehiculizado con Tissucol®, con la finalidad de prevenir la aparición de la FBP.

Los resultados histológicos demostraron que el tratamiento con Tissucol® induce la aparición precoz de necrosis por lo que es el menos apropiado para prevenir la aparición de FBP. En cambio, el PPP autólogo protege al muñón bronquial de la aparición de necrosis, lo que unido a su fácil obtención, aplicación, bajo coste y escaso riesgo, le confiere las características adecuadas para ser valorado en humanos. La concentración de Igf-1 en el PPP autólogo y su nivel de expresión en el muñón bronquial indican que probablemente este factor de crecimiento está implicado en sus beneficiosos efectos.

El tratamiento con ADSC y ADSC+Tissucol® disminuye la presencia de necrosis y ulceraciones en el muñón bronquial, protegiéndolo de la FBP. La adhesividad tisular, capacidad de proliferación y diferenciación de las ADSC permiten su aplicación directa sobre el muñón bronquial, incluso en una gran cavidad como la de neumonectomía sin restarle eficacia. Sus propiedades intrínsecas de reparación de los tejidos revierten los efectos del Tissucol® y lo convierten en una combinación efectiva. El tratamiento con ADSC induce significativamente cambios en la expresión de Col2a1, TgfB1, Agc-1 y Sox 6 en el muñón bronquial. Muchos de estos genes están íntimamente relacionados con los procesos biológicos de reparación y podrían participar en la migración, proliferación y diferenciación de las ADSC en el tejido conectivo del muñón bronquial. La dificultad tecnológica y el coste económico que conlleva el trasplante de ADSC hace que su uso traslacional en la actualidad esté más restringido que el del PPP.

Estos conocimientos podrían ayudar a entender mejor la fisiopatología de la cicatrización y remodelado del muñón bronquial tras una resección pulmonar y sentar unas bases más sólidas que permitan desarrollar estrategias terapéuticas específicas y

preventivas de la FBP que, en última instancia y siguiendo el carácter carácter traslacional, ayuden a mejorar la esperanza de vida de los pacientes sometidos a una resección pulmonar.

INDICE

ÍNDICE DE CONTENIDO

| | |
|--|------------|
| ÍNDICE DE TABLAS | V |
| ÍNDICE DE FIGURAS | VII |
| ABREVIATURAS | IX |
| <hr/> | |
| I.-INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.- EL APARATO RESPIRATORIO | 1 |
| 1.1- Anatomía del bronquio | 1 |
| 1.2- Histología del bronquio | 2 |
| 1.3.- Irrigación del bronquio | 4 |
| 1.4.- Daño y respuesta bronquial | 4 |
| 2.- FÍSTULA BRONCOPLEURAL | 9 |
| 2.1.- Definición, etiología, factores de riesgo e incidencia | 9 |
| 2.1.1.- Definición | 9 |
| 2.1.2.- Etiología | 10 |
| 2.1.3.- Factores de riesgo | 12 |
| 2.1.3.1.- Los factores de riesgo preoperatorios | 13 |
| 2.1.3.2.- Los factores de riesgo intraoperatorios | 14 |
| 2.1.3.3.- Los factores de riesgo postoperatorios | 14 |
| 2.1.4.- Incidencia | 15 |
| 2.2.- Manifestaciones clínicas | 16 |
| 2.2.1.- Forma aguda o precoz | 16 |
| 2.2.2.- Forma subaguda o intermedia | 16 |
| 2.2.3.- Forma crónica o tardía | 16 |
| 2.3.- Prevención | 17 |
| 2.4.- Diagnóstico | 17 |
| 2.5.- Pronóstico | 19 |
| 2.6.- Tratamiento | 19 |
| 2.6.1.- Orientación inicial | 19 |
| 2.6.2.- Broncoscopia, sustancias sellantes y ocluyentes | 20 |
| 2.6.3.- Ventana torácica y drenaje | 21 |



| | |
|--|-----------|
| 2.6.4.- Colgajos musculares y epiplon | 22 |
| 3.- PLASMA RICO EN FACTORES DE CRECIMIENTO | 25 |
| 3.1.- Las plaquetas | 26 |
| 3.2.- Desventajas del uso de PRFC | 29 |
| 4.- FACTORES DE CRECIMIENTO CELULAR | 29 |
| 4.1.- Definición | 29 |
| 4.2.- Síntesis | 30 |
| 4.3.- Mecanismo de acción | 30 |
| 4.4.- Funciones | 32 |
| 4.5.- Clasificación y tipos | 33 |
| 4.6.- Otras proteínas relacionadas con la reparación tisular | 33 |
| 4.6.1.- Colágeno | 33 |
| 5.- LAS CÉLULAS MADRE | 34 |
| 5.1.- Tipos de células madre | 35 |
| 5.1.1.- Células madre embrionarias | 36 |
| 5.1.2.- Células madre adultas | 36 |
| 5.1.2.1.- Fuentes de obtención de CM adultas | 37 |
| 5.1.2.2.- Mecanismo de diferenciación de las células madre adultas | 37 |
| 6.- LA BIOLOGÍA MOLECULAR EN EL ESTUDIO BRONQUIAL | 39 |
| 6.1.- Regulación de la expresión génica | 39 |
| 6.2.- PCR y PCR cuantitativa en tiempo real | 41 |
| II.-JUSTIFICACIÓN | 45 |
| III.-OBJETIVOS | 49 |
| IV.-MATERIAL Y MÉTODO | 53 |
| 1.-MATERIAL | 53 |
| 1.1.-Animales de experimentación | 53 |
| 1.2.-Salas, equipos y material inventariable | 54 |
| 1.3.-Material quirúrgico | 55 |
| 1.4.-Medicación anestésica y analgésica | 55 |
| 1.5.- Material utilizado para las mediciones | 55 |
| 2.-MÉTODO | 56 |
| 2.1.-Diseño | 56 |



| | |
|---|-----------|
| 2.2.-Técnica quirúrgica | 57 |
| 2.3.- Cuidados postoperatorios | 62 |
| 2.4.- Tratamientos sellantes del muñón bronquial | 63 |
| 2.4.1.- Obtención del PPP autólogo | 63 |
| 2.4.2.- Obtención de CM derivadas del tejido adiposo | 65 |
| 2.4.3.- Trasplante de ADSC | 65 |
| 2.5.- Obtención y recogida de las muestras | 66 |
| 2.6.- Mediciones | 67 |
| 2.6.1.- Evolución clínica del período postoperatorio | 67 |
| 2.6.2.- Determinaciones histológicas | 67 |
| 2.6.2.1.- Procesamiento de las muestras | 67 |
| 2.6.2.2.- Lectura de las muestras | 68 |
| 2.6.3.- Determinación de la expresión genómica | 69 |
| 2.6.3.1.- Extracción de ARN y síntesis de cADN | 69 |
| 2.6.3.2.- Determinación de la expresión genómica mediante qRT-PCR | 70 |
| 2.7.- Análisis Estadísticos | 72 |
| V.-RESULTADOS | 75 |
| 1.- Evolución clínica del período postoperatorio | 75 |
| 2.- Determinaciones histológicas | 75 |
| 2.1.- Influencia del tratamiento local sobre el muñón bronquial | 75 |
| 2.2.- Influencia del tratamiento con Tissucol® | 80 |
| 2.3.- Influencia del tratamiento con PPP autólogo | 84 |
| 2.4.- Influencia del tratamiento con ADSC | 89 |
| 2.5.- Influencia del tratamiento combinado con ADSC+Tissucol® | 93 |
| 3.- Análisis de los cambios en la expresión de genes | 100 |
| 3.1.- Colágeno 2a1 | 100 |
| 3.2.- Ctgf | 101 |
| 3.3.- Sox 6 | 102 |
| 3.4.- Tgfβ-1 | 103 |
| 3.5.- Vegfa | 104 |
| 3.6.- Igf-1 | 105 |
| 3.7.- Agc-1 | 106 |



| | |
|---------------------------------|------------|
| VI.-DISCUSIÓN | 109 |
| VII.-CONCLUSIONES | 119 |
| VIII.-BIBLIOGRAFÍA | 125 |



ÍNDICE DE TABLAS

INTRODUCCIÓN

| | | |
|-------------------|---|----|
| Tabla I. | Etiología asociada con la aparición de FBP | 11 |
| Tabla II. | Clasificación de la FBP | 12 |
| Tabla III. | Factores de riesgo en la dehiscencia del muñón bronquial. Factores preoperatorios | 13 |
| Tabla IV. | Factores de riesgo en la dehiscencia del muñón bronquial. Factores intraoperatorios | 14 |
| Tabla V. | Factores de riesgo en la dehiscencia del muñón bronquial. Factores postoperatorios | 14 |
| Tabla VI. | Principales constituyentes de los orgánulos plaquetarios y actividades | 28 |
| Tabla VII. | Familia de factores de crecimiento | 33 |

MATERIAL Y MÉTODO

| | | |
|--------------------|--|----|
| Tabla VIII. | Diseño de los grupos para el estudio histológico | 56 |
| Tabla IX. | Diseño de los grupos para el estudio genómico | 57 |
| Tabla X. | Genes y condiciones de la PCR en tiempo real | 71 |

RESULTADOS

| | | |
|---------------------|---|-----|
| Tabla XI | Número de muertes en los grupos | 75 |
| Tabla XII. | Hallazgos microscópicos de la mucosa y submucosa bronquial | 76 |
| Tabla XIII. | Hallazgos microscópicos de la pared bronquial | 78 |
| Tabla XIV. | Hallazgos microscópicos de la pleura peribronquial | 79 |
| Tabla XV. | Hallazgos microscópicos de la mucosa y submucosa con Tissucol® | 80 |
| Tabla XVI. | Hallazgos microscópicos de la pared bronquial con Tissucol® | 82 |
| Tabla XVII. | Hallazgos microscópicos de la pleural peribronquial con Tissucol® | 83 |
| Tabla XVIII. | Hallazgos microscópicos de la mucosa y submucosa con PPP | 85 |
| Tabla XIX. | Hallazgos microscópicos de la pared bronquial con PPP | 86 |
| Tabla XX. | Hallazgos microscópicos de la pleura peribronquial con PPP..... | 88 |
| Tabla XXI. | Hallazgos microscópicos de la mucosa y submucosa con ADSC.... | 89 |
| Tabla XXII. | Hallazgos microscópicos de la pared bronquial con ADSC | 91 |
| Tabla XXIII. | Hallazgos microscópicos de la pleura peribronquial con ADSC | 93 |
| Tabla XXIV. | Hallazgos microscópicos de la mucosa y submucosa con Tissucol® + ADSC | 94 |
| Tabla XXV. | Hallazgos microscópicos de la pared bronquial con Tissucol® + ADSC | 96 |
| Tabla XXVI. | Hallazgos microscópicos de la pleura peribronquial con Tissucol® + ADSC | 97 |
| Tabla XXVII. | Expresión de Col2a1 en el muñón bronquial postneumonectomía... | 100 |



| | | |
|----------------------|---|-----|
| Tabla XXVIII. | Expresión de Ctgf en el muñón bronquial postneumonectomía | 101 |
| Tabla XXIX. | Expresión de Sox6 en el muñón bronquial postneumonectomía | 102 |
| Tabla XXX. | Expresión de Tgf β -1 en el muñón bronquial postneumonectomía ... | 103 |
| Tabla XXXI. | Expresión de Vegf en el muñón bronquial postneumonectomía | 104 |
| Tabla XXXII. | Expresión de Igf-1 en el muñón bronquial postneumonectomía | 105 |
| Tabla XXXIII. | Expresión de Agc-1 en el muñón bronquial postneumonectomía | 106 |



ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

| | | |
|--------------------|--|----|
| Figura 1. | Corte transversal del bronquio | 2 |
| Figura 2. | Musculatura lisa en el bronquio | 3 |
| Figura 3. | Radiografía posteroanterior de tórax | 10 |
| Figura 4. | Fibrobroncoscopía mostrando la FBP | 10 |
| Figura 5. | Gammagrafía mostrando la imagen de la FBP | 18 |
| Figura 6. | Tratamiento de la FBP | 19 |
| Figura 7. | Resección costal | 21 |
| Figura 8. | Salida de líquido fibrinopurulento | 21 |
| Figura 9. | Uso de colgajos de músculo intercostal | 22 |
| Figura 10. | Uso de colgajos de músculo serrato anterior | 22 |
| Figura 11. | Uso del epiplon | 23 |
| Figura 12. | Componentes de la sangre | 25 |
| Figura 13. | Acción de los GFs. sobre las células productoras | 30 |
| Figura 14a. | Modelo clásico de diferenciación celular | 38 |
| Figura 14b. | Modelo clásico de diferenciación celular para precursores comprometidos | 38 |
| Figura 14c. | Modelo de trans-diferenciación | 38 |
| Figura 14d. | Modelo de de-diferenciación y re-diferenciación | 38 |
| Figura 15. | Regulación de la expresión génica | 40 |

MATERIAL Y MÉTODO

| | | |
|-------------------|---|----|
| Figura 16. | Rata de la cepa Sprague-Dawley | 53 |
| Figura 17. | Quirófano de la unidad de investigación-HUGC Dr. Negrín | 54 |
| Figura 18. | Fármacos anestésicos | 57 |
| Figura 19. | Intubación orotraqueal | 58 |
| Figura 20. | Posición decúbito lateral derecho del animal | 58 |
| Figura 21. | Ventilador Servo 900® | 59 |
| Figura 22. | Toracotomía posterolateral izquierda | 59 |
| Figura 23. | Incisión en el 4º espacio intercostal | 60 |
| Figura 24. | Tracción del pulmón izquierdo y disección del hilio pulmonar .. | 60 |
| Figura 25. | Clip de titanio | 61 |
| Figura 26. | Sutura del muñón bronquial | 61 |
| Figura 27. | Colocación del drenaje pleural | 62 |
| Figura 28. | Cierre de toracotomía | 62 |
| Figura 29. | Salas de pre y post operatorio | 62 |
| Figura 30. | Obtención del PPP autólogo | 64 |
| Figura 31. | Adición de cloruro cálcico al 10% | 64 |
| Figura 32. | Formación del coágulo después de inducirle calor | 64 |
| Figura 33. | ADSC de rata vista al microscopio invertido 4x | 65 |



| | | |
|-------------------|---|----|
| Figura 34. | Trasplante de ADSC en el muñón bronquial | 66 |
| Figura 35. | Extracción del bloque cardiopulmonar en el sacrificio | 67 |
| Figura 36. | Dispensador de parafina y placa fría (A). Microtomo (B) | 68 |
| Figura 37. | Microscopio óptico Olympus BX50® | 69 |
| Figura 38. | Termociclador de capilares Ligth Cyclor® 1.5 | 70 |

RESULTADOS

| | | |
|-------------------|---|-----|
| Figura 39. | Vista macroscópica del muñón bronquial, grupo Tissucol® | 80 |
| Figura 40. | Vista macroscópica del muñón bronquial, grupo ADSC | 89 |
| Figura 41. | Vista macroscópica del muñón bronquial, grupo ADSC+Tissucol® | 94 |
| Figura 42. | Imágenes de las categorías histológicas evaluadas | 99 |
| Figura 43. | Expresión de Col2a1, control vs ADSC | 101 |
| Figura 44. | Expresión de Sox6, control vs ADSC y Tissucol® | 102 |
| Figura 45. | Expresión de Tgfβ-1, control vs ADSC | 103 |
| Figura 46. | Expresión de Vegfa, control vs ADSC | 104 |
| Figura 47. | Expresión de Igf-1, control vs ADSC, Tissucol® y Tissucol+ADSC | 105 |
| Figura 48. | Expresión de Agc-1, control vs. ADSC | 106 |



ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

| | |
|-------------------|---|
| ADN | ácido desoxirribonucleico |
| ADP | adenosín difosfato |
| ADSC | células madre derivadas del tejido adiposo |
| Agc-1 | aggrecan-1 |
| APUD | captación y descarboxilación de precursores de aminas |
| ARN | ácido ribonucleico |
| ATP | adenosín trifosfato |
| ARDS | síndrome de distrés respiratorio agudo |
| Bdnf | factor neurotrófico derivado del cerebro |
| BMP | proteína morfogénica ósea |
| BO | bronquiolitis obliterante |
| Ca ⁺⁺ | calcio |
| cc | centímetro cúbico |
| cm | centímetro |
| CM | célula madre |
| Col2a1 | colágeno tipo II a 1 |
| Col4a1 | colágeno tipo IV a 1 |
| COX-2 | ciclooxigenasa-2 |
| Ctgf | factor de crecimiento de tejido conectivo |
| CuSO ₄ | sulfato cúprico |
| DLCO | difusión de monóxido de carbono |
| DPX | fosfato dibutil xileno |
| DTPA | ácido dietilentriaminopentaacético |
| Egf | factor de crecimiento epidérmico |
| EMTU | unidad trófica epitelial-mesenquimal |
| EPOC | enfermedad pulmonar obstructiva crónica |
| EtOH | etanol |
| FB | fístula bronquial |
| FBP | fístula broncopleural |
| FELASA | Federación Europea de Asociaciones de Animales de Laboratorio |
| FEVI | Flujo espiratorio máximo en el primer segundo |
| Fgf | Factor de crecimiento fibroblástico |
| FiO ₂ | fracción inspirada de oxígeno |
| FR | frecuencia respiratoria |
| GFs | factores de crecimiento |
| GITC | isotiocianato de guanidina |
| H ₂ S | ácido sulfhídrico |
| h | hora |
| Hbgf | factor de crecimiento ligado a la heparina |
| I/E | relación inspiratoria/espiratoria |



| | |
|-------------------|---|
| Igf-1 | factor de crecimiento insulínico-1 |
| IGFBP | insulin-like growth factor binding proteins |
| im | intramuscular |
| IOT | intubación orotraqueal |
| ip | intraperitoneal |
| iv | intravenoso |
| JNK | quinasa c-jun N-terminal |
| Kg | kilogramos |
| MAPK | proteína quinasa activada por mitogénesis |
| MEC | matriz extracelular |
| mg | miligramos |
| min | minutos |
| ml | mililitros |
| mm | milímetros |
| Ngf | factor de crecimiento nervioso |
| NH ₃ | amoníaco |
| NO ₂ | óxido de nitrógeno |
| N ₂ O | óxido nitroso |
| O ₂ | oxígeno |
| PBS | solución salina amortiguada por fosfatos |
| PCR | reacción en cadena de la polimerasa |
| Pdgf | factor de crecimiento derivado de las plaquetas |
| PEEP | presión positiva al final de la espiración |
| PPIA | ciclofilina A |
| PPP | plasma pobre en plaquetas |
| PRFC | plasma rico en factores de crecimiento |
| PRP | plasma rico en plaquetas |
| rpm | respiraciones por minuto |
| RT-PCR | PCR cuantitativo a tiempo real |
| Rx | radiografía |
| sc | subcutáneo |
| SCF | factor activador de células madre |
| SD | desviación estándar |
| TAC | tomografía axial computarizada |
| Tgfβ-1 | factor de crecimiento transformante β1 |
| Vegf | factor de crecimiento endotelial vascular |
| Xe-133 | xenón-133 |
| ^{99m} Tc | technetium-99m |



INTRODUCCION

1**EL APARATO RESPIRATORIO**

El aparato respiratorio se divide morfológica y funcionalmente en tres independientes pero continuos sistemas: 1) Sistema de conducción; 2) Sistema de transición; 3) Sistema de intercambio. Cada sistema está constituido por estructuras histológicas particulares y con funciones específicas¹.

El sistema de conducción lo forman la cavidad nasal, laringe, tráquea y bronquios y su función primordial es la de filtrar y conducir el aire que llega y sale de los pulmones. El sistema de transición está formado por los bronquios y es una tenue transición entre los sistemas de conducción y de intercambio. Las funciones de los bronquios, además de conducir el aire hasta los alveolos, es participar en el metabolismo de hormonas y en la detoxificación de sustancias tóxicas (xenobióticos). Finalmente, el sistema de intercambio lo constituyen los alveolos pulmonares y su función principal es el de facilitar el intercambio gaseoso. En los alveolos el oxígeno inspirado entra en contacto con la sangre mientras que el bióxido de carbono es eliminado en el aire expirado. Su delicada estructura hace que el alveolo sea particularmente vulnerable al daño celular^{1,2}.

1.1.- Anatomía del bronquio

A nivel de la IV vértebra torácica la tráquea se divide en bronquio principal, derecho e izquierdo. El lugar de la división de la tráquea, en dos bronquios, recibe el nombre de bifurcación traqueal. La parte interna del lugar de la bifurcación presenta un saliente semilunar penetrante en la tráquea, la carina traqueal^{2,3}.

Los bronquios se dirigen asimétricamente hacia los lados, el bronquio derecho es más corto (3 cm), pero más ancho y se aleja de la tráquea casi en ángulo obtuso, el bronquio izquierdo es más largo (4-5 cm), más estrecho y más horizontal. Lo que explica que los cuerpos extraños, tubos endotraqueales y sondas de aspiración tiendan a ubicarse más frecuentemente en el bronquio principal derecho. En los niños menores de 3 años el ángulo que forman los dos bronquios principales en la Carina, es igual en ambos lados⁴.

El número de cartílagos del bronquio derecho es de 6 a 8 y el bronquio izquierdo de 9 a 12. Los cartílagos se unen entre sí mediante los ligamentos anulares traqueales^{2,4}.

Al llegar los bronquios a los pulmones, penetran en ellos por el hilio pulmonar, acompañado de vasos sanguíneos, linfáticos y nervios, iniciando su ramificación. El bronquio derecho se divide en 3 ramas (superior, media e inferior), mientras que el izquierdo se divide en 2 ramas (superior e inferior)^{5,6}.



En el interior de los pulmones cada una de estas ramas se divide en bronquios de menor calibre, dando lugar a los llamados bronquiolos, que se subdividen progresivamente en bronquiolos de primero, segundo y tercer orden, finalizando en el bronquiolo terminal, bronquiolo respiratorio, conducto alveolar, sacos alveolares y alveolos.

A medida que se produce la ramificación de los bronquios, estos van cambiando la estructura de sus paredes. Las primeras 11 generaciones tienen cartílagos como soporte principal de su pared, mientras que las generaciones siguientes carecen de él^{4,5}.

1.2.- *Histología del bronquio*

Desde el punto de vista histológico la estructura del bronquio es similar a la de la tráquea, formada por dos capas o túnicas. La túnica externa fibrocartilaginosa le aporta consistencia (armazón) mientras que la túnica interna está constituida por la mucosa y las estructuras glandulares y participa de las funciones exocrinas y de revestimiento^{6,7}.

Sin embargo, la estructura del bronquio difiere con el de la tráquea en algunos aspectos:

Los bronquios están formados externamente por cartílago hialino el cual está rodeado por abundantes fibras de tejido conectivo. El cartílago bronquial no forma anillos como sucede en la tráquea por lo que generalmente estas estructuras se designan simplemente como placas cartilaginosa. Desde el punto de vista de la morfología comparada es importante mencionar que el pulmón de la rata, ratón y hámster no contiene cartílago alguno, o sea, que éstas especies animales no poseen propiamente bronquios intrapulmonares⁸⁻¹¹.

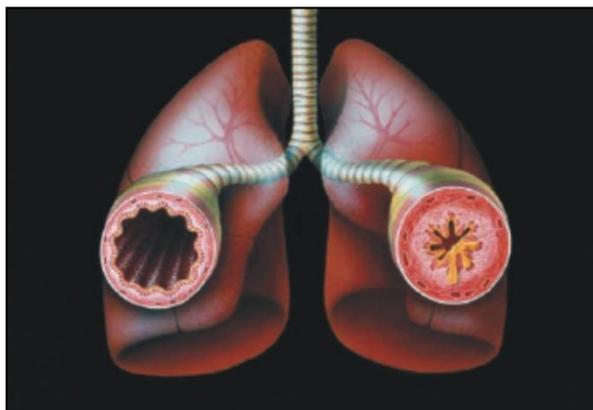


Figura 1. Corte transversal del bronquio

La luz de los bronquios está recubierta por una mucosa bronquial constituida primordialmente por epitelio pseudoestratificado ciliar y células productoras de moco (células caliciformes). Otras células importantes pero menos conocidas son las células

basales cuya función principal es la de soporte del anclaje y de la proliferación de las células ciliares, las células de cepillo (*Brush cells*) cuya función no es bien conocida, y las células neuroendocrinas APUD que están implicadas en el metabolismo de serotonina, epinefrina, norepinefrina, dopamina y neurotensina. La identificación de las células de cepillo y APUD requiere de microscopía electrónica o tinciones especiales por lo que raramente son evaluadas en histopatología de pulmón¹¹⁻¹³.

La mucosa bronquial también posee una población importante de células migratorias como son linfocitos, leucocitos globulares (*globular leucocytes*) de función desconocida y células cebadas (Lámina propia). Todas estas células participan conjuntamente en la inmunidad local y en el proceso inflamatorio, así como en reacciones de tipo alérgico. La proporción de células ciliares, caliciformes y cebadas varía notablemente entre especies, y también con el nivel de bifurcación bronquial. Debido a estas grandes variaciones es difícil evaluar histológicamente dichas células en las enfermedades broncopulmonares, pues se requiere de métodos morfométricos, técnicas especiales de muestreo o de tinciones especiales¹⁴.

Entre la mucosa bronquial y las placas de cartílago existen abundantes fibras de músculo liso, fibras de colágeno, fibras nerviosas y cuerpos nerviosos ganglionares. La mayoría de las fibras de músculo liso discurren de forma transversal y diagonal a la luz bronquial y su función primaria es la de bronco-constricción cuando el músculo es estimulado y de bronco-dilatación cuando se interrumpe el estímulo.

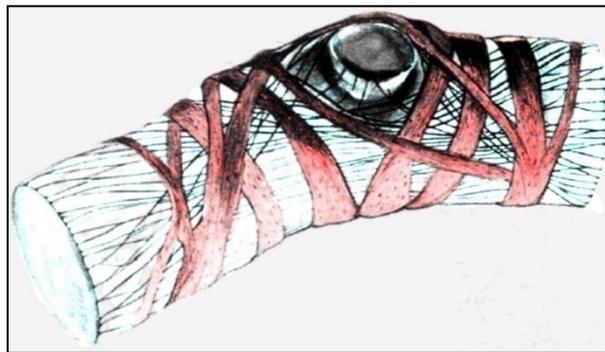


Figura 2. Musculatura lisa en el bronquio

La contractilidad muscular depende de un delicado balance entre estímulos excitatorios e inhibitorios, los cuales son gobernados tanto por impulsos nerviosos como por mediadores químicos. La estimulación parasimpática, la secreción de neurotransmisores como la taquininas, sustancia P, y mediadores de la inflamación como citoquinas, COX-2 e histamina figuran entre los agentes químicos más conocidos involucrados en la regulación del músculo liso bronquial¹⁴.

Es interesante destacar que en general, la contracción del músculo liso en las paredes vasculares tiene muchas veces efectos benéficos en el pulmón, mientras que la

estimulación del músculo liso bronquial generalmente está asociada a enfermedades respiratorias. Esto sugiere, según algunos investigadores, que algunas funciones propias del músculo bronquial son desconocidas.

Las glándulas sero-mucosas localizadas en la lámina propia (capa reticular) de la mucosa son otras estructuras de importancia en la fisiología e histopatología bronquial. El número y tamaño de estas glándulas bronquiales varía y se extienden externamente desde las placas de cartílago hasta llegar a la mucosa, pasando entre las fibras de músculo liso y las terminaciones nerviosas. Alrededor de las glándulas y de los ductos excretores que se abren hacia la luz bronquial se encuentran las células mioepiteliales. Las secreciones serosas de las glándulas bronquiales contribuyen en gran medida a la producción del moco que recubre a los bronquios.

1.3.- Irrigación de bronquio

Las arterias bronquiales se originan de los siguientes vasos: aorta descendente torácica, aorta abdominal, tronco braquiocefálico, subclavia y sus ramas. El número y tipo de ramificación tienen una gran variación individual.

Los anillos cartilagosos reciben su irrigación exclusivamente de los capilares que se encuentran en su superficie interna, por lo que la revascularización de estas estructuras será secundaria a la vascularización previa del plexo submucoso, y sólo podrá producirse a través de los espacios intercartilagosos.

1.4.- Daño y respuesta bronquial

La mucosa bronquial está expuesta a daños causados por un elevado número de agentes químicos y biológicos. Al igual que en la tráquea y cavidad nasal, la superficie del epitelio que recubre a los bronquios está protegida por una fina capa de moco producido tanto por las células caliciformes como por las glándulas bronquiales. Este moco sirve como protección para absorber y neutralizar muchos de los agentes químicos comúnmente inhalados como son el ácido sulfhídrico (H₂S), óxido de nitrógeno (NO₂) y amoníaco (NH₃), entre otros¹⁵. La delicada capa de moco que cubre al epitelio también actúa como barrera física atrapando e impidiendo la adherencia de agentes infecciosos como bacterias, mycoplasmas o agentes virales. Las partículas atrapadas y los gases disueltos en el moco se eliminan rápidamente al exterior mediante el constante movimiento metacrónico generado por la pulsación continua de los cilios. Se estima que cada célula ciliar posee alrededor de 250 cilios y cada uno de ellos produce unas 1,000 pulsaciones por minuto¹⁵.

Los cambios morfológicos que se observan en el epitelio bronquial después de un daño agudo son similares a los que observados en la mucosa nasal y traqueal. Estos cambios se han estudiados detalladamente en animales de laboratorio sometidos a la inhalación de gases tóxicos, expuestos a infecciones virales o causados por daño



mecánico inducido por cepillado. Resultados de estos estudios demostraron que independientemente de la etiología, las alteraciones celulares y la respuesta a daño son esencialmente los mismos.

El daño celular se manifiesta primero por un proceso degenerativo en donde el citoplasma se hincha (*cell swelling*) o toma apariencia vacuolada, lo que generalmente va seguido por una rápida pérdida de anclaje a la membrana basal. Esta pérdida de anclaje propicia que las células afectadas se desprendan fácilmente y se exfolien hacia la luz bronquial. Ejemplos de esta forma de degeneración celular se observa en la mayoría de las infecciones virales respiratorias como moquillo canino, rinotraqueitis bovina y felina, parainfluenza-3 y el virus respiratorio sincicial de los rumiantes, etc. La degeneración celular en bronquios tiene frecuentemente una distribución lineal similar a la que se observa en la mucosa nasal y traqueal después de un daño. La razón de esta linealidad no se conoce pero está probablemente relacionada al ciclo celular. O sea que las células, en alguna de las fases G0, G1, S o G2, pudieran ser particularmente más vulnerables al daño. Estudios experimentales indican que la pérdida de anclaje no sólo ocurre cuando hay degeneración celular sino también cuando existen procesos inflamatorios que afectan negativamente a los mecanismos normales de adhesión celular que existe entre las células basales y ciliares. Estos mecanismos de adhesión celular están regulados por moléculas de superficie como la E-caderina, alfa-catenina, beta-catenina, y gamma-catenina^{16,17}.

En algunos casos, además de la hinchazón celular y pérdida de anclaje, el citoplasma de células infectadas por virus se fusiona formando las típicas células multinucleares, también llamadas células sinciciales. Estas células multinucleares no deben confundirse con las células gigantes formadas por la fusión de macrófagos que se presentan comúnmente en las bronconeumonías pulmonares.

Un tipo peculiar de cambio degenerativo es la separación de la placa ciliar. Esta placa ciliar con forma de “penacho” o “pestañas” se separa del resto de la célula ciliar en un proceso de fragmentación celular conocido como “*cilicitoria*.” Esta alteración citológica puede ocurrir después de cualquier tipo de daño bronquial pero se observa con más frecuencia en lavados broncoalveolares de animales con infección viral o que están expuestos a gases tóxicos. A raíz de la separación de la placa ciliar, el remanente celular que contiene el núcleo y parte del citoplasma toma una forma redondeada por lo que puede confundirse citológicamente con macrófagos o células mononucleares. Las placas ciliares desprendidas pueden ser también confundidas con parásitos.

Otro tipo peculiar de cambio morfológico en el epitelio ciliar es la formación de los llamados Cuerpos de Creola (*Creola Bodies*) los cuales están constituidos por conglomerados celulares que se exfolian hacia la luz bronquial. Estos cuerpos se observan en pulmones con daño crónico y en ocasiones pueden confundirse con células tumorales. A diferencia de conglomerados de células tumorales, los cuerpos de Creola no revelan atipia celular y están típicamente rodeados por cilios.



El epitelio bronquial posee excelente capacidad de reparación siempre y cuando su membrana basal permanezca intacta después del daño bronquial. Las células ciliares degeneradas se desprenden hacia la luz bronquial y de ahí se elimina rápidamente mediante fagocitosis, acción mucociliar de los remanentes de la carpeta mucociliar, o mediante la fuerza física ejercida por la tos. La reparación bronquial requiere conjuntamente de los procesos de inflamación y de proliferación celular. Numerosos mensajeros químicos como las citoquinas, quimioquinas, neurotransmisores, óxido nítrico y factores de crecimiento participan en la inflamación y reparación del epitelio bronquial¹⁸⁻²⁰. Algunos factores se producen localmente mientras que otros son importados al sitio de la lesión bronquial por el torrente circulatorio. Es importante reiterar que tanto la inflamación como la reparación celular utilizan a la membrana basal como andamio para el movimiento y proliferación nuevas células bronquiales.

La reparación de la mucosa bronquial en respuesta a un daño agudo se lleva a cabo en cinco fases principales²¹.

- 1- Células viables presentes en el margen de la superficie ulcerada comienzan a migrar en cuestión de minutos a lo largo de la membrana basal para rápidamente cubrir el área ulcerada. En esta fase se observa histológicamente un epitelio aplanado que cubre partes de la membrana basal.
- 2- Las células basales y las “células secretoras no ciliadas” son las “células madre” (*stem cells*) encargadas de restituir las células epiteliales perdidas. Estas “células madre” entran en mitosis y sus células hijas (todavía no diferenciadas) migran rápidamente al epitelio dañado a lo largo de la membrana basal. En esta fase de “restitución” se pueden observar microscópicamente figuras mitóticas en la mucosa bronquial generalmente en los bordes de la úlcera.
- 3- Las células hijas también conocidas como “*células preciliares*” maduran, toman forma cuboidal y se acomodan en la pared bronquial para más tarde diferenciarse finalmente en células ciliares o en células caliciformes. En esta fase de proliferación celular se observa hacinamiento de células en la mucosa que se percibe microscópicamente como una leve hiperplasia bronquial. Se estima que durante esta fase hay 20-30% más células que en epitelio normal.
- 4- Reorganización de la población celular eliminando cualquier exceso de células mediante procesos de apoptosis. En esta fase de reorganización se observa una pared bronquial más o menos normal pero su luz contiene algunas células descamadas y algunos leucocitos.
- 5- Finalmente, el epitelio dañado es reparado y se restablece tanto la estructura como la función normal de la mucosa bronquial. En esta última fase el epitelio bronquial tiene una apariencia microscópica normal y sólo se



observan algunas células descamadas o inflamatorias en los espacios broncoalveolares.

Cuando la mucosa bronquial se expone a un daño continuo o persistente como es el caso de las infecciones crónicas, el epitelio pseudoestratificado ciliar puede sufrir hiperplasia o metaplasia²². Las células caliciformes frecuentemente proliferan aumentando no solo el número de estas células en la mucosa bronquial sino también la cantidad de moco secretado. La hiperplasia caliciforme es un cambio comúnmente observado en bronquitis crónica y se manifiesta clínicamente como hipersecreción bronquial. Ejemplos de enfermedades que se caracterizan por hiperplasia caliciforme e hipersecreción son el asma en gatos y perros^{23,24}, inflamación crónica respiratoria (bronconeumonías crónicas) en todas las especies, huélfago en caballos²⁵, y desde luego neumonías verminosas en donde los parásitos residen en la luz bronquial (*Dictiocaulosis pulmonar*).

Estudios experimentales sugieren que la hiperplasia caliciforme es el resultado de la proliferación de dos estirpes celulares: proliferación de las mismas células caliciformes y proliferación de células basales (madres) que posteriormente se diferencian en células caliciformes. El proceso de hiperplasia puede verse desde dos puntos de vista diferentes.

En el primer caso, la hiperplasia caliciforme puede considerarse como un mecanismo de defensa, mientras que en el segundo caso puede considerarse como un proceso adverso pues el exceso de moco impacta desfavorablemente en el funcionamiento del sistema de conducción. Este último caso ocurre con el asma y la enfermedad pulmonar crónica obstructiva en donde la sobreproducción de moco interfiere notablemente con el movimiento del aire a través del sistema de conducción. Poco se conoce sobre los mecanismos específicos que regulan la hiperplasia caliciforme bronquial. Además de factores que inducen mitosis, la homeostasis caliciforme también parece estar regulada por mecanismos de apoptosis en el epitelio bronquial. En resumen, la hiperplasia caliciforme puede considerarse en algunos casos como un proceso protector pero con funciones adversas transitorias, mientras que en otros como en el asma bronquial, puede considerarse un mecanismo fuera de control y con funciones adversas recurrentes²⁶.

Durante el daño o irritación crónica bronquial puede desarrollarse una metaplasia de tipo escamosa²⁷ en el cual el epitelio ciliar que es especializado se reemplaza por un epitelio escamoso que es menos especializado pero más resistente al daño. Los mecanismos implicados en la metaplasia escamosa bronquial están siendo investigados extensamente, pues se sabe que ésta es una alteración preneoplásica en tumores nasales y broncopulmonares. La asociación entre metaplasia y neoplasia se observa comúnmente en los bronquios de los fumadores.



Así como el epitelio bronquial reacciona a la irritación o daño produciendo hiperplasia caliciforme o metaplasia escamosa, de la misma forma las glándulas bronquiales reaccionan aumentando su tamaño y el volumen de sus secreciones. El aumento de tamaño glandular es referido tanto como hiperplasia como hipertrofia ya que se presenta un aumento en el número y tamaño de células²⁸. En algunos casos los ductos que descargan las secreciones glandulares se dilatan formando la llamada ectasia ductal bronquial (*bronchial gland duct ectasia*).

En estudios histopatológicos de rutina es difícil evaluar el tamaño de las glándulas bronquiales pues se requiere tomar en cuenta las variaciones entre especies animales, así como también, reconocer que el tamaño glandular varía de acuerdo al tamaño del bronquio. Un ejemplo de variación de especie se observa típicamente en los bronquios felinos en donde el tamaño de las glándulas es proporcionalmente mucho mayor al de otras especies domésticas. Este problema de la subjetividad para la evaluación glandular fue parcialmente solucionado estableciendo la relación normal o índice entre el tamaño glandular y grosor de la pared bronquial en los pulmones de humanos. Este índice se conoce “índice de Reid” (*Reid Index*) y su valor normal en el humano es de 0.33 o sea que la glándula bronquial es aproximadamente 33% del grosor de la pared bronquial²⁹. Altos índices de Reid se describen en pacientes con bronquitis crónica.

Los mecanismos que gobiernan la hiperplasia bronquial son complejos e involucran tanto células epiteliales como mesenquimales, así como a numerosos mensajeros químicos. El término remodelación tisular se utiliza con frecuencia en patología contemporánea para describir los procesos que ocurren en la reparación y que incluyen inflamación, modificación de matrices extracelulares, hipertrofia, hiperplasia y apoptosis³⁰.

Los cambios más relevantes en la remodelación bronquial son la hiperplasia caliciforme, deposición de colágeno y engrosamiento de la lámina reticular, hiperplasia del músculo liso, neo-vascularización y proliferación de terminaciones nerviosas. Es importante notar que en la remodelación bronquial los cambios morfológicos pueden manifestarse antes de la presentación de los signos clínicos. Algunos investigadores han comparado la remodelación bronquial con una curación de herida por segunda intención³¹. O sea que la falta de resolución en una lesión aguda bronquial inicial crea un medioambiente en donde se mantienen continuamente procesos de inflamación y cicatrización.

