



# BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

## FACULTAD DE MEDICINA

---

---

LABORATORIO DE MEDICINA EXPERIMENTAL

FACULTAD DE MEDICINA

Tesis para obtener el grado de Médica Cirujana y Partera:

*“Efecto de surfactante pulmonar enriquecido con fosfatidiletanolamina en el número de células caliciformes en tejido pulmonar en ratones con asma crónico y remodelación de la vía aérea”*

Presenta:

Isabel López Salomón.

Director de Tesis:

D. C. Luis Guillermo Vázquez de Lara Cisneros

Co-director de tesis:

M.C.M Beatriz Tlatelpa Romero

Departamento de Investigación y Estudios de Posgrado de la Benemérita  
Universidad Autónoma de Puebla.

Puebla, Pue., octubre de 2020

*A mis padres por su apoyo y motivación, por permitirme  
terminar una carrera y que pueda contribuir en la sociedad  
como profesionista.*

*A mi hermana por ser mi amiga, mi confidente y consejera, por  
su cariño incondicional, por apoyarme constantemente cuando  
más he necesitado.*

*A mi mejor amigo César por su apoyo y motivación, pero sobre  
todo por estar siempre cuando más lo necesitaba, nos vemos  
en el más allá amigo.*

*Quisiera expresar mi sincero agradecimiento al PhD Luis Guillermo Vázquez de  
Lara Cisneros por su gran conocimiento y experiencia, por su tiempo y apoyo.*

*Agradezco a la M.C. Beatriz Tlatelpa Romero por brindarme su amistad y por  
enseñarme las técnicas del laboratorio.*

*A mis amigos y compañeros del Laboratorio de Medicina Experimental, en  
especial a Mimi por su motivación y apoyo, pero sobre todo por su amistad.*

*A mis amigos de medicina y otras áreas, gracias por su amistad y apoyo, por  
compartir su conocimiento conmigo, por sus buenos consejos, pero sobre todo por  
todos aquellos buenos momentos que compartimos.*

## Contenido

ÍNDICE DE FIGURAS .....	v
ÍNDICE DE TABLAS .....	vi
TABLA DE ABREVIATURAS.....	vii
RESUMEN.....	9
INTRODUCCION.....	10
ANTECEDENTES GENERALES .....	11
ASMA .....	11
EPIDEMIOLOGÍA.....	11
FISIOPATOLOGÍA.....	12
CLASIFICACIÓN.....	14
SURFACTANTE PULMONAR.....	15
EL SURFACTANTE PULMONAR COMO REGULADOR DE LA ACTIVIDAD CELULAR.....	16
ANTECEDENTES ESPECÍFICOS.....	17
JUSTIFICACIÓN:.....	19
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	19
HIPÓTESIS .....	20
OBJETIVOS.....	20
OBJETIVO GENERAL.....	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
MATERIAL Y MÉTODOS .....	21
DISEÑO DEL ESTUDIO.....	21
UBICACIÓN ESPACIO TEMPORAL.....	21
METODOLOGÍA GENERAL.....	21
METODOLOGÍA PARA LOS OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	24
Metodología para el objetivo específico 1.....	24
Metodología para el objetivo específico 2.....	25
ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	26
TAMAÑO DE LA MUESTRA .....	26
INFRAESTRUCTURA FÍSICA Y HUMANA .....	28
RECURSOS HUMANOS .....	28

<b>RECURSOS MATERIALES</b> .....	28
<b>RECURSOS FINANCIEROS</b> .....	28
<b>ASPECTOS ÉTICOS</b> .....	29
<b>RESULTADOS</b> .....	30
<b>ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO DE MEDICIÓN DE CÉLULAS CALICIFORMES</b>	30
<b>CONSISTENCIA Y VALIDEZ DE LAS MEDICIONES CON IMAGE J</b> .....	30
<b>CONSISTENCIA Y VALIDEZ DE LAS MEDICIONES CON MOTIC IMAGE PLUS</b> ...	32
<b>CONSISTENCIA Y VALIDEZ DE LAS MEDICIONES CON ORBIT</b> .....	34
<b>EFFECTO DEL SURFACTANTE PULMONAR ENRIQUECIDO CON FOSFATIDILETANOLAMINA EN EL NÚMERO DE CÉLULAS CALICIFORMES</b> .....	36
<b>DISCUSIÓN</b> .....	37
<b>CONCLUSIONES</b> .....	44
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	45
<b>ANEXOS</b> .....	50
<b>ANEXO 1</b> .....	50
<b>ANEXO 2</b> .....	52
<b>ANEXO 3</b> .....	56

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Microfotografías representativas de bronquios analizados con el programa ImageJ. ....	31
Figura 2. Medición de las células caliciformes empleando el programa Motic Image Plus. ....	34
Figura 3. Medición de las células caliciformes empleando el programa Orbit. ....	35
Figura 4. Medición de las células caliciformes en el grupo control negativo, el grupo control positivo y el grupo tratado con surfactante pulmonar enriquecido con fosfatidiletanolamina, empleando el programa Orbit. ....	36
Figura 5. Vía de señalización STAT6-TMEM16A-ERK 1/2. ....	39
Figura 6. Vía de señalización IL13-NT4-PNEC-GABA. ....	40
Figura 7. Selección y calibración de imagen. ....	50
Figura 8. Medición de Perímetro bronquial. ....	51
Figura 9. Selección de Imágenes. ....	52
Figura 10. Selección de bronquios. ....	52
Figura 11. Color Threshold. ....	53
Figura 12. Selección de zonas de interés. ....	54
Figura 13. Detección de color. ....	54
Figura 14. Ajuste de parámetros. ....	55
Figura 15. Microfotografías representativas de tejido pulmonar con células epiteliales y células caliciformes. ....	57
Figura 16. Configuración de las clases a evaluar. ....	58
Figura 17. Clasificación de estructuras en clases de Inclusion y Exclusion. ....	59
Figura 18. Configuración de clases a evaluar. ....	60
Figura 19. Clasificación de las áreas representativas para cada clase de tejido. ....	60
Figura 20. Definición del área de interés a analizar. ....	61

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.Variables de medición .....</b>	<b>23</b>
<b>Tabla 2. Consistencia de mediciones entre observadores. ....</b>	<b>32</b>
<b>Tabla 3.Consistencia de mediciones entre observadores. ....</b>	<b>34</b>

## TABLA DE ABREVIATURAS

AIOH	Hidróxido de Aluminio
ASM	Músculo Liso de las Vías Respiratorias
BUAP	Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
CaCC	Canal de cloruro activado por calcio
CCI	Coeficiente de Correlación Intraclase
CEI	Corticoesteroides inhalados
CLCA	Regulador del canal de Cl <sup>-</sup> activado por Ca <sup>2+</sup>
CLCA1	Regulador 1 del canal de Cl <sup>-</sup> activado por Ca <sup>2+</sup>
CNEP	Células neuroendocrinas pulmonares
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina
ECH	Extracto Crudo de Huevo
FEV1	Volumen Espiratorio Forzado en el Primer Segundo
FMBUAP	Facultad de Medicina de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
FOXA3	Ortólogo A3 en forma de horquilla
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
GBD	Carga Global de Enfermedades Estudiadas
HVR	Hiperreactividad de las vías respiratorias
IVR	Inflamación de las vías respiratorias
IP	Intraperitoneal
LPA	Lesión Pulmonar Aguda
LPS	Lipopolisacáridos
MAPK13	Proteína quinasa 13 activada por mitógenos
MEC	Matriz Extracelular
MMPs	Metaloproteinasas
NT4	Neurotrofina 4

OMS	Organización Mundial de la Salud
OVA	Ovoalbúmina
PAS	Ácido peryódico de Schiff
PG	Fosfatidilglicerol
PGD2	Prostaglandina D2
PE	Fosfatidiletanolamina
PI	Fosfatidilinositol
RVR	Remodelación de las vías respiratorias
RYK	Tirosina quinasa
SDRA	Síndrome de Dificultad Respiratoria Aguda
SP	Surfactante pulmonar
SPDEF	Factor de transcripción que contiene el dominio con punta SAM
STAT6	Transductor de señal y activador de la transcripción 6
TGF $\beta$	Factor de Crecimiento Transformante $\beta$
TMEM16A	Proteína transmembrana 16 A
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa

## RESUMEN

**Introducción:** El surfactante pulmonar (SP) es un complejo de lípidos y proteínas que recubren la superficie alveolar y es esencial para la vida (1). Existe evidencia de que el SP como la fosfatidiletanolamina (PE) tienen un efecto antifibrosante *in vivo* en un modelo murino de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina (2), asimismo se probó su efecto en un modelo murino de asma crónico con remodelación de la vía aérea y se concluyó que el SP enriquecido con PE inhalado atenúa la fibrosis inducida por la exposición prolongada a alérgenos en ratones(3). Sin embargo, la función que pudieran tener sobre la hiperplasia de células caliciformes en el asma no se ha esclarecido. **Objetivo:** Evaluar los cambios histopatológicos que provoca la administración de surfactante pulmonar enriquecido con fosfatidiletanolamina en el número de células caliciformes en tejido pulmonar en ratones con asma crónico y remodelación de la vía aérea. **Metodología:** se emplearon ratones hembra adultos de la cepa BALB/c, para sensibilizar al modelo murino con extracto crudo de huevo (ECH), se usaron 5 ml de solución de ECH al 2.5% nebulizada en NaCl al 0.9%, para la fase de tratamiento se administró SP enriquecido con PE en nebulización a una dosis de 400 mg/Kg de peso a una concentración de 25 mg/ml, en la fase de sacrificio se obtuvieron los pulmones, con los cuales se obtuvieron cortes histológicos y se realizaron las tinciones de hematoxilina y eosina, PAS y Tricrómico de Masson. Para la cuantificación de células caliciformes en los cortes histológicos con tinción PAS se emplearon los programas *Motic Image Plus 2.0 NC*, *ImageJ 1.25a* y *Orbit Image Analysis Version 3.15 (2008-2019)*. Se utilizó el coeficiente de correlación intraclase (CCI) para la concordancia entre los observadores, para el análisis estadístico se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y la prueba de Dunn para analizar las diferencias entre grupos. **Resultados:** las mediciones realizadas con ImageJ fueron descartadas debido a la poca precisión y errores encontrados en ella, las mediciones con Moticam Image Plus y Orbit demostraron ser consistentes, sin embargo, se observó la eficacia de Orbit frente a Moticam al ser un método más consistente y válido para la identificación y cuantificación de células caliciformes. El tratamiento inhalado con surfactante pulmonar enriquecido con fosfatidiletanolamina no disminuyó el número de células caliciformes. **Conclusión:** el modelo murino de medición de asma crónico inducido por ECH si aumentó significativamente el número de células caliciformes, el tratamiento de SP enriquecido con PE no disminuyó la hiperplasia de células caliciformes, se observó la eficacia de Orbit frente a Moticam al ser un método más consistente y válido para la identificación y cuantificación de células caliciformes.