Otro concepto novedoso relacionado a la remodelación bronquial es la aparición postnatal de la EMTU que no es otra cosa que la relación epitelio-submucosa^{32,33}. Durante el desarrollo embrionario el crecimiento y diferenciación de los tejidos depende en gran medida de una comunicación directa entre células epiteliales y mesenquimales. Esta comunicación entre epitelio y tejido conectivo desaparece una vez que se han formado los bronquios tras el nacimiento. Se ha postulado que en el asma y en otras



afecciones crónicas respiratorias esta comunicación fetal se restablece causando una proliferación celular desordenada y una deposición excesiva de matrices colágenas en la lámina propia de los bronquios³².

Por otro lado, la bronquiectasia es una alteración importante que se desarrolla en los bronquios a raíz de una obstrucción o de una inflamación crónica y severa. La bronquiectasia es un proceso irreversible en los cuales los bronquios se dilatan permanentemente como resultado de un daño y debilitamiento de la pared bronquial³⁴.

Este padecimiento ha sido dividido etiológicamente en dos grandes grupos: bronquiectasia obstructiva y bronquiectasia no obstructiva. En el primer caso la dilatación de la pared bronquial ocurre en la porción distal de un bronquio obstruido por un tumor o cuerpo extraño. En la bronquiectasia no obstructiva (destrucciona) se debe fundamentalmente a infecciones pulmonares crónicas en los cuales las paredes bronquiales son destruidas por el proceso inflamatorio mientras que la tracción ejercida por el tejido pulmonar adyacente produce la dilatación del tubo bronquial^{35,36}.

Desde el punto de vista morfológico la bronquiectasia se divide en sacular y cilíndrica. La bronquiectasia sacular aparece macroscópicamente como sacos redondos llenos de exudado purulento que se parecen a los abscesos pulmonares. Sin embargo, mientras que los abscesos están delimitados por una cápsula o membrana piogénica, en bronquiectasia sacular el exudado está rodeado por restos de la pared bronquial.³⁷ La bronquiectasia cilíndrica aparece como cilindros uniformes de exudado rodeado por segmentos largos de paredes bronquiales. Los pulmones con bronquiectasia tienen una apariencia externa nodular que frecuentemente se describe en necropsias como apariencia bocelada. Microscópicamente, en la bronquiectasia se observa exudado purulento o necropurulento rodeado de tejido conectivo entremezclado con restos de cartílago, músculo liso y remanentes de tejido glandular infiltrados por neutrófilos, linfocitos y células plasmáticas^{34,38,39}.

2

FÍSTULA BRONCOPLEURAL

2.1.- Definición, etiología, factores de riesgo e incidencia

2.1.1.- Definición

La fístula broncopleural (FBP) es una comunicación anormal que se establece entre el árbol bronquial y el espacio pleural, siendo producida por la dehiscencia del muñón bronquial, que ocasiona un empiema por contaminación e infección retrógrada del bronquio remanente⁴⁰. La dehiscencia del muñón bronquial es definida como una alteración en el cierre bronquial que ocurre después de una resección quirúrgica del pulmón. Aunque afortunadamente es poco frecuente, cuando ésta ocurre representa un



desafiante y frustrante problema de manejo asociada con una importante morbilidad y mortalidad que conlleva a una prolongada estancia hospitalaria y una elevada utilización de recursos sanitarios.



Figura 3. Radiografía posteroanterior de tórax. Colección de líquido y nivel hidro-aéreo en hemitórax izquierdo

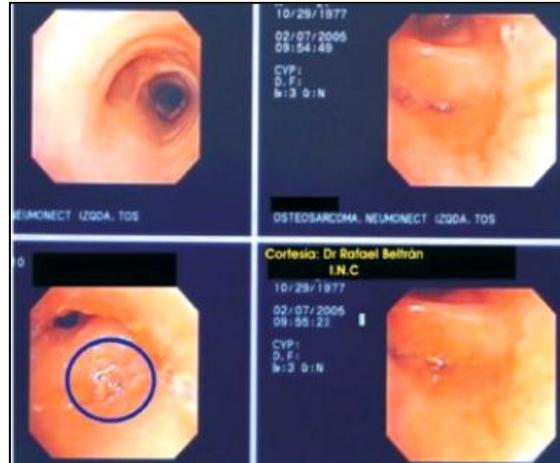


Figura 4. Fibrobroncoscopia mostrando la FBP

La FBP causa una interrupción de la vía aérea, contamina el espacio pleural y anega de líquido el pulmón o pulmones remanentes, pudiendo originar una neumonía por aspiración. Hay que distinguir, sin embargo, las fugas persistentes aéreas de las resecciones pulmonares de lo que realmente es una fístula bronquial (FB). No es una mera distinción académica, ya que la etiología y el tratamiento son muy distintos. Las primeras son fístulas alveolo-pleurales que se originan a partir de laceraciones del parénquima pulmonar, y su tratamiento es el mantenimiento, el tiempo que sea necesario de los drenajes torácicos, y en última instancia la utilización de dispositivos de seguimiento ambulatorio como la válvula de Heimlich y más rara vez la reintervención quirúrgica. En cambio, una FBP es una urgencia quirúrgica que necesitará de algún tipo de intervención.

2.1.2.- Etiología

La etiología de la FBP es variada y puede amenazar la vida de un paciente. Pueden aparecer después de una resección pulmonar (causa más común) ya sea una neumonectomía o una lobectomía, por complicaciones infecciosas en casos con necrosis pulmonar, tras quimioterapia o radioterapia (por cáncer pulmonar), y muy rara vez en casos de neumotórax persistente espontáneo y tuberculosis (menos común)⁴¹⁻⁴⁴

| TABLA I. ETIOLOGÍA ASOCIADA CON LA APARICIÓN DE FBP | |
|---|--|
| <i>Infecciones</i> | <ul style="list-style-type: none"> ● <i>Haemophilus influenzae</i> ● <i>Streptococcus viridans</i> ● <i>Staphylococcus viridans</i> ● <i>Pseudomona aeruginosa</i> ● <i>Nonhemolytic streptococcus</i> ● <i>Aspergillus</i> ● <i>Histoplasma capsulatum</i> |
| <i>Médicos</i> | <ul style="list-style-type: none"> ● <i>Pleuroneumonía complicada</i> ● <i>Obstrucción bronquial severa</i> ● <i>Distrés respiratorio agudo (ARDS)</i> |
| <i>Quirúrgicos (lobectomía)</i> | <ul style="list-style-type: none"> ● <i>Enfisema lobar congénito LSI</i> ● <i>Secuestro pulmonar LII</i> ● <i>Bronquiectasias LSD</i> |
| <i>Enfermedad concomitante</i> | <ul style="list-style-type: none"> ● <i>Cardiopatía congénita</i> ● <i>Enfermedad neurológica</i> ● <i>Genetopatía</i> ● <i>Bronquiolitis obliterante</i> |
| <i>Enfermedad maligna</i> | <ul style="list-style-type: none"> ● <i>Cáncer de pulmón</i> ● <i>Cáncer de tiroides</i> ● <i>Cáncer de esófago</i> ● <i>Linfomas</i> |
| <i>Otros</i> | <ul style="list-style-type: none"> ● <i>Neumotórax espontáneo persistente</i> ● <i>Enfermedad pulmonar necrosante asociada a radiación o quimioterapia</i> ● <i>Idiopática</i> |

En la fisiopatología, la aparición de una fístula temprana (dentro de la primera semana) ocurre generalmente por un fallo técnico de la sutura del muñón ya sea por encontrarse muy suelta, o todo lo contrario, es decir, cuando se aplica una excesiva tensión a los bordes del tejido bronquial que producen isquemia del mismo. La intermedia (entre 8 y 30 días) es debida a un fallo en la cicatrización en pacientes que recibieron radioterapia previa. Por último, la fístula tardía (más de 30 días) suele asociarse a bronquitis o empiema que conduce a la pérdida de la integridad del tejido, evita la cicatrización e incluso puede llevar a la ruptura del bronquio⁴⁵. Se ha descrito que la mortalidad del empiema post-neumonectomía con FBP puede llegar a ser del 11-13%^{46,47}.

Así mismo, ésta patología se presenta en pacientes con enfermedades respiratorias graves, como por ejemplo el síndrome de distrés respiratorio agudo, crisis bronquial obstructiva severa, absceso pulmonar o pleuroneumonía complicada^{44,48}. Sato y cols⁴⁹ analizaron sus experiencias postoperatorias, llegando a la conclusión que 5 de 64 casos (7.8%) tuvieron FBP en el caso de enfermedades inflamatorias y 19 de 481 casos (4%) en los casos de cáncer de pulmón. En estos últimos pacientes, las FBP están



asociados con casos avanzados, tumores residuales en el muñón bronquial o el uso intratorácico de quimioterapia.

La FBP puede ocurrir también como una complicación tardía y grave de los procedimientos broncoplásticos, en los que suele aparecer en la 3ª a la 4ª semana tras la operación y se reconoce como causa fundamental de la misma el fallo técnico⁴⁵. La colocación de tubos de drenaje pleural o de catéteres venosos centrales^{48,50}, y los procedimientos con riesgo de trauma pulmonar como la pleurodesis^{51,52} pueden ocasionarla, así como también, la disección ganglionar mediastínica al producir devascularización bronquial, pudiendo favorecer la dehiscencia bronquial y la subsecuente formación de una FBP.

| TABLA II. CLASIFICACIÓN DE LA FBP | |
|---|--|
| <i>Postoperatoria</i> | <i>No postoperatoria</i> |
| <i>Asociada con resección</i> | ● <i>Después de procedimientos</i> |
| ● <i>Malignidad</i> | ● <i>Biopsia pleural</i> |
| ● <i>Trauma</i> | ● <i>Broncoscopia</i> |
| ● <i>Infeciosas</i> | ● <i>Biopsia de pulmón</i> |
| <i>Asociada a enfermedad pleuroparenquimal</i> | ● <i>Idiopática</i> |
| ● <i>Empiema</i> | ● <i>Infecciones</i> |
| ● <i>Trauma torácico</i> | ● <i>Neumotórax espontáneo persistente</i> |
| ● <i>Otras infecciones</i> | ● <i>Trauma torácico</i> |
| <i>Otros</i> | ● <i>Enfermedad pulmonar necrotizante asociada a radiación o quimioterapia</i> |
| ● <i>Reparación de perforaciones traqueal o esofágica</i> | ● <i>ARDS</i> |
| ● <i>Enfermedad de reflujo gastroesofágico</i> | |
| ● <i>Síndrome de Boerhaave</i> | |

Debido a que la etiología quirúrgica y no quirúrgica de la FBP tiene diferentes abordajes y pronósticos se ha clasificado a la FBP en la Tabla II⁵³. Ésta clasificación puede ser útil al clínico y puede servirle de guía para la elección y aproximación al diagnóstico. En general, los procedimientos quirúrgicos (particularmente, los que están relacionados con pulmones necróticos o cáncer pulmonar) tienen la incidencia más alta y pueden tener el peor pronóstico.

2.1.3.- Factores de riesgo

La predisposición a la dehiscencia del muñón bronquial puede ocurrir debido a factores de riesgo preoperatorios, intraoperatorios y postoperatorios.



2.1.3.1.- Los factores de riesgo preoperatorios

Está relacionada con las características propias de cada paciente tales como enfermedades concomitantes (inmunodepresión, diabetes insulino-dependiente⁴¹, malnutrición), medicamentos (esteroides, inmunosupresores) y tratamientos previos a la cirugía como la radiación preoperatoria del tórax⁴¹. Estudios realizados por Algar y cols⁵⁴, demostraron que la aparición de la FBP precoz después de una neumonectomía estuvo significativamente asociada con la EPOC (p=0.017), la hiperglicemia (p=0.003), la hipoalbuminemia (p=0.017) y la terapia con esteroides previa a la cirugía (p<0.001).

| TABLA III. FACTORES DE RIESGO EN LA DEHISCENCIA DEL MUÑÓN BRONQUIAL | |
|---|---|
| <i>Factores preoperatorios</i> | |
| ✓ | <i>Esteroides</i> |
| ✓ | <i>Medicamentos inmunosupresores (e.j. azatioprina)</i> |
| ✓ | <i>Medicamentos antiproliferativos (e.j. sirolimus)</i> |
| ✓ | <i>Enfermedad colágeno vascular</i> |
| ✓ | <i>Cirrosis</i> |
| ✓ | <i>Fumadores</i> |
| ✓ | <i>Neumonía</i> |
| ✓ | <i>Enfermedad inflamatoria pulmonar</i> |
| ✓ | <i>Infeción pleural/empiema</i> |
| ✓ | <i>Tuberculosis activa</i> |
| ✓ | <i>Radioterapia torácica previa</i> |
| ✓ | <i>Diabetes mellitus/hiperglicemia</i> |
| ✓ | <i>Pacientes con edad avanzada (>60 años)</i> |
| ✓ | <i>Malnutrición/hipoalbuminemia</i> |
| ✓ | <i>Quimioterapia preoperatoria</i> |
| ✓ | <i>Función pulmonar comprometida (EPOC, FEV1 baja, DLCO baja)</i> |

En la medida de lo posible se deben corregir o disminuir estos factores de riesgo. Así, las infecciones o la malnutrición deben ser tratadas de una forma agresiva. Los tratamientos con esteroides deben ser ajustados a las dosis más bajas posibles antes de la cirugía. Los pacientes diabéticos deben seguir un estricto control y restringir el hábito tabáquico a los pacientes.

También se han descrito otros factores de riesgo, que estarían relacionados con los anteriores como son: fiebre, H. influenzae en esputo, índice de sedimentación eritrocítica elevada y anemia⁵⁵.



2.1.3.2.- Los factores de riesgo intraoperatorios

| TABLA IV. FACTORES DE RIESGO EN LA DEHISCENCIA DEL MUÑÓN BRONQUIAL | |
|--|---|
| <i>Factores intraoperatorios</i> | |
| ✓ | <i>Neumonectomía derecha</i> |
| ✓ | <i>Desvascularización del bronquio</i> |
| ✓ | <i>Fallo técnico de la grapadora</i> |
| ✓ | <i>Sutura desintegrada</i> |
| ✓ | <i>Margen bronquial afecto por tumor</i> |
| ✓ | <i>Muñón bronquial largo</i> |
| ✓ | <i>Linfadenectomía mediastínica⁵⁶</i> |
| ✓ | <i>Diámetro grande del muñón bronquial (>25 mm)⁵⁷</i> |
| ✓ | <i>Trasfusión sanguínea⁵²</i> |

Las resecciones pulmonares amplias como la neumonectomías constituyen un factor importante de riesgo de FBP^{58,59}, siendo significativamente más frecuente su aparición tras la neumonectomía derecha (13.2%) que tras la neumonectomía izquierda (5.0%)⁶⁰⁻⁶³. Hay dos razones principales para que se incremente esta incidencia en la neumonectomía derecha. Una de ellas es que el bronquio principal está irrigado por una sólo arteria bronquial, mientras que el bronquio principal izquierdo está irrigado por dos arterias bronquiales. La segunda es que⁶⁰⁻⁶³ el bronquio principal izquierdo se encuentra protegido debajo del arco aórtico con un tejido mediastínico circundante vascularizado. El muñón del bronquio izquierdo se retrae debajo del arco aórtico, mientras que el bronquio principal derecho no tiene tal protección natural. Éste es, probablemente, un componente del riesgo inherente de la neumonectomía derecha. Cuando además, la neumonectomía derecha se asocia a terapia neo-adyuvante, se ha observado una mortalidad de 24%⁶⁴ debido a FBP. Otro factor de riesgo a tener en cuenta es la metástasis de los ganglios subcarinales⁶¹ en contacto con el muñón bronquial.

2.1.3.3.- Los factores de riesgo postoperatorios

Entre los factores de riesgo más importantes para la formación de una FBP se encuentran la necesidad de ventilación mecánica postoperatoria⁶³, de hecho la extubación precoz debe ser una prioridad después de la cirugía para evitar el inherente barotrauma que puede poner en riesgo el cierre del muñón bronquial.

| TABLA V. FACTORES DE RIESGO EN LA DEHISCENCIA DEL MUÑÓN BRONQUIAL | |
|---|---|
| <i>Factores postoperatorios</i> | |
| ✓ | <i>Ventilación mecánica presión positiva</i> |
| ✓ | <i>Empiema postoperatoria</i> |
| ✓ | <i>Uso prolongado de tubo de drenaje torácico</i> |
| ✓ | <i>Requerimiento de transfusiones de sangre</i> |



Otros factores de riesgo que están implicados son: la fiebre, uso de esteroides, leucocitosis, traqueostomía y broncoscopia para succionar el esputo/moco⁵⁵, contaminación de la cavidad pleural⁴¹.

2.1.4.- Incidencia

Aunque ha disminuido en los últimos años, debido al avance de las técnicas quirúrgicas, la incidencia y desarrollo de la FBP varía desde 1.5% – 28% después de una resección pulmonar^{43,59,65,66}. Ésta variabilidad aparentemente depende de la etiología, la técnica quirúrgica y la experiencia del cirujano⁶⁷⁻⁶⁹. La incidencia es menor cuanto mejores sean las condiciones del paciente. Cerfolio⁶⁵ describió una incidencia que variaba desde 4.5% a 20% tras una neumonectomía y de 0.5% después de una lobectomía⁶⁵. Sirbu y cols⁵⁹, encontró en 490 pacientes que sufrieron una resección pulmonar debido a cáncer de pulmón una incidencia de FBP de 4.4% (22 de 490 pacientes), 21 de los pacientes (95.5%) fueron hombres y 1 paciente (4.5%) fue mujer con un promedio de edad de 57.8 años. La FBP ocurrió en 12 pacientes tras una neumonectomía (54.6%), en 9 después de una lobectomía (40.9%), y en 1 paciente (4.5%) después de una resección broncoplastica en manguito⁵⁹.

Como se ha comentado previamente, los aspectos de la técnica quirúrgica también influye en la incidencia de FBP como la neumonectomía y sobre todo la del hemitórax derecho que puede llegar a ser incluso de un 75%⁷⁰, un muñón bronquial largo, cáncer residual en el margen bronquial, devascularización del muñón bronquial, ventilación prolongada o reintubación después de la resección y la inexperiencia quirúrgica. La resección excesiva o escasa en tumores malignos, con tejido tumoral residual cercano o residual en el muñón bronquial^{41,58}, la tensión de la sutura y la excesiva disección peribronquial y paratraqueal se han asociado con el incremento en la incidencia de FBP. Todos ellos incrementan el riesgo de necrosis isquémica con subsecuente colonización bacteriana.

La mayor incidencia de FBP se presenta en adultos, asociándose a una mortalidad que puede oscilar entre 18%–50%⁷¹. En niños, la mayoría de los estudios corresponden a casos de prematuros en los cuales la FBP aparece como complicación de la ventilación mecánica debido a un ARDS por membrana hialina. La mortalidad en éstos pacientes puede sobrepasar el 50% en aquellos prematuros de muy bajo peso al nacimiento⁷².

Cuando consideramos la incidencia de la FBP en relación al tipo de sutura, Sonobe y cols⁷³ encontró una incidencia de 1.8% cuando se utiliza una sutura manual, 5,0% cuando el muñón bronquial es cerrado con una grapadora, y 1,9% si se combina el cierre con grapadora y una sutura de refuerzo en el lado distal a las grapas y un 1,0% cuando la sutura de reforzamiento fue colocada en el lado proximal a las grapas.



2.2.- *Manifestaciones clínicas*

La presentación clínica es variable, y para una mejor comprensión, se puede dividir en: subaguda, aguda y crónica.

2.2.1.- *Forma aguda o precoz*

Puede haber una dehiscencia del muñón bronquial en los primeros 7 días de realizar una resección pulmonar, y se presenta con una importante salida de aire y, muchas veces, la formación de un enfisema subcutáneo. El paciente presentará a la exploración física, malestar general, disnea, fiebre, sudoración profusa y escalofrío secundario a una infección dentro del espacio pleural. En otros casos se sospechará en pacientes que durante el período postoperatorio presenten expectoración copiosa de líquido claro, espumosa o serosanguinolenta en los primeros días y de secreciones purulentas si ocurre más tardíamente.

Asimismo, se debe sospechar una FBP cuando aparece un nivel hidroaéreo que aumenta de tamaño, se observa desplazamiento de la tráquea y mediastino y disminución o ausencia de derrame pleural en la radiografía torácica⁴⁵. Puede ocurrir también un distrés respiratorio debido a causas secundarias, como el paso de fluidos pleurales del muñón bronquial hacia el pulmón contralateral, o por fuga de aire dentro del espacio pleural vacío, lo que puede ocasionar un neumotórax a tensión que lleva a un compromiso cardiovascular. Los etapas siguientes tras el desarrollo de una FBP aguda sería: aparición de un neumotórax, alteración de la relación ventilación/perfusión, hipoventilación alveolar y finalmente el desarrollo o la agravación de una insuficiencia respiratoria^{44,50}.

2.2.2.- *Forma subaguda o intermedia*

Cuando aparecen entre los 8 y 30 días después de la cirugía. Usualmente, después de una neumonectomía⁷⁴, pueden estar presentes pequeñas cantidades de aire y fluidos en el espacio pleural. El aire se reabsorbe de forma gradual y progresiva y se acumula el líquido aunque ambos serán reabsorbidos dentro de las primeras 24 a 48 horas tras la cirugía. Cuando la presentación es de forma subaguda, a menudo los síntomas pasan desapercibidos en la evolución clínica de los pacientes. Sin embargo, se aprecia debilitamiento, malestar, fiebre y puede haber o no presencia de tos.

2.2.3.- *Forma crónica o tardía*

La FBP aparece después de los 30 días tras la cirugía. La FBP que ocurre después de las 2 semanas siguientes a la cirugía, es secundaria a secreciones que se acumulan y que se encuentran contaminadas o infectadas en el muñón bronquial y que penetran dentro de la cavidad pleural conduciendo a un empiema postneumonectomía. Mucho menos frecuente es que se deba a una infección primaria del espacio pleural que



conduce a una dehiscencia del muñón bronquial⁷⁵. La FBP ocurre después de una neumonectomía, usualmente dentro de los 90 días de la operación⁷¹.

2.3.- *Prevención*

El mejor tratamiento para evitar la dehiscencia del muñón bronquial es la prevención. Identificar y corregir los factores de riesgo que conllevan a ésta dehiscencia antes del acto quirúrgico es primordial para evitar posibles complicaciones. En lo posible, tratar la desnutrición y reducir, lo más que se pueda, las dosis de esteroides. La infección pulmonar (bronquitis, neumonía) debe tratarse con antibióticos antes de una resección pulmonar⁶¹.

Durante la cirugía, se debe ser muy meticuloso al diseccionar el bronquio hasta su origen para evitar la excesiva desvitalización del mismo o durante la linfadenectomía. Si ha existido radioterapia previa, el refuerzo del muñón bronquial con un colgajo muscular reduce la posibilidad de dehiscencia. Deben usarse suturas bronquiales mecánicas y/o con puntos sueltos irreabsorbibles finos, con aguja atraumática. No se deben dar puntos demasiado unidos ni muy apretados para evitar la isquemia del muñón. Debe evitarse el almacenamiento de secreciones dentro del muñón bronquial por que puede conducir a una infección, dehiscencia y fallo en el cierre del muñón. La pars membranosa, que es muy flexible, debe aproximarse hasta la porción cartilaginosa del bronquio para evitar que haga tensión en las esquinas del muñón⁷³.

2.4.- *Diagnóstico*

Una FBP pequeña puede presentar una sintomatología mínima o incluso puede estar oculta. Se sospechará en pacientes que en el período postoperatorio presentan expectoración copiosa de líquido serosanguinolento en los primeros días o de material séptico si ocurre tardíamente. Asimismo se tendrá en cuenta la posibilidad de FBP cuando en la radiografía simple del tórax aparece un nivel hidroaéreo que aumenta de tamaño progresivamente, asociado a la expectoración, o cuando el hemitórax intervenido está vacío. La desviación del mediastino hacia el lado no operado es otro signo radiológico de esta complicación debido a un incremento de la cantidad de aire en el lado intervenido⁴⁵. Puede también aparecer en el pulmón remanente un moteado difuso, secundario a broncoaspiración.

Ricci y cols⁷⁶, realizaron un estudio retrospectivo en 33 pacientes utilizando la tomografía axial computarizada (TAC) como una herramienta guía para el diagnóstico de una FBP periférica. Encontraron que la TAC sirvió para identificar y localizar la causa en un 55% de los pacientes que requirieron una intervención quirúrgica. La FBP apareció en el lado derecho en 24 pacientes, mientras que el lado izquierdo sólo en 9 pacientes. En este estudio concluyeron que la TAC es útil para detectar la etiología de la FBP y seleccionar potenciales candidatos para cirugía y que además puede ser útil en la demostración de recidiva o persistencia tumoral.



En los últimos tiempos se ha descrito la fistulografía a través del orificio cutáneo o inyectando un contraste por el tubo de drenaje pleural como el azul de metileno dentro de la cavidad pleural para determinar si el esputo se tiñe con el colorante, aunque no son prácticas habituales. Así mismo, se ha descrito la utilidad de la inhalación de N₂O y monitorización de endotelina-1 plasmática⁷⁷.

Un método de diagnóstico en el campo de la medicina nuclear sencillo y no agresivo es la gammagrafía de ventilación que consiste en hacer respirar al paciente aerosoles de ^{99m}Tc-DTPA en un circuito cerrado durante 10 minutos, adquiriendo posteriormente imágenes en proyecciones anterior y posterior en una gamma-cámara, las imágenes obtenidas se manipulan mediante un software y se aplican filtros sobre el parénquima pulmonar y árbol bronquial, visualizándose de ésta forma trazados de diferentes tonalidades o depósitos de aire y comunicaciones broncopleurales⁷⁸. También se ha utilizado el radioisótopo Xe-133 que es capaz de valorar más correctamente la función ventilatoria en todas sus fases y probablemente sea superior al ^{99m}Tc-DTPA en la detección de FBP^{58,79}, sin embargo presenta la desventaja que éste procedimiento no es accesible en la mayoría de los centros dada la complejidad de una infraestructura específica y la difícil disponibilidad del radioisótopo (Figura 5).

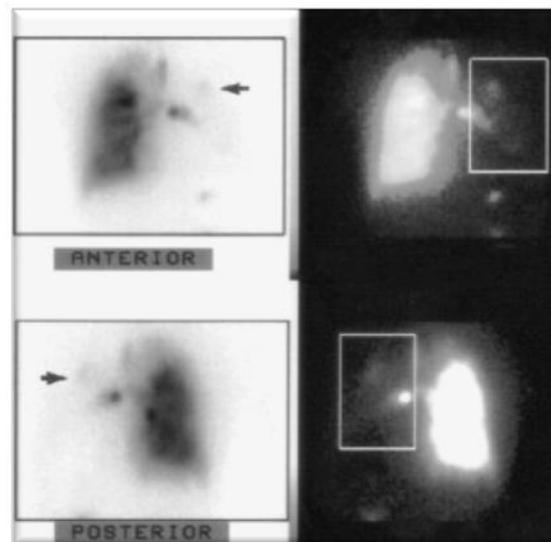


Figura 5. Gammagrafía mostrando la imagen de la FBP

La broncoscopia es de importancia capital, ya que permite una adecuada evaluación de la localización del orificio fistuloso y sus características⁴⁵, también excluye de tuberculosis u otra etiología infecciosa e incluso, y de ser posible, permite la introducción de sustancias sellantes dentro del tracto fistuloso que resuelvan la FBP.

Por último, las pruebas de laboratorio son inespecíficas y suelen mostrar una intensa leucocitosis con desviación a la izquierda y marcada hipoxemia.

2.5.- Pronóstico

Los índices de mortalidad descritos por FBP son muy variables. Pierson y cols⁴⁴ realizaron un estudio con ventilación mecánica en urgencias durante un período de 4 años. Ellos encontraron que 39 de los 1700 pacientes (no operados y con ventilación mecánica) desarrollaron FBP dentro de las primeras 24 horas. La mortalidad en éstos 39 pacientes fue de un 67%, siendo aquellas de aparición más tardía las más mortales con respecto a las FBP de aparición temprana (94% vs 45%). Del mismo modo, las fugas de aire mayores se asocian con más mortalidad que aquellas donde hay una pequeña fuga de aire. Otros autores han descrito mortalidades cercanas al 50%. Sin embargo, en estudios en los que se utilizaron colgajos musculares torácicos y omento se logró disminuir la mortalidad, como es el caso del estudio publicado Sirbu y cols⁵⁹, donde la mortalidad fue de un 27.2% (6 de 22 pacientes).

2.6.- Tratamiento

Durante años la única técnica disponible para el cierre de la fístula era la cirugía, la cual estaba asociada a una alta morbi-mortalidad^{63,80}. Hoy en día, no hay un único tratamiento establecido para la FBP, existiendo varias opciones terapéuticas de elección que van desde terapias conservadoras hasta procedimientos quirúrgicos agresivos, los cuales, incluso, pueden ser incapaces de solucionar el problema. La mayoría de éstas intervenciones son descritas en series de casos aislados, experiencias personales o estudios retrospectivos, pero no existe un consenso establecido; así que los tratamientos sobretodo son individualizados, dependiendo tanto de las características fisiopatológicas de la fístula (recorrido, calibre) como de la situación clínica del paciente⁸¹ (Figura 6).

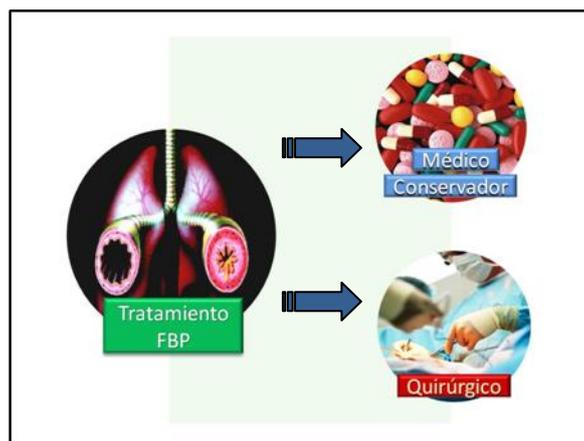


Figura 6. Tratamiento de la FBP

2.6.1.- Orientación inicial

El manejo inicial consiste en la evaluación del paciente, siendo lo más importante su estabilización⁸². Si hay presencia de neumotórax a tensión, está indicado el uso de un drenaje pleural no aspirativo, que permite la resolución del neumotórax y la

reexpansión pulmonar, en los casos de lobectomías, ya que la presión negativa dificultaría el cierre de la fístula. Sin embargo, si es necesario el uso transitorio de un drenaje aspirativo, debido a persistencia del neumotórax, es aconsejable utilizar la menor presión negativa posible^{48,50,83}. La evacuación del líquido mediante el drenaje pleural, evita la inundación del pulmón remanente y a su vez esta acción, constituye una medida clave para tratar el empiema cuando existe. El empiema es una complicación frecuente asociada a las fístulas, sobre todo en aquellas de mayor tamaño y aparición tardía^{84,85}. Su presencia supone un aumento de la morbilidad de los pacientes.

El control de la ventilación y oxigenación del paciente, el uso de antibióticos intravenosos y el apoyo nutricional son partes esenciales del tratamiento de la FBP^{86,87}.

2.6.2.- Broncoscopia, sustancias sellantes y ocluyentes

Inicialmente fue utilizado para la evaluación del muñón y para el diagnóstico diferencial de tuberculosis, sin embargo, el broncoscopio flexible ha ido ganando más aceptación como instrumento de diagnóstico y como una modalidad terapéutica en pacientes con FBP. Incluso el broncoscopio de fibra óptica ha sido utilizado de manera percutánea para visualizar la vía de una fístula broncopleurocutánea⁸⁸.

En los últimos años y con el desarrollo de la fibrobroncoscopia se ha logrado un mejor diagnóstico de la FBP a través de su visualización directa. Además ha permitido la instilación de sustancias sellantes⁸⁹, sustancias ocluyentes, la inyección submucosa de sustancias que aproximen los bordes de la fístula⁹⁰ como el polidocanol y las partículas revestidas de carbono pirolítico suspendidas en un gel con base acuosa⁹⁰⁻⁹² o la introducción de prótesis de silicona o metálicas⁹³. Las sustancias sellantes más utilizadas en la actualidad son metil-2-ciano-acrilato: Histoacryl[®] o colas de fibrina como son Tissucol[®] (solución de fibrinógeno, trombina, plasmafibrinectina, factor XIII, plasminógeno, aprotinina). Como sustancias ocluyentes⁹⁴ se han usado catéteres o espirales vasculares.

En un estudio realizado por Takaoka y cols⁹⁵, cinco pacientes con FBP fueron tratados con una inyección de etanol absoluto colocado directamente dentro de la submucosa de la fístula con un broncoscopio flexible. En los resultados obtenidos, no encontraron complicaciones, recomendándolo como primera línea de terapia en pacientes que desarrollaron FBP central postoperatoria y las cuales tenían un orificio inferior a 3mm de diámetro.

En la actualidad, los más utilizados, y con los que se tiene una mayor experiencia, son los sellantes, en concreto la cola de fibrina y el metil-2-ciano-acrilato. Las principales ventajas de Histoacryl[®] es su fácil aplicación, que no necesita prepararse con antelación, que se solidifica inmediatamente y que es de fácil extracción en caso de obstrucción bronquial; en el caso del Tissucol[®] sus 2 componentes se aplican por



separado y se unen a la salida del catéter de angioplastia, formando así una sustancia gelatinosa que tarda horas en solidificarse, pero que recubre una mayor extensión.

Las diferentes sustancias sellantes son más eficaces si se aplican en fístulas menores de 5 mm, aunque la ausencia de complicaciones asociadas a la técnica y el hecho de que el tratamiento puede aplicarse en la misma fibrobroncoscopia que confirma el diagnóstico de la FBP, permiten intentarlo en prácticamente todos los pacientes, dado que ni imposibilita ni retrasa la realización de una cirugía reparadora si se considera necesaria. Aunque éstas sustancias pueden ser efectivas en muchos casos, en otros produce recidiva por desprendimiento del sellado⁹⁶.

Uno de los tratamientos que se han utilizado para intentar conseguir la aproximación de los bordes de la fístula es la instilación de ácido tricloro-acético, de características irritantes cuando se utiliza en concentraciones de 20–40% preparadas a partir del ácido tricloro-acético puro y disolviéndolo en agua destilada⁹⁷.

2.6.3.- Ventana torácica y drenaje

En general, ante la presencia de una FBP crónica tras una resección pulmonar, la ventana de Eloesser se recomienda como un procedimiento intermedio. Éste procedimiento consiste en realizar una incisión de U invertida fijando la pleura parietal con la piel y una resección de uno a tres arcos costales para el drenaje libre de la cavidad torácica (Figura 7 y 8). Se utiliza para el control de la infección y dar tiempo para mejorar nutricionalmente al paciente, mientras se intenta un procedimiento definitivo con cierre de la fístula y obliteración del espacio pleural⁹⁸. Si la enfermedad primaria fue tumoral y el tratamiento quirúrgico es apropiado y no se encuentra recidiva tumoral, los resultados suelen ser satisfactorios para controlar la FBP, con éxitos de entre el 70% y el 90%⁹⁹.



Figura 7. Resección costal



Figura 8. Salida de líquido fibrinopurulento

2.6.4.- Colgajos musculares y epiplón

En los pacientes con FBP precoz tras una cirugía de resección pulmonar, la mayoría de los casos se deben a la dehiscencia de la sutura del muñón bronquial por fallo de cierre del mismo. Salvo que la fístula sea pequeña o no lo permitan las condiciones clínicas del paciente, se intenta el cierre endoscópico o el sellado quirúrgico del muñón¹⁰⁰⁻¹⁰². La técnica utilizada se conoce como técnica de Abruzzini y comprendería la resección del muñón por esternotomía media, a través del mediastino para evitar la zona séptica de la cavidad pleural, la sutura del bronquio en margen sano y el relleno de la cavidad ya sea con músculos, epiplón o su obliteración mediante una toracoplastia, menos usada^{103,104} (Figura 9 y 10).

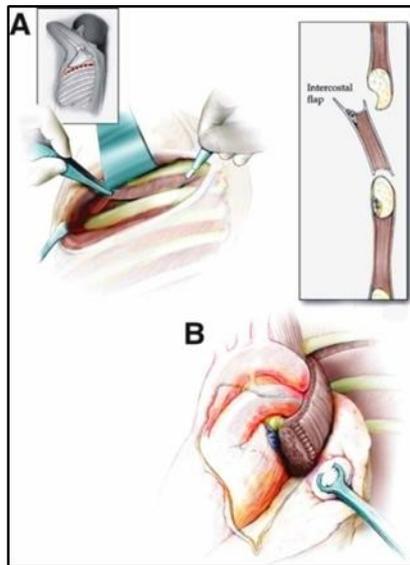


Figura 9. Uso de colgajos de músculo intercostal

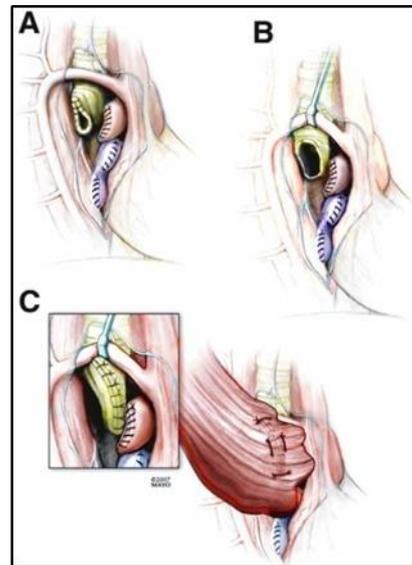


Figura 10. Uso de colgajos de músculo serrato anterior

Como ya hemos dicho, el mejor tratamiento para la FBP es la prevención. Ésta gira alrededor de técnicas quirúrgicas meticulosas y el libre uso de profilácticos. La cobertura del muñón bronquial con colgajos musculares pediculados se ha descrito en pacientes sometidos a terapia neoadyuvante en cáncer de pulmón, protegiendo el muñón bronquial de isquemia adicional y necrosis⁴⁷. El uso de estos colgajos musculares se recomienda en pacientes con empiema pleural en los que se requiere resección pulmonar mayor o cuando el compromiso infeccioso del parénquima pulmonar pone en riesgo el muñón bronquial. Aunque el uso de colgajos musculares pediculados o miocutáneos no está exento de complicaciones, es un método efectivo y confiable para el manejo de pacientes con lesiones cardiotorácicas complicadas, entre las que incluyen FBP y empiema¹⁰⁵. En ocasiones la fístula puede recidivar por atrofia del músculo traslocado con el consecuente fallo para sellar el muñón y llenar la cavidad pleural residual¹⁰⁶. Las mioplastías aportan relleno a las cavidades, vascularización y refuerzo de suturas. Los músculos más comúnmente usados en éste tipo de procedimientos han

sido el dorsal ancho, el pectoral mayor, el serrato anterior y el recto anterior del abdomen.

El uso de un músculo como colgajo requiere la disección quirúrgica de todo o parte del mismo sin interrumpir su vascularización, por lo que es básico tener conocimientos de la anatomía vascular de éste. El factor más importante para la elección del colgajo va a ser la localización de la toracotomía. Otro aspecto a tener en cuenta en la selección del músculo es la forma y la función tanto en el sitio donante como el receptor.

El uso de algunos músculos puede dejar considerables secuelas funcionales y estéticas. Por ello se debe usar uno de un grupo muscular con funciones sinérgicas o realizar técnicas preservadoras de la función y/o de la forma del músculo basadas en la particular circulación e inervación del mismo. El último factor que se debe tener en cuenta en la selección de mioplastías es el arco de rotación, éste depende del avance del músculo desde la zona donante sin desvascularizarse y el alcance del mismo para llegar al sitio receptor. El punto de rotación es determinado por el lugar de entrada del pedículo dominante en el músculo¹⁰⁷.

Por otro lado, se ha descrito el uso del omento para el manejo profiláctico de los muñones bronquiales en riesgo, la desventaja de ésta técnica radica en agregar una laparotomía y manipulación intraabdominal⁹⁸ (Figura 11).

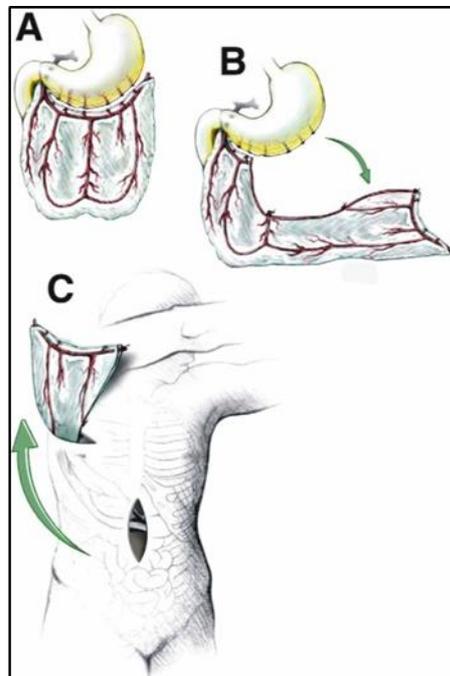


Figura 11. Uso del epiplon

Finalmente, el índice más alto de supervivencia en un FBP se debe a una sospecha temprana, así como, su rápido diagnóstico, manejo inicial y una intervención quirúrgica agresiva.

A modo de indicaciones generales:

Si se hace el diagnóstico de FBP en las primeras 24 a 48 horas del período postoperatorio:

-Se recomienda realizar una toracotomía de urgencia con la inclusión de nuevos puntos de sutura o reamputación y nueva sutura del bronquio, según los hallazgos. Recubrir la sutura con un colgajo de pleura, pericardio o de músculo intercostal con su paquete vasculonervioso.

-Si se trata de una gran fístula que de inicio requiera ventilación mecánica, se deben disminuir los parámetros de presión positiva (PIM y PEEP) hasta los niveles que permitan mantener la adecuada ventilación con la mínima fuga posible a través de la fístula.

-La ventilación de alta frecuencia mejora el intercambio gaseoso y disminuye el escape aéreo.

Cuando el diagnóstico se hace después del tiempo señalado:

-La conducta terapéutica y su secuencia dependerá en general del estado físico del paciente, su enfermedad de base, reserva cardiorrespiratoria preoperatoria, hallazgos operatorios previos y tipo de resección realizada, cronología, magnitud y topografía de la fístula, experiencia quirúrgica y respuesta a los procedimientos aplicados. Es recomendable:

-Evacuar el empiema asociado y esterilizar lo más posible la cámara pleural.

-Punciones torácicas, drenaje pleural (excepcionalmente con aspiración negativa controlada a baja presión) y lavados pleurales.

-Antibioterapia sistémica y local.

-Revisión quirúrgica de la cámara pleural, (extracción de cuerpos extraños y masas de fibrina que impiden el cierre de la fístula) la que se podrá complementar con una operación sobre la pared para reducir su volumen (toracoplastia) o ventana torácica.

- Una vez drenada la cámara pleural se podrán realizar:

-Cauterizaciones endoscópicas repetidas o colocación de sellantes a través del broncoscopio de fibra óptica (habitualmente en fístulas menores de 5 mm de diámetro).



-Transposiciones intratorácicas de colgajos musculares pediculados o libres (pectoral mayor, menor, serrato anterior, músculo intercostal, dorsal ancho, recto anterior del abdomen) o transdiafragmática de epiplón mayor, de acuerdo con el cuadro clínico y tamaño y localización del espacio pleural residual.

-De no existir empiema, lo que habitualmente es excepcional, puede valorarse la posibilidad de practicar reamputación con sutura en parte sana del bronquio o ampliación de la resección pulmonar.

-Neumonectomía en fístulas grandes incontrolables de lóbulo superior. En fístulas de lóbulo medio o inferior derecho, sección del bronquio intermediario conservando el lóbulo superior. Lobectomías en caso de fístulas tras resecciones pulmonares segmentarias o atípicas.

-En el caso de fístulas crónicas es difícil y peligroso intentar el abordaje del bronquio a través de la fibrosis mediastínica, debiendo seguirse el principio de buscar el bronquio en zona sana. En las fístulas derechas, directamente en el mediastino a través de una esternotomía media (técnica de Abruzzini). En el lado izquierdo por toracotomía estándar movilizándolo ampliamente el cayado aórtico. Estas técnicas son de manejo excepcional y sólo a tomar en cuenta después del fracaso de los tratamientos anteriores y de la enfermedad causal.

3

PLASMA RICO EN FACTORES DE CRECIMIENTO

La estimulación de la regeneración de tejidos del organismo sigue siendo uno de los retos más perseguidos y anhelados por los especialistas en varias áreas terapéuticas. Los últimos adelantos se dirigen a aumentar o mejorar los mecanismos intrínsecos de respuesta celular, centrándose en un elemento nuevo: *la sangre y sus componentes*. De ésta manera se llega al plasma rico en factores de crecimiento (PRFC) (Figura 12).

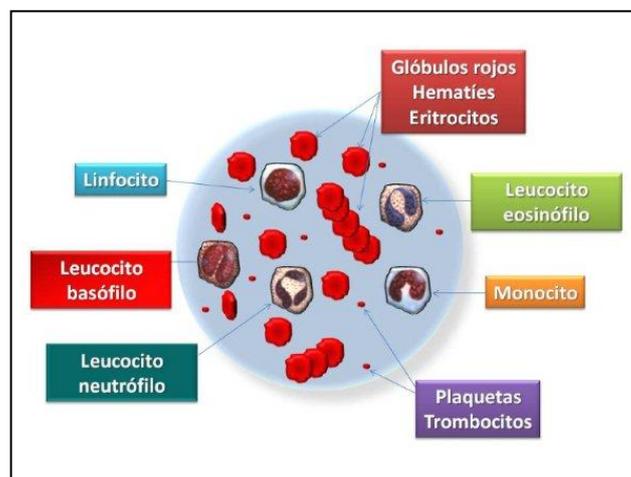


Figura 12. Componentes de la sangre



El plasma sanguíneo es la porción líquida de la sangre en la que están inmersos los elementos formes. Es esencialmente una solución acuosa de composición compleja que contiene un 91% de agua, proteínas (6-8 g/dL), aminoácidos, glúcidos, lípidos, sales, hormonas, enzimas, anticuerpos, urea, gases en disolución y sustancias inorgánicas como sodio, potasio, cloruro de calcio, carbonato y bicarbonato. Además de vehiculizar las células de la sangre, también transporta los alimentos y las sustancias de desecho recogidas de las células. El volumen plasmático total oscila entre 40-50mL/Kg peso.

Young y Medawar¹⁰⁸ en 1940, publicaron un artículo donde explicaban que habían conseguido unir varios nervios periféricos de conejos con plasma sanguíneo. En 1943 Tarlov¹⁰⁹ hizo experimentos similares. Trabajó con plasma de conejo autólogo y homólogo y desarrolló una técnica especial para mejorar la aposición nerviosa del muñón, pero la fuerza y estabilidad de los sellantes era pobre y las técnicas de microcirugía aún no se habían desarrollado, por lo que el número de fracasos fue alto.

Los investigadores han identificado sustancias biológicamente activas en el plasma sanguíneo, que promueven la reparación del tejido afectado. Éstos agentes han sido denominados factores de crecimiento (*GFs*). Marshal Urist¹¹⁰ describió en 1965 la proteína morfogénica ósea (BMP) y desde entonces se han sintetizado estas y otras proteínas, que nuestro organismo posee de forma natural en la sangre y particularmente en las plaquetas. En 1982 Knighton y col., descubren el potencial de los factores de crecimiento como estimuladores de la curación de lesiones y heridas¹¹¹.

Inicialmente los procedimientos de obtención del plasma rico en plaquetas (PRP) partían de cantidades de sangre muy grandes (500 cc) que requerían de unos aparatos especiales y costosos que impedían la utilización en procedimientos ambulatorios¹¹².

En la década de los 90 varios autores utilizaron los concentrados a base de PRP en injertos orales y maxilofaciales, con el fin de obtener la fibrina de manera autóloga, activando el PRP con trombina bovina. De esta forma observaron que, además del beneficioso efecto osteoconductor que aportaba la fibrina, existía un aporte de factores de crecimiento beneficiosos para la curación ósea^{112,113}.

3.1.- Las plaquetas

Las plaquetas son porciones citoplasmáticas de los megacariocitos de la médula ósea. En sangre encontramos de 150.000 a 400.000/ μ l y como no tienen núcleo para replicarse, morirán en 7-9 días.

Además de intervenir en los procesos de hemostasis mediante la formación del coágulo, inician el proceso de reparación de las heridas¹¹⁴ ya que son un reservorio fisiológico de algunos factores de crecimiento que poseen un papel activo en la



regeneración de los tejidos¹¹⁵. Las plaquetas son una fuente rica de al menos tres factores de crecimiento, el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (Pdgf), factor de crecimiento tumoral beta 1 (Tgfb-1) y factor de crecimiento tumoral beta 2 (Tgfb-2)¹¹⁶.

Cuando se produce una herida, las plaquetas se unirán al colágeno expuesto de la pared vascular (adhesión) y a la vez entre sí (agregación) a través de puentes de fibrinógeno. La degranulación (activación) de las plaquetas se puede realizar por varios mecanismos, mecánicos o químicos. Uno de los más fuertes es la adhesión de las plaquetas al colágeno y otros componentes del endotelio, otro sería la presencia de trombina. Al activarse, las plaquetas obtienen una forma esferoidal y espinosa con movimientos de pseudópodos y expulsión de gránulos que liberarán a su vez factores de crecimiento. Una plaqueta en circulación posee alrededor de 35 gránulos alfa y 5 cuerpos densos¹¹⁷. También se liberan nuevos factores agregantes que, junto con la fase plasmática de la coagulación, originarán trombina y posteriormente sustituirán el fibrinógeno soluble por fibrina. Este proceso no se realizará si existe ruptura o fragmentación plaquetaria por lo que las variaciones en la obtención de los preparados plasmáticos ricos en plaquetas modificarán el contenido de factores de crecimiento final¹¹⁸. *In vitro* se ha visto que la membrana de las plaquetas también estimula la actividad mitogénica de las células óseas humanas contribuyendo a la regeneración de tejidos mineralizados¹¹⁹.

Tras la liberación inicial de factores de crecimiento del PRP, las plaquetas sintetizarán y liberarán más GFs durante los 7 días siguientes de su vida. Una vez mueren, los macrófagos que habrán alcanzado la zona estimulados por las propias plaquetas, liberarán a continuación más factores de crecimiento¹²⁰. Las plaquetas desempeñan un papel muy importante dentro del PRP, ya que constituyen la principal fuente de actividad mitógena en el plasma sanguíneo¹²¹ y van a funcionar como un vehículo portador de factores de crecimiento y de otras proteínas que desempeñan un papel importante en la biología ósea, como son la fibronectina y otras proteínas adhesivas¹²².

En 1993, Hood¹²³ describió el uso de concentrados plaquetarios para formar gel plaquetario, extraído mediante un método de centrifugación diferencial¹²⁴. Se obtienen entre 50 y 60 ml. de concentrados plaquetarios que son mezclados con trombina bovina y que han sido de gran utilidad en cirugía cardíaca para sellar erosiones ocasionadas por la disección en las reintervenciones, así como para el sellado de las líneas de suturas y de las prótesis^{123,125}. Se ha utilizado para el sellado de áreas cruentas y como hemostático en cirugía de hígado y riñón¹²³, y además en la reparación de fístulas de líquido cefalorraquídeo en la duramadre con porcentajes de éxito del 95%¹²⁶.

Otro grupo de investigadores, dirigidos por Marx en 1998¹¹², estudiaron el comportamiento de las plaquetas de la sangre como responsables de la reparación celular, encontrando los tres factores de crecimiento ya comentados: Pdgf, Tgfb-1 y



Tgf β -2. En el 2004 éste mismo autor, describió otros siete factores de crecimiento implicados¹²⁰. De forma que, Anitua en 1999 propone utilizar en clínica el PRFC que contienen importantes GFs como: Tgf β -1, factor de crecimiento vascular derivado del endotelio (Vegfa), factor de crecimiento insulínico 1 (Igf-1), ya que dichas proteínas tienen propiedades como la migración celular dirigida (quimiotáxis), proliferación y la diferenciación celular, procedimientos claves en los procesos de reparación y regeneración¹²⁷⁻¹²⁹.

Tabla VI. Principales Constituyentes de los Orgánulos Plaquetarios y Actividades

| | Constituyentes | Actividad |
|-------------------------------------|--|--|
| Cuerpos Densos | ADP | Agregación |
| | ATP | |
| | Ca ²⁺ | Pro-agregación |
| | Serotonina | Agregación |
| Gránulos α | Factor plaquetario 4 (PF4) | Proteína neutralizador de heparina |
| | Trombomodulina | Inhibición de la actividad de trombina |
| | β tromboglobulina (β -TBG) | Antiheparina |
| | Trombospondin (TSP-1) | |
| | Fibronectina | Glicoproteína adhesiva |
| | Factor Van Willebrand | |
| | Pdgf | Factores de crecimiento para fibroblastos, queratinocitos, células endoteliales y musculares |
| | Tgf β -1 | |
| | Factor de crecimiento de hepatocito (HGF) | |
| | Factor de crecimiento fibroblástico básico (bFgf) | |
| | Factor de crecimiento vascular endotelial (Vegfa, Vegfc) | |
| | Factor de crecimiento epidérmico (Egf) | |
| | Inhibidor C1 | Inhibidor |
| | Fibrinógeno | procoagulante |
| Antígeno Factor VIII | Mejorador de la adhesión plaquetaria | |
| Macroglobulina α_2 | Antiproteasas | |
| Antiplasmina α_2 | | |

Fuente: Bocci, V, 2002¹³⁰



3.2.- *Desventajas del uso de PRFC*

Sin duda, son innegables los buenos resultados de los tratamientos con concentrados de PRFC, en relación a la mejor y más rápida regeneración de los tejidos donde se han aplicado^{112,127,131}. Por otro lado, las dosis de GFs en el PRFC son dosis terapéuticas y no filológicas, y que por lo tanto actúan sobre el incremento de la proliferación celular y la replicación del ADN de manera indirecta, a través de complejas vías de transducción de señal.

Hay evidencias que muestran que los GFs encontrados en las plaquetas, aparecen sobre expresados en los tejidos tumorales. Estos hechos nos plantean las siguientes preguntas: 1) ¿El aumento de las concentraciones de éstos GFs utilizados en las dosis terapéuticas habituales, y en determinados tejidos y localizaciones anatómicas, podría iniciar un proceso oncogénico en tejidos normales?. 2) ¿Podrían inducirlo en tejidos displásicos o que han sido expuestos a carcinógenos?. 3) ¿Qué mecanismos bioquímicos nos harían sospechar que la oncogénesis se podría producir de una manera dosis-dependiente o tiempo dependiente?¹¹⁸.

No se ha descrito mayor riesgo de infecciones, transmisión de enfermedades o cualquier otro efecto indeseable con la utilización de PRFC. Tampoco se conocen las concentraciones ideales de cada factor de crecimiento o la dosificación adecuada para cada situación terapéutica en concreto y también hay que destacar la potencial existencia de GFs que todavía no han sido descritos^{127,132}.

4

FACTORES DE CRECIMIENTO CELULAR

4.1.- *Definición*

Los factores de crecimiento (GFs) son péptidos grandes o glicoproteínas que ejercen diversos efectos sobre el crecimiento, el metabolismo y la diferenciación celular; regulando diversos procesos biológicos a través de interacciones con receptores celulares que funcionan como un ligando-activador de enzimas intracelulares¹³³.

Los GFs fueron descubiertos inicialmente debido a su capacidad para estimular la mitosis continua de células quiescentes, en un medio nutricionalmente completo que carecía de suero. Esto distingue a los GFs de los elementos esenciales, cofactores y nutrientes requeridos para los procesos metabólicos, pero que no son suficientes para iniciar la división celular¹³⁴.



4.2.- Síntesis

Los GFs son producidos localmente a nivel del tejido lesionado, y sistémicamente desde diferentes fuentes, siendo sintetizados por muchos tipos celulares que intervienen en la reparación de los tejidos¹³⁴. Las plaquetas almacenan los GFs en los gránulos alfa, que tras una lesión se liberan al medio extracelular durante el proceso de la coagulación. La concentración de los GFs alcanzada tras la degranulación de los gránulos alfa se incrementa de forma lineal¹³².

4.3.- Mecanismo de acción

Los GFs actúan sobre la célula diana de diversas formas: estimulación endocrina, paracrina, yuxtacrina, autocrina e intracrina¹³⁴.

Un modo de acción endocrino tiene lugar cuando un GFs secretado por una célula ejerce su acción sobre otras células a distancia. El paracrino ocurre cuando el GFs tiene efecto sobre las células adyacentes y el modo yuxtacrino es similar, aunque el GFs ejerce su efecto cuando está unido a la membrana celular ó a la matriz extracelular. Las acciones autocrinas están mediadas por un GFs sobre su propia célula de origen, después de su secreción dentro del medio extracelular¹³⁵. Una variación de la acción autocrina ha sido denominada intracrina y fue descrita por primera vez en una variante oncogénica del PDGF denominada v-sis¹³⁶. La acción intracrina ocurre dentro de la célula de origen, y es así independiente de la secreción del GF¹³⁵. Los GFs liberados desde los macrófagos, neutrófilos, linfocitos, plaquetas y fibroblastos, se unen a las células diana por una vía específica a través de los receptores de superficie celulares, induciendo a las células a migrar, dividirse o producir otras proteínas (síntesis de la matriz) y factores requeridos para la reparación¹³⁷. Una interrelación compleja de lazos de “feed-back” surge en el medioambiente tisular, donde los GFs se regulan así mismos los unos a los otros durante el crecimiento tisular¹³⁷.

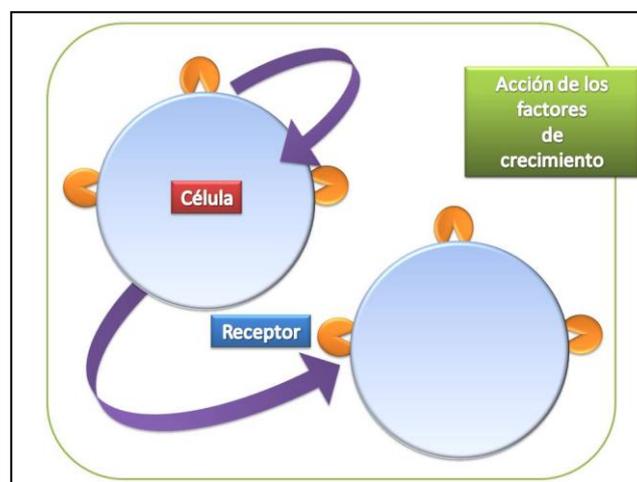


Figura 13. Acción de los GFs sobre las células productoras



Los efectos de los GFs están mediados por la activación de receptores celulares específicos¹³⁸. Los receptores son complejos de proteínas transmembrana que pueden unir GFs a sus dominios extracelulares con una alta afinidad y especificidad y pueden transmitir la información generada por la unión produciendo cambios intracelulares. Las similitudes estructurales entre los receptores celulares pueden explicar la reactividad cruzada entre sustancias¹³⁷. Los receptores de los GFs constan de por lo menos tres dominios: *una región extracelular* que se une al factor de crecimiento con alta afinidad y especificidad, un *segmento intramembrana*, y uno o más *dominios intracelulares* que interactúan con señales moleculares dentro de la célula. A pesar de la diversidad de GFs y receptores caracterizados, todos los receptores comparten estos rasgos estructurales. Cuando el mismo ligando se une a dos receptores vecinos ocurren cambios conformacionales que son transmitidos al dominio intracelular, y origina una serie de cambios citoplasmáticos que dan lugar al inicio de la transcripción de los ácidos nucleicos. Los receptores de los GFs ejercen su función uniéndose a enzimas intracelulares a las que activan. Con la excepción de los receptores para la familia de Tgf β , todos los receptores de los GFs estudiados tienen actividad tirosinquinasa. Así en muchos casos, los fenómenos intracitoplasmáticos se llevan a cabo a través de esta enzima, la cual fosforila proteínas citoplasmáticas, alguna de las cuales permanecen en el citoplasma y otras pasan al núcleo donde producen una activación genética¹³⁷. Los receptores para Tgf β y moléculas relacionadas fosforilan substratos de serina y treonina en lugar de tirosina¹³⁹.

Varios principios generales gobiernan los pasos a través de los cuales los GFs activan sus receptores, aunque hay detalles específicos que difieren para cada combinación GFs-receptor. La unión de un GFs al dominio extracelular de su receptor, conduce a una dimerización u oligomerización del receptor¹³⁵.

Los cambios conformacionales inducidos por la unión al ligando activan el dominio intracelular quinasa del receptor, lo cual conduce secuencialmente a una fosforilación del receptor, por un mecanismo de transfosforilación, y entonces a la fosforilación de otros substratos. La autofosforilación, particularmente sobre los residuos de tirosina, crea una serie de sitios cercenados para otras proteínas intracelulares que contienen módulos denominados dominios SH₂, por su similitud con una región de aproximadamente 100 aminoácidos que fue identificada por primera vez en el oncogén celular c-src¹⁴⁰. Se ha identificado otra clase de lugar de unión a fosfotirosina, denominado dominio PTB. Aunque estructuralmente distinto del dominio SH₂, es funcionalmente equivalente en mediar interacciones entre una tirosina fosforilada y una proteína de señalización. Así, los receptores de GFs activados con múltiples tirosinas fosforiladas en diferentes contextos de aminoácidos, vuelven al punto focal para la agregación intracelular transitoria de muchas proteínas que contienen SH₂ - o PTB-. Estas proteínas incluyen una variedad de intermediarios en sendas de transducción de señal, con los últimos efectos amplificados y diversificados respecto a la señal inicial inducida por la unión de los GFs a su receptor¹⁴¹.



En el contexto de las acciones sobre el núcleo de los GFs, los cambios a largo plazo que se dan en las células inducidas por GFs son secundarios a alteraciones en la expresión de genes. Estos cambios no son sino un resultado de las múltiples rutas de señales inducidas después de la unión de proteínas sobre el receptor activado. Así, hay rutas que reflejan una respuesta primaria a los GFs, de la que dependen una serie de interacciones proteína-proteína y pasos enzimáticos, en los que intervienen miembros de la familia de la proteína quinasa activada por mitogénesis (*Mitogen-activated protein kinase*, MAPK), que no requieren una nueva síntesis de proteínas celulares. La proteína c-fos se combina con c-jun como componentes de la proteína-1 activadora del factor de transcripción, el cual a su vez regula la actividad de una variedad de genes¹⁴². De este modo, la expresión de genes y la biosíntesis de proteínas están alteradas después de que son estimuladas las señales del factor de crecimiento. Una vía relacionada, mediada por la activación de receptores de GFs, conduce a la estimulación de otros miembros de la familia MAPK denominados quinasa c-jun N-terminal (JNK). Las JNK fosforilan c-jun sobre dos residuos de serina, que son críticos para su activación como un factor de transcripción¹⁴³. Así, c-jun y c-fos pueden ser inducidos a través de la ruta de señales estimulada por los GFs.

Existen también otras cascadas de MAPK con diferentes efectos sobre el núcleo que son activadas por los receptores de los GFs. Como podemos observar la acción de los GFs a través de diversas rutas tiene una gran repercusión en la biología de la célula, y por ende, en la del tejido en el que se localiza.

4.4.- Funciones

Los GFs ejercen funciones distintas en pacientes caquéticos y malnutridos, así como en pacientes con cáncer. De hecho, son secretados por muchos tipos celulares como función basal o de respuesta a una lesión, como una herida o un proceso carcinogénico. Son los mediadores del crecimiento y la reparación celular fisiológica y patológica que incluye procesos tales como la embriogénesis, la reparación de tejidos y la carcinogénesis.

Las sendas enzimáticas que se inician por la unión de un factor de crecimiento a su receptor conducen a largo plazo a cambios en la expresión génica y de la síntesis proteica que alteran el fenotipo de células individuales y tejidos, y tienen profundos efectos sobre el crecimiento y desarrollo completo del animal^{134,135}.

Los factores de crecimiento son proteínas solubles de señalización que regulan acontecimientos claves en los procesos de reparación tisular, como son la proliferación celular, la capacidad para reclutar células al foco de lesión mediante el proceso de quimiotaxis, la capacidad de diferenciar estas células a elementos capaces de reproducir la función apropiada para el tejido en el que se encuentran y, por último, hacer que estas células sean capaces de sintetizar la matriz extracelular necesaria para dar forma al



tejido en el que asienta la lesión¹³². Estas propiedades demostrables *in vitro* llevaron a la conclusión de que tales GFs juegan un importante papel en la reparación^{138,144}.

Hoy en día sabemos que en las plaquetas se encuentran elevadas concentraciones de múltiples GFs, lo cual resulta en una mayor y más efectiva interrelación entre los mismos. Así, la combinación de Pdgf-2 e Igf-1 o bien la de Pdgf-2 y el factor de crecimiento tumoral α (Tgf- α) es más efectiva que la acción de cada uno de ellos por separado^{145,146}. De hecho, se sabe que en la regeneración ósea, Pdgf y Tgf- β tienen un potente efecto sinérgico quimiotáctico sobre los osteoblastos humanos^{147,148}.

4.5.- Clasificación y tipos

Una vez conocidos los genes que codifican los GFs y su secuencia de aminoácidos, se ha intentado agruparlos en una serie de familias (Tabla VII), en base a las homologías estructurales existentes entre ellos. En cualquier caso, hemos de tener en cuenta que todavía no se conoce la secuencia de bases que codifican un gran número de GFs de existencia probada.

Tabla VII. Familia de Factores de Crecimiento

| FAMILIA | MIEMBROS |
|-------------|---|
| Egf | Egf Tgfa |
| Tgf β | Tgf β |
| Hbgf | Fgf a Fgf b Ecdgf |
| Pdgf | Pdgf-AA Pdgf-AB Pdgf-BB |
| Igf | Igf-1 Igf-2 |
| Ngf | Ngf Bdnf |
| Vegf | Vegfa Vegfb Vegfc Vegfd Vegfe |

4.6.- Otras proteínas relacionadas con la reparación tisular

4.6.1.- Colágeno

El colágeno es la proteína más abundante en el cuerpo humano, representando el 30% de su peso en seco. El hueso, la piel, el tendón, el cartílago, los ligamentos y las



paredes vasculares son especialmente ricas en colágenos, los cuales son esenciales en todos los tejidos y desarrollan un importante papel en el mantenimiento de la integridad estructural sobre numerosos tejidos y órganos. Además, los colágenos están implicados en muchas otras funciones biológicas importantes, tales como la unión celular, la quimiotaxis, la agregación plaquetaria y la filtración a través de la membrana basal.

El colágeno desempeña también un papel importante en la curación de heridas y fracturas. Por otro lado, la excesiva formación de colágeno representa un problema, ocasionando fibrosis de diferentes órganos y tejidos¹⁴⁹. Pertenecen a una familia de más de 25 miembros que son producidos por varios tipos celulares y se diferencian en su estructura molecular, características morfológicas, distribución, funciones y patologías. Los colágenos tipo II y XI se encuentran principalmente en tejido cartilaginoso¹⁵⁰.

En el presente trabajo hemos estudiado el colágeno tipo II $\alpha 1$ (Col2a1), que forma parte de los colágenos que forman largas fibrillas¹⁵¹. También pertenecen a este mismo grupo los colágenos tipo I, III, V y XI. En un estudio *in vitro*, se observó como la exposición de células mesenquimales a Tgf β -1 inducía la expresión de colágeno tipo II en cultivos en monocapa, y como estas células se diferenciaban rápidamente a condrocitos maduros¹⁵².

Entre los genes candidatos a participar en el proceso artrósico, parecen tener un papel importante los que codifican para las proteínas estructurales de la matriz extracelular del cartílago, particularmente los que codifican para Col2a1. Hay varios indicios de que las alteraciones en este gen podrían ser causa de la degeneración de la articulación en el proceso artrósico, tales como la asociación de diversas mutaciones con distintas osteocondrodisplasias o la propia función de Col2a1, que codifica para las proteínas más abundantes de la matriz extracelular¹⁵³⁻¹⁵⁵.

5

LAS CÉLULAS MADRE

En los últimos años el término “célula madre” (CM) ha tomado gran importancia desde que la terapia génica y la clonación son temas de discusión en la literatura mundial. Sin embargo, el estudio de su biología no es el resultado de investigaciones recientes, ya que en 1916, Danchakoff describe la presencia de una célula como precursora de otras en la médula ósea¹⁵⁶. En general, una CM se define como una célula que tiene la capacidad de dividirse (autorreplicarse) por períodos indefinidos durante toda la vida de un individuo y que bajo las condiciones apropiadas o señales correctas del microambiente puede dar origen (diferenciarse) a diferentes linajes con características y funciones especializadas como miocitos, neuronas o hepatocitos¹⁵⁷⁻¹⁶⁰.



5.1.- Tipos de células madre

Muchos de los términos usados para definir una CM, obedecen además, al comportamiento de éstas en condiciones *in vivo* o *in vitro*¹⁶¹, de ahí que existan diversas clasificaciones. De acuerdo al tipo de tejido que originan, existen cuatro tipos de células madre: totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes. El término “totipotencial” (del latín *totus*, que significa completo) hace referencia al potencial que tienen estas células de generar un embrión completo (tejido embrionario y extraembrionario). “Pluri” (del latín *plures*, que significa muchos o varios) es utilizado para describir las células madre pluripotentes que pueden dar origen a progenitores que forman cualquiera de las tres capas germinales embrionarias: mesodermo, endodermo y ectodermo. Es importante destacar que para que una CM pueda considerarse como pluripotente tiene que cumplir las siguientes condiciones: en primer lugar, una única célula debe ser capaz de diferenciarse a progenitores especializados procedentes de cualquier capa embrionaria; en segundo lugar, demostrar la funcionalidad *in vitro* e *in vivo* de las células en las que se ha diferenciado, y, finalmente, que se produzca un asentamiento claro y persistente de éstas en el tejido blanco, tanto en presencia como en ausencia de daño en los tejidos en los cuales se injerta¹⁶².

Las células madre multipotenciales son aquellas que pueden dar origen a precursores relacionados solamente con una de las tres capas embrionarias; por ejemplo, células madre que dan origen a tejidos derivados exclusivamente del endodermo como tejido pancreático o pulmonar. La última categoría corresponde a las células madre unipotenciales, que corresponden a las células que solo pueden generar células hijas que se diferencian a lo largo de una sola línea celular, tal y como hace referencia su nombre (del latín *unus*: uno). Hasta hace algunos años, se consideraba a las células madre hematopoyéticas de médula ósea en esta categoría, ya que se relacionaban solamente con la generación de células sanguíneas, esto antes del reconocimiento del fenómeno conocido como “*plasticidad de las células madre*”. La mayoría de las células madre de un tejido específico que no ha sufrido ningún tipo de agresión o daño son del tipo unipotencial y son las responsables de la fase fisiológica de auto-renovación tisular, donde la cantidad de células perdidas es igual al número de nuevas células. Sin embargo, si el tejido es alterado en su estructura básica a través de un fenómeno lesivo y se requiere de diversos tipos celulares para su reparación, se pueden activar células del tipo pluripotencial para reparar el daño¹⁶¹.

Ahora, si las células madre se clasifican de acuerdo al tejido de donde se pueden obtener, éstas pueden proceder del embrión o de un organismo adulto, de ahí que se hable de células madre embrionarias y de células madre adultas. Las células madre embrionarias pueden ser obtenidas a partir de las primeras etapas de formación del embrión cuando el óvulo fecundado es una esfera compacta o mórula¹⁶³; éstas son



entonces precursores totipotenciales con capacidad de proliferar indefinidamente *in vitro*. El primer reporte acerca del aislamiento de células madre embrionarias provenientes de blastocistos humanos data de 1994, cuando se determinó que estas células *in vitro* se diferencian espontáneamente en estructuras multicelulares conocidas como “cuerpos embrionarios”, que contienen elementos de las tres capas germinales a partir de las cuales se pueden formar varios tipos de células como cardiomiocitos, neuronas y progenitores hematopoyéticos entre otros^{164,165}.

5.1.1.- Células madre embrionarias

Las células madre embrionarias (derivadas del blastocisto) y las células embrionarias germinales (derivadas tras la implantación del blastocisto) son similares en muchos aspectos; ambos tipos de células son capaces de replicarse y dividirse en cultivos por largos períodos de tiempo sin mostrar alteraciones cromosómicas, además expresan una serie de marcadores característicos de progenitores totipotenciales que facilitan su identificación; sin embargo, las células madre embrionarias derivadas del blastocisto y las células germinales difieren del tejido de donde provienen y de su comportamiento *in vivo* ya que las células madre embrionarias son capaces de generar teratomas mientras que las células germinales humanas no^{166,167}. Una de las ventajas del uso de células madre embrionarias en investigación es su habilidad de proliferar indefinidamente ya que son capaces de generar una gran variedad de grupos celulares, lo que permite que bajo ciertas condiciones puedan ser manipuladas *in vitro* con el fin de producir precursores de un linaje específico y contribuir así al tratamiento de enfermedades como la diabetes y el Parkinson en las que existen tejidos claramente comprometidos. Además, pueden ser utilizadas para estudios de enfermedades producidas durante el desarrollo embrionario y contribuir a identificar sus bases genéticas¹⁶⁸. Sin embargo, al tratarse de células muy indiferenciadas, éstas pueden inducir la formación de ciertas neoplasias como teratomas y las implicaciones éticas generadas por su uso son un punto muy importante a tener en cuenta¹⁶⁹.

5.1.2.- Células madre adultas

Además de las células madre embrionarias, se han identificado células madre adultas que se pueden encontrar en la mayoría de los tejidos de un individuo totalmente desarrollado como la médula ósea, el sistema neuronal, el sistema gastrointestinal, el músculo esquelético, el músculo cardíaco, el hígado, el páncreas y el pulmón. En un principio se pensó que las células madre adultas estaban predeterminadas a diferenciarse a un tipo celular procedente de su mismo tejido de origen o al menos de su misma capa embrionaria; sin embargo, esta idea ha sido reevaluada por varios grupos de investigadores cuyos estudios sugieren que las células madre adultas son capaces de diferenciarse funcionalmente a células



especializadas procedentes de capas embrionarias distintas a las de su origen. Incluso, algunos de estos grupos han sido capaces de probar la pluripotencialidad de CM adultas procedentes de la médula ósea o de sistema nervioso central^{170,171}.

Esta “habilidad biológica”, propia de estas células adultas, se fundamenta en la capacidad que tienen de alterar drásticamente su fenotipo en respuesta a los cambios del microambiente donde se desarrollan, y se le conoce en la actualidad como “fenómeno de plasticidad”¹⁷²⁻¹⁷⁵. Esta característica fue reconocida por primera vez en estudios realizados en progenitores derivados de la médula ósea, donde se observaron cambios en el fenotipo en células inmaduras bajo condiciones controladas que simulaban microambientes diferentes al medular¹⁷⁶. Los mecanismos moleculares que conducen a los cambios de linaje celular dentro del sistema hematopoyético están siendo estudiados. Sin embargo, los resultados más recientes acerca de la “plasticidad” de las células madre adultas contradicen el dogma sobre la diferenciación de las células madre restringida a su tejido de origen. Evidencias obtenidas tanto *in vivo* como *in vitro* muestran que las células madre adultas, originadas en un tejido determinado, tienen la capacidad de producir células con una expresión fenotípica característica de otros tejidos cuando se transfieren a un microambiente diferente al original.

5.1.2.1.- Fuentes de obtención de CM adultas

Éstas células pueden ser aisladas principalmente de médula ósea que puede producir células con propiedades muy similares a hepatocitos, neuronas y cardiomiocitos¹⁷⁷⁻¹⁸², sin embargo, también pueden ser aisladas de sangre de cordón umbilical y tejido adiposo (ADSC) de donde se han logrado realizar cultivos que han permitido establecer sus propiedades funcionales y fenotípicas. Así mismo de se han podido cultivar de otros tejidos como páncreas, hígado, músculo esquelético, dermis, membrana sinovial, hueso trabecular, tejido pulmonar, pulpa dental y ligamento periodontal.

Respecto al aislamiento y cultivo a partir de tejido adiposo, las células obtenidas de ésta fuente tienen una morfología, fenotipo y capacidad de diferenciación y es más fácil acceder a muestras de tejido adiposo a través de procedimientos quirúrgicos habituales como la liposucción o la abdominoplastía.

5.1.2.2.- Mecanismo de diferenciación de las CM adultas

Existen cuatro modelos que explican los posibles mecanismos que llevan a las CM adultas a diferenciarse a células de un tejido diferente al original en respuesta a cambios del microambiente o procesos de reparación tisular; el primer modelo es el que corresponde al conocido convencionalmente sobre diferenciación celular en el



que una célula progenitora restringida hacia un solo linaje da origen a células de su misma estirpe (Figura 14a). El segundo modelo se refiere a la capacidad que tiene las CM adultas de diferenciarse en progenitores más activos en el ciclo celular que pueden dar origen a su vez a células de linajes celulares diferentes, tal es el caso de la CM hematopoyética la cual puede generar dos progenitores celulares diferentes (progenitor mieloide y progenitor linfoide) que dan origen a su vez a linajes celulares diferentes (Figura 14b). En el tercer modelo, conocido como trans-diferenciación, las CM de un tejido particular bajo condiciones de un microambiente diferente al original, adquieren la capacidad de generar células de muy diversos linajes (Figura 14c). El último modelo hace referencia a la capacidad que poseen las células maduras de de-diferenciarse y re-diferenciarse a células del mismo tejido que le dio origen o a un tejido diferente¹⁷⁹ (Figura 14d).