## INTRODUCCION

El asma es una enfermedad inflamatoria crónica de la vía aérea, con múltiples fenotipos que afecta tanto a niños como adultos, en la cual diversas células y elementos celulares desempeñan un papel importante, siendo diagnosticada clínicamente por síntomas respiratorios como sibilancias, disnea, dificultad respiratoria y tos, que varían en tiempo e intensidad (4–6). En la actualidad de acuerdo con la OMS hay 235 millones de pacientes con asma (10). La prevalencia entre los niños y adultos varía del 1 al 18% en diferentes partes del mundo y su mortalidad es de aproximadamente 383,000 personas por año (7). La prevalencia en México es variable en diferentes poblaciones, las fluctuaciones son del 7-33%. En la ciudad de México es de aproximadamente 5% mientras que en las ciudades de Puebla es de 14%, Tulancingo 17%, Tlaxcala 7% y Cancún 14% (12).

La patogenia del asma implica una compleja red de factores que interactúan en todos los niveles y escalas de la enfermedad, desde genético a celular, de tejido a órgano, que juntos provocan cambios estructurales en la vía aérea (13). Uno de los cambios estructurales que se presentan son los cambios en las unidades secretoras de moco como son la hiperplasia de células caliciformes e hipersecreción de moco. Y como se ha visto en la mayoría de los casos con crisis fatales, estas crisis son provocadas por el taponamiento debido a acúmulos mucosos grandes en la vía aérea. No obstante que actualmente existe tratamiento para manejo y control de las crisis asmáticas, los diferentes fenotipos y endotipos que presenta esta patología hacen de ella una enfermedad de difícil manejo.

Diversos estudios han reportado efectos beneficiosos con la administración de surfactante pulmonar exógeno en modelos de animales con asma. En el laboratorio de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la BUAP, se ha demostrado que un preparado de surfactante pulmonar tiene un efecto antifibrótico *in vivo* en un modelo murino de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina (29). Posteriormente se probó el efecto de algunos de sus fosfolípidos, en donde se observó que la fosfatidiletanolamina es el principal fosfolípido involucrado en este efecto antifibrosante. Además, se demostró que la administración temprana de SP enriquecido con fosfatidiletanolamina y la fosfatidiletanolamina por sí misma atenúan la fibrosis pulmonar en un modelo murino *in vivo* (2). En un estudio reciente desarrollamos un modelo murino de asma crónico con remodelación de la vía aérea y se concluyó que el beractante enriquecido con PE inhalado atenúa la fibrosis inducida por la exposición prolongada a alérgenos en ratones (3).

## **ANTECEDENTES GENERALES**

### **ASMA**

El asma es una patología compleja de las vías respiratorias con múltiples fenotipos que afecta tanto a niños como a adultos. Es definida por sus características clínicas, fisiológicas e histopatológicas y de acuerdo con la definición de la estrategia global para el manejo y prevención del asma (GINA), es definida como una enfermedad inflamatoria crónica de la vía aérea, en la cual diversas células y elementos celulares desempeñan un papel importante (4–6). La inflamación crónica induce hiperreactividad de la vía aérea que provoca los episodios recurrentes de sibilancias, disnea, dificultad respiratoria y tos, particularmente en la noche o por la mañana. Estos episodios se asocian generalmente a una obstrucción extensa y variable del flujo aéreo pulmonar que es a menudo reversible, ya sea espontáneamente o con tratamiento” (4,6–8).

### **EPIDEMIOLOGÍA**

En el 2013 el asma se consideró una de las enfermedades más comunes del aparato respiratorio, se informó una tasa de mortalidad global estandarizada por edad de 8.0 por 100,000; por esto se mantuvo entre las 50 principales causas de pérdida de años de vida en el mundo y se estimaron 300 millones de asmáticos para el 2025 (9). Sin embargo, en la actualidad de acuerdo con la OMS hay 235 millones pacientes con asma y en el 2015 se notificaron 383,000 muertes (10).

El Estudio Internacional de Asma y Alergias en la Infancia (ISAAC) encuestó una muestra representativa de 798,685 adolescentes, de 13 a 14 años en 233 centros en 97 países, donde se les preguntó a estos adolescentes si habían experimentado sibilancias en los 12 meses anteriores. El hallazgo crucial fue que la prevalencia de sibilancias recientes varió ampliamente entre los países. La prevalencia más alta ( $\geq 20\%$ ) se observó generalmente en los países de habla inglesa como Australia, Europa y América del Norte, y en algunas partes de América Latina. La prevalencia más baja ( $< 5\%$ ) se observó en Asia, en el Mediterráneo oriental y Europa Oriental y del Norte. La prevalencia de asma en adultos jóvenes (entre 18 y 45 años), se estimó a partir de los datos obtenidos por la Encuesta Mundial de Salud, realizada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) casi al mismo tiempo que ISAAC (2002-2003). Esta encuesta incluyó a 177,496 pacientes adultos que viven en 70 países. Como se observó en los niños, la prevalencia general del asma varió ampliamente en adultos jóvenes. En general, el 4.3% de la población mundial en este grupo de edad recibió un diagnóstico de asma por un médico, el 4.5% de la población mundial

informó haber recibido un diagnóstico médico o que estaba tomando tratamiento para el asma, y el 8.6% informó que había experimentado ataques de sibilancias o silbidos respiratorios (síntomas de asma) en los 12 meses anteriores (7,8).

La prevalencia entre los niños y adultos varía del 1 al 18% en diferentes partes del mundo y su mortalidad es de aproximadamente 383,000 personas por año (7). De acuerdo con los resultados publicados por el “Estudio internacional de asma y alergias en la infancia” [ISAAC] se reporta que, en nuestro país, la prevalencia promedio es del 8%, y una mayor prevalencia en las ciudades cercanas al Golfo de México (7,11), sin embargo, depende de la región estudiada. En un estudio de Mancilla-Hernández se observó que la prevalencia en México fue variable en diferentes poblaciones, las fluctuaciones son del 7-33%. Utilizando un nuevo cuestionario previamente validado, la prevalencia en la población a nivel preescolar, primaria, secundaria y preparatoria en Puebla fue de 14%, Tulancingo 17%, Tlaxcala 7% y Cancún 14% (12).

## **FISIOPATOLOGÍA**

La patogenia del asma implica una compleja red de factores que interactúan en todos los niveles y escalas de la enfermedad, desde genético a celular, de tejido, a órgano. Se considerará la patogenia del asma utilizando tres dominios principales de la enfermedad: inflamación de las vías respiratorias, hiperreactividad bronquial y remodelación de las vías respiratorias (13).

El proceso inflamatorio involucra células como los linfocitos T cooperadores tipo 2 (Th-2), eosinófilos, neutrófilos, macrófagos, mastocitos, plaquetas, y fibroblastos, los cuales se aprecian infiltrando el epitelio mucoso y el área muscular lisa de las vías aéreas (14). Los eosinófilos liberan múltiples mediadores proinflamatorios como interleucinas 11, 17, 17E y 25 (IL-11, IL-17, IL-17E IL-25), factor de crecimiento transformante  $\alpha$  y  $\beta$ 1 (TGF- $\alpha$  y  $\beta$ 1) y metaloproteinasas tipo 9 (MMP-9), los cuales contribuyen directamente a la broncoconstricción, hipersecreción de moco y principalmente a la inflamación de la mucosa bronquial. Esta estirpe celular ha sido reconocida como célula profibrótica debido a su capacidad de producción de citocinas tales como TGF- $\beta$  e IL-6 así como proteinasas tales como MMP-9, las cuales, contribuyen de forma directa en la fibrosis de la vía aérea (6). Los mastocitos son células efectoras de la inmunidad innata localizadas en todo el cuerpo, particularmente en la interfaz con el mundo externo y en las cercanías a vasos sanguíneos, vasos linfáticos, fibras nerviosas y a una variedad de células inmunes; están implicados en la reacción inmediata de hipersensibilidad mediada por histamina y leucotrienos, que

producen broncoconstricción, vasodilatación y edema tisular; también promueven la infiltración leucocitaria, el depósito de colágena y el crecimiento de células nativas a través de las citocinas y proteinasas liberadas (6,14). Múltiples mediadores derivados de mastocitos, incluyendo la triptasa, histamina y citocinas como el factor de necrosis tumoral (TNF) se han propuesto como contribuyentes del proceso de remodelación de la vía aérea. La triptasa liberada por los mastocitos estimula la proliferación de miocitos y fibroblastos, así como la producción de colágena tipo I. Los neutrófilos producen múltiples citocinas, particularmente IL-9, TNF- $\alpha$  y TGF- $\alpha$ . Estas células pueden ser mediadores importantes de la hipersecreción mucosa, observada en el asma aguda severa y crónica debido a que la elastasa de neutrófilos es un importante secretagogo para las células caliciformes y las glándulas submucosas. Son, así mismo, una fuente importante de TGF- $\beta$ , por lo que se considera que juegan un papel importante en la fibrosis subepitelial de la vía aérea (6).