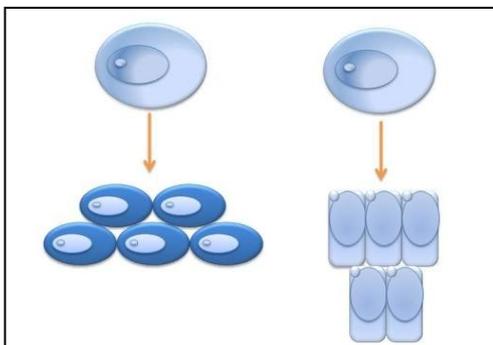


Figura 14a. Modelo clásico de diferenciación celular

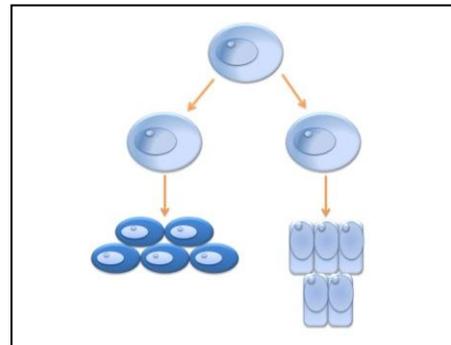


Figura 14b. Modelo de diferenciación celular para precursores comprometidos

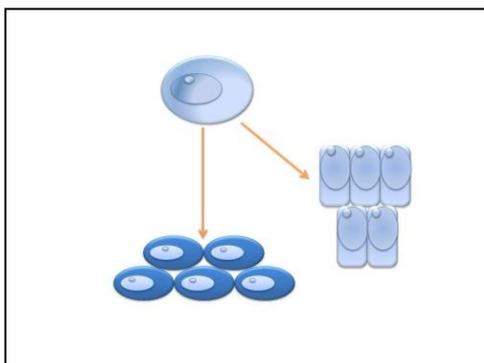


Figura 14c. Modelo de trans-diferenciación

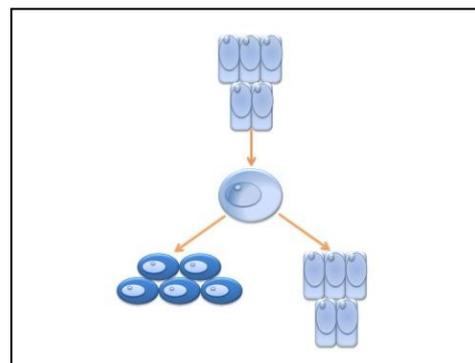


Figura 14d. Modelo de de-diferenciación y re-diferenciación

6

LA BIOLOGÍA MOLECULAR EN EL ESTUDIO BRONQUIAL

El término biología molecular fue utilizado por primera vez en 1945 por William Astbury para referirse al estudio de la estructura química y física de las macromoléculas biológicas. Por aquel tiempo, los bioquímicos habían descubierto muchas reacciones químicas intracelulares fundamentales y habrían comprendido la importancia de las reacciones específicas y de la estructura de las proteínas para definir numerosas propiedades de las células.

Sin embargo, el desarrollo de la biología molecular tuvo que esperar a que los adelantos más prolíficos se llevaran a cabo estudiando sistemas “sencillos” tales como bacterias y bacteriófagos (virus bacterianos), los cuales proporcionan información acerca de los procesos biológicos básicos de una forma más rápida que las células animales.

A pesar de que las bacterias y los bacteriófagos son en sí mismos biológicamente muy complicados, permitieron a los científicos identificar el ADN como la molécula que contiene la mayoría, si no toda, de la información genética de una célula. Después de éste descubrimiento, el nuevo campo de la genética molecular avanzó rápidamente a finales de la década de los años 50 y principios de los años 60 proporcionando nuevos conceptos a una velocidad que sólo puede compararse con la del desarrollo de la mecánica cuántica en los años 20. El éxito inicial y la acumulación de una gran cantidad de información permitieron a los investigadores aplicar las técnicas y los poderosos métodos lógicos de la genética molecular a temas como la función nerviosa y muscular, la estructura de membrana, el modo de acción de los antibióticos, la diferenciación celular, el desarrollo, inmunología, etc.

En el año 2001 se publicó la secuencia completa del genoma humano, y poco después se completó la del ratón y otras especies¹⁸³. Esta información, constituye una excelente base para la investigación de los procesos moleculares relacionados con múltiples procesos patológicos o el mecanismo de acción de hormonas y fármacos. Sin embargo, la secuencia del genoma sólo nos aporta una información estructural del mismo y aún estamos muy lejos de conocer la anotación funcional de la mayor parte de los genes. Para intentar llenar este vacío, se ha desarrollado rápidamente la genómica funcional y en la actualidad disponemos de técnicas que permiten explorar a gran escala y con rapidez las funciones del genoma de múltiples especies.

6.1.- Regulación de la expresión génica

Todas las células del organismo poseen la misma información genética, pero es la expresión de determinado número de genes lo que define a los distintos tipos



celulares. Esta expresión diferencial determina la producción y la activación de determinadas proteínas en respuesta por ejemplo, a los procesos de desarrollo celular e influencia ambiental. Algunos genes se expresan en niveles constantes en muchos tipos celulares, mientras que otros sólo se expresan en determinadas células o en respuesta a determinados estímulos.

Los genes codifican proteínas, y son estas las que llevan a cabo las distintas funciones en la célula determinando sus propiedades. La producción de proteínas a partir de la información genética está regulada a distintos niveles. (Figura 15)

El primer nivel hace referencia la integridad física del ADN, que como es sabido se encuentra fuertemente empaquetado en la cromatina, la cual controla el grado al que pueden actuar los reguladores de la transcripción y la maquinaria de ARN polimerasa sobre determinados genes.

El inicio de la transcripción está estrictamente controlado por la presencia de co-reguladores y cofactores. El ARN producido es sometido a distintos procesos de maduración que afectará a sus propiedades. La funcionalidad del ARN mensajero (ARNm) depende del transporte desde el núcleo al citosol, de la estabilidad y ratio de degradación, y de la eficiencia translacional del transcrito. Y por último, la función y estabilidad de las proteínas producidas está regulada por modificaciones postraslacionales, por su localización y por su interacción con otras proteínas o ligandos. Lo ideal sería estudiar todos estos procesos dinámicos del genoma y las proteínas de manera conjunta, pero hasta ahora las técnicas de alta resolución sólo permiten mediciones estacionarias¹⁸⁴.

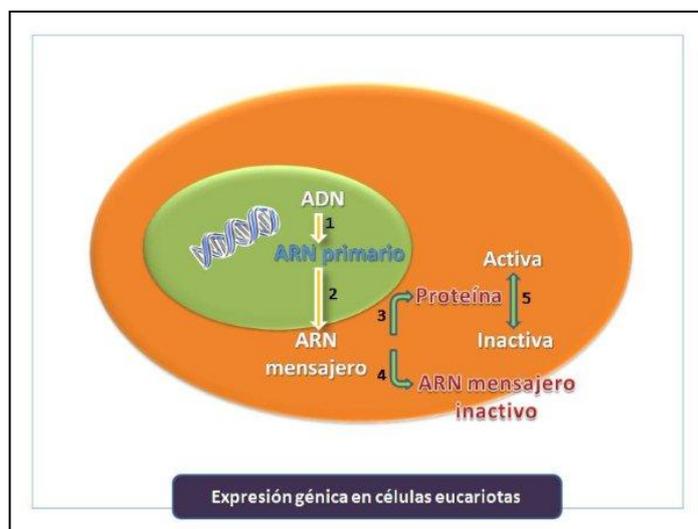


Figura 15. Regulación de la expresión génica

El inicio de la transcripción está regulado por una gran variedad de factores de transcripción. Algunos elementos en el inicio de la transcripción génica son comunes a muchas células, como lo son los factores de transcripción generales o la maquinaria de la ARN polimerasa. En última instancia, la cantidad de un ARN específico en una célula depende por tanto de la disponibilidad de todos estos factores.

La ARN polimerasa interacciona con la región promotora de un gen para el inicio de la transcripción. Cada factor es capaz de reconocer una región específica en el ADN¹⁸⁵. Puede ocurrir que determinados nucleótidos presentes en la región promotora condicionen una interacción más o menos intensa. El mecanismo general se resume de esta manera. El factor de transcripción IID se une a la caja-TATA, localizada en la región promotora. Se recluta al resto de la maquinaria ARN polimerasa y se inicia la transcripción. Estos factores controlan las proteínas y los ARNm que van a ser producidas en una célula, dándole así especificidad al sistema¹⁸⁶.

Distintos tipos de células pueden tener el mismo tipo de factores, pero es la diferencia en la concentración de éstos y las distintas combinaciones entre ellos lo que permite la activación o la inhibición de determinados genes en un momento dado. Así, dependiendo del lugar del ADN al que se unan los factores de transcripción en relación con el punto de inicio de la misma, y en qué combinación, se puede mediar la activación o la inhibición de determinados genes específicos. Incluso factores que no se han unido al ADN pueden influir sobre este proceso pudiéndose unir a otros que si se encuentran interaccionando con el material genético¹⁸⁷.

6.2.- PCR y PCR cuantitativa en tiempo real

Ideada por el científico Kary Mullis a mediados de los 80 y más conocida como PCR (*Polymerase Chain Reaction*)¹⁸⁸, la reacción en cadena de la polimerasa ha cambiado el curso de las ciencias biológicas y biomédicas más que cualquier otra técnica inventada durante el siglo XX. El gran éxito científico de la PCR reside en que permite obtener *in vitro* un gran número de copias de fragmentos específicos de ADN, basándose en un principio muy sencillo: la utilización de mecanismos similares a los empleados por la propia célula en la replicación del ADN durante la división celular.

Gracias a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se puede obtener un número muy alto de copias de ADN partiendo de un fragmento determinado del mismo¹⁸⁹. Básicamente, consiste en someter al ADN a un ciclo de temperaturas siguiéndose estos pasos: (i) desnaturalización, (ii) alineamiento de los cebadores y (iii) extensión.



Una evolución importante de esta tecnología ha sido el desarrollo de la PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCR). La RT-PCR sigue el principio de la PCR convencional, pero con una serie de ventajas. Igualmente se necesita un ADN (cADN), una polimerasa, unos cebadores y unos fluorocromos¹⁹⁰. Debido a que cada nuevo fragmento sintetizado lleva incorporado fluorocromos, es posible saber exactamente y en cada ciclo la cantidad de moléculas sintetizadas, que será proporcional a la señal de fluorescencia emitida. La cinética de la reacción de amplificación es por tanto conocida y registrada. Un algoritmo específico convierte la señal luminosa en un número que es usado por nosotros para saber cuánto se está generado en un determinado pocillo y en un determinado momento. Los sistemas de detección por fluorescencia empleados en esta técnica son de dos tipos; agentes intercalantes (SYBR Green) y sondas específicamente diseñadas que tienen incorporados los fluorocromos (Taqman). En esta Tesis Doctoral se ha hecho uso del primero de los sistemas. Esta técnica es muy rápida y fiable, y permite hacer estudios de expresión génica con facilidad, especificidad y elevada sensibilidad^{191,192}.



JUSTIFICACION





En la actualidad, la FBP continúa siendo una temible complicación postquirúrgica, a pesar de los avances experimentados en los cuidados perioperatorios y postoperatorios, así como de las técnicas quirúrgicas empleadas en Cirugía Torácica. La FBP compromete de una forma muy seria la vida del paciente y sus posibilidades de recuperación total tras la intervención, relegando a un segundo plano todos los esfuerzos quirúrgicos y médicos realizados por tratar y en última medida curar al paciente de la neoplasia que amenaza su vida.

Las FBP postquirúrgicas son una de las causas que originan más reingresos hospitalarios tras las resecciones pulmonares. La mortalidad de una FBP perioperatoria es alta, y si el paciente requiere una intervención quirúrgica urgente para resolverla, el riesgo de fallecimiento se incrementa aún más. A pesar de que en la práctica clínica y de forma preventiva y en algunas ocasiones empírica, los cirujanos realizan coberturas del muñón bronquial para protegerlo de la isquemia adicional y la necrosis con pleura, grasa pericárdica, colgajos musculares y algunos sellantes biológicos de uso comercial, ninguno de los tratamientos ha demostrado ser óptimo para prevenir la FBP.

Es por ello que el mejor tratamiento de la FBP es su prevención. Una lesión que altera la continuidad de la superficie de un tejido desencadena diversas reacciones celulares, mecanismos de reparación tisular y señales químicas para restablecer y modular la integridad del área lesionada. El bronquio es una estructura dinámica con multitud de tipos celulares y por tanto distintas respuestas a la agresión. Qué ocurre con el muñón bronquial remanente tras una resección pulmonar, qué mecanismos moleculares están implicados en sus fases de reparación y si estas respuestas pueden ser moduladas por agentes biológicos externos es algo que aún no se conoce.

En este sentido, existen escasos estudios que valoren el uso preventivo de sellantes biológicos y su influencia sobre la reparación del muñón bronquial. Todas estas evidencias demandan un esfuerzo de investigación experimental básica. En concreto, un esfuerzo dirigido a la búsqueda de tratamientos preventivos de la FBP y al conocimiento de las rutas moleculares implicadas en sus mecanismos de acción. Con este deseo se ha desarrollado la presente Tesis Doctoral en la que nos propusimos estudiar y valorar en el animal de experimentación, la capacidad de cicatrización del muñón bronquial tras una neumonectomía, mediante la aplicación local de un sellante de fibrina como es el Tissucol[®], el plasma autólogo y el trasplante de células madre, directo o vehiculizado con Tissucol[®], con la finalidad de prevenir la aparición de la FBP y sus complicaciones.



Este conocimiento podría ayudar a entender mejor la fisiopatología de la cicatrización y remodelado del muñón bronquial tras una resección pulmonar y sentar unas bases más sólidas que permitan desarrollar estrategias terapéuticas específicas y preventivas de la FBP que, en última instancia y con carácter traslacional, ayuden a mejorar la esperanza de vida de los pacientes sometidos a una resección pulmonar.



OBJETIVOS





1

“Lograr un modelo experimental válido en ratas para el estudio de la cicatrización y remodelación del muñón bronquial tras la neumonectomía”

2

“Valorar histológicamente la capacidad de cicatrización y calidad de remodelación del muñón bronquial tras la aplicación local de diferentes sellantes biológicos como son el Tissucol[®], el plasma fresco autólogo pobre en plaquetas (PPP) y las células madre, con la finalidad de prevenir la aparición de la fístula broncopleural”

3

“Estudiar, mediante PCR en tiempo real, las variaciones de expresión génica que pudieran estar relacionados con el mecanismo de acción de estos sellantes biológicos sobre la cicatrización del muñón bronquial”





MATERIAL Y METODO





1**MATERIAL****1.1.- Animales de experimentación**

Para este estudio se utilizaron un número de 121 ratas (*Rattus norvegicus*), machos, de la cepa Sprague-Dawley con un peso comprendido entre 300 y 400 grs. Estos animales procedieron de la colonia criada en el animalario de la Unidad de Investigación del Hospital universitario Dr. Negrín a partir de una pareja de reproductores (1ª generación) procedente del Centro de producción Animal de Harlan Interfauna Ibérica S.L. (Barcelona, España).

Todos los animales fueron destetados a los 21 días de edad, y se ubicaron en jaulas de macrolón de 20 x 35 x 55 cm (Allentown Inc., Panlab S.L., Barcelona, España), las cuales contenían 4 animales por jaula¹⁹³ y con las condiciones idóneas de estabulación.

El ciclo de luz dentro del animalario se programó a 12 h. de luz y 12h. de oscuridad y una intensidad de 270 lux teniendo un grado de humedad relativa de 45 – 55%. El sistema de ventilación permitió 16 renovaciones/hora y la temperatura ambiente fue de 22°±1 °C.



Figura 16. Rata de la cepa Sprague-Dawley

El régimen de alimentación administrado ha sido de un pienso concentrado para roedores suministrado *ad libitum* con una dieta comercial de mantenimiento en pellets con la siguiente composición: proteína bruta 15,6%; materia grasa bruta 2,8%; celulosa bruta 4,8%; cenizas brutas 4,6%; vitamina A 7500 UI/Kg.; CuO 14,7 ng/Kg.; vitamina D; 80 mg/Kg de vitamina E; productos y subproductos de semillas de oleaginosas, productos de panadería y de fabricación de productos alimenticios,

minerales, semillas de oleaginosas y productos de pescado (R.02-E Standard Diet, Prolabor, España). Se suministró agua *ad libitum* con $\text{pH } 6,5 \leq 8,5$; y el encamado consistía en viruta de bagazo de caña desmeollado.

La monitorización microbiológica de rutina, de acuerdo a las recomendaciones de la FELASA, no ha revelado presencia de patógenos en ratas durante el periodo del estudio experimental¹⁹⁴.

Siguiendo las recomendaciones de FELASA, se ha supervisado en todo momento la conducta, el estrés y el bienestar de los animales¹⁹⁵. De este modo se han valorado signos fisiológicos oculares (hematoporfirina y hundimiento del globo ocular), respiratorios (estornudo, flujo nasal y frecuencia respiratoria), aspecto externo (piloerección, lordosis, deshidratación y pérdida de peso) y signos de actividad anormal (somnolencia, anorexia, automutilación y vocalización).

Se han seguido las normas internacionales y nacionales vigentes sobre cuidado y protección de los animales de experimentación, bajo condiciones sanitarias en la categoría de convencional limpio de acuerdo a las recomendaciones y exigencias recogidas en el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (*National Research Council*, 1996), Directiva del Consejo Europeo 86/609 (Directiva- Comisión de las Comunidades Europeas, 1986), Real Decreto Español 1201/2005 (Ministerio Presidencia, 2005) y la Ley 32/2007 (Cortes Generales, 2007).

1.2.- Salas, equipos y material inventariable

Para el desarrollo del modelo experimental, se ha utilizado el quirófano I para animales inmunocompetentes con nivel de contención biológica II y las salas de preoperatorio y postoperatorio de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín. Así como, ventiladores Servo 900[®] (Siemens-Elema, Suecia), microscopio de pie Zeiss OPMI[®] 9-12,5x (West, Alemania), nevera Misa[®] de 4 °C y congelador Revco[®] de -70 °C.

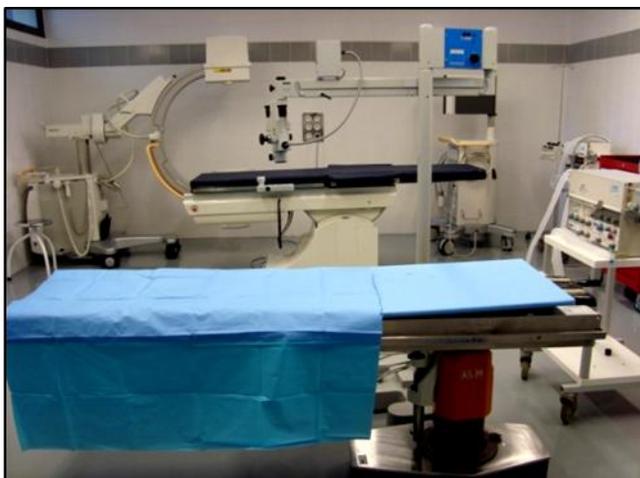


Figura 17. Quirófano de la Unidad – HUGC Dr. Negrín

1.3.- Material quirúrgico

Para garantizar un mínimo de esterilidad se han utilizado paños quirúrgicos estériles, así también bisturís nº 22, jeringas de insulina, agujas 25 G, tijeras de Metzemaum y Mayo, pinzas de disección, pinzas de Adson, pinzas de microcirugía (relojero), tijeras de microcirugía, tijeras de microcirugía Westcott, porta aguja Baumgartner, blefarostato Murdock, microportaguja Castroviejo estriado, micro porta aguja Barraquer, suturas de Vycril® (Johnson and Johnson, Madrid, España) y seda negra 3/0 (Silkan®. B. Braun Surgical S.A. España), ligaduras de Surgipro II® de 6/0 y 7/0 (Tyco-Healthcare, USA), torundas y gasas estériles.

1.4.- Medicación anestésica y analgésica

Los fármacos que se han empleado en la anestesia de los animales han sido: lidocaína 1% (Xilonibsa®, Inibsa, Barcelona, España), medetomidina (Domtor®, Pfizer, Madrid, España), ketamina (Ketolar 500®, Pfizer, Madrid, España) y atropina 1% (Atropina®, Braun, Madrid, España). El efecto de la medetomidina se ha revertido con su antagonista, el atipamezol (Antisedan®, Pfizer, Madrid, España.) Como analgésico postoperatorio se ha empleado la buprenorfina (Buprex®, Shering-Plug. Barcelona. España).

1.5.- Material utilizado para las mediciones

Las muestras se fijaron en formol 3,7 - 4% en recipientes de vidrio oscuro y a temperatura ambiente. La deshidratación se llevó a cabo con alcoholes y xilol (Leica, TP-1050, Leica Instruments, GmbH, Nussloch, Alemania). Las muestras se incluyeron en parafina (Leica, Reichert-Jung Histoembedder, Leica Instruments, GmbH, Nussloch, Alemania). Para la preparación de las secciones se utilizaron un microtomo (Leica, LR-2055, Leica Instruments, GmbH, Nussloch, Alemania), un calentador de agua P Selecta y portaobjetos 76 x 26 Knittel Glaber.

Para la coloración de las muestras en Hematoxilina-Eosina se necesitó los siguientes materiales: hematoxilina, alcohol etílico, potasio alume, agua destilada, óxido mercurio, ácido acético glacial, eosina soluble en agua.

Para purificar el RNA se usó GITC-fenol/cloroformo. El bromuro de etidio de Pierce (Rockford, IL). Para la síntesis del cADN se usó el kit Script cADN síntesis (BioRad, Barcelona-España). Los cebadores fueron fabricados por Thermo Electrón (www.thermo.co). Para realizar las PCRs a tiempo real se usó SYBR Green (Foster City, CA). El resto de reactivos procedían de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).



2

MÉTODO

2.1.- *Diseño*

Se diseñó un estudio experimental con un total de 121 ratas de la cepa Sprague-Dawley, realizándose a todas ellas una neumonectomía izquierda. Tras la misma y sobre el muñón bronquial se aplicó localmente 4 tipos de sellantes biológicos salvo en los animales del grupo control que no recibieron tratamiento. Tras el sacrificio del animal se extrajo el muñón bronquial para estudio histológico o de expresión génica.

Para el **análisis histológico** se han seleccionado 61 animales, que han sido distribuidos aleatoriamente en cinco grupos: a) grupo control, b) grupo que recibió Tissucol[®], c) grupo que recibió plasma fresco pobre en plaquetas (PPP), d) grupo que recibió ADSC y e) grupo que recibió Tissucol[®]+ADSC. Cada grupo ha sido subdividido, a su vez, en 2 subgrupos en función del tiempo de sacrificio establecido: 10 y 20 días postneumonectomía (Tabla VIII).

Tabla VIII. Diseño de los grupos para el estudio histológico

| Grupo | Tratamiento | Nº de animales | | TOTAL |
|--------------|------------------------------------|----------------|-----------|-----------|
| | | 10 días | 20 días | |
| A | Grupo Control | 6 | 7 | 13 |
| B | Grupo Tissucol [®] | 6 | 6 | 12 |
| C | Grupo PPP | 6 | 6 | 12 |
| D | Grupo ADSC | 6 | 6 | 12 |
| E | Grupo Tissucol [®] + ADSC | 6 | 6 | 12 |
| TOTAL | | 30 | 31 | 61 |

Para el **estudio de expresión génica** se han seleccionado 60 animales, que han sido distribuidos teniendo en cuenta los mismos criterios utilizados para el estudio histológico. (Tabla IX).



Tabla IX. Diseño de los grupos para el estudio genómico

| Grupo | Tratamiento | Nº de animales | | TOTAL |
|--------------|------------------------|----------------|-----------|-----------|
| | | 10 días | 20 días | |
| A | Grupo Control | 6 | 6 | 12 |
| B | Grupo Tissucol® | 6 | 6 | 12 |
| C | Grupo PPP | 6 | 6 | 12 |
| D | Grupo ADSC | 6 | 6 | 12 |
| E | Grupo Tissucol® + ADSC | 6 | 6 | 12 |
| TOTAL | | 30 | 30 | 60 |

2.2.- Técnica quirúrgica

-Modelo quirúrgico de neumonectomía con posterior sutura y sellado del muñón bronquial

Para la anestesia de los animales se ha utilizado un protocolo de combinación de un α -2 agonista (medetomidina) y un agente disociativo (ketamina) por vía parenteral¹⁹⁶. De este modo se ha procedido a la premedicación con 0,5 mg/kg sc de medetomidina (Domtor® Pfizer, Madrid, España), tras 5 minutos y una vez comprobada la sedación del animal se ha inyectado 75 mg/kg ip de ketamina (Ketolar 500®, Pfizer, Madrid, España). Finalmente se ha inyectado 0,04 mg/kg im de atropina (Atropina® Braun, España) a los 3 minutos de administrar la ketamina (Figura 18).

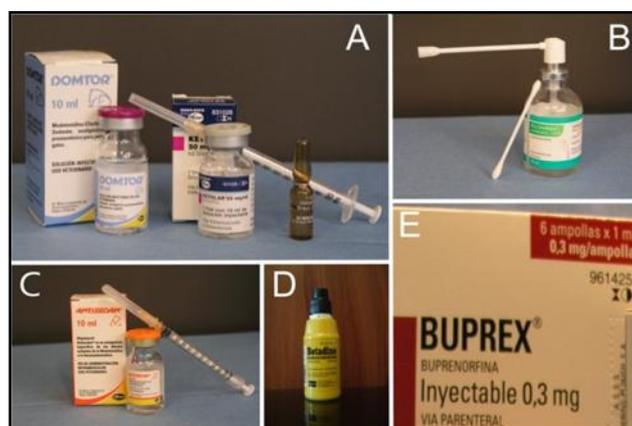


Figura 18. Fármacos anestésicos. A: Domtor®, Ketamina® y atropina®. B: Xilonibsa®. C: Antisedan®. D: Betadine®. E: Buprex®

Una vez anestesiado se ha rasurado la piel del hemitórax izquierdo. Tras esto, se ha procedido a realizar una intubación orotraqueal (IOT) del animal (Figura 19) según la técnica descrita por Weksler y cols¹⁹⁷.



Figura 19. Intubación orotraqueal

Para ello se ha aplicado, al final de la laringe, lidocaína al 2% (Xylonibsa[®], Inibsa, Barcelona, España) con una torunda de algodón para prevenir el espasmo de la musculatura laríngea. Para localizar los cartílagos aritenoides, se ha desplazado la epiglotis con la ayuda de una guía de teflón de punta roma que se ha introducido entre dichos cartílagos en el interior de la laringe hasta una profundidad aproximada de 0,5 cm. A través de la guía mencionada, se ha introducido un catéter intravenoso de 14 G x 51 mm (Abboath[®]-T, Abbot Ireland Ltd., Sligo, Irlanda) en la tráquea. Tras retirar la guía de la boca del animal, el catéter se ha asegurado al maxilar superior para evitar su desplazamiento durante la intervención.

Se ha posicionado al animal en decúbito lateral derecho y se ha fijado el miembro torácico izquierdo en extensión completa (Figura 20).



Figura 20. Posición decúbito-lateral derecho del animal

Se ha ventilado al animal con un ventilador SERVO 900 (Siemens S.A., Madrid, España) (Figura 21) con una presión de 12 cm de H₂O, una relación inspiración/expiración de 1:2, frecuencia respiratoria de 60 rpm, y una FiO₂ de 0,21.



Figura 21. Ventilador SERVO 900[®]

Una vez comprobada la estabilidad respiratoria del animal y la consecución de un adecuado plano anestésico (ausencia de movimientos voluntarios respiratorios, no presencia de distrés respiratorio, coloración de mucosas normales y la ausencia de reflejo palpebral y patelar), se ha realizado una toracotomía posterolateral izquierda. Con tijeras de Mayo se ha realizado una disección roma del plano subcutáneo hasta visualizar el *latísimus dorsi* y los músculos *serratus dorsalis* y *ventralis*, los cuales se han seccionado exponiéndose de este modo las costillas y la musculatura intercostal (Figura 22).



Figura 22. Toracotomía posterolateral izquierda.
Exposición de músculos intercostales y costillas.

Se ha abierto el 4º espacio intercostal con tijeras de microcirugía Westcott (Figura 23), y se ha utilizado como separador torácico un blefarostato. Se ha extraído el pulmón de la cavidad torácica y se ha colocado un clip de folios que ha servido de medio de tracción.



Figura 23. Incisión en el 4º espacio intercostal. Se observa músculo intercostal y pleura parietal.

A continuación, se ha procedido a la disección del hilio pulmonar con la identificación de la arteria, bronquio y vena pulmonar (Figura 24). Se ha ligado la arteria y la vena pulmonar con sutura monofilamentosa 6/0 no absorbible de polipropileno del 6-0 (Surgipro II[®], Tyco-Healthcare, USA) y seccionadas próximas al corazón. Se ha colocado un clip de titanio próximo a la carina traqueal (Surgiclip II[®] M-11.5, Autosuture Premium, Tyco-Healthcare, USA) (Figura 25) y se ha cortado el bronquio dejando 2 cartílagos bronquiales distales al clip, y se han aproximado los bordes bronquiales con la colocación de dos puntos de 6/0 de Surgipro II[®] (Figura 26).

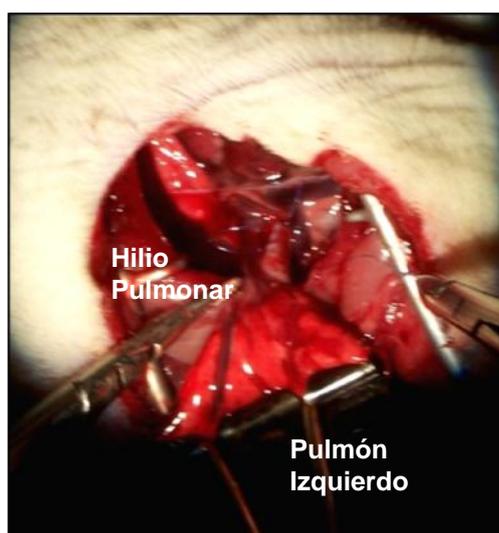


Figura 24. Tracción de pulmón izquierdo y disección del hilio pulmonar



Figura 25. Clips de titanio

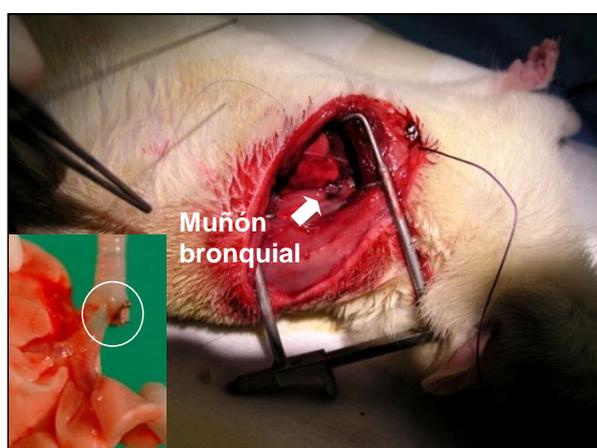


Figura 26. Sutura del muñón bronquial. Se observa clip e hilos de sutura

Finalmente, se ha procedido al cierre de la toracotomía aproximando las costillas con puntos en “x” mediante una sutura absorbible 3/0 polyglactin 910 (Vicryl[®], Ethicon, Inc, Johnson and Johnson Intl, Brussels, Belgium). Posteriormente, se ha realizado una sutura continua de los planos musculares y subcutáneo con sutura absorbible 3/0 de Vicryl[®] y una sutura de puntos simples en la piel con sutura no absorbible de 3/0 (Silkan[®], B. Braun Surgical S.A, España).

Para revertir el plano anestésico se ha administrado 0,5 mg/kg im de atipamezol (Antisedan[®], Pfizer, Madrid, Spain) (Figura 18-C). Se ha colocado un drenaje pleural de pequeño calibre (Pleurocath[®] de 8 french) conectado a un sello de agua (Figura 27) con la finalidad de devolver a la cavidad torácica su presión negativa. Cuando el animal ha presentado respiración espontánea, se ha procedido a retirar el drenaje y se ha suturado la piel de la zona de salida del mismo con un punto en U (Figura 28) de Silkan[®] 3/0. Se ha efectuado la antisepsia de las incisiones realizadas en la piel con aplicación tópica de povidona yodada (Betadine[®]. Laboratorios Asta Médica, Madrid, España) (Figura 18-D).



Figura 27. Colocación del drenaje pleural. De esta manera se devolverá presión negativa a la cavidad torácica.



Figura 28. Cierre de Toracotomía

2.3.- *Cuidados postoperatorios*

Tras la cirugía, los animales fueron llevados al área postoperatoria de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín para proveerles de los cuidados necesarios hasta el momento del sacrificio.

Estos cuidados incluían: 1) calor y confort, 2) cuidados respiratorios, 3) hidratación, 4) control del dolor y cuidados generales.



Figura 29. Salas de pre y postoperatorio

1. *Calor y confort*

Para prevenir la hipotermia, los animales del estudio se colocaron dentro de sus jaulas sobre un lecho a base de viruta de bagazo de caña desmeollado, y expuestos al calor de lámparas. La temperatura media del ambiente ha sido de 21 ± 1 °C. Un termómetro indicaba la conveniencia o no de la temperatura.

2. *Cuidados respiratorios*

Se controlaron periódicamente los movimientos respiratorios de los animales prestando especial atención a la presencia de signos de depresión respiratoria.

3. *Hidratación*

En el estudio, los animales fueron hidratados durante las primeras 24 horas con 2,5 mL/Kg de peso de Ringer lactato inmediatamente tras la operación y con 2 mL/Kg de peso de dextrosa 4% a las 12 h de la intervención.

4. *Control del dolor*

Finalmente y como analgésico, se ha administrado a todos los animales 0,03 mg/Kg/12h sc de buprenorfina (Buprex[®], Schering-Plough, Madrid, España) (Figura 18-E) durante las primeras 48 horas postcirugía, administrando la primera dosis una hora después de la inyección de atipamezol.

2.4.- *Tratamientos sellantes del muñón bronquial*

Dependiendo del grupo de animales neumonectomizados, se ha procedido a la aplicación local y directa sobre el muñón bronquial de los tratamientos sujetos a estudio: Tissucol[®], PPP autólogo, ADSC, ADSC + Tissucol[®].

2.4.1.- Obtención del PPP autólogo

Durante la toracotomía lateral izquierda y previa a la neumonectomía, se ha extraído asépticamente con una aguja de 22 G x 1 ¼" por punción cardíaca, 1.5 ml de sangre que contenía una media de 717.285 ± 190.973 plaquetas/ μ l. La sangre se ha depositado en un tubo de ensayo de 5 ml que contenía 0.15 ml de citrato de sodio (9NC 0.129M; BD Vacutainer Systems[®], Stewartby, UK), y se han mezclado suavemente con la finalidad de homogenizar el contenido.



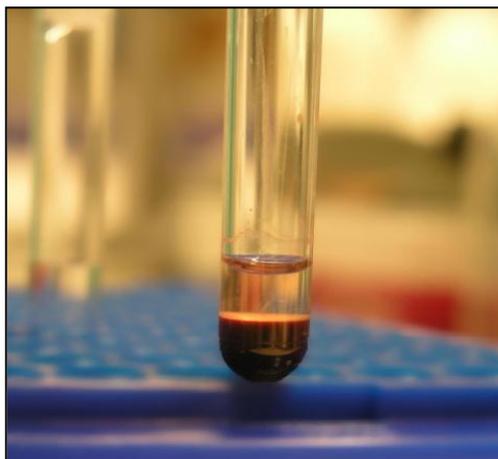


Figura 30. Obtención del PPP autólogo

Mientras se realizaba la neumonectomía, la sangre se ha centrifugado a 3000 rpm durante 10 min para que se separe en 3 fracciones (Figura 30). Posteriormente, se ha extraído sólo la fracción superior que corresponde al plasma, el cual contenía de media 36.750 ± 11.870 plaquetas/ μl , se ha añadido de cloruro cálcico al 10% y se ha administrado calor con una lámpara para obtener un coágulo que será el que se colocará en la zona del muñón bronquial (figura 31 y 32).



Figura 31. Adición de cloruro cálcico al 10%

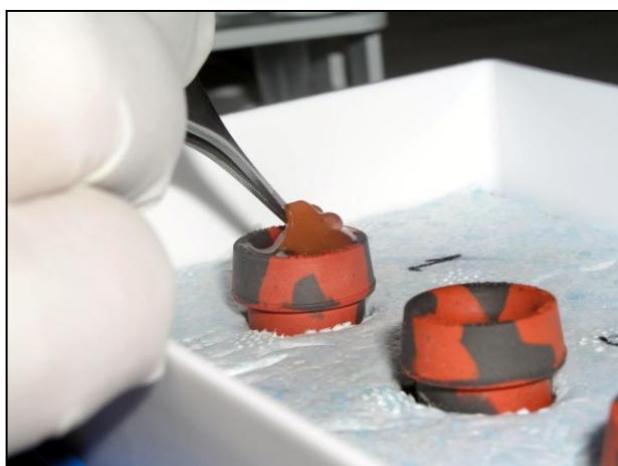


Figura 32. Formación del coágulo después de inducirle calor

Además, se ha determinado la concentración de Igf-1 en el plasma mediante método ELISA (Mouse Igf1 Elisa Kit Quantikine[®], R&D System, Abingdon, UK) y se ha obtenido un valor medio de $786,64 \pm 57,2$ ng/ml.

2.4.2.- Obtención de CM derivadas del tejido adiposo (ADSC)

El aislamiento de ADSC se realizó a partir de tejido adiposo inguinal de ratas macho Sprague-Dawley de 3-5 meses de edad. Tras ser anestesiadas con 50 mg/kg de ketamina (Ketolar[®]) ip, el tejido adiposo se retiró con precisión en condiciones de máxima esterilidad. Tras la homogeneización y lavados con solución salina estéril del tejido adiposo se realizó una digestión enzimática durante 1 hora. El pellet obtenido tras la centrifugación en rotor basculante, fue resuspendido en medio de cultivo (DMEM, 5% FBS, P/S1X) y sembrado en un Flask permaneciendo en un incubador a 37°C/5%CO₂ hasta la confluencia.

Las células fueron expandidas mediante sucesivas tripsinizaciones hasta conseguir un número óptimo para criopreservar y comenzar los experimentos.

2.4.3.- Trasplante de ADSC

Justo antes de su aplicación, se ha tripsinizado dos flasks en condiciones de esterilidad y de forma conservativa. Se ha realizado un conteo celular y cálculo de viabilidad, desechando los casos de muerte superior al 2%. Tras la centrifugación, el pellet celular fue resuspendido, aplicando 3-4 millones de células directamente al muñón bronquial o al Tissucol[®] que cubría el muñón mediante el uso de una pipeta Hamilton, dependiendo del grupo de tratamiento.

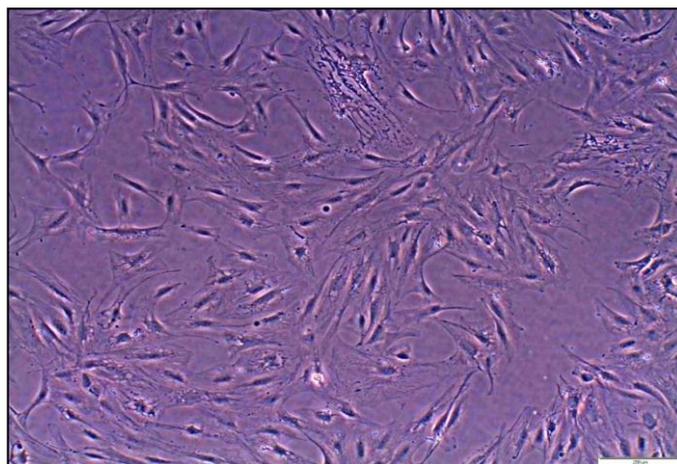


Figura 33. ADSC de rata vista al microscopio invertido

4x. La barra blanca equivale a 200 μ m.

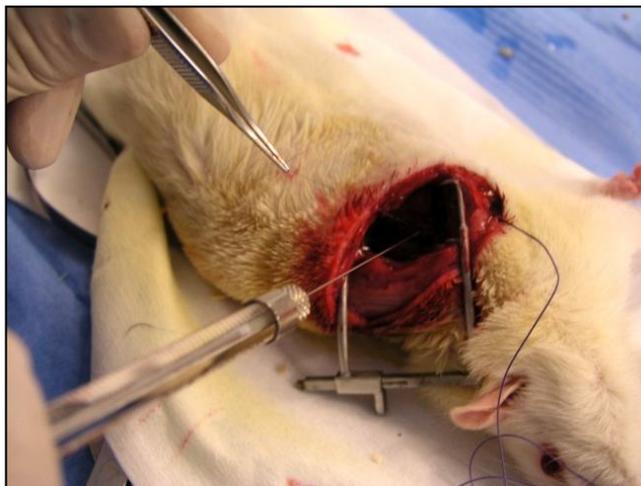


Figura 34. Trasplante de ADSC en el muñón bronquial

2.5.- *Obtención y recogida de las muestras*

El sacrificio de los animales se ha realizado a los 10 y 20 días tras la neumonectomía. Para ello el animal ha sido sometido a anestesia general profunda con el mismo protocolo anestésico que para la neumonectomía. Una vez anestesiado se ha rasurado la parte anterior del tórax, se ha realizado una traqueostomía y se ha ventilado al animal con los mismos parámetros ventilatorios que en la neumonectomía.