La hiperreactividad de la vía respiratoria (HVR) refleja una contracción aumentada/disfuncional del músculo liso de las vías respiratorias (ASM, por sus siglas en inglés) debido a una variedad de estímulos directos o indirectos. La HVR aumenta con la inflamación. El grado de infiltración de mastocitos en el ASM también se correlaciona con la reactividad bronquial medida por la metacolina PC20. Juntos, estos hallazgos sugieren que los mastocitos en el ASM juegan un papel específico en la HVR, a través de la liberación de mediadores, incluyendo histamina, prostaglandinas D2 (PGD2) y cisteinil leucotrienos, que pueden inducir directamente la contracción de la ASM, con el consiguiente HVR. Los mastocitos ubicados en el músculo liso de las vías respiratorias (ASM) también se diferencian bajo la influencia de las proteínas de la matriz extracelular derivadas de ASM para convertirse en fibroblásticas, y la prevalencia de dichos mastocitos alterados en el músculo liso de las vías respiratorias está relacionada con el grado de hiperreactividad. Los estímulos, como el estrés oxidativo y los contaminantes ambientales inhalados, también pueden aumentar la hiperreactividad (13).

La remodelación de la vía aérea se puede considerar como una consecuencia de un proceso inflamatorio crónico que al reparar de forma prolongada la vía aérea produce alteración en su estructura. Existen dos tipos, la remodelación fisiológica y la remodelación patológica. La primera incluye cambios estructurales durante el desarrollo normal del pulmón y liderando el crecimiento maduro normal de la pared de la vía aérea o como una respuesta aguda y transitoria a una lesión o inflamación. La segunda incluye alteraciones que ocurren como resultado de cualquier disturbio desarrollado en el pulmón o como una

respuesta crónica a una lesión o inflamación dejando permanentemente alterada la pared estructural y funcional de la vía aérea, resultando en una pérdida progresiva y lenta (9). Dentro de los cambios estructurales que se llevan a cabo en la remodelación patológica de la vía aérea encontramos cambios epiteliales, producción excesiva de matriz extracelular (ECM) y deposición de colágeno que conduce a fibrosis de las vías respiratorias, aumento de la masa celular de músculo liso de las vías respiratorias, hiperplasia de las glándulas mucosas, y un número elevado de fibroblastos/miofibroblastos. La deposición aberrante de las proteínas de la matriz extracelular es una característica del asma crónica que causa la rigidez y el estrechamiento de las vías respiratorias (6,13,15).

## **CLASIFICACIÓN**

La clasificación fenotípica tradicional en los pacientes con asma se basa en los factores desencadenantes (alérgenos, ejercicio, infecciones), en la presentación clínica, o en los marcadores inflamatorios (eosinófilos o neutrófilos) (16). Por lo tanto, un fenotipo describe "características observables" y, en el contexto del asma, describe características clínicas, fisiológicas, morfológicas y bioquímicas, así como la respuesta a diferentes tratamientos (17). Se han identificado muchos fenotipos. Algunos de los fenotipos más comunes y de acuerdo con GINA son:

- Asma alérgica: a menudo comienza en la infancia y se asocia con un historial familiar de enfermedades alérgicas como el eccema, rinitis alérgica o alergia a los alimentos o medicamentos. El examen del esputo revela una inflamación eosinofílica de las vías respiratorias. Los pacientes generalmente responden bien al tratamiento con corticosteroides inhalados (CEI).
- Asma no alérgica: algunos adultos tienen asma que no está asociada con la alergia. El perfil celular del esputo de estos pacientes puede ser neutrófilo, eosinófilo o contener solo unas pocas células inflamatorias (paucigranulocítica). Los pacientes con asma no alérgica a menudo responden no tan bien a la CEI.
- Asma de inicio tardío: algunos adultos, especialmente mujeres, se presentan con asma por primera vez en la vida adulta. Estos pacientes tienden a ser no alérgicos. y con frecuencia requieren dosis más altas de CEI o son relativamente refractarios al tratamiento con corticosteroides.

- Asma con limitación de flujo de aire fijo: algunos pacientes con asma de larga evolución desarrollan una limitación de flujo de aire fija que se cree que se debe a la remodelación de la pared de la vía aérea.

- Asma con obesidad: algunos pacientes obesos con asma tienen síntomas respiratorios prominentes y poca inflamación eosinofílica de las vías respiratorias (7).

## **SURFACTANTE PULMONAR**

El surfactante pulmonar (SP), se compone de una mezcla compleja de fosfolípidos y proteínas, que recubre la enorme superficie alveolar en la interfase aire-líquido. La fosfatidilcolina y el fosfatidilglicerol son los principales lípidos constituyentes y SP-A, SP-B, SP-C y SP-D son cuatro tipos de proteínas asociadas al surfactante (18). La principal función del surfactante pulmonar es la reducción de la tensión superficial dentro del alvéolo, estabilizando así los alvéolos al final de la espiración. Además, ayuda a mantener las vías respiratorias abiertas y limpias, y también regula la defensa del huésped pulmonar y las respuestas inmunitarias. El surfactante se sintetiza, ensambla y finalmente se libera por los neumocitos tipo II presentes en los alvéolos (19).

El surfactante pulmonar es 80% –85% de fosfolípidos y 5% –10% de lípidos neutros (principalmente colesterol). Además de los lípidos, una proporción menor es la proteína (5% –6%), que incluye las cuatro proteínas asociadas a los surfactantes: SP-A, SP-B, SP-C y SP-D. Los fosfolípidos tienen una estructura anfipática con una cabeza polar (hidrófila) y una cadena no polar, hidrófoba, de ácido graso, y autoorganizados en bicapas. En las interfaces polarizadas, como la barrera aire-líquido en los alvéolos, los fosfolípidos forman una monocapa en la que los grupos de cabeza polar están orientados hacia la fase líquida y las cadenas de ácidos grasos hidrófobas se enfrentan a la fase gaseosa, es decir, el lumen de las vías respiratorias. La fracción de fosfolípido del surfactante comprende diferentes especies moleculares, siendo la fosfatidilcolina la más abundante (19,20).

La fosfatidilcolina conforma aproximadamente el 80% de los lípidos totales y cerca de dos terceras partes del total del surfactante. En condiciones normales, aproximadamente el 70% de sus ácidos grasos están saturados, siendo el ácido palmítico el ácido graso saturado más común. Otros lípidos que componen al SP son: fosfatidilglicerol (PG), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI) entre otros; el 10 % restante está compuesto por otros lípidos principalmente colesterol y fosfatidilserina, esfingomiélin y lisofosfatidilcolina. La dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) se considera el compuesto más

activo para disminuir la tensión superficial alveolar, pero la presencia de otros componentes, como el fosfatidilglicerol o fosfatidilinositol, así como las proteínas, resultan imprescindibles para una adecuada disposición espacial, redistribución y probablemente reutilización del surfactante (21). En general, son moléculas con propiedades anfipáticas o francamente hidrofóbicas, la mayoría de ellas con muchas modificaciones postraduccionales, cuyas funciones más importantes son las siguientes: a) aumento de la actividad biofísica del SP; b) asociación con otros componentes del SP; c) formación de la mielina tubular; d) participación en los fenómenos de secreción, recambio y aclaramiento del SP en el alvéolo; e) como moduladores de los mecanismos de defensa del pulmón (22).

## **EL SURFACTANTE PULMONAR COMO REGULADOR DE LA ACTIVIDAD CELULAR**

El tensioactivo pulmonar tiene otras funciones además de la de reducir la tensión superficial intraalveolar. Se han descrito efectos sobre la proliferación celular y sobre la secreción de sustancias que participan en la respuesta inflamatoria. El surfactante desempeña un papel importante en los mecanismos de defensa pulmonar y en la inmunomodulación local, aunque los efectos observados varían de acuerdo con el componente empleado. Tanto el surfactante completo como el componente lípido aislado, suprimen la proliferación de células B y células T en respuesta a mitógenos (1). En contraste, la apoproteína SP-A estimula la proliferación de linfocitos (23). Por otro lado, el surfactante pulmonar reduce la secreción de interleucinas 1 y 6 (IL-1 e IL-6) y del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) por monocitos humanos (23). Por el contrario, la SP-A estimula la producción de estas citocinas. Esto sugiere que las cantidades relativas de SP-A y lípidos en el agente tensioactivo, son importantes para el mantenimiento del balance inmune normal en el pulmón y que, bajo ciertas circunstancias, la SP-A puede ser un mediador importante de la inflamación (2).

## **ANTECEDENTES ESPECÍFICOS.**

Los surfactantes exógenos se han utilizado de forma rutinaria para tratar a los recién nacidos prematuros con síndrome de dificultad respiratoria neonatal (SDRN), reducir la atelectasia alveolar, mejorar la oxigenación y estabilizar el estado del sistema de líquido pulmonar. La administración de surfactante también se ha intentado para el tratamiento de adultos con lesión pulmonar aguda (LPA) o síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA). En diversos estudios se ha demostrado que la administración de surfactante exógeno puede no solo prevenir el edema del pulmón al estabilizar el sistema de líquido en el pulmón, sino que también puede inhibir la respuesta inflamatoria. En un estudio, se mostró el efecto terapéutico del Surfactante Pulmonar Porcino en aerosol sobre la Lesión Pulmonar Aguda inducida por ácido oleico, logrando una mejoría más rápida de la oxigenación y otros efectos terapéuticos (24).