Con la rata en decúbito supino, se ha realizado una laparoesternotomía media y se ha abierto el tórax ampliamente con dos pinzas de Kocher. Se ha seccionado y retirado el timo. Para comprobar si existía dehiscencia del muñón bronquial se ha añadido suero en la cavidad torácica y se ha ido aumentando gradualmente de 10 en 10 cm de H₂O las presiones de aire hasta llegar a un máximo de 90 cm de H₂O, valorando la presencia o ausencia de burbujas de aire.

Seguidamente se ha extraído el bloque cardiopulmonar teniendo especial cuidado de que el muñón bronquial con el clip estuvieran incluidos en el mismo bloque. Posteriormente, se ha procedido a extraer el clip y se ha depositado el bloque en formaldehído al 3,7 - 4% para aquellas muestras destinadas al estudio histológico, mientras que, para las muestras destinadas a estudio genómico, el bloque cardiopulmonar se ha colocado en una placa petri con solución de PBS fría ($pH= 7,4$ cuya composición química es en g/L. NaCl =8,0; KCl= 0,2; Na₂HPO₄= 1,15; KH₂PO₄= 0,2 y glucosa = 1) sobre un corcho con hielo para proceder a la extracción del clip y seguidamente a la sección del muñón justo detrás de éste para ser congelados de forma inmediata en N₂ líquido y almacenados a -80° C hasta su uso.

2.6.- Mediciones

2.6.1.- Evolución clínica del período postoperatorio

Se ha valorado la presencia de hemoptisis, insuficiencia respiratoria, exudado serohemorrágico por orificios nasales y si se ha producido el fallecimiento antes del periodo de sacrificio, considerando el momento y posible causa de la muerte.

2.6.2.- Determinaciones histológicas

Tras la extracción del bloque cardiopulmonar y, bajo magnificación de imagen con un microscopio quirúrgico Zeiss OPMI 9-12,5 (Carl Zeiss Microimaging S.L., Barcelona, España), se ha retirado el clip de titanio y se ha cortado justo detrás de éste, resultando un muñón bronquial con una longitud de 5 mm (Figura 35). Estas muestras han sido fijadas en formol tamponado al 3,7 - 4% a temperatura ambiente.

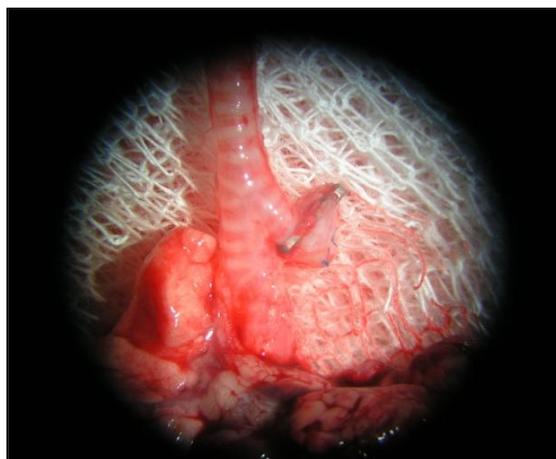


Figura 35. Extracción del bloque cardio-pulmonar en el sacrificio. Retiro del clip y fijación en formol.

2.6.2.1.- Procesamiento de las muestras

Posteriormente las muestras histológicas fueron sometidas a deshidratación, inclusión y corte de las secciones.

Deshidratación: Mediante un procesador automático de tejidos (Leica, TP-1050, Leica Instruments, Gmbh, Nussloch, Alemania).

Inclusión: Las muestras se incluyeron en parafina por medio de un dispensador de parafina (Leica, Reichert-Jung Histoembedder, Leica Instruments, Gmbh, Nussloch, Alemania) (Figura 36 A). Así, una vez deshidratadas las muestras se depositaron en un medio que contenía parafina líquida a 60° C. Posteriormente, se

procedió a enfriar la parafina y se dejó reposar todo el material durante 12 horas. Transcurrido este tiempo, se fundió la parafina y se extrajeron las muestras para luego confeccionar los bloques colocados con la orientación correcta en cada una de las muestras. Se han dejado solidificar los bloques, primero sobre una base fría. Los bloques se identificaron y se guardaron en un ambiente seco, oscuro y fresco hasta el momento de su corte.



Figura 36. Dispensador de parafina y placa fría (A). Microtomo (B)

Corte de las secciones: Los cortes se efectuaron a $5\mu\text{m}$ de grosor con un microtomo (Leica, LR-2055, Leica Instruments, GmbH, Nussloch, Alemania) (Figura 36 B). Estos se han dejado calentar en un calefactor a agua, se han recogido las muestras y se han colocado en los portaobjetos. Se han secado y dejado enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente se ha procedido a la coloración mediante la técnica con hematoxilina y eosina.

A continuación se procedió a la fijación de la lámina cubreobjetos con fosfato dibutil xileno (DPX).

2.6.2.2.- Lectura de las muestras

Las muestras histológicas del muñón bronquial han sido estudiadas a doble ciego con un microscopio óptico Olympus BX50 (Olympus España S.A., Madrid, España) (Figura 37) y se han clasificado de modo didáctico teniendo en cuenta los fenómenos que acontecen en la mucosa y submucosa, pared bronquial y pleura peribronquial tanto a los 10 como a los 20 días tras la cirugía.

a) *Mucosa y submucosa:* Se ha determinado la presencia de inflamación (leve-moderada-grave), fibrosis (inexistente-focal-difusa), úlceras (inexistente-focal-difusa) y necrosis (si-no).

b) *Pared bronquial (incluye cartílago y tejido conectivo adyacente)*: Se ha determinado la presencia de inflamación (leve-moderada-grave), fibrosis (inexistente-focal-difusa) y necrosis (si-no).

c) *Pleura peribronquial*: Se ha determinado la presencia de inflamación (leve-moderada-grave) y fibrosis (inexistente-focal-difusa).



Figura 37. Microscopio óptico Olympus BX50[®]

2.6.3.- *Determinación de la expresión genómica*

Las muestras de muñón bronquial fueron primero homogeneizadas según el protocolo GITC-fenol/cloroformo, descrito por Ansubel y cols¹⁹⁸. Posteriormente se ha realizado la extracción de ARN total. Se ha determinado la concentración de ARN en las muestras mediante espectrofotometría de absorbancia (NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.7, Thermo Scientific). La síntesis del cADN monocatenario se ha realizado con primers de hexanucleótidos al azar (Iscrip cADN Synthesis Kit, Biorad).

2.6.3.1.- *Extracción de ARN y síntesis de cADN*

La homogenización de las muestras congeladas se ha realizado tras trituración y pulverización en nitrógeno líquido con la ayuda de un mortero y vástago de porcelana, hasta la total desintegración del tejido. Para la extracción del ARN total se ha seguido el protocolo de Ausubel y cols¹⁹⁸, donde se ha realizado 2 lavados de etanol (EtOH).

Una vez extraído el ARN, se ha procedido a la síntesis de cADN para su posterior análisis mediante Real Time PCR. Para la síntesis de este cADN se ha utilizado un kit comercial de Roche[®] (Transcriptor First Strand cADN Synthesis Kit;

Cat.No. 04896866001, Mannchim-Alemania), siguiendo las recomendaciones del fabricante y se ha seguido el siguiente protocolo:

Una vez que se han descongelado y centrifugado los reactivos, se han mantenido en hielo, en tubos de 0,2 ml adecuadamente rotulados a los que se ha añadido: el ARN muestra (para obtener 1ug de ARN total), 1ul de *Anchored-oligo (dt) 18 primer* (vial 5), 2ul de *Random Hexamer Primer* (vial 6), agua, para un volumen total final de 13 ul.

A continuación, se han desnaturalizado las muestras a 65°C durante 10 minutos y se han colocado los tubos en hielo. A cada tubo se le ha añadido, y en este orden, lo siguiente: 4ul de *Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer 5x* (vial 2), 0,5ul de *Protector RNase inhibitor, 40U/ul* (vial 3), 2ul de *Deoxynucleotide Mix, 10mM* (vial 4) y 0,5ul de *Transcriptor Reverse Transcriptase, 20U/ul* (vial 1), para un volumen total final de 20ul.

Una vez que se les ha añadido los reactivos anteriores, se ha mezclado bien (sin utilizar vortex) y se ha centrifugado los tubos para luego ser colocados en el bloque del termociclador, pasando todo ellos por los siguientes programas: 10 minutos a 25°C para que se unan los *Random Hexamer Primer*, 60 minutos a 50°C para que el *Transcriptor Reverse Transcriptase sintetice cADN*, 5 minutos 85°C para que el ARN se digiera el ARN mensajero y mantenerse a 4°C para que no se degrade el cADN.

Acabada la etapa del termociclador, los tubos con el cADN ya sintetizado se han conservado en una nevera a -20°C

2.6.3.2.- Determinación de la expresión génica mediante qRT-PCR

Se ha utilizado un termociclador de capilares LightCycler® 1.5 (Roche, Mannheim, Alemania), con el kit “LightCycler FastStart ADN Master SYBR Green I” (Roche, Cat. No. 12 239 264 001) y el software de Lightcycler 3. 5. 3. y se han seguido las instrucciones del fabricante.

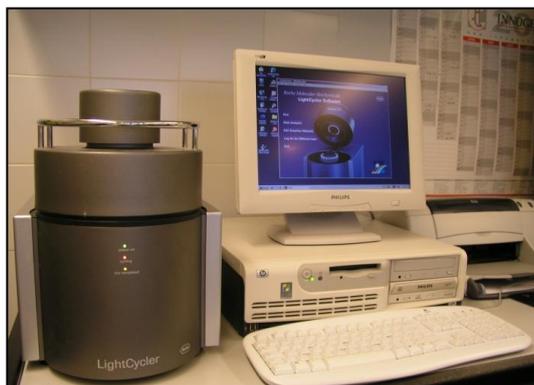


Figura 38. Termociclador de capilares LightCycler® 1.5

Los cebadores que se han usado para cada uno de los genes del estudio han sido diseñados utilizando el software online “Primer3” (<http://frodo.wi.mit.edu/>) y posteriormente se han optimizado con la temperatura de anillado y la concentración de $MgCl_2$. La especificidad de los cebadores ha sido comprobada mediante electroforesis en gel de agarosa, para ello se ha realizado un pool de cada grupo experimental y con cada pareja de primers de los genes estudiados, se ha hecho una PCR con la que posteriormente se ha realizado una electroforesis en gel de agarosa y se ha comprobado que generaba una banda del tamaño esperado. El fragmento amplificado se ha analizado mediante una curva de *melting* que permite la identificación y diferenciación de las variantes genéticas.

Los cebadores específicos que se han empleado y las condiciones de la RT-PCR en tiempo real han sido recogidos en la tabla X. Los resultados han sido corregidos mediante el gen PPIA (peptidylprolyl isomerase A, ciclofilina A) como housekeeping gene¹⁹⁹, ya que es el que presenta una expresión más estable.

Tabla X. Genes y condiciones de la PCR en tiempo real

| Gen | Numero | Descripción | Prime Forward | Prime Reverse | Tamaño (BP) |
|---------------|--------------|---|------------------------------|-------------------------------|-------------|
| PPIA | NM_017101 | peptidylprolyl isomerase A, ciclofilina A | GGTGACTTCAC ACGCCATAA | AGCCACTC AGTCTTGG CAGT | 173 |
| Igf-1 | NM_178866 | factor de crecimiento ligado a insulina 1 | TCTGAGGAGG CT GGAGATGT | GTTCCGAT GTTTTGCA GGTT | 240 |
| Tgfb-1 | NM_021578 | factor de transformación de crecimiento, beta 1 | TGAGTGGCTGT CTTTTGACG | TGGGAGTG ATCCCATT GATT | 146 |
| Ctgf | NM_022266 | factor de crecimiento de tejido conectivo | AGACCTGT GCCTGCCA TTAC | ACTTCGGT GGGGTGTT TTC | 242 |
| Vegfa | NM_001110334 | factor de crecimiento endotelial vascular | GCCCATGAAG TGGTGAAGTT | TATGTGCT GGCTTTGG TGAG | 243 |
| Sox6 | NM_001024751 | SRY (sex determining region Y)-box 6 | CTGCCTCTGCA CCCCATAATG | TTGCTGAG ATGACAGA ACGCT | 111 |
| Agc-1 | NM_022190 | Aggrecan 1 | CCTGCTACTTC ATCGACCCC | AGATGCTG TTGACTCG AACCT | 150 |
| Col2a1 | NM_012929 | colágeno type II alfa 1 | CTCACGCCTTC CCATTGTT | ATCAGGTC AGGTCAGC CATTC | 201 |



2.7.- *Análisis estadístico*

El análisis estadístico se ha realizado mediante el paquete estadístico SPSS v15.0 para Windows (2005, SPSS Inc. Illinois, USA). La expresión de los genes la mostramos como media con su desviación estándar (SD), salvo Vegfa que se ha valorado en base a la mediana con valores mínimo y máximo. Las determinaciones histológicas se expresan en porcentajes. Para los contrastes de hipótesis hemos considerado un error $\alpha = 0.05$. Hemos aplicado el test de la U de Mann Whitney para dos muestras independientes para verificar las diferencias en la expresión de los genes, ya que estas no siguen una distribución normal (Test de Kolmogorov-Smirnov). Se ha realizado el Test de Chi-Cuadrado con la razón de verosimilitud (RV) para valorar la asociación de las determinaciones histológicas de los tratamientos versus los controles. Se ha considerado que existía significación estadística si $p < 0,05$.



RESULTADOS





1.- *Evolución clínica del período postoperatorio*

En general, los animales operados (n=121) en todos los grupos se han recuperado satisfactoriamente de la anestesia después de la cirugía, aunque con evidentes signos de hipotermia, que se han controlado con fuentes de calor. Los animales han presentado movimientos respiratorios espontáneos y el reflejo ocular en los 2 primeros minutos posteriores a la administración de atipamezol. La posición fisiológica y la deambulación la han recuperado entre los 3 y los 5 minutos. También se ha apreciado que el 80% de los animales han presentado hemoporfirina alrededor de los ojos, debido al malestar propio de la cirugía pero que desaparecía a los 2 días. No se ha observado exudados serohemorrágicos por nariz, ni disnea producto de la cirugía.

Se han producido 4 muertes; 2 en los animales del grupo control debido a FBP precoz debida a fallo mecánico en la estanquidad del cierre bronquial con el microclip bronquial durante el acto quirúrgico, 1 en el grupo de ADSC y 1 en el grupo Tissucol[®]+ADSC debido a edema del pulmón contralateral (Tabla XII).

El tiempo quirúrgico empleado ha tenido una duración de 45 – 50 min hasta el cierre de la piel.

Tabla XI. Número de muertes en los grupos

| GRUPO TRATADO | CAUSA DE MUERTE | TOTAL |
|------------------------------|------------------|-------|
| Control | ● FBP precoz | 2 |
| ADSC | ● Edema pulmonar | 1 |
| Tissucol [®] + ADSC | ● Edema pulmonar | 1 |

2.- *Determinaciones histológicas*

2.1.- *Influencia del tratamiento local sobre el muñón bronquial*

A continuación mostramos los resultados del estudio histológico después de agrupar todos los animales que han recibido tratamiento y compararlos con la evolución natural del muñón bronquial.

Podemos observar que en la mucosa y submucosa:



1.-Existe una tendencia a producir más inflamación en los animales tratados a 20 días, ya que un 26% de los animales tratados presenta inflamación moderada frente a ninguno del grupo control ($p=0,057$).

2.-El tratamiento induce una tendencia a la fibrosis localizada ya que el 31,8% de estos animales presentan fibrosis focal a los 10 días ($p=0,096$).

3.-Los animales tratados presentan significativamente menos necrosis de la mucosa y de la submucosa a los 20 días de la cirugía ($p=0,034$).

Tabla XII. Hallazgos microscópicos de mucosa y submucosa bronquial

| Mucosa y Submucosa | | | Control | Caso | p | |
|--------------------|----------|-------------|----------|------|------|-------|
| Inflamación | 10 días | Leve | Recuento | 3 | 16 | 0,842 |
| | | | % | 75 | 72,7 | |
| | | Moderada | Recuento | 0 | 1 | |
| | | | % | 0 | 4,5 | |
| | | Grave | Recuento | 1 | 5 | |
| | | | % | 25 | 22,7 | |
| | Total | Recuento | 4 | 22 | | |
| | | % | 100 | 100 | | |
| | 20 días | Leve | Recuento | 7 | 17 | 0,057 |
| | | | % | 100 | 73,9 | |
| | | Moderada | Recuento | 0 | 6 | |
| | | | % | 0 | 26,1 | |
| Grave | | Recuento | 0 | 0 | | |
| | | % | 0 | 0 | | |
| Total | Recuento | 7 | 23 | | | |
| | % | 100 | 100 | | | |
| Fibrosis | 10 días | Inexistente | Recuento | 0 | 0 | 0,096 |
| | | | % | 0 | 0 | |
| | | Focal | Recuento | 0 | 7 | |
| | | | % | 0 | 31,8 | |
| | Difusa | Recuento | 4 | 15 | | |
| | | % | 100 | 68,2 | | |
| | Total | Recuento | 4 | 22 | | |
| | | % | 100 | 100 | | |
| | 20 días | Inexistente | Recuento | 0 | 1 | 0,760 |
| | | | % | 0 | 4 | |
| Focal | | Recuento | 4 | 13 | | |
| | | % | 57,1 | 56,5 | | |
| Difusa | | Recuento | 3 | 9 | | |
| | | % | 43 | 39 | | |
| Total | Recuento | 7 | 23 | | | |

| | | | | | | |
|--------------|--------------|--------------------|----------|------|------|-------|
| | | % | 100 | 100 | | |
| Úlceras | 10 días | Inexistente | Recuento | 2 | 12 | 0,867 |
| | | | % | 50 | 54,5 | |
| | | Focal | Recuento | 2 | 10 | |
| | | | % | 50 | 45,5 | |
| | | Total | Recuento | 4 | 22 | |
| | | | % | 100 | 100 | |
| | 20 días | Inexistente | Recuento | 4 | 14 | 0,860 |
| | | | % | 57,1 | 60,9 | |
| | | Focal | Recuento | 3 | 9 | |
| | | | % | 42,9 | 39,1 | |
| Total | | Recuento | 7 | 23 | | |
| | | % | 100 | 100 | | |
| Necrosis | 10 días | No | Recuento | 4 | 16 | 0,129 |
| | | | % | 100 | 72,7 | |
| | | Si | Recuento | 0 | 6 | |
| | | | % | 0 | 27,3 | |
| | Total | Recuento | 4 | 22 | | |
| | | % | 100 | 100 | | |
| | 20 días | No | Recuento | 4 | 21 | 0,034 |
| | | | % | 57,1 | 91,3 | |
| | | Si | Recuento | 3 | 2 | |
| | | | % | 42,9 | 8,7 | |
| Total | | Recuento | 7 | 23 | | |
| | | % | 100 | 100 | | |

A nivel de la pared bronquial observamos que:

1.-Hay un mayor grado de inflamación (grave) en los animales que han recibido tratamiento a los 10 días ($p=0,012$) que no se aprecia en los animales controles.

2.-El tratamiento del muñón induce un grado menor de fibrosis de la pared (fibrosis focal) a los 10 días con respecto a los controles, que no es estadísticamente significativa ($p=0,171$).

3.-El tratamiento del muñón protege de la necrosis frente a la evolución natural del muñón a los 20 días ($p=0,001$).

Tabla XIII. Hallazgos microscópicos de la pared bronquial

| Pared bronquial | | | Control | Caso | p | | |
|-----------------|----------|-------------|----------|------|------|-------|-------|
| Inflamación | 10 días | Leve | Recuento | 4 | 6 | 0,012 | |
| | | | % | 100 | 27,3 | | |
| | | Moderada | Recuento | 0 | 7 | | |
| | | | % | 0 | 31,8 | | |
| | Grave | Recuento | 0 | 9 | | | |
| | | % | 0 | 40,9 | | | |
| | Total | Recuento | 4 | 22 | | | |
| | | % | 100 | 100 | | | |
| | 20 días | Leve | Recuento | 6 | 17 | | 0,518 |
| | | | % | 85,7 | 73,9 | | |
| Moderada | | Recuento | 1 | 6 | | | |
| | | % | 14,3 | 26,1 | | | |
| Grave | | Recuento | 0 | 0 | | | |
| | | % | 0 | 0 | | | |
| Total | | Recuento | 7 | 23 | | | |
| | | % | 100 | 100 | | | |
| Fibrosis | 10 días | Inexistente | Recuento | 0 | 0 | 0,171 | |
| | | | % | 0 | 0 | | |
| | | Difuso | Recuento | 4 | 17 | | |
| | | | % | 100 | 77,3 | | |
| | Focal | Recuento | 0 | 5 | | | |
| | | % | 0 | 22,7 | | | |
| | Total | Recuento | 4 | 22 | | | |
| | | % | 100 | 100 | | | |
| | 20 días | Inexistente | Recuento | 0 | 0 | | 0,300 |
| | | | % | 0 | 0 | | |
| Difuso | | Recuento | 6 | 15 | | | |
| | | % | 85,7 | 65,2 | | | |
| Focal | | Recuento | 1 | 8 | | | |
| | | % | 14,3 | 34,8 | | | |
| Total | Recuento | 7 | 23 | | | | |
| % | 100 | 100 | | | | | |
| Necrosis | 10 días | Sí | Recuento | 0 | 2 | 0,404 | |
| | | | % | 0 | 9,1 | | |
| | | No | Recuento | 4 | 20 | | |
| | | | % | 100 | 90,9 | | |
| | Total | Recuento | 4 | 22 | | | |
| | | % | 100 | 100 | | | |
| | 20 días | Sí | Recuento | 5 | 2 | | 0,001 |
| | | | % | 71,4 | 8,7 | | |
| No | | Recuento | 2 | 21 | | | |
| | | % | 28,6 | 91,3 | | | |
| Total | Recuento | 7 | 23 | | | | |



| | | | |
|--|---|-----|-----|
| | % | 100 | 100 |
|--|---|-----|-----|

A nivel de la pleura peribronquial observamos que:

1.-El tratamiento muestra una tendencia a inducir mayor grado de inflamación a los 10 días ($p=0,093$) que es significativa a los 20 días ($p=0,023$).

Tabla XIV. Hallazgos microscópicos de la pleura peribronquial

| Pleura peribronquial | | Control | Caso | p | |
|----------------------|---------|-------------|----------|------|-------|
| Inflamación | 10 días | Leve | Recuento | 2 | 0,093 |
| | | | % | 50 | |
| | | Moderada | Recuento | 2 | |
| | | | % | 50 | |
| | | Grave | Recuento | 0 | |
| | | % | 0 | | |
| | | Total | Recuento | 4 | |
| | | % | 100 | | |
| | 20 días | Leve | Recuento | 7 | 0,023 |
| | | | % | 100 | |
| Moderada | | Recuento | 0 | | |
| | | % | 0 | | |
| Grave | | Recuento | 0 | | |
| | | % | 0,0 | | |
| | Total | Recuento | 7 | | |
| | % | 100 | | | |
| Fibrosis | 10 días | Inexistente | Recuento | 1 | 0,325 |
| | | | % | 25 | |
| | | Focal | Recuento | 1 | |
| | | | % | 25 | |
| | | Difuso | Recuento | 2 | |
| | | % | 50 | | |
| | | Total | Recuento | 4 | |
| | | % | 100 | | |
| | 20 días | Inexistente | Recuento | 2 | 0,554 |
| | | | % | 28,6 | |
| Focal | | Recuento | 4 | | |
| | | % | 57,1 | | |
| Difuso | | Recuento | 1 | | |
| | | % | 14,3 | | |
| | Total | Recuento | 7 | | |
| | % | 100 | | | |



2.2.- Influencia del tratamiento con Tissucol®

Al sacrificio pudimos observar una masa de tejido de consistencia fibrosa de aproximadamente 0.3 - 0.4 cm que rodeaba los bordes del muñón (figura 38).

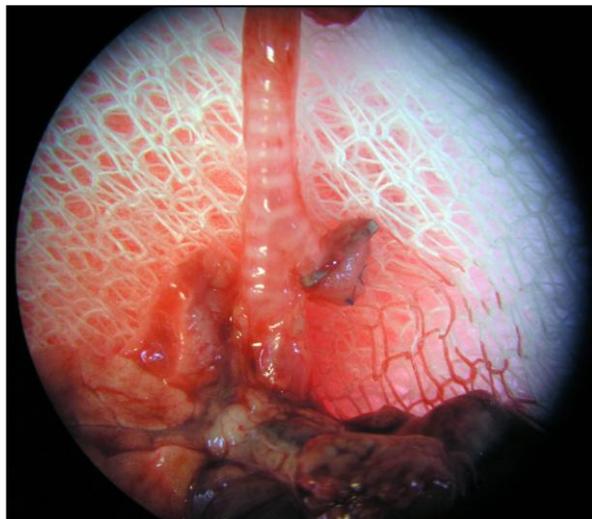


Figura 39. Vista macroscópica del muñón bronquial, grupo Tissucol®

En la Tabla XV se muestran los hallazgos histológicos observados en el muñón bronquial de los animales tratados con Tissucol® tras la neumonectomía.

Podemos observar que en la mucosa y submucosa (Tabla XV):

1.-Existe una tendencia a producirse más inflamación (moderada) en los animales tratados con Tissucol® a los 20 días, ya que un 33,3% de los animales tratados presenta inflamación moderada frente a ninguno del grupo control ($p=0,060$).

2.-A los 10 días el Tissucol® produce una distribución focal significativa de la fibrosis del muñón ($p=0,002$).

3.-Induce la aparición de signos de necrosis a los 10 días ($p=0,048$), sin que existan diferencias con respecto a los controles a los 20 días.

Tabla XV. Hallazgos microscópicos de mucosa y submucosa bronquial con Tissucol®

| Mucosa y submucosa | | Control | Tissucol® | p | |
|--------------------|----------|----------|-----------|----|-------|
| Inflamación | 10 días | Leve | Recuento | 3 | 0,778 |
| | | | % | 75 | |
| | Moderada | Recuento | 0 | 0 | |
| | | % | 0 | 0 | |

| | | | | | | | |
|---------------|-----------------|--------------------|----------|------|------|-------|-------|
| Fibrosis | 20 días | Grave | Recuento | 1 | 2 | 0,060 | |
| | | | % | 25 | 33 | | |
| | | Total | Recuento | 4 | 6 | | |
| | | | % | 100 | 100 | | |
| | | Leve | Recuento | 7 | 4 | | |
| | | | % | 100 | 66,7 | | |
| | Moderada | Recuento | 0 | 2 | | | |
| | | % | 0 | 33,3 | | | |
| | Grave | Recuento | 0 | 0 | | | |
| | | % | 0 | 0 | | | |
| | Total | Recuento | 7 | 6 | | | |
| | | % | 100 | 100 | | | |
| Fibrosis | 10 días | Inexistente | Recuento | 0 | 0 | 0,002 | |
| | | | % | 0 | 0 | | |
| | | Focal | Recuento | 0 | 6 | | |
| | | | % | 0 | 100 | | |
| | Difusa | Recuento | 4 | 0 | | | |
| | | % | 100 | 0 | | | |
| | Total | Recuento | 4 | 6 | | | |
| | | % | 100 | 100 | | | |
| | 20 días | Inexistente | Recuento | 0 | 1 | | 0,308 |
| | | | % | 0 | 16,7 | | |
| | | Focal | Recuento | 4 | 4 | | |
| | | | % | 57 | 66,7 | | |
| Difusa | Recuento | 3 | 1 | | | | |
| | % | 43 | 17 | | | | |
| Total | Recuento | 7 | 6 | | | | |
| | % | 100 | 100 | | | | |
| Úlceras | 10 días | Inexistente | Recuento | 2 | 2 | 0,598 | |
| | | | % | 50 | 33,3 | | |
| | | Focal | Recuento | 2 | 4 | | |
| | % | | 50 | 66,7 | | | |
| | Total | Recuento | 4 | 6 | | | |
| | | % | 100 | 100 | | | |
| | 20 días | Inexistente | Recuento | 4 | 2 | 0,391 | |
| | | | % | 57 | 33,3 | | |
| | | Focal | Recuento | 3 | 4 | | |
| | % | | 43 | 66,7 | | | |
| | Total | Recuento | 7 | 6 | | | |
| | | % | 100 | 100 | | | |
| Necrosis | 10 días | No | Recuento | 4 | 3 | 0,048 | |
| | | | % | 100 | 50 | | |
| | | Si | Recuento | 0 | 3 | | |
| | % | | 0 | 50 | | | |
| | Total | Recuento | 4 | 6 | | | |

| | | % | 100 | 100 | |
|---------|-------|----------|-----|------|-------|
| 20 días | No | Recuento | 4 | 4 | 0,725 |
| | | % | 57 | 66,7 | |
| | Si | Recuento | 3 | 2 | |
| | | % | 43 | 33,3 | |
| | Total | Recuento | 7 | 6 | |
| | | % | 100 | 100 | |

La Tabla XVI muestra los hallazgos microscópicos a nivel de la pared bronquial:

1.-Se aprecia un mayor grado de inflamación (grave) no significativa en los animales que han recibido tratamiento a los 10 días ($p=0,124$).

2.-El tratamiento del muñón tiende a inducir un grado menor de fibrosis (fibrosis focal) con respecto a los controles a los 10 días ($p=0,016$) y a los 20 días ($0,047$).

3.-No se observan cambios significativos sobre la necrosis de la pared en el tratamiento con Tissucol[®], aunque se aprecia menor grado de necrosis en los animales tratados a los 20 días.

Tabla XVI. Hallazgos microscópicos de la pared bronquial con Tissucol[®]

| Pared bronquial | | Control | Tissucol [®] | p | | |
|-----------------|---------|-------------|-----------------------|------|-------|-------|
| Inflamación | 10 días | Leve | Recuento | 4 | 0,124 | |
| | | | % | 100 | | 66,7 |
| | | Moderada | Recuento | 0 | | 0 |
| | | | % | 0 | | 0 |
| | Grave | Recuento | 0 | 2 | | |
| | | % | 0 | 33,3 | | |
| | Total | Recuento | 4 | 6 | | |
| | | % | 100 | 100 | | |
| | 20 días | Leve | Recuento | 6 | 4 | 0,416 |
| | | | % | 85,7 | 66,7 | |
| Moderada | | Recuento | 1 | 2 | | |
| | | % | 14,3 | 33,3 | | |
| Grave | | Recuento | 0 | 0 | | |
| | | % | 0 | 0 | | |
| Total | | Recuento | 7 | 6 | | |
| | | % | 100 | 100 | | |
| Fibrosis | 10 días | Inexistente | Recuento | 0 | 0 | 0,016 |



| | | | | | | |
|-----------------|----------------|--------------------|----------|------|------|-------|
| | | | % | 0 | 0 | |
| | | Focal | Recuento | 0 | 4 | |
| | | | % | 0 | 66,7 | |
| | | Difuso | Recuento | 4 | 2 | |
| | | | % | 100 | 33,3 | |
| | | Total | Recuento | 4 | 6 | |
| | % | | 100 | 100 | | |
| | 20 días | Inexistente | Recuento | 0 | 0 | |
| | | | % | 0 | 0 | |
| | | Focal | Recuento | 1 | 4 | 0,047 |
| | | | % | 14,3 | 66,7 | |
| | | Difuso | Recuento | 6 | 2 | |
| % | | | 85,7 | 33,3 | | |
| Total | Recuento | 7 | 6 | | | |
| | % | 100 | 100 | | | |
| Necrosis | 10 días | Sí | Recuento | 0 | 2 | 0,124 |
| | | | % | 0 | 33,3 | |
| | | No | Recuento | 4 | 4 | |
| | | | % | 100 | 66,7 | |
| | Total | Recuento | 4 | 6 | | |
| | | % | 100 | 100 | | |
| | 20 días | Sí | Recuento | 5 | 2 | 0,165 |
| | | | % | 71,4 | 33,3 | |
| | | No | Recuento | 2 | 4 | |
| | | | % | 28,6 | 66,7 | |
| | Total | Recuento | 7 | 6 | | |
| | | % | 100 | 100 | | |

La Tabla XVII muestra a nivel histológico que en la pleura peribronquial:

1.-Se aprecia un mayor grado de inflamación (moderada) no significativa a los 10 días ($p=0,260$) y un predominio de la distribución focal de la misma a los 10 días, tampoco significativa ($p=0,108$).

Tabla XVII. Hallazgos microscópicos de la pleura peribronquial con Tissucol®

| Pleura peribronquial | | Control | Tissucol® | p | | |
|----------------------|----------------|-----------------|-----------|----|-------|------|
| Inflamación | 10 días | Leve | Recuento | 2 | 0,260 | |
| | | | % | 50 | | 16,7 |
| | | Moderada | Recuento | 2 | | 5 |
| | | | % | 50 | | 83,3 |
| | Grave | Recuento | 0 | 0 | | |
| | | % | 0 | 0 | | |



| | | | | | | | |
|-----------------|--------------------|--------------------|----------|-------|-------|-------|-------|
| | Total | Recuento | 4 | 6 | 0,200 | | |
| | | % | 100 | 100 | | | |
| | Leve | Recuento | 7 | 5 | | 0,108 | |
| | | % | 100 | 83,3 | | | |
| | Moderada | Recuento | 0 | 1 | | 0,529 | |
| | | % | 0,0 | 16,7 | | | |
| | Grave | Recuento | 0 | 0 | | 0,108 | |
| | | % | 0 | 0 | | | |
| | Total | Recuento | 7 | 6 | | 0,529 | |
| | | % | 100 | 100 | | | |
| Fibrosis | Inexistente | Recuento | 1 | 1 | 0,529 | | |
| | | % | 25 | 16,7 | | | |
| | Focal | Recuento | 1 | 5 | | 0,108 | |
| | | % | 25 | 83,3 | | | |
| | Difuso | Recuento | 2 | 0 | | 0,108 | |
| | | % | 50 | 0 | | | |
| | Total | Recuento | 4 | 6 | | 0,108 | |
| | | % | 100 | 100 | | | |
| | 20 días | Inexistente | Recuento | 2 | | 3 | 0,529 |
| | | | % | 29 | | 50,0 | |
| Focal | | Recuento | 4 | 3 | 0,529 | | |
| | | % | 57 | 50 | | | |
| Difuso | | Recuento | 1 | 0 | 0,529 | | |
| | | % | 14 | 0 | | | |
| Total | Recuento | 7 | 6 | 0,529 | | | |
| | % | 100 | 100 | | | | |

2.3.-Influencia del tratamiento con PPP autólogo

Macroscópicamente observamos una masa de tejido de consistencia fibrosa de aproximadamente 0,5 cm que rodeaba los bordes del muñón.

A continuación se muestran los hallazgos histológicos observados en el muñón bronquial de los animales tratados con plasma autólogo local tras la neumonectomía.

En la Tabla XVIII podemos observar que en la mucosa y submucosa:

1.-Se observa una tendencia a producir más inflamación en los animales tratados con PPP a los 20 días, ya que un 33,3% de los animales tratados presenta inflamación moderada frente a ninguno del grupo control ($p=0,060$).

2.-A los 10 días produce una distribución difusa de la fibrosis del muñon al igual que ocurre en los controles y a diferencia de lo observado en el grupo de Tissucol®.

3.-Protege al muñon de la producción de necrosis a los 20 días ya que ninguno de los animales tratados presentó necrosis frente a un 43% de los animales controles que si lo presentaron (p=0,034).

Tabla XVIII. Hallazgos microscópicos de la mucosa y submucosa con PPP

| Mucosa y submucosa | | Control | PPP | p | | |
|--------------------|---------|-------------|----------|------|-------|-------|
| Inflamación | 10 días | Leve | Recuento | 3 | 0,429 | |
| | | | % | 75 | | 50 |
| | | Moderada | Recuento | 0 | | 0 |
| | | | % | 0 | | 0 |
| | | Grave | Recuento | 1 | | 3 |
| | | | % | 25 | | 50 |
| | | Total | Recuento | 4 | 6 | |
| | | | % | 100 | 100 | |
| | 20 días | Leve | Recuento | 7 | 4 | 0,060 |
| | | | % | 100 | 66,7 | |
| Moderada | | Recuento | 0 | 2 | | |
| | | % | 0 | 33,3 | | |
| Grave | | Recuento | 0 | 0 | | |
| | | % | 0 | 0 | | |
| | Total | Recuento | 7 | 6 | | |
| | | % | 100 | 100 | | |
| Fibrosis | 10 días | Inexistente | Recuento | 0 | 0 | 0,725 |
| | | | % | 0 | 0 | |
| | | Focal | Recuento | 0 | 0 | |
| | | | % | 0 | 0 | |
| | | Difusa | Recuento | 4 | 6 | |
| | | | % | 100 | 100 | |
| | | Total | Recuento | 4 | 6 | |
| | | | % | 100 | 100 | |
| | 20 días | Inexistente | Recuento | 0 | 0 | 0,725 |
| | | | % | 0 | 0,0 | |
| Focal | | Recuento | 4 | 4 | | |
| | | % | 57,1 | 66,7 | | |
| Difusa | | Recuento | 3 | 2 | | |
| | | % | 43 | 33 | | |
| | Total | Recuento | 7 | 6 | | |
| | | % | 100 | 100 | | |

| | | | | | | |
|----------|---------|-------------|----------|------|------|-------|
| Úlceras | 10 días | Inexistente | Recuento | 2 | 1 | 0,260 |
| | | | % | 50 | 16,7 | |
| | | Focal | Recuento | 2 | 5 | |
| | % | | 50 | 83,3 | | |
| | Total | Recuento | 4 | 6 | | |
| | | % | 100 | 100 | | |
| Úlceras | 20 días | Inexistente | Recuento | 4 | 1 | 0,125 |
| | | | % | 57,1 | 16,7 | |
| | | Focal | Recuento | 3 | 5 | |
| | % | | 42,9 | 83,3 | | |
| | Total | Recuento | 7 | 6 | | |
| | | % | 100 | 100 | | |
| Necrosis | 10 días | No | Recuento | 4 | 4 | 0,124 |
| | | | % | 100 | 67 | |
| | | Si | Recuento | 0 | 2 | |
| | % | | 0 | 33 | | |
| | Total | Recuento | 4 | 6 | | |
| | | % | 100 | 100 | | |
| Necrosis | 20 días | No | Recuento | 4 | 6 | 0,034 |
| | | | % | 57 | 100 | |
| | | Si | Recuento | 3 | 0 | |
| | % | | 43 | 0 | | |
| | Total | Recuento | 7 | 6 | | |
| | | % | 100 | 100 | | |

A nivel de la pared bronquial observamos en la Tabla XIX que:

1.-Mayor grado de inflamación (moderada y grave) en los animales que han recibido PPP a los 10 días ($p=0,006$).

2.-El tratamiento del muñón con PPP induce a los 10 y 20 días una distribución difusa de la fibrosis semejante a los controles, y a diferencia de lo que ocurre con el Tissucol®.

3.-Protege al muñón de la necrosis a los 20 días ya que ninguno de los animales tratados presentó necrosis frente a un 71,4% de los animales controles que si lo presentaron ($p=0,003$).