En un estudio se demostró que el surfactante pulmonar promueve la muerte celular programada de los fibroblastos de pulmón humanos normales, induce la regulación positiva de la matriz metaloproteinasa-1 y la regulación descendente del colágeno tipo I. Y también se proporcionó evidencia de que el Surfactante Pulmonar enriquecido con Fosfatidiletanolamina mejora la fibrosis pulmonar en la lesión pulmonar inducida por bleomicina en ratones (2).

En el laboratorio estamos interesados en el fenómeno de remodelación del asma, pero principalmente en la hipersecreción de moco e hiperplasia de células caliciformes en las vías respiratorias, ya que se ha mostrado como una característica clínica en la enfermedad respiratoria, así como un importante contribuyente a la morbilidad y la mortalidad en el asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (25). La producción incrementada de esputo es una característica tanto en las exacerbaciones del asma como de la inflamación crónica de la vía aérea, que se ha asociado con un descenso acelerado en el FEV1 (Volumen Espiratorio Forzado en el primer Segundo). La hiperplasia de células caliciformes y glándulas submucosas, así como la consecuente sobreproducción de moco, son un componente importante en la fisiopatología del asma; y la mayoría de los casos de crisis fatales son resultado de taponamiento por acúmulos mucosos grandes en la vía aérea. La adhesión de moco a la vía aérea de pequeño y mediano calibre contribuye a la disminución del flujo de aire y atrapamiento aéreo en casos de asma severa, observándose un incremento en el área ocupada por glándulas mucosas en la vía aérea.

Los tapones mucosos se presentan en toda la vía aérea desde la segunda bifurcación hasta los bronquiolos. Las vías aéreas se encontrarán con secreciones y exudado inflamatorio tan viscoso que los pacientes tendrán una respuesta pobre a los broncodilatadores y se puede requerir remoción de los tapones por broncoscopia y lavado endobronquial (6).

En un modelo murino de asma alérgico sensibilizado con ovoalbúmina se ha observado aumento de la secreción de moco e hiperplasia de células caliciformes (25), lo que también lo hace un modelo adecuado para estudiar tanto la remodelación de la vía aérea como la medición de las células caliciformes y la hipersecreción de moco. Como se ha mencionado, en el laboratorio se ha observado que en un modelo *in vivo* de fibrosis pulmonar, el surfactante enriquecido con PE disminuyó la concentración de colágena y el análisis histopatológico corroboró este efecto en las lesiones pulmonares causadas por bleomicina (2). Hasta el momento, no se ha estudiado el efecto del surfactante enriquecido con fosfatidiletanolamina en un modelo murino de asma, y su efecto en hiperplasia de células caliciformes y la hipersecreción de moco.

## **JUSTIFICACIÓN:**

El asma es una enfermedad inflamatoria crónica de la vía aérea; y se considera al asma como una de las enfermedades crónicas más frecuentes a nivel global, reportándose una incidencia de 235 millones de seres humanos afectados. Como ya se ha estudiado anteriormente, la remodelación de la vía aérea es una consecuencia de un proceso inflamatorio crónico que al reparar de forma prolongada la vía aérea produce cambios en su estructura; uno de los cambios estructurales que se presentan en la remodelación de la vía aérea en el asma son los cambios en las unidades secretoras de moco como son la hiperplasia de células caliciformes e hipersecreción de moco. Y como se ha visto en la mayoría de los casos con crisis fatales, éstas son provocadas por el taponamiento debido a acúmulos mucosos grandes en la vía aérea. No obstante que actualmente existe tratamiento para manejo y control de las crisis asmáticas, los diferentes fenotipos y endotipos que presenta esta patología hacen de ella una enfermedad de difícil manejo. Es por ello que, en el laboratorio nos hemos interesado en investigar posibles dianas terapéuticas mediante el desarrollo de un modelo murino asmático, el cual será sensibilizado y retado con extracto crudo de huevo y así mismo tratado con surfactante pulmonar enriquecido con PE, esperando encontrar cambios significativos en el análisis histopatológico de las células caliciformes, que nos pudieran indicar su posible efecto terapéutico en el tratamiento del asma.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En estudios previos realizados en el laboratorio de Medicina Experimental de la FMBUAP, se ha encontrado que, en un modelo murino *in vivo* con fibrosis pulmonar inducida con bleomicina, el surfactante pulmonar enriquecido con fosfatidiletanolamina disminuyó la concentración de colágena, lo cual fue corroborado mediante el análisis histopatológico. Igualmente, en un estudio reciente se encontró que la administración inhalada de surfactante pulmonar exógeno enriquecido con fosfatidiletanolamina (PE) atenúa la fibrosis inducida por la exposición prolongada a alérgenos en un modelo murino de asma crónico con remodelación de la vía aérea sensibilizado con extracto crudo de huevo. No obstante, no se ha esclarecido el efecto que tiene el surfactante pulmonar exógeno enriquecido con PE en un modelo de asma crónico con remodelación de la vía aérea con un marcado aumento de hipersecreción de moco e hiperplasia de células caliciformes. Lo que nos ha llevado a plantear la siguiente interrogante:

¿El surfactante pulmonar enriquecido con fosfatidiletanolamina modifica el número de células caliciformes en un modelo murino asmático sensibilizado con extracto crudo de huevo?

## **HIPÓTESIS**

El Surfactante Pulmonar enriquecido con fosfatidiletanolamina modifica el número de células caliciformes en tejido pulmonar en ratones con asma crónica y remodelación de la vía aérea.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar los cambios histopatológicos que provoca la administración de surfactante pulmonar enriquecido con fosfatidiletanolamina en el número de células caliciformes en tejido pulmonar en ratones con asma crónico y remodelación de la vía aérea.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Estandarizar el método de medición de células caliciformes en cortes histológicos con tinción de PAS con los programas MOTIC Image Plus 2.0 NC, ImageJ 1.52a y Orbit Image Analysis Version 3.15 (2008-2019).
2. Determinar el efecto del surfactante pulmonar enriquecido con fosfatidiletanolamina sobre la cantidad de células caliciformes en el modelo murino de remodelación de la vía aérea.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### DISEÑO DEL ESTUDIO

- Por el objetivo: comparativo.
- Por asignación de la maniobra: experimental.
- Por la temporalidad: transversal.
- Por la obtención de los datos: prolectivo.

### UBICACIÓN ESPACIO TEMPORAL

Este estudio se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Medicina Experimental de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

### METODOLOGÍA GENERAL

**Desarrollo de un modelo murino asmático:** En el laboratorio de Medicina Experimental se desarrolló un modelo murino de remodelación de vías respiratorias de asma, que originalmente fue descrito con ovoalbúmina por Fraga-Iriso y cols. (26), pero en el laboratorio se empleó extracto crudo de huevo (ECH) el cual contiene 60% de ovoalbúmina. Los resultados que se obtuvieron utilizando ECH, permitieron desarrollar la condición de fibrosis descrita en el modelo con ovoalbúmina. Para el modelo experimental se emplearon ratones hembra adultos de la cepa BALB/c de 6 semanas de edad, con un peso de 16-19 gr.

**Preparación del extracto crudo de huevo:** La preparación del ECH consistió en que de un huevo se obtuvo 4 gr de ECH, se homogeneizó la clara de huevo con un batidor manual de cocina, hasta que se obtuvo una consistencia espumosa, se vertieron en cajas Petri y se colocaron en la incubadora Felisa a una temperatura de 45° durante 48 horas. Posteriormente se pulverizó el desecado con un mortero de cerámica, se pesó y se colocó en un frasco estéril. La preparación del ECH, para la sensibilización intraperitoneal se pesaron 800 mg de hidróxido de aluminio en un tubo de 50 ml y se le añadieron 20 mg del ECH, después se añadió solución salina 50 ml y se re suspendió con una pipeta estéril 10 ml, hecho esto, se almacenó en el congelador de -20°C muestras alícuotas de 5 ml en tubos estériles. La preparación de la solución del ECH para nebulizar consistió en pesar 2.5 mg de ECH y se colocaron en un matraz aforado de 100 ml con un imán en el fondo. Se agregó 100 ml de solución salina y se colocó en la plancha de calor y rotatoria "Thermolyne Cimarec" por 30 minutos. Se micronebulizó 5 ml y se almacenó la solución restante en alícuotas.

**Preparación del surfactante:** Para el tratamiento con surfactante se utilizó Beractante de la marca Abbott, la cual se expende a una concentración de 25 mg de fosfolípidos por ml.

La fosfatidiletanolamina (PE) se preparó con medio de cultivo (Ham F12 sin suero) a una concentración de 20 mg/ml, se utilizó un homogeneizador ultrasónico (CPX-400, Cole-Parmer, EUA) con una punta de 13 mm, la cual opera a una frecuencia de 20 kHz y a una amplitud de 90  $\mu$ m, se sonicó a 4°C por 2 minutos. La concentración de PE el surfactante fue de 0.75 mg/ml. Para el enriquecimiento de surfactante con PE se duplicó la concentración nativa. Se suspendió la PE (Sigma) en medio F12 Ham sin Suero fetal bovino mediante sonicación. Se usaron 300  $\mu$ l de PE en 8 ml de surfactante para una concentración final de PE añadida de 0.75 mg/ml.