Tabla XIX. Hallazgos microscópicos de la Pared bronquial con PPP

| Pared bronquial | | Control | PPP | p | |
|-----------------|---------|----------|----------|-----|-------|
| Inflamación | 10 días | Leve | Recuento | 4 | 0,006 |
| | | | % | 100 | |
| | | Moderada | Recuento | 0 | |



| | | | | | | |
|---------------|---------------|--------------------|----------|------|-------|------|
| Fibrosis | | % | 0 | 33,3 | 0,416 | |
| | | Grave | Recuento | 0 | | 4 |
| | | | % | 0 | | 66,7 |
| | | Total | Recuento | 4 | | 6 |
| | % | | 100 | 100 | | |
| | 20 días | Leve | Recuento | 6 | | 4 |
| | | | % | 85,7 | | 66,7 |
| | | Moderada | Recuento | 1 | | 2 |
| | | | % | 14,3 | | 33,3 |
| | | Grave | Recuento | 0 | | 0 |
| | | | % | 0 | | 0 |
| | Total | Recuento | 7 | 6 | | |
| % | | 100 | 100 | | | |
| Fibrosis | 10 días | Inexistente | Recuento | 0 | 0 | |
| | | | % | 0 | 0 | |
| | | Focal | Recuento | 0 | 0 | |
| | | | % | 0 | 0,0 | |
| | Difuso | Recuento | 4 | 6 | | |
| | | % | 100 | 100 | | |
| | Total | Recuento | 4 | 6 | | |
| | | % | 100 | 100 | | |
| | 20 días | Inexistente | Recuento | 0 | 0 | |
| | | | % | 0 | 0 | |
| | | Focal | Recuento | 1 | 2 | |
| | | | % | 14,3 | 33,3 | |
| Difuso | | Recuento | 6 | 4 | | |
| | | % | 85,7 | 66,7 | | |
| Total | Recuento | 7 | 6 | | | |
| | % | 100 | 100 | | | |
| Necrosis | 10 días | Sí | Recuento | 0 | 0 | |
| | | | % | 0 | 0 | |
| | | No | Recuento | 4 | 6 | |
| | | | % | 100 | 100 | |
| | Total | Recuento | 4 | 6 | | |
| | | % | 100 | 100 | | |
| | 20 días | Sí | Recuento | 5 | 0 | |
| | | | % | 71,4 | 0 | |
| | | No | Recuento | 2 | 6 | |
| | | | % | 28,6 | 100 | |
| | | Total | Recuento | 7 | 6 | |
| | | | % | 100 | 100 | |

A nivel de la pleura peribronquial, en la Tabla XX se observa:



1.-Una tendencia a producir mayor grado de inflamación (grave) a los 20 días ($p=0,057$).

2.-Un predominio a producir fibrosis con distribución focal de la misma a los 10 días ($p=0,435$) y 20 días ($0,210$) ya que todos los animales tratados presentaron signos de fibrosis.

Tabla XX. Hallazgos microscópicos de la pleura peribronquial con PPP

| Pleura peribronquial | | Control | PPP | p | | | |
|----------------------|----------|-------------|----------|------|-------|------|-------|
| Inflamación | 10 días | Leve | Recuento | 2 | 0,233 | | |
| | | | % | 50 | | 16,7 | |
| | | Moderada | Recuento | 2 | | 3 | |
| | | | % | 50 | | 50 | |
| | Grave | Recuento | 0 | 2 | | | |
| | | % | 0 | 33,3 | | | |
| | Total | Recuento | 4 | 6 | | | |
| | | % | 100 | 100 | | | |
| | 20 días | Leve | Recuento | 7 | | 3 | 0,057 |
| | | | % | 100 | | 50 | |
| Moderada | | Recuento | 0 | 2 | | | |
| | | % | 0,0 | 33,3 | | | |
| Grave | | Recuento | 0 | 1 | | | |
| | | % | 0 | 16,7 | | | |
| Total | | Recuento | 7 | 6 | | | |
| | | % | 100 | 100 | | | |
| Fibrosis | 10 días | Inexistente | Recuento | 1 | 0,435 | | |
| | | | % | 25 | | 0,0 | |
| | | Focal | Recuento | 1 | | 2 | |
| | | | % | 25,0 | | 33,3 | |
| | Difuso | Recuento | 2 | 4 | | | |
| | | % | 50 | 66,7 | | | |
| | Total | Recuento | 4 | 6 | | | |
| | | % | 100 | 100 | | | |
| | 20 días | Inexistente | Recuento | 2 | | 0 | 0,210 |
| | | | % | 29 | | 0,0 | |
| Focal | | Recuento | 4 | 4 | | | |
| | | % | 57,1 | 66,7 | | | |
| Difuso | | Recuento | 1 | 2 | | | |
| | | % | 14,3 | 33,3 | | | |
| Total | Recuento | 7 | 6 | | | | |
| % | 100 | 100 | | | | | |

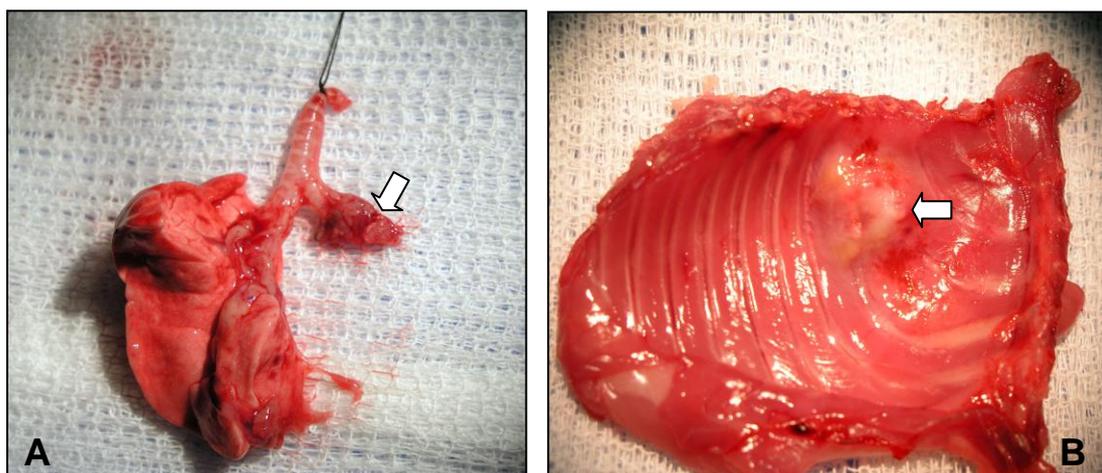


Figura 40. Vista macroscópica del muñón bronquial, grupo ADSC. A: muñón bronquial. **B:** Parrilla costal. Obsérvese la masa blanquecina que engloba el muñón bronquial y que se encuentra pegada a la parrilla costal (flecha).

2.4.-Influencia del tratamiento con ADSC

Desde el punto de vista macroscópico pudimos observar una masa de tejido de consistencia fibrosa de aproximadamente 0.8 cm a los 20 días, que rodeaba los bordes del muñón e incluso se encontraba adherida a la pared costal coincidiendo con la toracotomía. (Figura 40).

En la Tabla XXI se muestran los hallazgos histológicos observados en el muñón bronquial de los animales tratados con ADSC tras la neumonectomía.

Podemos observar que en la mucosa y submucosa:

1.-Se produce más inflamación en los animales tratados con células madre a los 20 días, ya que un 40% de los animales tratados presenta inflamación moderada frente a ninguno del grupo control ($p=0,043$).

2.-Evita la aparición de úlceras a los 10 días ($p=0,046$) y a los 20 días ($p=0,047$).

3.-Protege de la producción de necrosis a los 20 días ya que ninguno de los animales tratados presentó necrosis frente a un 43% de los animales controles que si lo presentaron ($p=0,047$).

Tabla XXI. Hallazgos microscópicos de la mucosa y submucosa con ADSC

| Mucosa y submucosa | | Control | ADSC | p | |
|--------------------|---------|---------|----------|----|-------|
| Inflamación | 10 días | Leve | Recuento | 3 | 0,246 |
| | | | % | 75 | |

| | | | | | | | |
|-----------------|-----------------|--------------------|----------|------|-----|-------|-------|
| | Moderada | Recuento | 0 | 1 | | | |
| | | % | 0 | 20 | | | |
| | | Grave | Recuento | 1 | | 0 | |
| | | | % | 25 | | 0 | |
| | | Total | Recuento | 4 | | 5 | |
| | | | % | 100 | | 100 | |
| | 20 días | Leve | Recuento | 7 | | 3 | 0,043 |
| | | | % | 100 | | 60 | |
| | | Moderada | Recuento | 0 | | 2 | |
| | | | % | 0 | | 40 | |
| | | Grave | Recuento | 0 | | 0 | |
| | | | % | 0 | | 0 | |
| Total | Recuento | 7 | 5 | | | | |
| | % | 100 | 100 | | | | |
| Fibrosis | 10 días | Inexistente | Recuento | 0 | 0 | 0,259 | |
| | | | % | 0 | 0 | | |
| | | Focal | Recuento | 0 | 1 | | |
| | | | % | 0 | 20 | | |
| | Difusa | Recuento | 4 | 4 | | | |
| | | % | 100 | 80 | | | |
| | Total | Recuento | 4 | 5 | | | |
| | | % | 100 | 100 | | | |
| | 20 días | Inexistente | Recuento | 0 | 0 | | 0,921 |
| | | | % | 0 | 0,0 | | |
| | | Focal | Recuento | 4 | 3 | | |
| | | | % | 57,1 | 60 | | |
| Difusa | | Recuento | 3 | 2 | | | |
| | | % | 43 | 40 | | | |
| Total | Recuento | 7 | 5 | | | | |
| | % | 100 | 100 | | | | |
| Úlceras | 10 días | Inexistente | Recuento | 2 | 5 | 0,046 | |
| | | | % | 50 | 100 | | |
| | | Focal | Recuento | 2 | 0 | | |
| | | | % | 50 | 0 | | |
| | Difusa | Recuento | 0 | 0 | | | |
| | | % | 0 | 0 | | | |
| | Total | Recuento | 4 | 5 | | | |
| | | % | 100 | 100 | | | |
| | 20 días | Inexistente | Recuento | 4 | 5 | | 0,047 |
| | | | % | 57 | 100 | | |
| | | Focal | Recuento | 3 | 0 | | |
| | | | % | 43 | 0 | | |
| Difusa | Recuento | 0 | 0 | | | | |
| | % | 0 | 0 | | | | |

| | | | | | | |
|-----------------|----------------|--------------|----------|------|-----|-------|
| | | % | 0 | 0 | | |
| | Total | Recuento | 7 | 5 | | |
| | | % | 100 | 100 | | |
| Necrosis | 10 días | No | Recuento | 4 | 5 | |
| | | | % | 100 | 100 | |
| | | Si | Recuento | 0 | 0 | |
| | | | % | 0 | 0 | |
| | | Total | Recuento | 4 | 5 | |
| | | | % | 100 | 100 | |
| | 20 días | No | Recuento | 4 | 5 | |
| | | | % | 57,1 | 100 | |
| | | Si | Recuento | 3 | 0 | 0,047 |
| | | | % | 100 | 0 | |
| | Total | Recuento | 7 | 5 | | |
| | | % | 100 | 100 | | |

A nivel de la pared bronquial (Tabla XXII) observamos que:

1.-Produce un mayor grado de inflamación (moderada y grave) en los animales que han recibido tratamiento con ADSC a los 10 días ($p=0,025$) que no se aprecia en los animales controles.

2.-Protege de la aparición de necrosis a los 20 días ya que ninguno de los animales tratados presentó necrosis frente a un 71,4% de los animales controles que si lo presentaron ($p=0,005$).

3.- Presencia de células de gran tamaño en el tejido conectivo de la pared bronquial.

Tabla XXII. Hallazgos microscópicos de la pared bronquial con ADSC

| Pared bronquial | | Control | ADSC | p | | |
|--------------------|----------------|-----------------|----------|------|-----|-------|
| Inflamación | 10 días | Leve | Recuento | 4 | 1 | |
| | | | % | 100 | 20 | |
| | | Moderada | Recuento | 0 | 3 | |
| | | | % | 0 | 60 | |
| | | Grave | Recuento | 0 | 1 | |
| | | % | 0 | 20 | | |
| | | Total | Recuento | 4 | 5 | |
| | | | % | 100 | 100 | |
| | 20 días | Leve | Recuento | 6 | 4 | 0,793 |
| | | | % | 85,7 | 80 | |



| | | | | | | |
|-----------------|-----------------|--------------------|----------|------|-----|-------|
| | Moderada | Recuento | 1 | 1 | | |
| | | % | 14,3 | 20 | | |
| | Grave | Recuento | 0 | 0 | | |
| | | % | 0 | 0 | | |
| Total | Recuento | 7 | 5 | | | |
| | % | 100 | 100 | | | |
| Fibrosis | 10 días | Inexistente | Recuento | 0 | 0 | 0,259 |
| | | | % | 0 | 0 | |
| | | Focal | Recuento | 0 | 1 | |
| | | | % | 0 | 20 | |
| | Difuso | Recuento | 4 | 4 | | |
| | | % | 100 | 80 | | |
| | Total | Recuento | 4 | 5 | | |
| | | % | 100 | 100 | | |
| | 20 días | Inexistente | Recuento | 0 | 0 | 0,310 |
| | | | % | 0 | 0 | |
| | | Focal | Recuento | 1 | 2 | |
| | | | % | 14,3 | 40 | |
| Difuso | Recuento | 6 | 3 | | | |
| | % | 85,7 | 60 | | | |
| Total | Recuento | 7 | 5 | | | |
| | % | 100 | 100 | | | |
| Necrosis | 10 días | Sí | Recuento | 0 | 0 | |
| | | | % | 0 | 0 | |
| | | No | Recuento | 4 | 5 | |
| | | | % | 100 | 100 | |
| | Total | Recuento | 4 | 5 | | |
| | | % | 100 | 100 | | |
| | 20 días | Sí | Recuento | 5 | 0 | 0,005 |
| | | | % | 71,4 | 0 | |
| No | | Recuento | 2 | 5 | | |
| | | % | 28,6 | 100 | | |
| Total | Recuento | 7 | 5 | | | |
| | % | 100 | 100 | | | |

A nivel de la pleura peribronquial (Tabla XXIII) se observa:

1.-Un mayor grado de inflamación (grave) aunque no significativo a los 10 días ($p=0,233$) y un mayor grado de inflamación (moderada) significativo a los 20 días ($p= 0,043$).

2.-Un mayor grado de fibrosis no significativo con distribución focal de la misma a los 10 días ($p=0,382$) y 20 días ($p=0,296$), ya que todos los animales tratados



presentaron signos de fibrosis frente un 29% de los controles que no la presentaron a los 20 días.

Tabla XXIII. Hallazgos microscópicos de la pleura peribronquial con ADSC

| Pleura peribronquial | | Control | ADSC | p | | |
|----------------------|---------|---------------|---------------|------|-------|-------|
| Inflamación | 10 días | Leve | Recuento 2 | 1 | 0,233 | |
| | | | % 50 | 16,7 | | |
| | | Moderada | Recuento 2 | 3 | | |
| | | | % 50 | 50 | | |
| | Grave | Recuento 0 | 2 | | | |
| | | % 0 | 33,3 | | | |
| | Total | Recuento 4 | 6 | | | |
| | | % 100 | 100 | | | |
| | 20 días | Leve | Recuento 7 | 3 | | 0,043 |
| | | | % 100 | 60 | | |
| Moderada | | Recuento 0 | 2 | | | |
| | | % 0 | 40 | | | |
| Grave | | Recuento 0 | 0 | | | |
| | | % 0 | 0 | | | |
| Total | | Recuento 7 | 5 | | | |
| | | % 100 | 100 | | | |
| Fibrosis | 10 días | Inexistente | Recuento 1 | 0 | 0,382 | |
| | | | % 25 | 0,0 | | |
| | | Focal | Recuento 1 | 3 | | |
| | | | % 25 | 50 | | |
| | Difuso | Recuento 2 | 3 | | | |
| | | % 50 | 50 | | | |
| | Total | Recuento 4 | 6 | | | |
| | | % 100 | 100 | | | |
| | 20 días | Inexistente | Recuento 2 | 0 | | 0,296 |
| | | | % 29 | 0 | | |
| Focal | | Recuento 4 | 4 | | | |
| | | % 57 | 80 | | | |
| Difuso | | Recuento 1 | 1 | | | |
| | | % 14 | 20 | | | |
| Total | | Recuento 7 | 5 | | | |
| | | % 100 | 100 | | | |

2.5.-Influencia del tratamiento combinado con ADSC+Tissucol®



Desde el punto de vista macroscópico pudimos observar una masa de tejido de consistencia fibrosa de aproximadamente 1 cm a los 20 días, que rodeaba los bordes del muñón e incluso se encontraba adherida a la pared costal coincidiendo con la toracotomía (Figura 41).

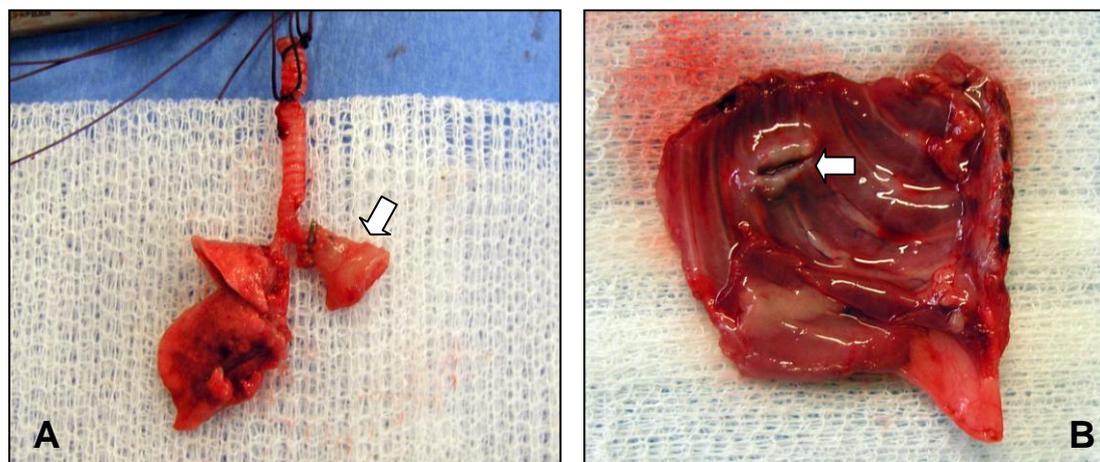


Figura 41. Vista macroscópica del muñón bronquial, grupo ADSC+Tissucol®. A: del muñón bronquial. B: Parrilla costal. Obsérvese la masa blanquecina asociada a la toracotomía (flecha)

A continuación se muestran los hallazgos histológicos observados en el muñón bronquial de los animales tratados con ADSC+Tissucol® local tras la neumonectomía.

Podemos observar que en la mucosa y submucosa (Tabla XXIV):

1.-Mayor inflamación leve en todos los animales tratados con ADSC y Tissucol® a los 10 y 20 días aunque no significativa ($p=0,182$ y $p=0,236$ respectivamente), a diferencia de los grupos de tratamiento anteriores que tienen tendencia a producir un mayor grado de inflamación.

2.-Evita la aparición de úlceras a los 20 días ($p=0,034$).

3.-Protege de la producción de necrosis a los 20 días ya que ninguno de los animales tratados presentó necrosis frente a un 43 % de los animales controles que si la presentaron ($p=0,034$).

Tabla XXIV. Hallazgos microscópicos de la mucosa y submucosa con Tissucol® +ADSC

| Mucosa y submucosa | | Control | Tissucol® + ADSC | p | |
|--------------------|----------|----------|------------------|----|-------|
| Inflamación | 10 días | Leve | Recuento | 3 | 0,182 |
| | | | % | 75 | |
| | Moderada | Recuento | 0 | 0 | |
| | | | | | |

| | | | | | | |
|--------------|--------------|--------------------|--------------------|----------|-------|------|
| | | % | 0 | 0 | | |
| | | Grave | Recuento | 1 | 0 | |
| | | | % | 25 | 0 | |
| | | Total | Recuento | 4 | 5 | |
| | | | % | 100 | 100 | |
| | 20 días | Leve | Recuento | 7 | 6 | |
| | | | % | 100 | 100 | |
| | | Moderada | Recuento | 0 | 0 | |
| | | | % | 0 | 0 | |
| | | Grave | Recuento | 0 | 0 | |
| | | | % | 0 | 0 | |
| | | Total | Recuento | 7 | 6 | |
| | | | % | 100 | 100 | |
| Fibrosis | 10 días | Inexistente | Recuento | 0 | 0 | |
| | | | % | 0 | 0 | |
| | | Focal | Recuento | 0 | 0 | |
| | | | % | 0 | 0 | |
| | | Difusa | Recuento | 4 | 5 | |
| | | | % | 100 | 100 | |
| | | Total | Recuento | 4 | 5 | |
| | | | % | 100 | 100 | |
| | | 20 días | Inexistente | Recuento | 0 | 0 |
| | | | | % | 0 | 0 |
| | | | Focal | Recuento | 4 | 2 |
| | | | | % | 57,1 | 33,3 |
| | | Difusa | Recuento | 3 | 4 | |
| | | | % | 42,9 | 66,7 | |
| | | Total | Recuento | 7 | 6 | |
| | | | % | 100 | 100 | |
| | | | | | 0,391 | |
| Úlceras | 10 días | Inexistente | Recuento | 2 | 4 | |
| | | | % | 50 | 80 | |
| | | Focal | Recuento | 2 | 1 | |
| | | | % | 50 | 20 | |
| | | Total | Recuento | 4 | 5 | |
| | | | % | 100 | 100 | |
| | 20 días | Inexistente | Recuento | 4 | 6 | |
| | | | % | 57 | 100 | |
| Focal | | Recuento | 3 | 0 | | |
| | | | % | 43 | 0 | |
| | Total | Recuento | 7 | 6 | | |
| | | % | 100 | 100 | | |
| | | | | | 0,034 | |
| Necrosis | 10 días | No | Recuento | 4 | 4 | |
| | | | % | 100 | 80 | |
| | | Si | Recuento | 0 | 1 | |
| | | | % | 0 | 20 | |
| | | | | | 0,259 | |



| | | | | | |
|---------|--------------|----------|------|-----|-------|
| 20 días | Total | Recuento | 4 | 5 | 0,034 |
| | | % | 100 | 100 | |
| | No | Recuento | 4 | 6 | |
| | | % | 57,1 | 100 | |
| | Si | Recuento | 3 | 0 | |
| | | % | 42,9 | 0 | |
| | Total | Recuento | 7 | 6 | |
| | | % | 100 | 100 | |

A nivel de la pared bronquial (Tabla XXV) observamos que:

1.-Produce un mayor grado de inflamación (moderada y grave) en los animales que han recibido tratamiento con células madres y Tissucol[®] a los 10 días ($p=0,025$) que no se aprecia en los animales controles.

2.-Protege de la aparición de necrosis a los 20 días ya que ninguno de los animales tratados presentó necrosis frente a un 71,4% de los animales controles que si la presentaron ($p=0,003$).

3.- Presencia de células de gran tamaño en el tejido conectivo de la pared bronquial.

Tabla XXV. Hallazgos microscópicos de la pared bronquial con Tissucol[®] +ADSC

| Pared bronquial | | Control | Tissucol [®] + ADSC | p | | | |
|-----------------|-----------------|--------------------|------------------------------|------|-------|------|-------|
| Inflamación | Leve | Recuento | 4 | 1 | 0,025 | | |
| | | % | 100 | 20 | | | |
| | Moderada | Recuento | 0 | 2 | | | |
| | | % | 0 | 40 | | | |
| | Grave | Recuento | 0 | 2 | | | |
| | | % | 0 | 40 | | | |
| | Total | Recuento | 4 | 5 | | | |
| | | % | 100 | 100 | | | |
| | 20 días | Leve | Recuento | 6 | | 5 | 0,906 |
| | | | % | 85,7 | | 83,3 | |
| Moderada | | Recuento | 1 | 1 | | | |
| | | % | 14,3 | 16,7 | | | |
| Grave | | Recuento | 0 | 0 | | | |
| | | % | 0 | 0 | | | |
| Total | Recuento | 7 | 6 | | | | |
| | % | 100 | 100 | | | | |
| Fibrosis | 10 días | Inexistente | Recuento | 0 | 0 | | |
| | | % | 0 | 0 | | | |
| | Focal | Recuento | 0 | 0 | | | |
| | | % | 0 | 0 | | | |



| | | | | | | |
|----------|---------|-------------|----------|------|-----|-------|
| Necrosis | 20 días | Difuso | % | 0 | 0 | 0,253 |
| | | | Recuento | 4 | 5 | |
| | | Total | % | 100 | 100 | |
| | | | Recuento | 4 | 5 | |
| | | Inexistente | % | 0 | 0 | |
| | | | Recuento | 0 | 0 | |
| | 10 días | Focal | % | 14,3 | 0 | |
| | | | Recuento | 1 | 0 | |
| | | Difuso | % | 85,7 | 100 | |
| | | | Recuento | 6 | 6 | |
| | | Total | % | 100 | 100 | |
| | | | Recuento | 7 | 6 | |
| 20 días | Sí | % | 0 | 0 | | |
| | | Recuento | 0 | 0 | | |
| | No | % | 100 | 100 | | |
| | | Recuento | 4 | 5 | | |
| | Total | % | 100 | 100 | | |
| | | Recuento | 4 | 5 | | |
| 20 días | Sí | % | 71,4 | 0 | | |
| | | Recuento | 5 | 0 | | |
| | No | % | 28,6 | 100 | | |
| | | Recuento | 2 | 6 | | |
| | Total | % | 100 | 100 | | |
| | | Recuento | 7 | 6 | | |

A nivel de la pleura peribronquial (Tabla XXVI) se observa:

1.-Mayor grado de inflamación grave a los 10 días ($p=0,002$) y a los 20 días ($p=0,001$).

2.-Fibrosis con distribución difusa de la misma no significativa a los 10 días ($p=0,136$), que es significativa a los 20 días ($p=0,013$).

Tabla XXVI. Hallazgos microscópicos de la Pleura peribronquial con Tissucol[®] +ADSC

| Pleura peribronquial | | Control | Tissucol [®] + ADSC | p | |
|----------------------|----------|----------|------------------------------|---|-------|
| Inflamación | 10 días | Leve | Recuento | 2 | 0,002 |
| | | % | 50 | 0 | |
| | Moderada | Recuento | 2 | 0 | |
| | | % | 50 | 0 | |



| | | | | | | | |
|-----------------|--------------------|--------------------|----------|------|--------------|--------------|--------------|
| Fibrosis | 20 días | Grave | Recuento | 0 | 5 | 0,001 | |
| | | | % | 0 | 100 | | |
| | | Total | Recuento | 4 | 5 | | |
| | | | % | 100 | 100 | | |
| | | Leve | Recuento | 7 | 1 | | |
| | | | % | 100 | 16,7 | | |
| | Moderada | Recuento | 0 | 0 | | | |
| | | % | 0 | 0 | | | |
| | Grave | Recuento | 0 | 5 | | | |
| | | % | 0 | 83,3 | | | |
| | Total | Recuento | 7 | 6 | | | |
| | | % | 100 | 100 | | | |
| 10 días | Inexistente | Recuento | 1 | 0 | 0,136 | | |
| | | % | 25 | 0,0 | | | |
| | Focal | Recuento | 1 | 0 | | | |
| | | % | 25 | 0 | | | |
| | Difuso | Recuento | 2 | 5 | | | |
| | | % | 50 | 100 | | | |
| | Total | Recuento | 4 | 5 | | | |
| | | % | 100 | 100 | | | |
| | 20 días | Inexistente | Recuento | 2 | | 1 | 0,013 |
| | | | % | 28,6 | | 16,7 | |
| Focal | | Recuento | 4 | 0 | | | |
| | | % | 57,1 | 0 | | | |
| Difuso | | Recuento | 1 | 5 | | | |
| | | % | 14,3 | 83,3 | | | |
| Total | | Recuento | 7 | 6 | | | |
| | | % | 100 | 100 | | | |

En las siguientes figuras se muestran algunos de los hallazgos histológicos descritos en el muñón bronquial tras neumonectomía.

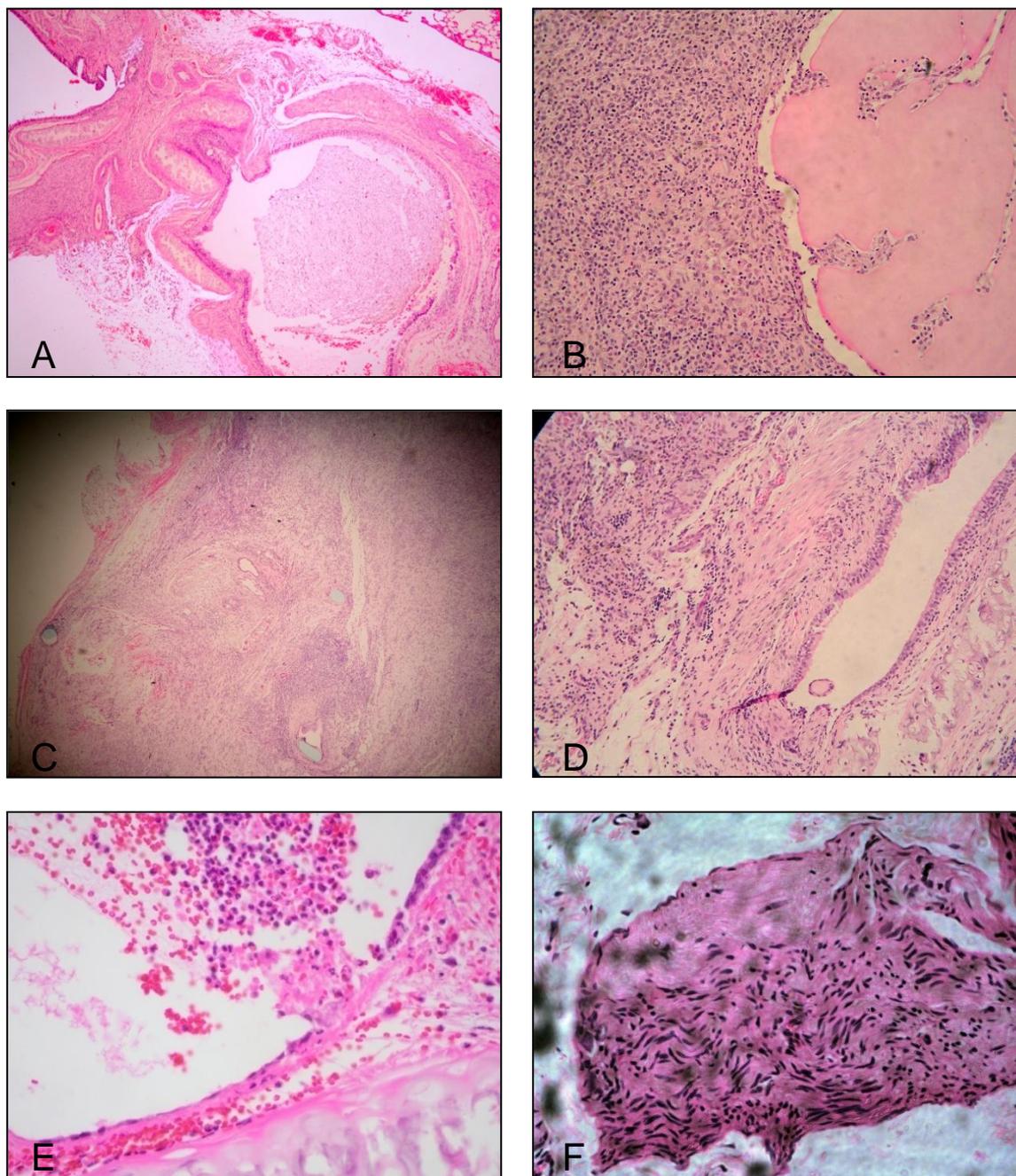


Figura 42. Imágenes de las categorías histológicas evaluadas

- A: Vista general del muñón bronquial a 4x/0.10.
 B: Infiltrado linfoplasmocitario de pared bronquial rodeando al Tissucol. Inflamación grave. 20x/0.40
 C: Fibrosis difusa de pared bronquial. Nótese el hilo de sutura (color azul). 10x/0.25
 D: Infiltrado linfoplasmocitario moderado de mucosa y sub-mucosa, pared bronquial y fibrosis focal. 20x/0.40
 E: Descamación y necrosis de mucosa y submucosa. 40x/0.65
 F: Necrosis de pared bronquial. Obsérvese la pérdida de organización y celularidad de fibroblastos. 40X/0.65

3.- Análisis de los cambios en la expresión de genes

El estudio de expresión de genes se ha realizado en 60 animales. La distribución de frecuencias de la expresión de genes entre los animales que han recibido los diferentes tratamientos del muñón bronquial se ha analizado en base a la media, salvo Vegfa que se ha valorado en base a la mediana y tras ponderar todos los valores individuales con respecto a la media, o la mediana del grupo control.

3.1.- Colágeno 2a1

No se han observado cambios significativos en la expresión de col2a1 a los 10 y 20 días en los grupos tratados con Tissucol[®], PPP y la combinación de Tissucol[®]+ADSC. Sí se ha observado un incremento significativo de su expresión en el tratamiento con ADSC exclusivamente tanto a los 10 como a los 20 días.

Los datos de la expresión de Col2a1 se muestran en la siguiente tabla:

Tabla XXVII. Expresión de Col2a1 en el muñón bronquial postneumonectomía

| | | Col2a1 | |
|---------------|-----------------------------|-----------|--------------|
| | Grupo | Media±SD | p |
| 10días | Control | 1,01±0,24 | |
| | Tissucol [®] | 1,57±1,02 | 0,302 |
| | Plasma | 1,31±0,72 | 0,439 |
| | ADSC | 3,66±1,26 | 0,020 |
| | Tissucol [®] +ADSC | 2,44±2,74 | 0,796 |
| 20días | Control | 1,00±0,42 | |
| | Tissucol [®] | 0,93±0,15 | 1,000 |
| | Plasma | 0,81±0,29 | 0,796 |
| | ADSC | 0,55±0,09 | 0,039 |
| | Tissucol [®] +ADSC | 1,63±0,92 | 0,480 |

A continuación se muestra gráficamente la expresión del gen Col2a1 con significación estadística (*).



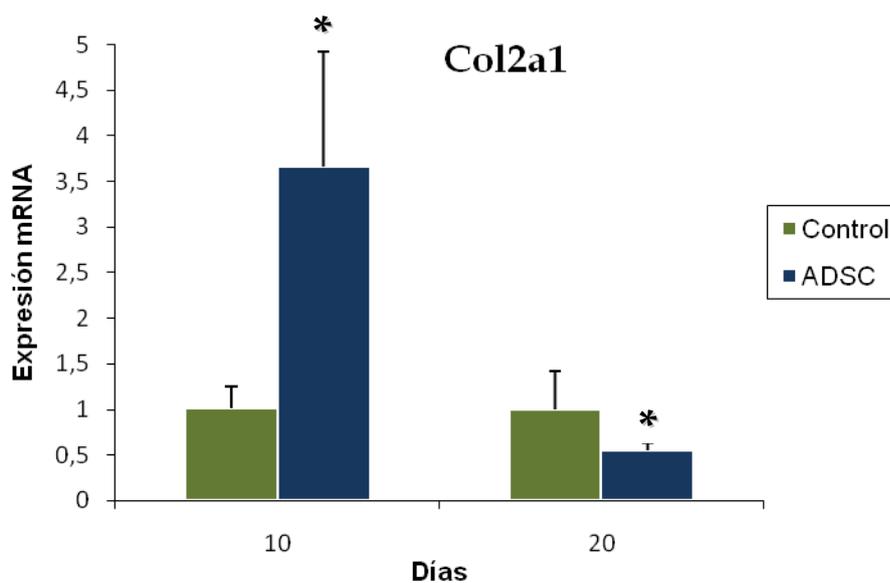


Figura 43. Expresión de Col2a1, control vs ADSC

3.2.-Ctgf

Los datos de la expresión de Ctgf se muestran en la siguiente tabla:

Tabla XXVIII. Expresión de Ctgf en el muñón bronquial postneumonectomía

| Ctgf | | | |
|--------|-----------------------------|-----------|-------|
| Grupo | Media±SD | p | |
| 10días | Control | 1,00±0,39 | |
| | Tissucol [®] | 0,64±0,15 | 0,197 |
| | Plasma | 0,83±0,30 | 0,606 |
| | ADSC | 0,91±0,45 | 0,796 |
| | Tissucol [®] +ADSC | 0,84±0,29 | 0,606 |
| 20días | Control | 1,00±0,33 | |
| | Tissucol [®] | 1,02±0,27 | 1,000 |
| | Plasma | 1,02±0,40 | 0,796 |
| | ADSC | 0,78±0,12 | 0,302 |
| | Tissucol [®] +ADSC | 1,07±0,23 | 1,000 |

No se han observado cambios significativos en la expresión de Ctgf a los 10 y 20 días en ninguno de los grupos tratados.



3.3.- Sox 6

Los datos de la expresión de Sox 6 se muestran en la siguiente tabla:

Tabla XXIX. Expresión de Sox 6 en el muñón bronquial postneumonectomía

| Sox 6 | | | |
|---------|-----------------------------|-----------|--------------|
| Grupo | Media±SD | p | |
| 10 días | Control | 1,01±0,16 | |
| | Tissucol [®] | 1,66±0,88 | 0,439 |
| | Plasma | 1,02±0,34 | 0,439 |
| | ADSC | 2,35±1,54 | 0,121 |
| | Tissucol [®] +ADSC | 1,33±0,49 | 0,197 |
| 20 días | Control | 1,01±0,20 | |
| | Tissucol [®] | 1,37±0,23 | 0,039 |
| | Plasma | 1,42±0,34 | 0,121 |
| | ADSC | 1,79±0,20 | 0,020 |
| | Tissucol [®] +ADSC | 1,23±0,32 | 0,289 |

No se han observado cambios significativos en la expresión de Sox 6 a los 10 días en los grupos que recibieron tratamiento, salvo un incremento de su expresión no significativo en el grupo de Tissucol[®] y ADSC. Si se ha observado un incremento significativo de su expresión en el tratamiento con Tissucol[®] ($p=0,039$) y con ADSC ($p=0,020$) a los 20 días.

A continuación se muestra gráficamente la expresión del gen Sox6 con significación estadística (*).

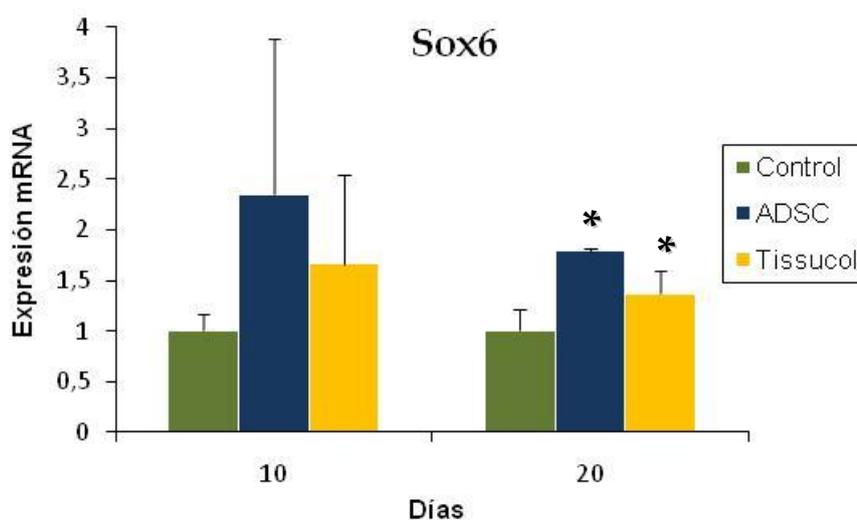


Figura 44. Expresión de Sox6, control vs ADSC y Tissucol[®]



3.4.- *Tgfβ-1*

Los datos de la expresión de *Tgfβ-1* se muestran en la siguiente tabla:

Tabla XXX. Expresión de *Tgfβ* en el muñón bronquial postneumonectomía

| <i>Tgfβ-1</i> | | | |
|----------------|-----------------------------|-----------|--------------|
| Grupo | Media±SD | p | |
| 10 días | Control | 1,00±0,26 | |
| | Tissucol [®] | 1,42±0,69 | 0,302 |
| | Plasma | 1,40±0,69 | 0,439 |
| | ADSC | 0,49±0,30 | 0,071 |
| | Tissucol [®] +ADSC | 1,79±0,94 | 0,302 |
| 20 días | Control | 1,00±0,71 | |
| | Tissucol [®] | 0,57±0,34 | 0,302 |
| | Plasma | 1,29±1,57 | 0,606 |
| | ADSC | 0,23±0,11 | 0,020 |
| | Tissucol [®] +ADSC | 0,78±0,79 | 0,724 |

No se han observado cambios significativos en la expresión de *Tgfβ-1* a los 10 días en los grupos que recibieron tratamiento salvo en el de ADSC en el que se ha observado un descenso de su expresión a los 10 días ($p=0,071$) y a los 20 días ($p=0,020$).