**Técnica para sensibilizar al modelo murino con extracto crudo de huevo (ECH):** Se dividieron a los ratones en 3 grupos, grupo I o grupo control negativo formado por 8 ratones, grupo II o grupo control positivo asmático de 18 ratones y el grupo III o grupo asmático tratado con SP enriquecido con PE de 6 ratones

Fase de sensibilización: Antes de la administración del ECH se anestesiaron de forma intraperitoneal con ketamina y xilacina a una dosis de 0.07 ml/10g de peso.

Se administraron intraperitonealmente 0.4 mg/mL de ECH más 16 mg/mL de hidróxido de aluminio (AlOH) mezclados en la misma jeringa los días 0 y 14. Los controles negativos fueron sometidos al mismo procedimiento, pero en lugar de ECH, se administró solución salina.

Fase de tratamiento y reto: Los ratones se introdujeron en un contenedor conectado a un micronebulizador durante 30 minutos y se hicieron 24 retos, los días 21, 22, 23, 28, 29, 30, 35, 36, 37, 42, 43,44,49, 50, 51, 56, 57, 58, 63, 64, 65, 70, 71 y 72. Grupo I: los ratones fueron tratados con solución salina y 30 minutos después fueron retados con la inhalación de la misma solución. Grupo II: los ratones fueron tratados con solución salina y 30 minutos después fueron retados con la inhalación de 5 ml de una solución de ECH al 2.5% nebulizada en NaCl al 0.9%. Grupo III: se administró SP enriquecido con PE en nebulización, a una dosis de 400 mg/Kg de peso a una concentración de 25 mg/ml, 30 minutos antes de cada reto con solución de ECH.

**Sacrificio:** Y en la fase de sacrificio los animales se anestesiaron con pentobarbital intramuscular a una dosis de 15 mg/kg de peso y se exanguinaron mediante sección de la aorta.

**Preparación de los pulmones:** El pulmón izquierdo fue disecado y se insufló con formol amortiguado al 10% para el análisis histopatológico. Las muestras del tejido pulmonar se sometieron al procesamiento de deshidratación e inclusión de parafina, posteriormente se realizaron cortes histológicos de 3 a 5 micras y se realizaron las tinciones de Hematoxilina y eosina (rutina), PAS (Ácido Peryódico de Schiff) para teñir los mucopolisacáridos del moco del epitelio bronquial y la Tricrómico de Masson, para distinguir la cantidad de colágena presente en el tejido pulmonar, estas tinciones ya se encuentran estandarizadas en el Laboratorio de Histopatología de la Facultad de Medicina de la BUAP. Se obtuvieron un total de 32 laminillas, cada una representando un ratón.

**Cortes Histológicos:** Se utilizaron 32 laminillas las cuales fueron obtenidas de los 3 grupos de ratones grupo I (grupo control negativo), grupo II (grupo control positivo) y grupo III (grupo asmático tratado con surfactante pulmonar enriquecido con fosfatidiletanolamina). Siguiendo el modelo descrito por Fraga-Iriso y cols. (26). Se utilizó la tinción de PAS (Ácido Peryódico de Schiff), para teñir los mucopolisacáridos del moco del epitelio bronquial y de esta forma poder evaluar la hiperplasia de las células caliciformes.

Para el análisis de la cantidad de células caliciformes, se tomaron fotografías de las 32 laminillas, obteniendo un total de 640 imágenes, las cuales fueron empleadas para las mediciones.

**Tabla 1. Variables de medición**

VARIABLE	ESCALA	MEDICIÓN	VALOR
Bronquios	Cuantitativa, discreta	Motic Image Plus 2.0 NC	Número de bronquiolos por campo
Perímetro bronquial	Cuantitativa, continua	Motic Image Plus 2.0 NC	µm
Células caliciformes	Cuantitativa, discreta	Motic Image Plus 2.0 NC.	Número de células caliciformes por bronquio.
	Cuantitativa, discreta	ImageJ 1.25a.	Número de células caliciformes por bronquio.
	Cuantitativa, continua	Orbit Image Analysis Version 3.15 (2008-2019).	% de células caliciformes por bronquio
Tratamiento	Nominal, dicotómica		Tratamiento con solución salina

## METODOLOGÍA PARA LOS OBJETIVOS ESPECÍFICOS

### Metodología para el objetivo específico 1.

**Objetivo específico 1:** Estandarizar el método para la cuantificación células caliciformes en cortes histológicos con tinción de PAS con los programas *Motic Image Plus 2.0 NC*, *ImageJ 1.25a* y *Orbit Image Analysis Version 3.15 (2008-2019)*.

Fundamento lógico: Las células caliciformes se encuentran en toda la vía aérea conductora y su función principal es secretar mucinas en la superficie interna del tracto respiratorio. La hipersecreción de moco se ha demostrado como una característica clínica en el asma mortal, donde se observó que las células caliciformes eran 3 veces más altas, especialmente en las vías respiratorias periféricas (25), por lo que su medición es importante para el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas. En el laboratorio no se tiene estandarizado un método de cuantificación de células caliciformes, por lo que se espera desarrollar un método de medición confiable.

**Metodología:** La patóloga experta seleccionó 30 imágenes, 15 del control negativo, y 15 del control positivo con diagnóstico de hiperplasia de células caliciformes. Estas imágenes fueron empleadas para probar las tres técnicas de medición.

**Análisis de imágenes con el programa Motic Image Plus 2.0 NC:** El programa de análisis Moticam 2300 permite la obtención de imágenes capturadas por microscopía e incluye un sencillo sistema de calibración que permite la medición manual de línea, rectángulo, círculo, círculo por 3 puntos, arco, polígono, polígono irregular, elipse, ángulo, área y línea irregular. Por lo cual este programa nos permitió no solo la captura de 30 fotografías sino también hacer la medición del perímetro interno, perímetro externo, área interna, área externa y el conteo de células caliciformes que había en cada bronquio fotografiado. Estas mediciones se llevaron a cabo por 3 observadores, los cuales estaban cegados, pero fueron entrenados para identificar los bronquios, células caliciformes y células epiteliales. Los detalles de la medición se encuentran en el anexo 1.

**Análisis de imágenes con el programa ImageJ 1.52a:** Es un programa de procesamiento de imagen digital de dominio público programado en Java, desarrollado en el National

Institutes of Health. Puede calcular el área y las estadísticas de valor de píxel de selecciones definidas por el usuario y la intensidad de objetos umbral (thresholded objects). El programa se utilizó con la finalidad de crear un algoritmo confiable que nos permitiera la cuantificación de células caliciformes por 3 observadores distintos. El algoritmo que se desarrolló consistía en el reconocimiento de células caliciformes por medio de una segmentación de objetos, dando un resultado aproximado de cuantas células caliciformes había por bronquio. Los detalles del desarrollo del algoritmo se encuentran en el anexo 2.

### **Análisis de imágenes con el programa Orbit Image Analysis Version 3.15 (2008-2019):**

El programa de análisis de imágenes *Orbit* es un programa de código libre que permite analizar imágenes de diferentes tejidos; integra algoritmos que utilizan el aprendizaje automático, basándose en un modelo de entrenamiento. Procesa imágenes a través de 4 módulos: *Tissue Classification*, *Exclusion Model*, *Object Segmentation* y *Object Classification*. El primer módulo (*Tissue Classification*) realiza una clasificación de tejidos que se aplica y permite hacer una discriminación de las regiones de interés en una imagen. El segundo módulo (*Exclusion Model*) permite clasificar una imagen en regiones que pueden ser de inclusión o de exclusión, logrando de esta manera un análisis más detallado que brinda información precisa sin perder tiempo analizando el fondo o zonas de poco interés. El tercer módulo (*Object Segmentation*) permite detectar objetos en una imagen y describirla con una forma, generalmente se usa para hacer una segmentación de células. El cuarto módulo (*Object Classification*) permite agregar a la segmentación de objetos la posibilidad de una clasificación de todos los objetos detectados, es decir clasifica objetos segmentados. Este programa se utilizó con la finalidad de crear un algoritmo confiable, válido y consistente, para la cuantificación de células caliciformes, el cual fue analizado por 2 observadores distintos. Los detalles del desarrollo del algoritmo se encuentran en el anexo 3.

### **Metodología para el objetivo específico 2.**

**Objetivo específico 2:** Determinar el efecto del surfactante pulmonar enriquecido con fosfatidiletanolamina sobre la morfología y cantidad de células caliciformes en el modelo murino de remodelación de la vía aérea.

Fundamento lógico: la remodelación de la vía aérea es una consecuencia de un proceso inflamatorio crónico que al repararla de forma prolongada produce cambios en su estructura; uno de esos cambios se refleja en las unidades secretoras de moco en forma de hiperplasia de las células caliciformes e hipersecreción de moco. Y como se ha visto en

la mayoría de los casos con crisis fatales de asma, estas son provocadas por el taponamiento de la vía aérea debido a grandes acúmulos mucosos (25). En el laboratorio se ha descrito que el surfactante enriquecido con fosfatidiletanolamina mejora la fibrosis en un modelo murino de bleomicina (2), igualmente se vio su efecto antifibrótico en un modelo de remodelación de la vía aérea con asma crónico (3), por lo cual se espera que su administración muestre cambios estructurales en el análisis histopatológico del modelo murino asmático.

**Metodología:** Se analizaron 640 fotografías por dos observadores distintos, los cuales estaban cegados y fueron entrenados para identificar bronquios, células caliciformes y células epiteliales.

**Análisis de imágenes con el programa Orbit Image Analysis Version 3.15 (2008-2019):** Al clasificar el modelo de medición completo con la metodología del objetivo específico 1 anteriormente descrita, se obtuvieron los resultados del análisis desplegándose una ventana donde se mostraron las proporciones por cada clase, que, sumadas, dan como resultado 1. Para cada grupo experimental (control negativo, control positivo y PE) se obtuvo el área de células caliciformes por bronquio en cada microfotografía.

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

La concordancia entre los observadores se midió con el coeficiente de correlación intraclase (CCI). En los datos obtenidos se presentaron medias y desviaciones estándar de cada grupo experimental y de los grupos control. Para el análisis estadístico se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Se empleó la prueba de Dunn para analizar las diferencias entre grupos. Se consideró como significativa una  $p < 0.05$ . Se emplearon los programas R (versión 3.6) y RStudio (versión 1.2.1335).

## **TAMAÑO DE LA MUESTRA**

Se realizó un estudio para una variable de respuesta continua de un sujeto control y uno experimental, con un control por cada sujeto experimental. La variable diana fue la cantidad de células caliciformes por bronquio. En un estudio previo (26), la respuesta dentro de cada grupo de sujetos se distribuyó normalmente con una desviación estándar de 780. Si la verdadera diferencia en la media experimental y de control es de 1150 (nos interesa una magnitud del efecto 50% o mayor), nosotros tendríamos que estudiar 8 sujetos experimentales y 8 sujetos control para ser capaces de rechazar la hipótesis nula de que las medias poblacionales de los grupos experimental y control son iguales, con una potencia

de 0.8 y probabilidad de cometer el error de tipo 1 de 0.05. El cálculo se hizo con el programa *PS Power and Sample Size Calculations* (27).

## **INFRAESTRUCTURA FÍSICA Y HUMANA**

### **RECURSOS HUMANOS**

D. C. Luis Guillermo Vázquez de Lara Cisneros

Isabel López Salomón

### **RECURSOS MATERIALES**

Recursos propios del Laboratorio de Medicina Experimental de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

### **RECURSOS FINANCIEROS**

Recursos propios del Laboratorio de Medicina experimental de la BUAP.

## **ASPECTOS ÉTICOS**

El presente trabajo de investigación cumplió los lineamientos éticos establecidos por la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio y los principios básicos de la declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. También se siguieron los lineamientos establecidos por el Bioterio Central de la BUAP.

## **RESULTADOS**

### **ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO DE MEDICIÓN DE CÉLULAS CALICIFORMES**

#### **CONSISTENCIA Y VALIDEZ DE LAS MEDICIONES CON IMAGE J.**

Cuando se intentó medir la cantidad de células caliciformes con el programa de Image J, inmediatamente se hicieron evidentes las limitaciones de esta medición.

En algunos bronquios donde se observó un aumento en la cantidad de células caliciformes, éstas se encontraban conglomeradas; el conteo de células caliciformes tuvo mucha variación de aquellos bronquios donde se notó la presencia de pocas células, las cuales se distinguían una de otra y de los bronquios donde hubo gran conglomeración de células. Igualmente, se advirtió que en algunos casos el algoritmo no detectó algunas células y no las contó lo que causó variación en el resultado. Al analizar los bronquios, el algoritmo no logró diferenciar una célula de otra como en el caso de aquellos bronquios con células conglomeradas, el programa hizo una segmentación, pero la realizó agrupando varias células a las cuales consideraba como una sola, lo que dio como resultado un conteo inexacto o menor del que debía ser al aproximado en cada bronquio, como se puede observar en la figura 1.

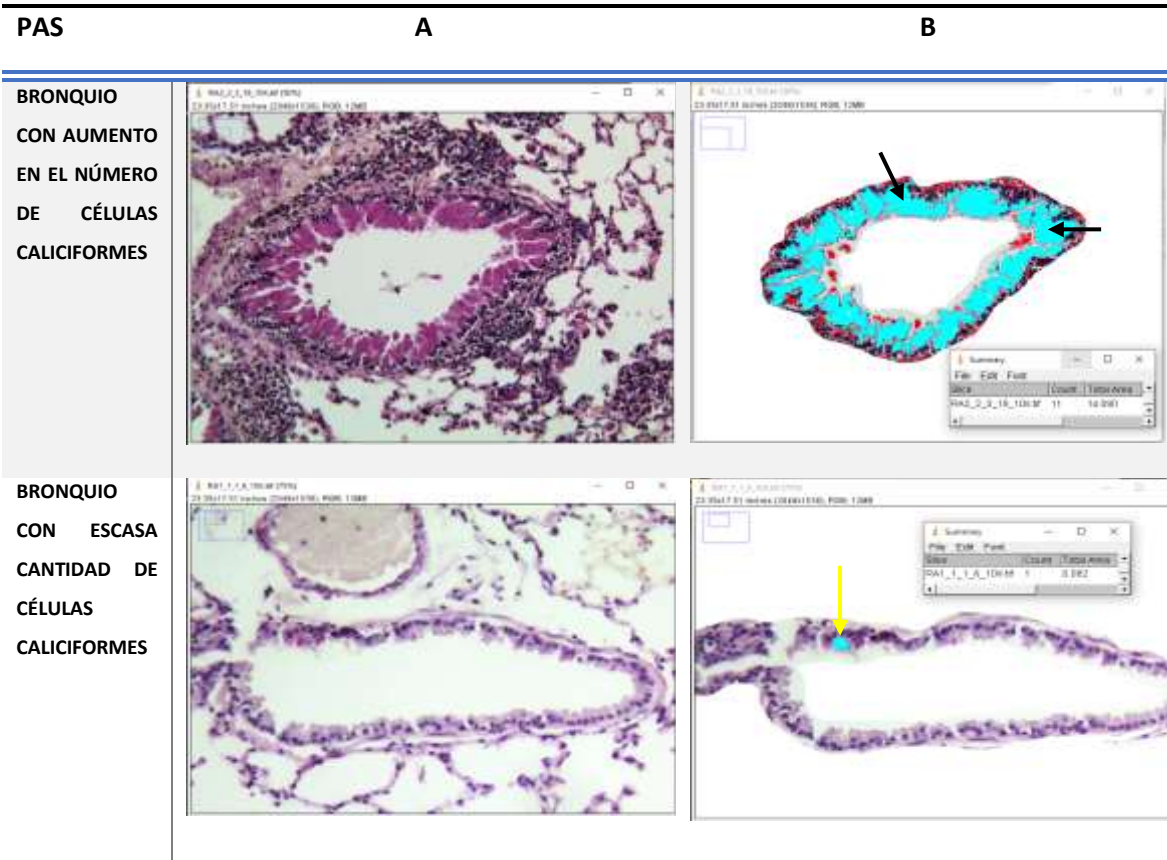


Figura 1. Microfotografías representativas de bronquios analizados con el programa ImageJ. En la columna A se puede observar a los bronquios sin analizar y a las células caliciformes de color magenta y en la columna B se encuentran los bronquios ya analizados, se puede observar de color azul claro a las células caliciformes que fueron contabilizadas y de color rojo a las células caliciformes que no fueron contabilizadas. Las flechas negras indican aquellas células que se encontraban conglomeradas y que se detectó como una sola célula, y las flechas amarillas indican que el programa las detectó como células únicas.

Puesto que, el programa utiliza como parte de su código de programación el cálculo de área y valor de píxeles de selecciones definidas por el usuario, y al haber un aumento en la cantidad de células caliciformes conglomeradas y con cantidad similar de píxeles, este no pudo discernir donde iniciaba una y donde finalizaba la otra. Por ese motivo, y a pesar de que el algoritmo permitió un conteo aproximado de cuantas células caliciformes había por bronquio, estas mediciones tuvieron un gran margen de error.

## CONSISTENCIA Y VALIDEZ DE LAS MEDICIONES CON MOTIC IMAGE PLUS.

Debido a que hubo un gran margen de error al utilizar el programa *Image J 1.52a*, se decidió usar *Motic Image Plus 2.0 NC* y *Orbit Image Analysis Version 3.15 (2008-2019)*. La medición de células caliciformes se realizó por tres observadores diferentes, los cuales fueron entrenados con la técnica descrita en los objetivos específicos para el programa *Motic*.

Con el programa *Motic Image Plus 2.0 NC* cada observador analizó las fotografías obtenidas lo que permitió la cuantificación del número de bronquios que había en cada fotografía, el conteo del número de células caliciformes existente en cada bronquio, su perímetro interno y externo, así como el área interna y externa de cada bronquio cuantificado. Para medir la consistencia entre observadores se empleó el Coeficiente de Correlación Intraclase (CCI), para determinar la concordancia entre los datos obtenidos de los tres observadores, los resultados se exhiben en la tabla 2.

**Tabla 2. Consistencia de mediciones entre observadores.**

Estructura	CCI*	IC <sub>95%</sub> **
Bronquio	1	-
Células caliciformes	0.997	0.997-0.997
Perímetro externo	0.932	0.925-0.938
Perímetro interno	0.441	0.405-0.477
Área externa	0.8	0.779-0.82
Área interna	0.959	0.954-0.964

\*CCI: Coeficiente de Correlación Intraclase      \*\*IC<sub>95%</sub>: intervalo de Confianza al 95%

Los valores obtenidos con el CCI oscilan entre 0 (ausencia de concordancia) y 1 (concordancia absoluta). Se ha indicado que existen tres categorías propuestas por Fisher en donde los valores del CCI por debajo del 0.4 representan baja fiabilidad, valores entre 0.41 y 0.75 representan una fiabilidad entre regular/buena, y valores por encima de 0.75 representan una fiabilidad excelente (28). De acuerdo con estas categorías se puede observar a partir de las mediciones realizadas por los tres observadores que los valores de

CCI para las siguientes estructuras: Bronquios, Células caliciformes, Perímetro externo, Área externa y Área interna respectivamente, oscilan entre 1 y 0.8, lo que representa una fiabilidad excelente, y el CCI del Perímetro interno fue de 0.44 indicando una fiabilidad regular/buena.