A continuación se muestra gráficamente la expresión del gen *Tgfβ-1* con significación estadística (*).

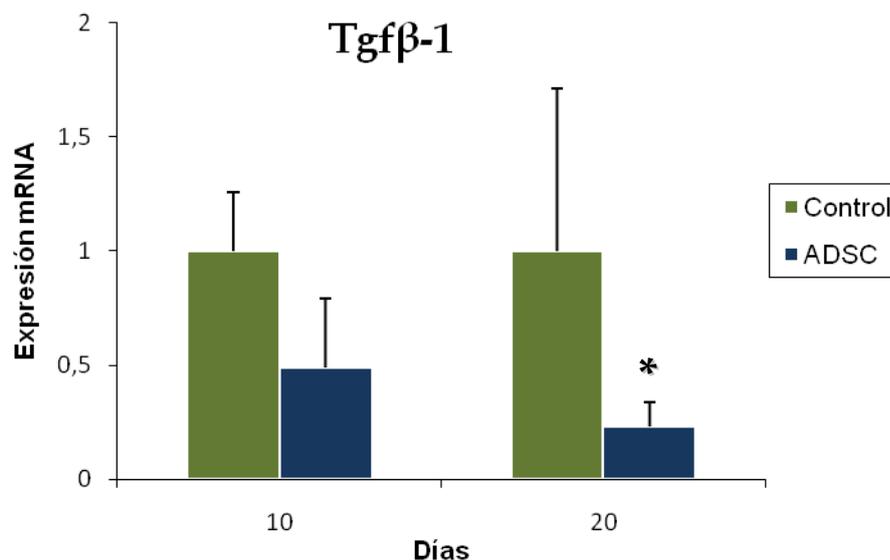


Figura 45. Expresión de *Tgfβ-1* control vs ADSC



3.5.- Vegfa

Los datos de la expresión de Vegfa se muestran en la siguiente tabla:

Tabla XXXI. Expresión de Vegfa en el muñón bronquial postneumonectomía

| Vegfa | | | |
|--------|-----------------------------|------------------|--------------|
| Grupo | Mediana | p | |
| 10días | Control | 1,00 (0,92-1,61) | |
| | Tissucol [®] | 1,00 (0,53-5,04) | 1,000 |
| | Plasma | 0,94 (0,84-1,56) | 1,000 |
| | ADSC | 0,30 (0,23-0,70) | 0,524 |
| | Tissucol [®] +ADSC | 0,95 (0,36-1,77) | 1,000 |
| 20días | Control | 1,00 (0,38-5,43) | |
| | Tissucol [®] | 0,95 (0,28-1,20) | 1,000 |
| | Plasma | 1,52 (0,75-3,33) | 0,524 |
| | ADSC | 0,78 (0,46-2,13) | 0,048 |
| | Tissucol [®] +ADSC | 1,50 (0,57-1,87) | 1,000 |

No se han observado cambios significativos en la expresión de Vegfa a los 10 días en los grupos que recibieron tratamiento. Se ha observado un descenso de su expresión en el tratamiento con Tissucol[®] a los 20 días ($p=0,020$).

A continuación se muestra gráficamente la expresión del gen Vegfa con significación estadística (*).

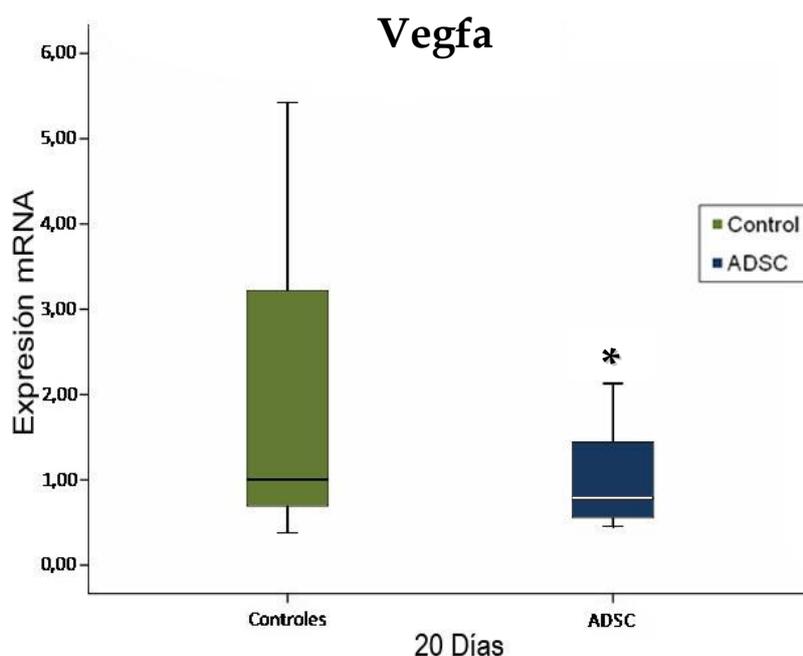


Figura 46. Expresión de Vegfa, control vs ADSC



3.6.- *Igf-1*

Los datos de la expresión de *Igf-1* se muestran en la siguiente tabla:

Tabla XXXII. Expresión de *Igf-1* en el muñón bronquial postneumonectomía

| Igf-1 | | | |
|---------|----------------|-----------|--------------|
| Grupo | Media±SD | p | |
| 10 días | Control | 1,00±0,17 | |
| | Tissucol® | 0,26±0,21 | 0,020 |
| | Plasma | 1,74±1,02 | 0,302 |
| | ADSC | 0,41±0,33 | 0,039 |
| | Tissucol®+ADSC | 0,45±0,20 | 0,039 |
| 20 días | Control | 1,00±1,19 | |
| | Tissucol® | 0,48±0,15 | 0,796 |
| | Plasma | 1,28±0,80 | 0,439 |
| | ADSC | 0,05±0,03 | 0,020 |
| | Tissucol®+ADSC | 0,40±0,20 | 0,724 |

Se ha observado un descenso en la expresión de *Igf-1* en los grupos tratados con Tissucol® (p=0,020), ADSC (p=0,039) y la combinación de Tissucol®+ADSC (p=0,039) a los 10 días. Sin embargo, el descenso en su expresión fue significativo exclusivamente en el tratamiento con ADSC a los 20 días (0,020).

A continuación se muestra gráficamente la expresión del gen *Igf-1* con significación estadística (*).

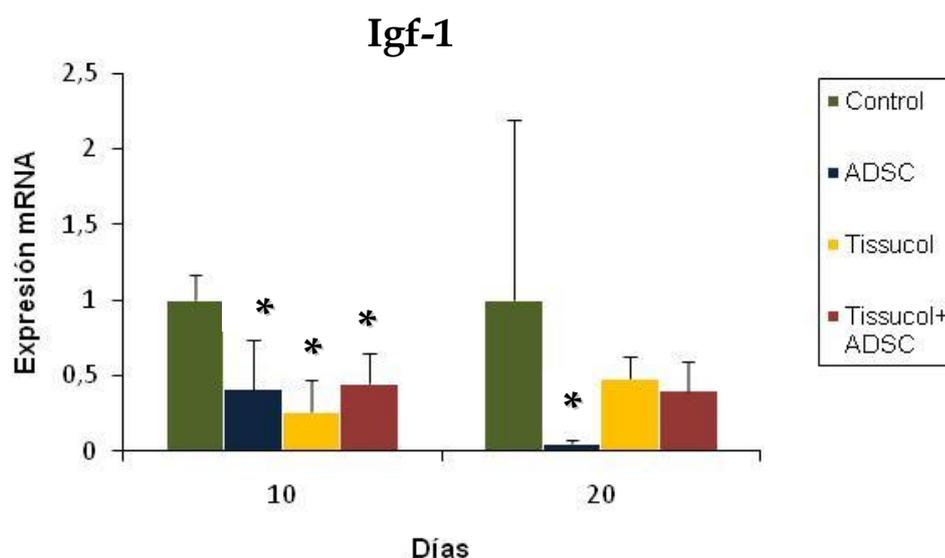


Figura 47. Expresión de *Igf-1*, control vs. ADSC, Tissucol® y Tissucol®+ADSC



3.7.- *Agc-1*

Los datos de la expresión de *Agc-1* se muestran en la siguiente tabla:

Tabla XXXIII. Expresión de *Agc-1* en el muñón bronquial postneumectomía

| Agc-1 | | | |
|--------|----------------|-----------|--------------|
| Grupo | Media±SD | p | |
| 10días | Control | 1,31±0,57 | |
| | Tissucol® | 1,60±0,73 | 0,512 |
| | Plasma | 0,98±0,35 | 0,190 |
| | ADSC | 1,60±0,31 | 0,039 |
| | Tissucol®+ADSC | 1,44±0,43 | 0,278 |
| 20días | Control | 1,00±0,45 | |
| | Tissucol® | 0,73±0,21 | 0,197 |
| | Plasma | 0,74±0,21 | 0,439 |
| | ADSC | 0,96±0,08 | 0,439 |
| | Tissucol®+ADSC | 1,09±0,22 | 0,724 |

Se ha observado un incremento en la expresión de *Agc-1* en el tratamiento con ADSC ($p=0,039$) los 10 días. No se ha observado cambios en su expresión en ninguno de los grupos que recibieron tratamiento a los 20 días.

A continuación se muestra gráficamente la expresión del gen *Agc-1* con significación estadística (*).

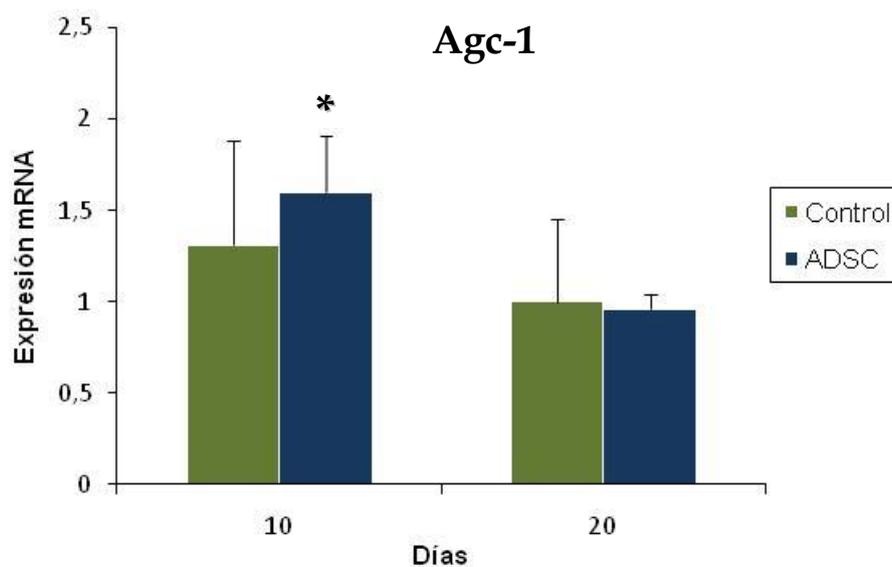


Figura 48. Expresión de *Agc-1*, control vs ADSC



DISCUSION





En la actualidad, la FBP continúa siendo una temible complicación postquirúrgica, a pesar de los avances experimentados en los cuidados perioperatorios y postoperatorios, así como de las técnicas quirúrgicas empleadas en Cirugía Torácica. Por otro lado, los avances médicos en el campo de la quimioterapia y la radioterapia, que han permitido que pacientes oncológicos con tumores avanzados puedan ser intervenidos quirúrgicamente, han influido también en la incidencia de aparición de las FBP.

La FBP compromete de una forma muy seria la vida del paciente y sus posibilidades de recuperación total tras la intervención, pues causa una disrupción de la vía aérea que contamina el espacio pleural y anega de líquido el pulmón o pulmones remanentes, originando una neumonía por aspiración (de máximo riesgo en el caso de pulmón único), sepsis y en muchos casos un fatal SRDA, que pone en peligro la vida del enfermo, relegando a un segundo plano todos los esfuerzos quirúrgicos y médicos realizados por tratar y en última medida curar al paciente de la neoplasia que amenaza su vida.

De hecho, las FBP postquirúrgicas son una de las causas que originan más reingresos hospitalarios tras las resecciones pulmonares. En concreto, en algunas series es la segunda causa de reingreso (un 10% del total de los mismos), por detrás del empiema pleural⁷⁴. La mortalidad de una FBP perioperatoria tras una resección pulmonar mayor, esté acompañado o no de empiema de la cavidad es alta, desde un 27,2% hasta un 50% según las series^{43,59,65,66}. Ésta variabilidad depende de la etiología, la técnica quirúrgica, la experiencia del cirujano⁶⁷⁻⁶⁹ y de las condiciones del paciente, ya que la incidencia de FBP es menor cuanto mejor sean las condiciones del paciente y es mayor en las neumonectomías (4,5-20%) que en las lobectomías (0.5%)⁶⁵. Además hay que añadir que si el paciente requiere una intervención quirúrgica de urgencia para resolver la FBP, se estima que ello incrementa el riesgo de fallecimiento en un 10% más⁷⁴.

A pesar de que en la práctica clínica y de forma preventiva y en algunas ocasiones con base empírica, los cirujanos realizan coberturas del muñón bronquial con colgajos musculares pediculados en pacientes con alto riesgo como los sometidos a terapia neoadyuvante, para proteger al muñón bronquial de la isquemia adicional y la necrosis⁴⁷ o con otros materiales descritos como la pleura, la grasa pericárdica y algunos sellantes biológicos de uso comercial como el Tisuscol[®] o Bioglue[®], ninguno de los tratamientos ha demostrado ser óptimo y eficaz para prevenir la FBP.

Como ya hemos comentado el mejor tratamiento de la FBP es su prevención. Una lesión que altera la continuidad de la superficie de un tejido desencadena diversas reacciones celulares y mecanismos de reparación. Para restablecer la integridad del área lesionada se cuenta con diversos procesos de acción simultánea conocidos como



fases de la reparación. Las fases identificadas son la inflamatoria, la proliferativa y la de remodelación tisular²⁰⁰⁻²⁰⁶. Los distintos mecanismos que se producen en momentos diferentes provocan la liberación de señales químicas, que sirven para modular ordenadamente la migración, proliferación y diferenciación de las células, así como las síntesis y degradación de las proteínas de la matriz extracelular (MEC). Éstas no tienen límites estrictos en el tiempo y generan como resultado un tejido con características similares, pero no idénticas, al tejido ileso^{202,204}.

Qué ocurre con el muñón bronquial remanente tras una resección pulmonar y qué mecanismos moleculares están implicados en las fases de reparación del mismo es algo que aún no se conoce. El bronquio presenta sus peculiaridades en cuanto a la respuesta a una injuria, ya que es abundante en cartílago. Al ser el cartílago avascular, este presenta algunas modificaciones con respecto a la respuesta de los tejidos vascularizados ante la agresión. Así, en el cartílago hialino articular, la fase de necrosis postraumática es similar a la de los tejidos vascularizados, caracterizándose por la muerte celular y la interrupción de la matriz, en grado variable dependiendo de la extensión y la naturaleza del traumatismo. Sin embargo, la fase de inflamación está ausente, ya que está fundamentalmente mediatizada por el sistema vascular y la fase de reparación estará condicionada al número de células capaces de responder al traumatismo. Es así que nos encontramos con numerosos estudios²⁰⁷⁻²¹⁰ que muestran la relativa incapacidad de respuesta del cartílago articular al traumatismo, y su escasa capacidad de regeneración^{208,210,211} donde sólo cabe demostrar un aumento temporal de la actividad mitótica en las células cartilaginosas adyacentes a los márgenes del defecto, actividad asociada a un aumento de la síntesis celular de los componentes de la matriz. Existe escasa información sobre la reparación del cartílago bronquial a diferencia de lo que ocurre con el cartílago articular, teniendo ambos en común el que pertenecen al mismo tipo de cartílago, sin embargo el bronquio es más que cartílago, es una estructura dinámica con multitud de tipos celulares y por tanto distintas respuestas a la agresión. Si estas respuestas pueden ser moduladas por agentes biológicos externos, tampoco se conoce.

En este sentido, la aplicación de adhesivos biológicos como sustitutos o refuerzo de las suturas fue introducida en 1975 en Austria y posteriormente se han extendido y utilizado como agentes selladores y hemostáticos en múltiples campos de la cirugía^{212,213}. Chevrel en 1990²¹⁴ describió la utilización del adhesivo de fibrina Tissucol[®] en las eventroplastias abdominales para mejorar la adherencia de la malla a los tejidos y reducir el espacio muerto. Desde entonces el Tissucol[®] ha sido utilizado ampliamente en casi todos los campos de la cirugía como la Cirugía Torácica, para el sellado de laceraciones de parénquima pulmonar y hemostasia quirúrgica^{215,216}, dado que forma un coágulo fisiológico hemostático, adhesivo e impermeable.



Sin embargo, a pesar de los muchos estudios clínicos que se han realizado, ninguno hasta ahora, ha valorado los fenómenos histológicos que se producen en el muñón bronquial cuando se aplica localmente Tissucol[®], ni los cambios que puede inducir en la expresión génica. En nuestro estudio, a nivel macroscópico observamos que el coágulo de fibrina sella el muñón bronquial a los 20 días del tratamiento; sin embargo, microscópicamente no muestra signos de protección del mismo ya que induce la aparición de necrosis de la mucosa y submucosa y no disminuye la aparición de necrosis de la pared, siendo en este sentido el menos eficaz de los tratamientos valorados en nuestro estudio y por la tanto no parecería recomendable para prevenir la FBP. De acuerdo con ello y con los malos resultados obtenidos con Tissucol[®] en el tratamiento endoscópico de FBP, descritos por Matthew y col²¹⁷, su uso para el tratamiento endoscópico de la FBP establecida debería desaconsejarse y valorarse otro tipo de sellantes.

La respuesta inflamatoria del muñón bronquial observada en todos los grupos de tratamiento, puede tener una doble lectura. Por un lado, la inflamación es una reacción de la microvasculatura caracterizada por el desplazamiento de líquido y leucocitos de la sangre hacia el compartimiento extravascular. Ésta es un intento del huésped por localizar y eliminar células metabólicamente alteradas, partículas extrañas, o antígenos²¹⁸. En ésta reacción tiene lugar una interrelación entre muchos tipos celulares y mediadores como citocinas, factores de crecimiento (Vegfa, Tgfβ-1, entre otras) y otros tipos de moléculas como las quimioquinas. Ésta fase de la cicatrización es importante debido a que actúan, entre otras células, los macrófagos que son encargados de coordinar la liberación de citocinas y estimular muchos de los procesos subsiguientes de la cicatrización de una herida. Sin la actividad de los monocitos o macrófagos, la herida evoluciona lentamente con un desbridamiento inadecuado y una proliferación tardía de los fibroblastos y células endoteliales^{204,206} que puede facilitar la necrosis²¹⁹⁻²²⁴ como en el caso del Tissucol[®] y por otro lado, la gran liberación de mediadores puede actuar de forma protectora contra la necrosis como es el caso de los grupos de PPP autólogo y ADSC.

Por otro lado, durante la última década se ha desarrollado lo que hoy parece ser una nueva opción de tratamiento: la aplicación en la zona a regenerar de preparados plasmáticos. Se están usando para mejorar la regeneración de tejidos en periodoncia, ortopedia, cirugía maxilofacial y cirugía plástica. Nunca antes se había probado ni como tratamiento de la FBP ni en su prevención, como es nuestro caso.

El plasma rico en plaquetas (PRP) fue introducido por Whitman¹¹³ en 1997. Se decía que a través de la activación de las plaquetas, se liberaban factores de crecimiento que mejorarían la regeneración de tejido al aumentar la mitosis, la producción de colágeno o la diferenciación celular, cruciales en la reparación de las heridas. Basándose en la idea de que si pocos son buenos, muchos serán mejor, se



supuso que aumentando el número de plaquetas la regeneración sería mayor²²⁵. La literatura es contradictoria en cuanto a los resultados obtenidos y sus posibles efectos no deseados^{118,226}. Esas aparentes contradicciones son el motivo del planteamiento de los objetivos de este trabajo y el porqué de hayamos usado PPP autólogo. En nuestro caso, el motivo de realizar una sola centrifugación es facilitar la traslacionalidad de éste estudio y ser prácticos en una situación real de quirófano. De hecho, otros autores han obtenido plasma con una sola centrifugación y en condiciones de centrifugación similares a las nuestras, como describieron Fontana y cols. (1500 rpm 15 min)²²⁷, Eppley y cols. (3200 rpm 12 min)²²⁸, Jensen y cols. (4000 rpm 20 min)²²⁹. En todos ellos ha habido un enriquecimiento plaquetario de 240%, 813% y 670% respectivamente. Sin embargo, con nuestro protocolo encontramos disminuidos estos recuentos plaquetarios e incrementados los niveles de IGF-1 y probablemente de otros factores que han sido activados al momento de la centrifugación de la sangre.

En el grupo tratado con PPP autólogo se observó un mayor grado de inflamación con respecto al grupo control, sin embargo a diferencia del grupo de Tissucol[®], el PPP protegió al muñón de la aparición de la necrosis y propició una distribución difusa de la fibrosis del muñón a los 20 días. Diversos estudios coinciden en que la administración en forma líquida de los GFs, especialmente cuando se trabaja en un lecho quirúrgico abierto, favorece que estos se diluyan en el tejido y sean atacados por proteasas que los inactiven^{230,231}. Con un vehículo apropiado, los GFs mantendrían una concentración ideal en el tejido para producir una estimulación celular adecuada. El efecto del PPP autólogo en el lugar de administración se prolonga durante 5 días, y sus efectos sobre la aceleración de la regeneración ósea se pueden observar a las 4 semanas después de su administración^{112,232}. En este sentido, en nuestro estudio la eficacia del PPP autólogo, puede residir en la forma de administración usada, ya que el plasma líquido obtenido por la centrifugación, al ser activado con calcio se convierte en un gel donde quedan retenidos y protegidos los GFs dentro de un coágulo de fibrina, que permite una liberación prolongada de los mismos y por tanto mayor tiempo de acción, lo que puede haber ayudado a que se observen cambios regenerativos del muñón desde los 10 días de su administración. Todo ello, junto alto nivel de concentración de IGF-1 en el plasma demuestra que los GFs no se han perdido durante la manipulación de nuestro preparado²³³.

En este sentido IGF-1 es uno de los GFs más abundantes en el plasma y un potente estimulante del crecimiento en casi todos los tejidos de mamíferos²³⁴. Está implicado en la regulación del metabolismo de proteínas y ejerce potentes efectos sobre la proliferación y la diferenciación de las células en la mayor parte de los tejidos. IGF-1 señala a través de una compleja red intracelular de quinasas que en última instancia son las responsables de regular la proliferación, la diferenciación y de proteger a las células frente a la apoptosis²³⁵. Sus efectos celulares están influenciados por la expresión de un grupo de proteínas con capacidad para fijarlo, la



familia de IGFBP (1-6)²³⁶. Además, es crucial en la homeostasis del cartílago y se sabe que los condrocitos de articulaciones inflamadas no muestran respuesta a este GF²³⁷ porque producen excesivos niveles de IGFBP, que bloquean la unión de Igf-1 a su receptor^{238,239,240}. De hecho, en nuestro estudio, el grupo de PPP es el único donde la expresión de Igf-1 no sólo no ha descendido sino que además supera la de los controles aunque no significativamente. Sin embargo, hay que tener en cuenta que pequeñas variaciones en la expresión de un gen puede producir importantes cambios biológicos como puede ser nuestro caso. En cambio, el Tissucol[®] disminuye su expresión significativamente de forma precoz, lo que puede influir en los peores resultados mostrados por este grupo de tratamiento, teniendo en cuenta además que la gran inflamación observada en el muñón bronquial podría favorecer la expresión de IGFBP que bloqueara sus acciones.

Aunque los primeros estudios con células madre datan de la década de los 70, los avances realizados en los últimos años han despertado el interés no sólo de la comunidad científica, sino, de la sociedad en general. Las implicaciones éticas en el uso de la célula madre embrionaria y las nuevas evidencias científicas que demuestran un mayor potencial de las células madre adultas que el inicialmente esperado, han reavivado aún más el debate sobre sus posibles aplicaciones terapéuticas. Existen muy escasos datos en la literatura de su uso para el tratamiento de FBP establecidos²⁴¹ y hasta ahora no se han utilizado como tratamiento preventivo de la FBP, ni se conocen sus efectos sobre la reparación bronquial ni sus mecanismos de acción molecular.

En modelos experimentales se ha demostrado que las ADSC son capaces de regenerar tejidos deteriorados o lesionados como hueso, cartílago, tejido hepático o miocardio²⁴²⁻²⁴⁴. En nuestro estudio, al analizar los resultados obtenidos en el grupo tratado con ADSC encontramos que macroscópicamente se observó oclusión del muñón bronquial de forma similar a lo que ocurre con el PPP y el Tissucol[®]. La aplicación de ADSC sobre el muñón protege al muñón de la FBP puesto que evita la aparición de úlceras y de necrosis a nivel microscópico. Ambos son factores importantes a tener en cuenta como desencadenantes de FBP ya que se ha observado necrosis de la pared bronquial en las FBP que tienen lugar tras una resección pulmonar²²⁶. De hecho, Shields²⁴⁵ observó un aumento en la incidencia de FBP en pacientes con tuberculosis, debido a una ulceración de la pared bronquial secundaria a cavidades e infecciones necrotizantes y también por necrosis del muñón tras una resección pulmonar. Pomerantz²⁴⁶ corroboró estos resultados, pues describió una incidencia de FBP del 10.5% después de una resección pulmonar en 85 pacientes con tuberculosis multiresistente (MDR).



Hasta ahora las ADSC que se han utilizado de forma terapéutica son administradas en la mayoría de los casos, inmersas en algún vehículo como Tissucol^{®247,248}. En nuestro caso, la efectividad del tratamiento obtenido mediante la administración directa sobre el muñón indica que las mismas poseen una adhesividad tisular importante. Además, la presencia de células gigantes multinucleadas inmersas en el espesor de la pared del muñón bronquial tratado con ADSC, que no se han observado en los grupos de Tissucol[®] y plasma, indica la capacidad de proliferación, migración y diferenciación de las ADSC en el muñón bronquial. Estas especiales características intrínsecas de las ADSC hacen que la adición de las mismas al Tissucol[®] revierta los efectos negativos de esta sellante biológico sobre el muñón bronquial y hace que la combinación se comporte de la misma forma que la aplicación de las ADSC aisladas, protegiendo al muñón de una posible FBP.

En teoría, la instilación “*in situ*” de ADSC evitaría el tiempo de reabsorción necesario del vehículo con el que se administran y disminuiría el tiempo de reclutamiento celular y por ende, aceleraría los mecanismos bioquímicos relacionados con la reparación del tejido. Urist^{249,250} describió hace unos años que las ADSC podían ser usadas como células progenitoras de condrocitos para la reparación de cartílago basándose en la estimulación del contacto de célula a célula o por medio de factores de crecimiento como Tgf y BMP-2. En este sentido, en nuestro estudio la aplicación de ADSC indujo en el muñón bronquial la expresión de Col2a1 y Tgf- β 1. El Tgf- β es uno de los factores más importantes implicados en la regeneración y es secretado por las células mesenquimales^{134,138}. Sus efectos dependen de su fuente de producción, de la dosis aplicada y del ambiente que lo rodea²⁵¹. Una de las principales funciones de Tgf- β es minimizar los fenómenos inflamatorios, ya que presentan una potente acción antiinflamatoria. De hecho, se ha descrito la propiedad antiinflamatoria de las ADSC²⁵²⁻²⁵⁴ como una característica intrínseca de las mismas. Por lo que la disminución de la expresión de Tgf-B1 puede ser responsable del gran grado de inflamación que produce la aplicación de ADSC en el muñón bronquial.

Vegf, es el mayor regulador tanto *in vitro* como *in vivo* de la angiogénesis durante diversos procesos fisiopatológicos, como pueden ser el desarrollo embriológico o la curación de las heridas. En nuestro estudio, hemos observado una disminución en su expresión a los 20 días en el tratamiento con ADSC que puede indicar que las fases de reparación inducidas por ellas se encuentran en etapas más avanzadas de la cicatrización que en las inducidas por los otros sellantes biológicos.

Es probable que la acción reparadora de las ADSC esté relacionada con la inducción de la producción de células diferenciadas especializadas en la reposición del tejido dañado. Por el contrario, los efectos del Igf-1 suelen ser mitóticos o proliferativos y no debe extrañarnos encontrar un incremento de la actividad de células diferenciadas (procedentes de las ADSC) asociada a una disminución



de estímulos mitóticos ya que, raramente, los fenómenos de diferenciación y proliferación (mitogénesis) celulares coexisten o se manifiestan al mismo tiempo en un célula, lo que podría explicar los bajos niveles de expresión de Igf-1 observados en nuestro estudio.

La comprensión molecular de la diferenciación del cartílago ha mejorado durante la última década. Los factores de transcripción promueven la condrogénesis y el mantenimiento del fenotipo del condrocito. En este sentido Sox5, Sox6 y Sox9 han sido identificados como esenciales para la diferenciación del condrocito, formación del cartílago y ha mejorado nuestra comprensión de los eventos moleculares que suceden durante en ella²⁵⁵. Se sabe que Sox5 es un factor de transcripción que controla la diferenciación de las células mesenquimales en condrocitos²⁵⁵, aunque la mayoría de los factores de transcripción y sus vías para la diferenciación y maduración de los condrocitos aún no están claras²⁵⁶. En nuestro caso, la sobreexpresión de Sox 6 puede estar implicada en la diferenciación de las ADSC hacia las líneas celulares mesenquimales que protegen al muñón bronquial de la FBP.

Por otro lado, los condrocitos son los encargados de regular la composición de la MEC, la que a su vez proporciona a estas células las condiciones necesarias para sus funciones²⁵⁷. La MEC del cartílago contiene básicamente agua, colágeno y proteoglicanos. El colágeno predominante en el cartílago es el tipo II, que es un homopolímero de tres cadenas denominadas alfa 1²⁵⁸ y entre los proteoglicanos de la MEC del cartílago articular, el Agc-1 se encuentra en mayor cantidad²⁵⁹, siendo Agc-1 la parte esencial de la MEC que proporciona al tejido cartilaginoso la propiedad de amortiguación. La actividad proteolítica en el cartílago se ha relacionado con la actividad de metaloproteinasas (MMPs), junto a la expresión constitutiva y actividad de una familia de proteasas (ADAMTS o agrecanasas). En relación a nuestros resultados, el aumento en la expresión de Agc-1 en el grupo de ADSC podría estar relacionado con un incremento de la actividad proteolítica temprana que facilitarían la migración y proliferación de las ADSC en el tejido conectivo de la pared del muñón bronquial.

Por último, el incremento de los niveles de expresión de los genes Col2a1, y del factor de transcripción Sox6 y la disminución de Tgf β -1 en el muñón bronquial corrobora los hallazgos descritos de que estos genes están involucrados en la inflamación y en la condrogénesis. Hasta ahora no se había determinado su expresión en el muñón bronquial después de una resección de pulmón. Estos genes podrían ser analizados como potenciales biomarcadores de reparación del muñón bronquial en los pacientes neumonectomizados durante su seguimiento mediante biopsias endoscópicas, lo que podría ayudar a identificar si el proceso de reparación del muñón está activo o por el contrario podría evolucionar hacia la fistulización por lo que debería ser tratado de forma precoz.



Finalmente, podemos concluir que en general el tratamiento preventivo del muñón bronquial con productos biológicos puede ser preferible a la evolución natural de reparación del mismo tras una resección pulmonar. De los cuatros tratamientos valorados en nuestro estudio el menos recomendable es el Tissucol[®], mientras que el PPP autólogo y las ADSC aisladas o con Tissucol[®] han demostrado eficacia para proteger al muñón de una posible FBP. La expresión de los genes identificados en nuestro análisis necesita aún otros estudios complementarios para confirmar o no su papel dentro de la fisiopatología de regeneración del muñón bronquial inducido por estos sellantes biológicos y su posible papel como biomarcadores de reparación del mismo. Desde el punto de vista traslacional, el tratamiento del muñón bronquial tras una resección pulmonar con PPP autólogo es un proceso de fácil realización, económico y disponible en todos los hospitales, mientras que el de ADSC es más costoso, sofisticado técnicamente y por lo tanto sólo disponible en sitios de referencia, aunque ambos son eficaces para proteger al muñón bronquial y podrían reducir significativamente la aparición y la morbi-mortalidad de los paciente afectos de una FBP postquirúrgica. Esta tesis doctoral es la base de nuevos estudios experimentales con los que estamos valorando el efecto a largo plazo de estos sellantes biológicos y del inicio de los ensayos clínicos.



CONCLUSIONES





1º

“Los hallazgos histológicos demostraron que el tratamiento del muñón bronquial tras una neumonectomía con sellantes biológicos induce un mayor grado de inflamación y lo protege de la aparición de necrosis. Ello indica que de forma general, es preferible proteger al muñón bronquial con sellantes biológicos tras una resección pulmonar para evitar la aparición de una FBP”.

2º

“Los hallazgos histológicos demostraron que el tratamiento con Tissucol® induce la aparición precoz de necrosis y menor grado de fibrosis del muñón. Estos hallazgos unidos al coste del producto hacen que probablemente, desde un punto de vista traslacional, sea el menos apropiado de los tratamientos biológicos empleados para prevenir la aparición de FBP y que su uso en el tratamiento endoscópico de la FBP establecida debería evitarse”.

3º

“Los hallazgos histológicos demostraron que el tratamiento con PPP autólogo protege al muñón bronquial de la aparición de necrosis, lo que evitaría la aparición de FBP. Su fácil obtención y procesamiento, aplicación, bajo coste y escaso riesgo, dado que es autólogo, le confiere las características adecuadas para valorar su uso en humanos”.

4º

“Los hallazgos histológicos demostraron que el tratamiento con ADSC disminuye la presencia de necrosis y ulceraciones en el muñón bronquial, protegiéndolo de la FBP. Su adhesividad tisular, capacidad de proliferación y diferenciación permiten su aplicación directa sobre el muñón bronquial, incluso en una gran cavidad como la de neumonectomía sin restarle eficacia”.



5°

“Los hallazgos histológicos demostraron que el tratamiento combinado de ADSC y Tissucol® protege al muñón de la FBP ya que reduce la aparición de necrosis y úlceras. Las propiedades intrínsecas de las ADSC para reparar los tejidos revierten los efectos del Tissucol® y lo convierten en una combinación efectiva. La dificultad tecnológica y el coste económico que conlleva la extracción y preparación de ADSC hace que no sea un método disponible en la mayoría de los hospitales y que su uso traslacional en la actualidad esté más restringido que el del PPP autólogo”.

6°

“La concentración de Igf-1 en el PPP autólogo y su nivel de expresión en el muñón bronquial indican que probablemente este factor de crecimiento está implicado en los beneficiosos efectos de este tratamiento biológico en la prevención de la FBP”.

7°

“El tratamiento con ADSC induce significativamente cambios en la expresión de Col2a1 y Tgfb1 en el muñón bronquial. Muchas de las actividades de estos genes están íntimamente relacionadas con los procesos biológicos de reparación. Además, Tgfb1 presenta una potente acción antiinflamatoria. La disminución en la expresión de Tgfb1 podría estar implicada en el mayor grado de inflamación que produce su aplicación sobre el muñón bronquial”.

8°

“El aumento de expresión Agc-1 observado en el tratamiento con ADSC, podría estar implicada en la actividad proteolítica de la matriz extracelular que facilitaría la migración y proliferación de las ADSC en el tejido conectivo del muñón bronquial, mientras que la sobreexpresión de Sox 6, podría estar implicada en su diferenciación hacia las líneas celulares mesénquimales que participan en los fenómenos de reparación y protección del muñón bronquial”.



9°

“La variación de los niveles de expresión de los genes Col2a1, Tgfb-1, Sox6, Igf1, Vegf y Agc-1 en el muñón bronquial indica que estos genes están involucrados en los fenómenos de reparación inducidos por los sellantes biológicos utilizados. Desde el punto de vista traslacional, podrían ser analizados como potenciales biomarcadores del estado de la reparación del muñón bronquial en los pacientes neumonectomizados mediante biopsias endoscópicas, lo que ayudaría a identificar si el proceso de reparación podría evolucionar hacia la fistulización y por lo tanto, ser tratado de forma precoz. Son necesarios más estudios que nos ayuden a valorar su papel dentro de la fisiopatología de la regeneración del muñón bronquial inducido por estos sellantes biológicos”.





BIBLIOGRAFIA





1. Tresguerres JAF. Fisiología humana. 3era ed, 2005.
2. Stephen RA. Tratado de neumología. 2da ed. Madrid, España: Harcourt, 2001.
3. Frandson RD, Spurgeon TL. Anatomía y fisiología de los animales domésticos. 5ta ed: Interamericana, 1995.
4. Des Jardins TR. Cardiopulmonary anatomy and physiology: essentials for respiratory care. 3era ed: Thomson Delmar Learning, 1999.
5. Davies A, Moores C. The respiratory system: Basic science and clinical conditions. 1era ed. United Kingdom: Elsevier science, 2003.
6. Kristic RV. Human microscopic anatomy. 3era ed. Lausanne-Switzerland: Springer-verlag, 1997.
7. Coburn RF. Airway smooth muscle in health and disease. New York: Plenum press, 1989.
8. Brody AR, Hook GER, Cameron GS, et al. The differentiation capacity of clara cells isolated from the lungs of rabbits. *Lab Invest* 1987; 57:219-229.
9. Manabe T, Ikeda H, Moriga T, Yamashita K. Immunohistochemical localization of the secretory products of rat clara cell. *Anat Rec* 1987; 217:164-174.
10. Souma T. The distribution and surface ultrastructure of airway epithelial cells in the rat lung: A scanning electron microscopic study. *Arch Histol* 1987; 50:419-436.
11. Ten Have-opbroek A. The structural composition of the pulmonary acinus in the mouse. *Anat Embryol* 1986; 174:49-57.
12. Davis ML, Lewandowski J, Dodson RF. Morphology and ultrastructure of the distal airway epithelium in the guinea pig. *Anat Rec* 1984; 209(4):509-22.
13. Linhartova A, Caldwell W, Anderson AE. A proposed alveolar model for adult human lungs: the regular dodecahedron. *Anat Rec* 1986; 214(3):266-72.
14. Banks W. Histología veterinaria aplicada. 2da ed. Mexico: Manual Moderno, 1996.
15. Jubb., Kennedy, Palmer's. Pathology of domestic animals. 5ta ed. Mosby: M Grant Maxie, 1993.
16. Bergeron C, Boulet LP. Structural changes in airway diseases: Characteristics, mechanisms, consequences, and pharmacologic modulation. *Chest* 2006; 129:1068-1087.
17. Tagaya E, Tamaoki J. Mechanisms of airway remodeling in asthma. *Allergology International* 2007; 56:331-340.
18. Barbato A, Turato G, Baraldo S, et al. Epithelial damage and angiogenesis in the airways of children with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174(9):975-81.
19. Fan C. Intrinsic differences of the airway epithelium in childhood allergic asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2006; 174:1066-1067.
20. Slade DJ, Kraft M. Airway remodeling from bench to bedside: current perspectives. *Clin Chest Med* 2006; 27(1):71-85, vi.
21. Huerta J, Jiménez C. Remodelación de la vía aérea en el asma. *Alergia, Asma e inmunología pediátricas* 2009; 18(2):60-78.
22. Baay GJ, hernández A, Huerta S. Contribución de la hipoxia en la remodelación del tejido pulmonar en procesos asmáticos. *Revista Alergia Mexico* 2008; 55(1):18-32.
23. Byers CG, Dhupa N. Feline bronchial asthma: Pathophysiology and diagnosis. *Comp Cont Education* 2005; 41:8-425.
24. King LG. Respiratory diseases of dogs and cats. Philadelphia, 2004.
25. Beech J. Equine, respiratory disorders. Philadelphia, 1991.
26. Broide DH. Immunologic and inflammatory mechanisms that drive asthma progression to remodeling. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121(3):560-70; quiz 571-2.



27. Jubb, Kennedy, Palmer's. *Patology of domestic animals*. 5ta ed. Mosby: M Grant Maxie, 1993.
28. Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, et al. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161(5):1720-45.
29. Martínez MA. Bronquiectasias: no todo es EPOC y asma en la vía aérea. *Medicina respiratoria* 2008; 1(2):53-64.
30. Watt AP, Brown V, Courtney J, et al. Neutrophil apoptosis, proinflammatory mediators and cell counts in bronchiectasis. *Thorax* 2004; 59(3):231-6.
31. Warner SM, Knight DA. Airway modeling and remodeling in the pathogenesis of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2008; 8(1):44-8.
32. Holgate ST, Lackie PM, Howarth PH, et al. Invited lecture: activation of the epithelial mesenchymal trophic unit in the pathogenesis of asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 124(1-3):253-8.
33. Wilson SJ, Wallin A, Sandström T, Holgate ST. The expression of NF- κ B and associated adhesion molecules in mild asthmatics and normal controls. *J. Allergy Clin. Immunol* 1998; 101:S149.
34. Berhrman RM, Kliegman RM, Jenson HB. *Tratado de pediatría*. 18 ed. Vol. 2. Madrid-España: Elsevier, 2008.
35. Bard M, Couderc LJ, Saimot AG, et al. Accelerated obstructive pulmonary disease in HIV infected patients with bronchiectasis. *Eur Respir J* 1998; 11(3):771-5.
36. Netter FH. *Colección de ilustraciones médicas del sistema respiratorio*. 1era ed. Vol. 7. Barcelona: Masson S. A., 1984.
37. Müller N, Fraser R, Colman N, Paré PD. *Diagnóstico radiológico de las enfermedades del tórax*. Vol. 1. Madrid-España: Elsevier Science, 2002.
38. Barker AF. Bronchiectasis. *N Engl J Med* 2002; 346(18):1383-93.
39. Sethi GR, Batra V. Bronchiectasis: causes and management. *Indian J Pediatr* 2000; 67(2):133-9.
40. Hurvitz RJ, Tucker BL. The Eloesser flap: past and present. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1986; 92(5):958-961.
41. Hankins JR, Miller JE, Attar S, et al. Bronchopleural fistula. Thirteen-year experience with 77 cases. *The journal of thoracic and cardiovascular surgery* 1978; 76(6):755-762.
42. Malave G, Foster ED, Wilson JA. Bronchopleural fistula: present day study of an old problem. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 1971; 11:1-10.
43. McManigle JE, Fletcher GL, Tenholder MF. Bronchoscopy in the management of bronchopleural fistula. *Chest* 1990; 97:1235-1238.
44. Pierson DJ, Horton CA, Bates PW. Persistent bronchopleural air leak during mechanical ventilation. A review of 39 cases. *Chest* 1986; 90(3):321-323.
45. Fuentes E, Corona SB, Ferrá AR, Martín MA. Mioplastia en el tratamiento de fistulas broncopleurales. *Revista Cubana de Cirugía* 2004; 43(2).
46. Mathisen DJ, Grillo HC, Vlahakes GJ. The omentum in the management of complicated cardiothoracic problems. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1988; 95:677-684.
47. Pairolero PC, Arnold PG, Trastek VF, et al. Postpneumonectomy Empyema: The role of intrathoracic muscle transposition. *The journal of thoracic and cardiovascular surgery* 1990; 99(6):958-966.
48. Powner DJ, Grenvik A. Ventilatory management of life-threatening bronchopleural fistulae. A summary. *Critical Care Medicine* 1981; 9(1):54-58.
49. Sato M, Saito Y, Fujimura S. Study of postoperative bronchopleural fistulas: analysis of factors related to bronchopleural fistulas. *Nippon Kyobu Geka Gakkai Zasshi* 1978; 37:498-503.
50. Baumann MH, Sahn SA. Medical management and therapy of



- bronchopleural fistulas in the mechanically ventilated patient. *Chest* 1990; 97(3):721-728.
51. Suzuki M, Otsuji M, Baba M, et al. Bronchopleural fistula after lung cancer surgery. Multivariate analysis of risk factors. *The Journal of Cardiovascular Surgery (Torino)* 2002; 43(2):263-267.
 52. Deschamps C, Bernard A, Nichols Fr, et al. Empyema and bronchopleural fistula after pneumonectomy: factors affecting incidence. *Annals of thoracic surgery* 2001; 72(1):243-247.
 53. Lois M, Noppen M. Bronchopleural fistulas: an overview of the problem with special focus on endoscopic management. *Chest* 2005; 128(6):3955-3965.
 54. Algar FJ, Alvarez A, Aranda JL. Prediction of early bronchopleural fistula after pneumonectomy: a multivariate analysis. *Ann thorac Surg* 2001; 72:1662-1667.
 55. Sato M, saito Y, Fujimura S, et al. Study of postoperative bronchopleural fistulas--analysis of factors related to bronchopleural fistulas. *Nippon Kyobu Geka Gakkai Zasshi* 1989; 37(3):498-503.
 56. Deslauriers J, Demers P. Postpneumonectomy empiema and bronchopleural fistula, in Yang SC and Cameron DE. *Current therapy in thoracic and cardiovascular surgery* 2004:304-306.
 57. Hollaus PH, setinek U, Lax F. Risk factors for bronchopleural fistula after pneumonectomy: stump size does matter. *Thorac cardiovasc surg* 2003; 51:162-166.
 58. Raja S, Rice TW, Newmann DR, et al. Scintigraphic detection of post-pneumonectomy bronchopleural fistulae. *Revista española de medicina nuclear* 1999; 26(3):215-219.
 59. Sirbu H, Busch T, Aleksic I. Bronchopleural fistula in the surgery of non-small cell lung cancer: incidence, risk factor and management. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2001; 7:330-336.
 60. Darling GE, Abdurahman A, Yi Q-L, et al. Risk of a Right Pneumonectomy: Role of Bronchopleural Fistula. *The Annals of Thoracic Surgery* 2005; 79(2):433-437.
 61. Haraguchi S, Koizumi K, Gomibuchi M, et al. Analysis of risk factors for development of bronchopleural fistula after pneumonectomy for lung cancer. *Nippon Kyobu Geka Gakkai Zasshi* 1996; 44(10):1835-1839.
 62. Protsenko AV, Ivchenko IB, Luk'ianov VI. The prevention and treatment of bronchial fistulae after pneumonectomy for lung cancer. *Voprosy Onkologii* 1991; 37(11-12):1082-1086.
 63. Wright CD, Wain JC, Mathisen DJ, Grillo HC. Postpneumonectomy bronchopleural fistula after sutured bronchial closure: Incidence, risk factors, and management. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 1996; 112(5):1367-1371.
 64. Martin J, Ginsberg RJ, Abolhoda A, et al. Morbidity and mortality after neoadjuvant therapy for lung cancer: the risks of right pneumonectomy. *The Annals of Thoracic Surgery* 2001; 72(4):1149-1154.
 65. Cerfolio RJ. The incidence, etiology, and prevention of postresectional bronchopleural fistula. *Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2001; 13(1):3-7.
 66. Turk AE, Karanas YL, Cannon W. Stage closure of complicated bronchopleural fistulas. *Ann Plastic Surg* 2000; 45:560-564.
 67. al-Kattan K, Cattelani L, Goldstraw P. Bronchopleural fistula after pneumonectomy for lung cancer. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery: Official Journal of the Europran Association for Cardio-Thoracic Surgery* 1995; 9:479-482.
 68. Conlan AA, Lukanich JM, Shutz J. Elective pneumonectomy for benign lung disease: modern day mortality and morbidity. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995; 110:1118-1124.
 69. Sato M, Saito Y, Nagamoto N. An improved method of bronchial stump



- closure for prevention of bronchopleural fistula in pulmonary resection. *Tohoku J Exp Med* 1992; 168:507-513.
70. Asamura H, Naruke T, Tsuchiya R, et al. Bronchopleural fistulas associated with lung cancer operations. Univariate and multivariate analysis of risk factors, management, and outcome. *The journal of thoracic and cardiovascular surgery* 1992; 104(5):1456-1464.
71. Hollaus PH, Lax F, El-Nashef BB, et al. Natural history of bronchopleural fistula after pneumonectomy: a review of 96 cases. *Annals of thoracic surgery* 1997; 63(5):1396-1397.
72. Powers WF, Clemens JD. Prognostic implications of age at detection of air leak in very low birth weight infants requiring ventilatory support. *The Journal of pediatrics* 1993; 123(4):611-617.
73. Sonobe M, Nakagawa M, Ichinose M, et al. Analysis of risk factors in bronchopleural fistula after pulmonary resection for primary lung cancer. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 2000; 18(5):519-523.
74. Moreno R, Ramasco F. *Manual de Anestesia y medicina perioperatoria en cirugía torácica*. Madrid: Menarini, 2009.
75. Zaheer S, Allen MS, Cassivi SD, et al. Postpneumonectomy Empyema: Results After the Clagett Procedure. *The Annals of Thoracic Surgery* 2006; 82(1):279-287.
76. Ricci ZJ, Haramati LB, Rosebaum AT, et al. Role of computed tomography in guiding the management of peripheral bronchopleural fistula. *J Thorac Imaging* 2002; 17:214-218.
77. Yamashita J, Kawahara K, Shirakusa T. A case of bronchopleural fistula detected by monitoring plasma endothelin-1. *The Thoracic and Cardiovascular Surgeon* 1996; 44(1):56-57.
78. Outomuro JM, Serena A, Campos L, Carreira M. Detección de fístula broncopleurale mediante gammagrafía de ventilación. A propósito de un caso. *Revista española de medicina nuclear* 2000; 19(3):215-218.
79. Pigula FA, Keenan RJ, Naunheim KS, et al. Diagnosis of postpneumonectomy bronchopleural fistula using ventilation scintigraphy. *Annals of thoracic surgery* 1995; 60(6):1812-1814.
80. Darling GE, Abdurahman A, Yi QL, et al. Risk of a right pneumonectomy: role of bronchopleural fistula. *Annals of thoracic surgery* 2005; 79(2):433-437.
81. Wain JC. Management of late postpneumonectomy empyema and bronchopleural fistula. *Chest Surgery Clinics of North America* 1996; 6(3):529-541.
82. Cooper WA, Miller JJ. Management of bronchopleural fistula after lobectomy. *Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2001; 13:8-12.
83. Downs JB, Chapman RL, Jr. Treatment of bronchopleural fistula during continuous positive pressure ventilation. *Chest* 1976; 69(3):363-366.
84. Deschamps C, Pairolero PC, Allen MS, Trastek VF. Management of postpneumonectomy empyema and bronchopleural fistula. *Chest Surgery Clinics of North America* 1996; 6(3):519-527.
85. Ferguson MK. Thoracoscopy for empyema, bronchopleural fistula, and chylothorax. *Annals of thoracic surgery* 1993; 56(3):644-645.
86. Eerola S, Virkkula L, Varstela E. Treatment of postpneumonectomy empyema and associated bronchopleural fistula. Experience of 100 consecutive postpneumonectomy patients. *Scandinavian Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 1988; 22(3):235-329.
87. Pairolero PC, Deschamps C, Allen MS, Trastek MS. Postoperative empyema. *Chest Surgery Clinics of North America* 1992; 2:813-817.
88. Chowdhury JK. Percutaneous use of fiberoptic bronchoscope to investigate



- bronchopleurocutaneous fistula. *Chest* 1979; 75(2):203-204.
89. Aasebo U. Thoracoscopic closure of distal bronchopleural fistulas, using tissue glue. *The European Respiratory Journal: Official Journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 1989; 2(4):383-384.
90. Kanno R, Suzuki H, Fujii K, et al. Endoscopic closure of bronchopleural fistula after pneumonectomy by submucosal injection of polidocanol. *The Japanese Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery: Official publication of the Japanese Association for Thoracic Surgery* 2002; 50(1):30-33.
91. García C, León A, López-Campos JL, et al. Nuevas técnicas de oclusión bronquial para el tratamiento endoscópico de fístulas broncopleurales. *Archivos de Bronconeumología* 2005; 41(129).
92. Varoli F, Roviario G, Grignani F, et al. Endoscopic treatment of bronchopleural fistulas. *Annals of thoracic surgery* 1998; 65(3):807-809.
93. Tayama K, Eriguchi N, Futamata Y, et al. Modified Dumon stent for the treatment of a bronchopleural fistula after pneumonectomy. *Annals of thoracic surgery* 2003; 75(1):290-292.
94. Hirata T, Ogawa E, Takenaka K, et al. Endobronchial closure of postoperative bronchopleural fistula using vascular occluding coils and n-butyl-2-cyanoacrylate. *Annals of thoracic surgery* 2002; 74(6):2174-2176.
95. Takaoka K, Inoue S, Ohira S. Central Bronchopleural Fistulas Closed by Bronchoscopic Injection of Absolute Ethanol*. *Chest* 2002; 122(1):374-378.
96. Spotnitz WD. Fibrin sealant in the United States: clinical use at the University of Virginia. *Thrombosis and Haemostasis* 1995; 74(1):482-485.
97. Gil M, Marín R, Martín J, Alvarez del Vayo C. Eficacia del ácido tricloroacético en fístula broncopleural. *Farmacia Hospitalaria* 2006; 30(1):59-63.
98. Visbal A, Quintero M, Garzón J, et al. Uso de los colgajos musculares en la enfermedad pleuropulmonar infecciosa complicada. *Revista Colombiana de Neumología* 2004; 16(1).
99. Deslauriers J, Ferraro P. Late complications. En: Pearson FG, Deslauriers J, Ginsberg RJ, Hiebert CA, Mackneally MF, Urschel HC Jr, editores: *Thoracic Surgery*. New York Churchill Livingstone 1995:763-782.
100. Torre M, Chiesa G, Ravini M, et al. Endoscopic gluing of bronchopleural fistula. *Annals of thoracic surgery* 1987; 43(3):295-297.
101. Tschopp JM, Evequoz D, Karrer W, et al. Successful closure of chronic BPF by thoracoscopy after failure of endoscopic fibrin glue application and thoracoplasty. *Chest* 1990; 97(3):745-746.
102. Wood RE, Lacey SR, Azizkhan RG. Endoscopic management of large, postresection bronchopleural fistulae with methacrylate adhesive (Super Glue). *Journal of pediatric surgery* 1992; 27(2):201-202.
103. Koch H, Tomaselli F, Pierer G, et al. Thoracic wall reconstruction using both portions of the latissimus dorsi previously divided in the course of posterolateral thoracotomy. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery: Official Journal of the Europran Association for Cardio-Thoracic Surgery* 2002; 21(5):874-878.
104. Rafaely Y, Paley M, Simansky DA, et al. Transsternal transpericardial closure of a postlobectomy bronchopleural fistula. *Annals of thoracic surgery* 2002; 73(2):635-636.
105. Dosios T, Papadopoulos O, Mantas D, et al. Pedicled myocutaneous and muscle flaps in the management of complicated cardiothoracic problems. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and hand Surgery* 2003; 37(4):220-224.
106. Watanabe N, Kanagawa T, Maeta K, et al. A new technique for muscle flap



- closure of the empyema space in complicated chronic bronchopleural fistula. Wedging the causative bronchus with a plug. The Japanese Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery: Official publication of the Japanese Association for Thoracic Surgery 2002; 50(11):466-471.
107. Arnold M. the surgical anatomy of sternal blood supply. The journal of thoracic and cardiovascular surgery 1972; 64(4):596-610.
 108. Young JZ, Medawar PB. Fibrin suture of peripheral nerves. Lancet 1940; 275:126-132.
 109. Tarlov IM, Denslow C, Swarz S, Pineles D. Plasma clot suture of nerves: experimental technic. Arch Surg 1943; 47(1):44-58.
 110. Urist MR. Formation by autoinduction. Science 1965; 150:893-899.
 111. Knighton DR, Hunt TK, Thakral KK, Goodson WH, 3rd. Role of platelets and fibrin in the healing sequence: an in vivo study of angiogenesis and collagen synthesis. Ann Surg 1982; 196(4):379-88.
 112. Marx RE, Carlsson E, Eichstaedt RM, et al. Platelet rich plasma. Growth factor enhancement for bone grafts. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1998; 85:638-646.
 113. Whitman DH, Berry R, Green D. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with application in oral and maxillofacial surgery. J Oral Maxillofac Surg 1997; 55:1294-1299.
 114. Zimmermann R, Arnold D, Strasser E, et al. Sample preparation technique and white cell content influence the detectable levels of growth factors in platelet concentrates. Vox sanguinis 2003; 85:283-289.
 115. Carlson N, Roach R. Platelet-rich plasma. Clinical applications in dentistry. JADA 2002; 133:1383-1386.
 116. Peñarrocha M, Sanchis JM, Martínez JM. Factores de crecimiento y proteínas que influyen en el crecimiento óseo: aplicaciones en implantología oral. Periodoncia 2001; 11(3):205-216.
 117. Klinger M, Jelkmann W. Role of blood platelets in infection and inflammation. J Interferon Citokine Res 2002; 22:913-922.
 118. Martínez JM, Cano J, Gonzalo JC, et al. ¿Existen riesgos al utilizar los concentrados de plasma rico en plaquetas (PRP) de uso ambulatorio? Medicina Oral 2002; 7:375-390.
 119. Fikret T, Demiralp B. Platelet-rich plasma: a promising innovation in dentistry. J Can Dent Assoc 2003; 69(10):664.
 120. Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. J Oral Maxillofac Surg 2004; 62:489-496.
 121. Romo-Simón L, et al. Plasma rico en factores de crecimiento óseo en quistes maxilares y sobre implantes. Resultados preliminares. RCOE 2001; 6:48.
 122. Anitua E. Un nuevo enfoque en la regeneración ósea. Plasma rico en factores de crecimiento (PRGF). Puesta al Día publicaciones, SL.Vitoria 2000.
 123. Hood A. Perioperative Autologous Sequestration III A new physiologic Glue with wound healing properties in "Autologous Blood component Theraphyt Program". Medtronic Inc. 1996; 5.
 124. Davies G. Platelet leukocyte depletion plasmapheresis attenuates the deleterious effect of cardiopulmonary by pass. Annals of thoracic surgery 1992; 53:274-277.
 125. Induni E. Tratamiento de fistula bronchopleural con el uso de gomas biológicas en paciente de alto riesgo quirurgico. Acta Médica Costarricense 1998; 40(1).
 126. Stover E. Intraoperatively prepared platelet gel as an alternative to fibrine glue in dural wound repair. Transfusion. 1996; 36(46).
 127. Anitua E. Plasma rich in growth factors: Preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. Int J Oral Maxillofac Implants 1999; 14:529-535.



128. Anitua E. Factores de crecimiento plasmático. Una revolución terapéutica. Ideas y Trabajos Odontoestomatológicos 2001; 2:90-94.
129. Anitua E. The use of plasma-rich growth factors (PRGF) in oral surgery. Pract Proced Aesthet Dent 2001; 13:487-493.
130. Bocci V. Oxygen-Ozone Therapy. A Critical Evaluation. 1era ed. The Netherlands: Kluwer Academic Publisher, 2002.
131. Man D, Plosker H, Winland-Brown JE. The use of autologous platelet rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. Plast Reconst Surg 2001; 107:229-237.
132. Garg AK. The use of platelet-rich plasma to enhance the success of bone grafts around dental implants. Dent Implantol Update 2000; 11(3):17-21.
133. De Groot CJ, Woodroffe MN. The role of chemokines and chemokine receptors in CNS inflammation. Prog Brain Res 2001; 132:533-544.
134. Bennett NT, Schultz GS. Growth factors and wound healing: Part II. Role in normal and chronic wound healing. Am J Surg 1993; 166(1):74-84.
135. Raff MC. Size control: the regulation of cell numbers in animal development. Cell 1996; 86:173-175.
136. Bejcek BE, Li DY, Deuel TF. Transformation by v-sis occurs by an internal autoactivation mechanism. Science 1989; 245(4925):1496-1499.
137. Herndon DN, Nguyen TT, Gilpin DA. Growth factors. Local and systemic. Arch Surg 1993; 128(11):1227-1233.
138. Bennett NT, Schultz GS. Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors. Am J Surg 1993; 165(6):728-737.
139. Massagué J. TGF-beta signal transduction. Annu Rev Biochem 1998; 67:753-791.
140. Koch CA, Anderson D, Moran MF, et al. SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. Science 1991; 252(5006):668-674.
141. Claesson-Welsh L. Platelet-derived growth factor receptor signals. J Biol Chem 1994; 269(51):32023-32026.
142. Hill CS, Treisman R. Differential activation of c-fos promoter elements by serum, lysophosphatidic acid, G proteins and polypeptide growth factors. EMBO J 1995; 14(20):5037-5047.
143. Sánchez I, Hughes RT, Mayer BJ, et al. Role of SAPK/ERK kinase-1 in the stress-activated pathway regulating transcription factor c-Jun. Nature 1994; 372(6508):794-798.
144. Schultz GS, Rotatori DS, Clark W. EGF and TGF-alpha in wound healing and repair. J Cell Biochem 1991; 45(4):346-352.
145. Lynch SE, Nixon JC, Colvin RB, Antoniades HN. Role of platelet-derived growth factor in wound healing: synergistic effects with other growth factors. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84(21):7696-7700.
146. Lynch SE, Williams RC, Polson AM, et al. A combination of platelet-derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration. J Clin Periodontol 1989; 16(8):545-548.
147. Cochran DL, Wozney JM. Biological mediators for periodontal regeneration. Periodontol 2000 1999; 19:40-58.
148. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. Science 1988; 242:1528-1534.
149. Okada A, Tomasetto C, Lutz Y, et al. Expression of matrix metalloproteinases during rat skin wound healing: evidence that membrane type-1 matrix metalloproteinase is a stromal activator of pro-gelatinase A. J Cell Biol 1997; 137:67.
150. Madlener M, Park WC, Werner S. Matrix metalloproteinases (MMPs) and their physiological inhibitors (TIMPs) are differentially expressed during excisional skin wound repair. Exp Cell Res 1998; 242:201.



151. Junqueira LC, Carneiro J. Basic Histology: Text & Atlas. McGraw-Hill Professional 2005:502.
152. Ibarra C, Garciadiego D, Martínez V, Velasquillo C. Ingeniería de tejidos y osteoartritis. *Reumatol Clin* 2007; 3(Supl 3):S19-22.
153. Cicutini FM, Spector TD. The genetics of osteoarthritis. *J Clin Pathol* 1996; 49:617-619.
154. Mustafa Z, Chapman K, Irven C, et al. Linkage analysis of candidate genes as susceptibility loci for osteoarthritis suggestive linkage of COL9A1 to female hip osteoarthritis. *Rheumatology* 2000; 39:299-306.
155. Zhai G, Rivadeneira F, Houwing-Duisterma J, et al. Insulin-like growth factor I gene promoter polymorphisms, collagen type II-1 (COL2A1) gene, and the prevalence of radiographic osteoarthritis: the Rotterdam study. *Ann Rheum Dis* 2004; 63(5):544-548.
156. Danachakoff V. Origin of the blood cells: development of the haematopoietic organs and regeneration of the blood cells from the standpoint of the monophyletic school. *Anat Rec.* 1916; 10:397-413.
157. Donovan P, Grearhart J. The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature* 2001; 414:92-97.
158. Enma H, Takano H, Sudo K, Nakauchi H. In vitro self-renewal division of hematopoietic stem cells. *J. Exp Med* 2000; 192:1281-1288.
159. Ivanova NB, Dimos JT, Schaniel C, et al. Stem Cell Molecular Signature. *Science* 2002; 298:601-604.
160. Watt F, Hogan L. Stem cell and their niches. *Science* 2000; 287:1427.
161. Weissman IL, Anderson DJ, Gage F. Stem and Progenitor Cells: Origins, Phenotypes, Lineage Commitments and Transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; 17:387-403.
162. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 98:10344-10349.
163. Verfaillie CM, Pera A, Lansdorp PM. Stem Cells : Hype and Reality. *Hematology* 2002:369-387.
164. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science* 1998; 282:1145-1147.
165. Xiaoxia G, Fuchu H. Properties and Applications of Embryonic Stem Cells. *Chinese Science Bulletin* 2000; 45:1258-1265.
166. Odorico JS, Kaufman D, Thomson J. Multilineage Differentiation from Human Embryonic Stem Cell Lines. *Stem Cells* 2001; 19:193-204.
167. Shamblo MJ, Axelman J, Wang S, et al. Derivation of Pluripotent Stem Cells from Cultured Primordial Germ Cells. *PNAS* 1998; 95:13726-13731.
168. Weissman IL. Translating Stem and Progenitor Cell Biology to the Clinic: Barriers and Opportunities. *Science* 2000; 287:1442-1446.
169. Pera MF, Reubinoff J, Trounson A. Human Embryonic Stem Cells. *J Cell Science* 2000; 113:5-10.
170. Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 2003; 102:3483-3492.
171. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of Mesenchymal Stem Cells derived from Adult Marrow. *Nature* 2002; 418:41-49.
172. Rutenberg MS, Hamazaki T, Singh AM, Terada N. Stem cell plasticity, beyond alchemy. *Int J Hematol* 2004; 79:15-21.
173. Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol* 2000; 164:247-256.
174. Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000; 32:11-16.
175. Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell* 2004; 116:639-648.
176. Robey PG. Stem Cells near the century mark. *J Clin Invest* 2000; 105:1489-1491.



177. Clarke DL, Johansson CB, Wilbertz J. Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* 2000; 288:1660-1663.
178. Heike T, Nakahata T. Stem cell plasticity in the hematopoietic system. *Int J Hematology* 2004; 79:7-14.
179. Körbling M, Estrov Z. Adult Stem Cells for Tissue Repair A New Therapeutic Concept? *N Engl J Med* 2003; 349:570-582.
180. Lagasse E, Connors H, Dhalmy M, et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000; 6:1229-1239.
181. Ogawa M. Changing phenotypes of Hematopoietic Stem Cells. *Experimental Hematology* 2002; 30:3-6.
182. Tsai RVL, Kittappa R, McKay RDG. Plasticity, niches, and the use of stem cells *Develop Cell* 2002; 2:707-712.
183. Lander ES, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409(6822):860-921.
184. Ren B, et al. Genome-wide location and function of DNA binding proteins. *Science* 2000; 290(5500):2306-2309.
185. Lee TI, et al. Transcriptional regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 2002; 298(5594):799-804.
186. Elkon R, et al. Genome-wide in silico identification of transcriptional regulators controlling the cell cycle in human cells. *Genome Res* 2003; 13(5):773-780.
187. Qiu P. Recent advances in computational promoter analysis in understanding the transcriptional regulatory network. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 309(3):495-501.
188. Mullis KB, Faloona FA. Specific Synthesis of DNA in Vitro via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction. *Methods in Enzymology* 1987; 155(335).
189. Kawai J, et al. Functional annotation of a full-length mouse cDNA collection. *Nature* 2001; 409(6821):685-690.
190. Jelinsky SA, et al. Regulatory networks revealed by transcriptional profiling of damaged *Saccharomyces cerevisiae* cells: Rpn4 links base excision repair with proteasomes. *Mol Cell Biol* 2000; 20(21):8157-8167.
191. Feng X, et al. Thyroid hormone regulation of hepatic genes in vivo detected by complementary DNA microarray. *Mol Endocrinol* 2000; 14(7):947-955.
192. Gunther EC, et al. Prediction of clinical drug efficacy by classification of drug-induced genomic expression profiles in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(16):9608-9613.
193. Baumans V. Science-based assessment of animal welfare: laboratory animals. *Rev Sci Tech* 2005; 24:503-513.
194. Nicklas W, Baneux P, Boot R, et al. Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units *Laboratory Animals* 2002; 36:20-42.
195. Zúñiga JM, Tur Marí JA, Milocco SN, Piñeiro R. *Ciencia y Tecnología en protección y experimentación animal*. Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España, 2001.
196. Hedenqvist P, Roughan JV, Flecknell PA. Effects of repeated anaesthesia with ketamine/medetomidine and of pre-anaesthetic administration of buprenorphine in rats. *Lab Anim* 2000; 34(2):207-211.
197. Weksler B, Ng B, Lenert J, Burt M. A simplified method for endotracheal intubation in the rat. *J Appl Physiol* 1994; 76(4):1823-1825.
198. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, et al. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, New York 1987.
199. Radonic A, Thulke S, Mackay IM, et al. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004; 313(4):856-862.
200. Baum C, Arpey C. *Normal Cutaneous Wound Healing: Clinical Correlation with Cellular and Molecular Events*.



- Dermatology surgery 2005; 31:674-686.
201. Frank S, Kämpfer H, Wetzeler C, et al. Nitric oxide drives skin repair: Novel functions of an established mediator. *Kidney International* 2002; 61:882-888.
202. Grose W, Grose S, Grose R. Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines. *Physiol Rev. Am J Pathol* 2003; 83:835-870.
203. Laurens N, Koolwijk P, De Maat MPM. Fibrin structure and wound healing. *J Thromb Haemost* 2006; 4:932-939.
204. Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in Dermatology* 2007; 25:9-18.
205. Roh C, Lyle S. Cutaneous stem cell and Wound Healing. *Pediatric Research* 2006; 59:100R-103R.
206. Schwartz JR, Marsh RG, Draelos ZD. Zinc and Skin Health: Overview of Physiology and Pharmacology. *Dermatol Surg* 2005:837-847.
207. Calandruccio RA, Gilmer WS. Proliferation, regeneration and repair of articular cartilage of immature animals. *J Bone Joint Surgery* 1962; 44-A:431-455.
208. Campbell CJ. The healing of cartilage defects. *Clin Orthop* 1963; 64:45-63.
209. Fuller JA, Chadially FN. Ultrastructural observations on surgically produced partial thickness defects in articular cartilage. 1972; 86:193-205.
210. Henry J, Mankin MJ. The response of articular cartilage of mechanical injury. *J Bone Joint Surg* 1982 1982; 64-A:460-465.
211. Sadarida K, Inque S, Maki Y. An experimental study of injured articular cartilage using H3 thymidine autoradiography. *Lut Orthop* 1982; 2:3-7.
212. Bruns TB, Simon HK, McLario DJ, et al. Laceration repair using a tissue adhesive in a children's emergency department. *Pediatrics* 1996; 98:673-675.
213. Kram HB, Clark SR, Ocampo HP, et al. Fibrin glue sealing of pancreatic injuries, resections and anastomoses. *Am J Surg* 1991; 161:479-481.
214. Chevrel JP, Flament JB. Methods thérapeutiques. In: *Les eventrations de la paroi abdominale*. Paris: Masson, 1990.
215. Gursoy S, Yapucu M, Ucvet A, et al. Fibrin Glue Administration to Support Bronchial Stump Line. *Asian Cardiovasc Thorac Ann* 2008; 16:450-453.
216. York EL, Lewall DB, Hirji M, et al. Endoscopic diagnosis and treatment of postoperative bronchopleural fistula. *Chest* 1990; 97(6):1390-1392.
217. Matthew TL, Spotnitz WD, Daniel TM, Kron IL. Closure of small bronchopleural fistulas using fibrin sealant through the flexible fiberoptic bronchoscope. *Chest* 1988; 94:775.
218. Benavides. Reparación de heridas cutáneas. *Rev Asoc Col Dermatol*. 2008; 16(1):29-35.
219. DiPietro LA. Wound healing: the role of the macrophage and other immune cells. *Shock* 1995; 4:233-240.
220. Hong YK, Lange-Asschenfeldt B, Velasco P, et al. VEGF-A promotes tissue repair-associated lymphatic vessel formation via VEGFR-2 and the alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins. *FASEB J* 2004; 18:1111-1113.
221. Leibovich SJ, Ross R. The role of the macrophage in wound repair: a study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am J Pathol* 1975; 78:71-100.
222. Odland G, Ross R. Human wound repair. I. Epidermal regeneration. *J Cell Biol* 1968; 39:135-151.
223. Polverini PJ, Cotran PS, Gimbrone JMA, Unanue ER. Activated macrophages induce vascular proliferation. *Nature* 1977; 269:804-806.
224. Ross R, Odland G. Human wound repair. II. Inflammatory cells, epithelial-mesenchymal interrelations, and fibrogenesis. *J Cell Biol* 1968; 39:152-168.



225. Freymiller EG, Aghaloo TL. Platelet-rich plasma: ready or not? *J Oral Maxillofac Surg* 2004; 62:484-488.
226. DiGiovanni J, Bol DK, Wilker E, et al. Constitutive expression of insulin-like growth factor-1 in epidermal basal cells of transgenic mice leads to spontaneous tumor promotion. *J Cancer Res* 2000; 60:1561-1570.
227. Fontana S, Olmedo D, Linares J, et al. Effect of platelet-rich plasma on the peri-implant bone response: an experimental study. *Impl Dent* 2004; 13(1):73-78.
228. Eppley BL, Woodell JE, Higgings J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg* 2004; 114:1502-1508.
229. Jensen TB, Rahbek O, Overgaard S, Soballe K. Platelet rich plasma and fresh frozen bone allograft as enhancement of implant fixation. An experimental study in dogs. *J Orth Res* 2004; 22:653-658.
230. Blankaert F, Saffar JM, Colombier ML. Heparan-like molecules induce the repair of skull defects. *Bone* 1995; 17:499-506.
231. Li RH, Wozney JM. Delivering on the promise of bone morphogenetic proteins. *Trends Biotechnol* 2001; 19:255-265.
232. Weibrich G, Hansen W, Kleis W. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone* 2004:665-671.
233. Tsay R, Vo J, Burke A, et al. Differential growth factor retention by platelet-rich plasma composites. *J Oral Maxillofac Surg* 2005; 63:521-528.
234. Beghe B, et al. Transforming growth factor-beta type II receptor in pulmonary arteries of patients with very severe COPD. *Eur Respir J* 2006; 28:556-562.
235. Vanaudenaerde BM, et al. The role of the IL23/IL17 axis in bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Am J Transplant* 2008; 8(9):1911-1920.
236. Hodge G, et al. Acute lung transplant rejection is associated with localized increase in T-cell IFN γ and TNF α proinflammatory cytokines in the airways. *Transplantation* 2007; 84(11):1452-1458.
237. Schalkwijk J, Joosten LAB, van den Berg WB, et al. Chondrocyte nonresponsiveness to insulin-like growth factor 1 in experimental arthritis. *Arthritis Rheumatology* 1989; 32:894-900.
238. Dore S, Pelletier JP, DiBattista JA, et al. Human osteoarthritic chondrocytes possess an increased number of IGF-1 binding proteins but are unresponsive to its stimulation. *Arthritis Rheumatology* 1994; 37:253-263.
239. Verschure PJ, van Marle J, Joosten LAB, et al. Localization and quantification of the insulin-like growth factor-1 receptor in mouse articular cartilage by confocal laser scanning microscopy. *Histochem Cytochem* 1994; 42:765-773.
240. Verschure PJ, van Marle J, Joosten LAB, et al. Chondrocyte IGF-1 receptor expression and responsiveness to IGF-1 stimulation in mouse articular cartilage during various phases of experimentally-induced arthritis. *Ann Rheum Dis* 1995; 54:645-653.
241. Álvarez PD-A, García-Arranz M, Georgiev-Hristov T, García-Olmo D. A new bronchoscopic treatment of tracheomediastinal fistula using autologous adipose-derived stem cells. *Thorax* 2008; 63(4):374-376.
242. Kassem M, Kristiansen M, Abdallah B. Mesenchymal Stem Cells: Cell Biology and Potential use in Therapy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2004; 95:209-214.
243. Krampera M, Pasini A, Pizzolo G, et al. Regenerative and immunomodulatory potential of mesenchymal stem cells. *Curr Opin Pharmacol* 2006; 6:435-441.
244. Krampera M, Pizzolo G, Aprili G, Franchini M. Mesenchymal Stem Cells for bone, cartilage, tendon and



- skeletal repair. *Bone* 2006; 39:678-683.
245. Shields TW, Ponn RB. General thoracic surgery. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins: Shields TW, LoCicero J, Ponn RB, editors, 2000.
246. Pomerantz M, Madsen L, Goble M, Isema M. Surgical management of resistant mycobacterial tuberculosis and other mycobacterial pulmonary infections. *Ann Thorac Surg* 1991; 52:1108-11011.
247. Garcia-Olmo D, Herreros D, Pascual M, et al. Treatment of enterocutaneous fistula in Crohn's Disease with adipose-derived stem cells: a comparison of protocols with and without cell expansion. *International Journal of Colorectal Disease* 2009; 24(1):27-30.
248. Garcia-Olmo DMD, Herreros DMD, Pascual IMD, et al. Expanded Adipose-Derived Stem Cells for the Treatment of Complex Perianal Fistula: a Phase II Clinical Trial. *Diseases of the Colon & Rectum* 2009; 52(1):79-86.
249. Nogami H, Urist MR. A substratum of bone matrix for differentiation of mesenchymal cells into chondro-osseous tissues in vitro. *Exp Cell Res* 1970; 63:404-410.
250. Urist MR, Nogami H. Morphogenic substratum for differentiation of cartilage tissues in culture. *Nature* 1970; 225:1051-1052.
251. Periodontology AAo. The potential role of growth and differentiation factors in periodontal regeneration. *J Periodontol* 1996; 67:545-553.
252. MacIntosh K, Zvonic S, Garrett S, et al. The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes in vitro. *Stem Cells* 2006; 24:1246-1253.
253. Puissant B, Barreau C, Bourin P, et al. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol* 2005; 129:118-129.
254. Zuk PA, Zhu PA, Zhu M, et al. Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plast Reconstr Surg Laparosc Endosc* 2002; 109:199-209.
255. Lefebvre V, Behringer RR, de Crombrughe B. L-Sox5, Sox6 and Sox9 control essential steps of the chondrocyte differentiation pathway. *Osteoarthritis and Cartilage* 2001; 9(Supplement 1):S69-S75.
256. Shinomura T. Chondrogenic differentiation and transcription factors. *Clin Calcium* 2006; 16(3):494-498.
257. Caplan A. Cartilage. *Sci Am* 1984; 251:84-94.
258. Eyre D. Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res* 2002; 4:30-35.
259. Hedlund H, Hedbom E, Heinegard D, et al. Association of the aggrecan keratan sulfate-rich region with collagen in bovine articular cartilage. *J Biol Chem* 1999; 274:5777-5781.