Para evaluar la validez de la medición de células caliciformes se espera que en el grupo control negativo se observen muy pocas células caliciformes. Se calculó el total de células caliciformes por ratón/laminilla ajustando respecto al perímetro de cada bronquio y el total de bronquios analizados como se observa en la ecuación 1:

Sean  $a \equiv$  número de células caliciformes

$b \equiv$  perímetro

$c \equiv$  cantidad de bronquios analizados

$n \equiv$  número de foto

$A \equiv$  ajuste de número de células caliciformes respecto del número de bronquios

Tales que:

$$A = \frac{\sum_n \left( \frac{a * 1000}{b} \right)}{c}$$

Ecuación 1

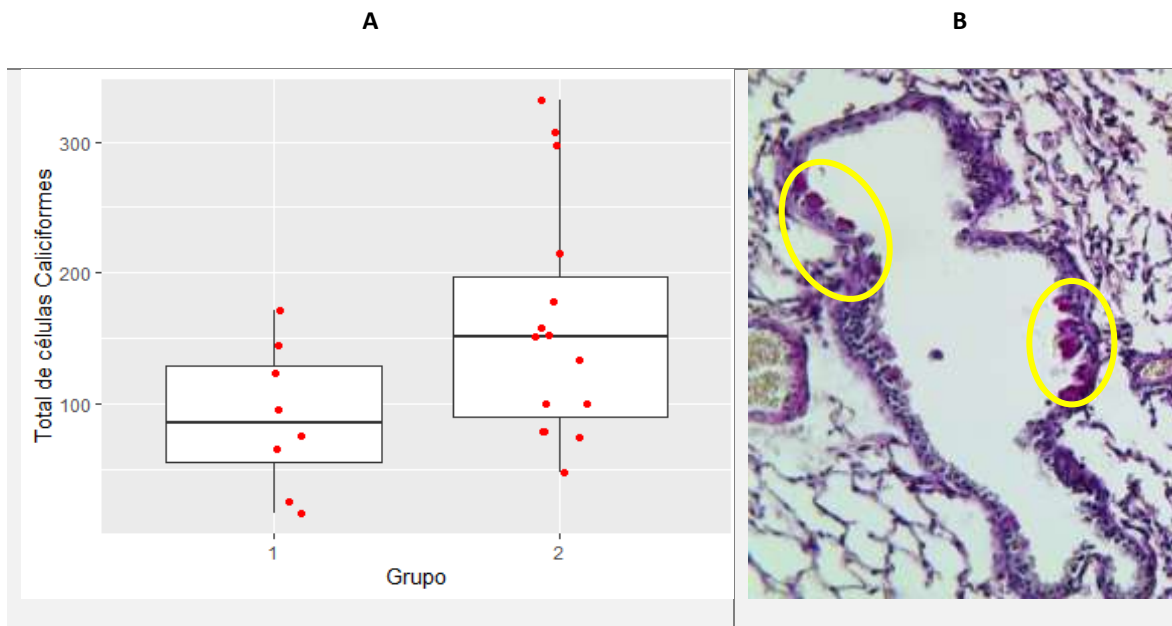


Figura 2. Medición de las células caliciformes en el grupo control negativo (grupo1) y el grupo control positivo (grupo 2), empleando el programa Motic Image Plus. Los valores se reportan como el total de células caliciformes sobre la cantidad de bronquios analizados. En la columna B se puede apreciar una microfotografía representativa de un bronquio con pocas células caliciformes (círculos amarillos)

La figura 2A muestra el total de células caliciformes de las imágenes observadas. Aunque se observa una diferencia entre las imágenes seleccionadas por la patóloga experta de los controles positivo y negativo, hay mucha dispersión en el control negativo, lo que nos habla que está produciendo muchos falsos positivos.

### CONSISTENCIA Y VALIDEZ DE LAS MEDICIONES CON ORBIT.

Para medir la consistencia entre observadores, se empleó el Coeficiente de correlación intraclase (CCI) para determinar la concordancia entre los datos obtenidos de los dos observadores, los resultados se exhiben en la tabla 3.

**Tabla 3. Consistencia de mediciones entre observadores.**

Estructura	CCI*	IC <sub>95%</sub> **
<i>Células caliciformes</i>	0.991	0.982-0.996

\*CCI: Coeficiente de Correlación Intraclase

\*\*IC<sub>95%</sub>: intervalo de Confianza al 95%

Se puede observar a partir de las mediciones realizadas por los dos observadores que el valor del CCI para Células caliciformes fue de 0.991, lo que representa una fiabilidad excelente como se argumentó previamente según Fisher (28).

Para verificar la validez en la medición de células caliciformes, se espera que en el grupo control negativo se observe un área menor de células caliciformes por bronquio respecto al grupo control positivo. El área relativa de células caliciformes en el control negativo fue de  $0.085 \pm 0.721$ , mientras que en el control positivo fue de  $0.721 \pm 0.337$  ( $p < 0.001$ ). En la figura 3, se observa que la dispersión en el grupo es mínima, y hay una clara diferencia entre las imágenes del grupo control positivo y del negativo.

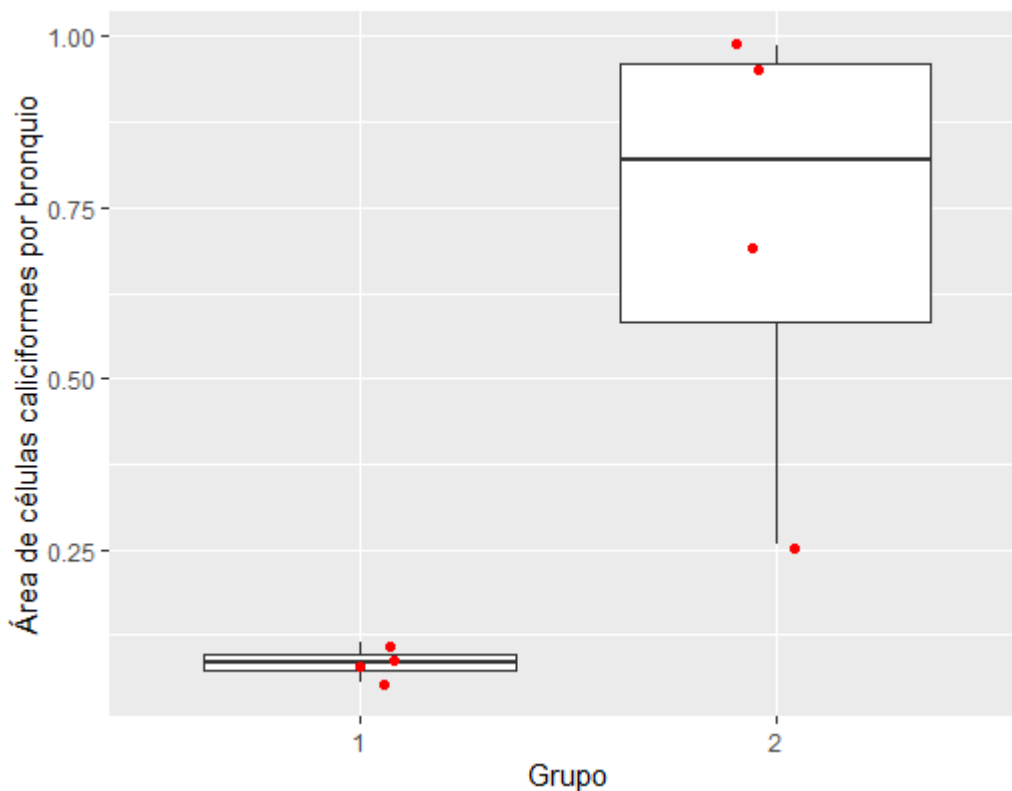


Figura 3. Medición de las células caliciformes en el grupo control negativo (grupo 1) y el grupo control positivo (grupo 2), empleando el programa Orbit. Los valores se reportan como el área relativa que ocupan las células caliciformes sobre el área total del bronquio.

Por lo anteriormente expuesto, se decidió implementar el análisis con Orbit Image Analysis como el método estandarizado más confiable para la medición de células caliciformes.

## EFFECTO DEL SURFACTANTE PULMONAR ENRIQUECIDO CON FOSFATIDILETANOLAMINA EN EL NÚMERO DE CÉLULAS CALICIFORMES

Una vez estandarizado el modelo de medición con el software Orbit, éste se utilizó para probar el efecto que tiene el Surfactante Pulmonar enriquecido con PE en el número de células caliciformes. Los resultados se muestran en la figura 4.

El modelo de extracto crudo de huevo produce un aumento en el área de células caliciformes, (prueba no paramétrica de Kruskal Wallis y para analizar las diferencias entre grupos se empleó la prueba de Dunn,  $p= 0.006$ ). Sin embargo, el tratamiento con PE, no disminuyó significativamente la cantidad de células caliciformes cuando se hace la comparación con el control positivo ( $p=0.541$ ).

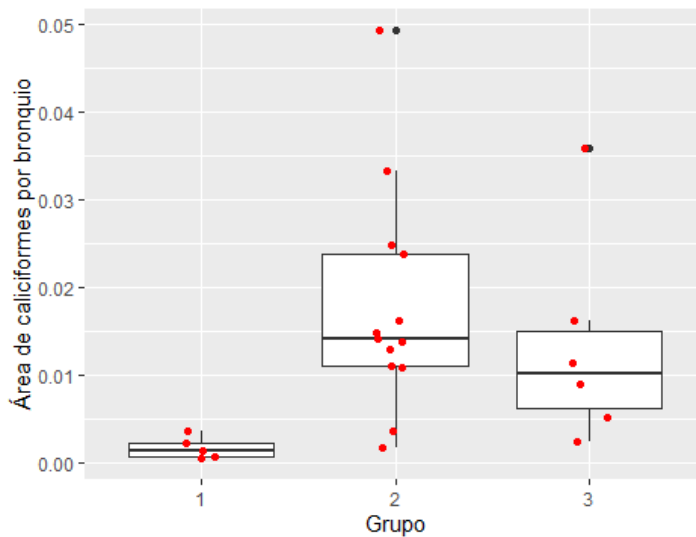


Figura 4. Medición de las células caliciformes en el grupo control negativo (grupo 1), el grupo control positivo (grupo 2) y el grupo tratado con surfactante pulmonar enriquecido con fosfatidiletanolamina (grupo 3), empleando el programa Orbit. Los valores se reportan como el área relativa de células caliciformes sobre el área total del bronquio.

## DISCUSIÓN

El surfactante pulmonar (SP) es un complejo de lípidos y proteínas que recubren la superficie alveolar y es esencial para la vida (1). En estudios previos realizados en nuestro laboratorio, se demostró que beractante, un preparado de surfactante pulmonar tiene un efecto antifibrótico *in vivo* en un modelo murino de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina (29). Posteriormente se probó el efecto de algunos de sus fosfolípidos, en donde se observó que la fosfatidiletanolamina (PE) es el principal fosfolípido involucrado en este efecto antifibrosante. Además, se demostró que la administración temprana de SP enriquecido con PE y la PE por sí misma atenúan la fibrosis pulmonar en un modelo murino *in vivo* (2). En un estudio reciente desarrollamos un modelo murino de asma crónico con remodelación de la vía aérea y se concluyó que el beractante enriquecido con PE inhalado atenúa la fibrosis inducida por la exposición prolongada a alérgenos en ratones (3). Como parte del seguimiento de la investigación del efecto que tiene el SP enriquecido con PE en el asma, en el presente estudio se continuó trabajando con el mismo modelo de asma crónico y remodelación de la vía aérea. Se utilizó un preparado de SP exógeno enriquecido con PE, pero carente de las proteínas SP-A y SP-D (30).

Se conoce al asma como una enfermedad inflamatoria crónica de la vía aérea, en donde los estudios histopatológicos demuestran cambios estructurales de la misma, lo cual se ha denominado remodelación de la vía aérea, y esta se puede considerar como consecuencia de un proceso inflamatorio crónico, que al reparar de forma prolongada produce alteración en su estructura (9). Dentro de la remodelación de la vía aérea destaca la hiperplasia de células caliciformes como una de las características típicas del asma crónica, y la obstrucción de las vías respiratorias por tapones mucosos se ha reconocido como una de las principales causas de muerte en el asma (31). Por ello, el objetivo de estudio del presente trabajo fue evaluar los cambios histopatológicos que provoca la administración de surfactante pulmonar enriquecido con fosfatidiletanolamina en el número de células caliciformes en tejido pulmonar en ratones con asma crónico y remodelación de la vía aérea.

La diferenciación de las células caliciformes está influenciada por los factores de transcripción que contienen el dominio con punta SAM (SPDEF) y el ortólogo A3 en forma de horquilla (FOXA3), que se expresan selectivamente en las células caliciformes (32,33). SPDEF es suficiente y necesaria para la diferenciación de las células caliciformes y la producción de moco en las vías respiratorias. SPDEF y FOXA3 se inducen tras la

exposición a alérgenos y citocinas Th2, que promueven la diferenciación de células caliciformes y regulan una red de genes incluidos *MUC5AC*, *MUC5B* y otras proteínas implicadas en la síntesis y el empaquetamiento de las mucinas de la vía aérea (32). Las mucinas secretadas por las células caliciformes están codificadas por genes MUC, hasta la fecha, se han identificado 21, de las cuales 14 se encuentran en las vías aéreas y dos son formadoras de gel (*MUC5AC*, *MUC5B*). En las vías respiratorias humanas, *MUC5B* se produce en las glándulas submucosas y en las células caliciformes, y *MUC5AC* se produce en las células caliciformes, mientras que, en los pulmones de ratón, *MUC5B* y *MUC5AC* se expresan principalmente en las células de Clara. Se ha observado que en pacientes con asma alérgica se secreta más mucina, particularmente *MUC5AC*, en respuesta a la exposición a alérgenos (33,34).

A pesar de que se conocen las principales moléculas involucradas en la secreción de moco, los mecanismos por los cuales se desarrolla hiperplasia de células caliciformes aún no están bien establecidos. Algunos autores especulan la posible fisiopatología que comprende diferentes vías de señalización y proteínas implicadas. Se ha demostrado que la IL-13, una importante citocina Th2, causa metaplasia de células caliciformes en las vías respiratorias e induce hipersecreción de moco en el asma (35,36). En uno de los mecanismos reconocidos actualmente, se ha observado que la IL-13 causa hiperplasia de células caliciformes a través de la vía de señalización y transcripción STAT6-TMEM16A-ERK 1/2 en las células epiteliales de las vías respiratorias (35). Este mecanismo de señalización (**figura 5**) inicia con la unión de IL-13 a su receptor, cuya unión conduce a una mayor expresión del gen de CLCA1 o regulador 1 del canal de Cl<sup>-</sup> activado por Ca<sup>2+</sup>, a través de la vía de señalización-transcripción STAT6 /SPDEF (37). El CLCA1 es un miembro de la familia CLCA (regulador del canal de cloruro activado por calcio) y su función principal es regular el transporte de Cl<sup>-</sup> dependiente de Ca<sup>2+</sup> dependientes de la proteína transmembrana 16A (TMEM16A) (37). El TMEM16A se describió inicialmente como un canal de cloruro activado por calcio (CaCC), cuya expresión depende de la activación de STAT6 (transductor de señal y activador de la transcripción 6) (35,36). El CLCA1 secretado estabiliza y se acopla a TMEM16A en la superficie celular, evitando así su eliminación, y en consecuencia aumentando así su expresión en la superficie lo que da como resultado un aumento de las corrientes de cloruro dependientes del calcio, pero sin aumentar la expresión de la proteína (38). TMEM16A activa a la proteína quinasa 13 activada por mitógenos (MAPK13) y la señalización de la vía RAS-RAF-MEK-ERK 1/2, lo que influye en

la proliferación celular y la expresión del gen de la mucina MUC5AC, dando como resultado la hipersecreción de moco y la hiperplasia de las células caliciformes (33,35,37,39,40).

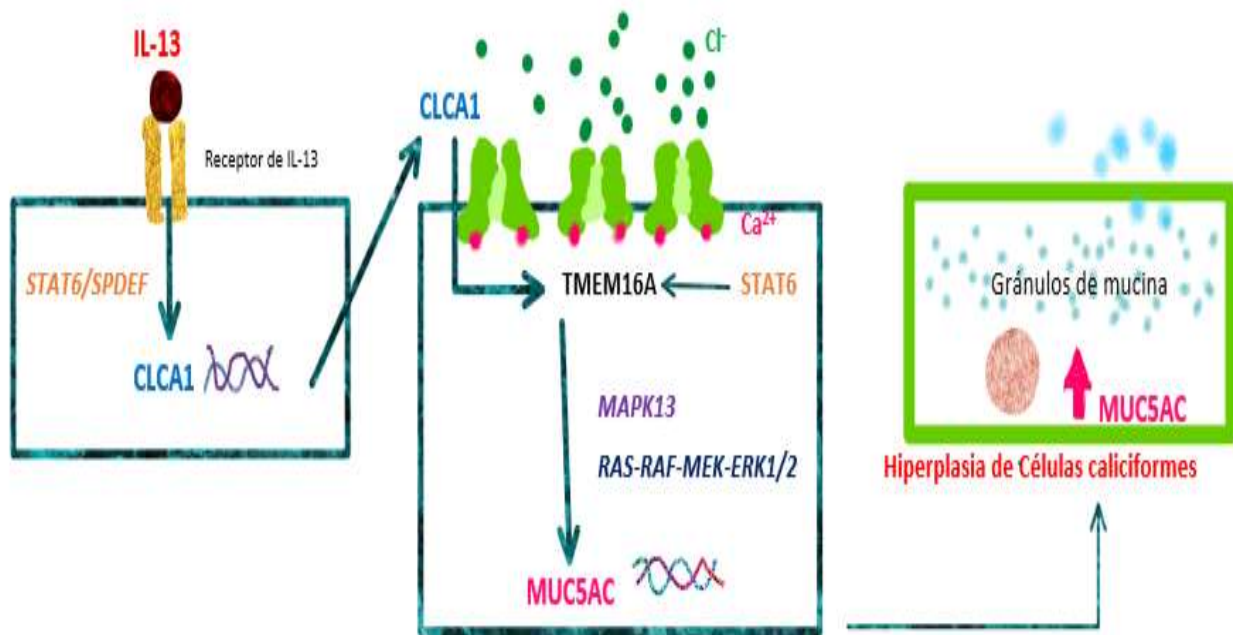


Figura 5. Vía de señalización STAT6-TMEM16A-ERK 1/2: La IL-13 se une al receptor de IL-13 y conduce a la expresión del gen de CLCA1 a través de la vía de señalización-transcripción STAT6 /SPDEF. El CLCA1 secretado estabiliza y se acopla a TMEM16A en la superficie celular, evitando así su eliminación y en consecuencia aumenta su expresión en la superficie lo que da como resultado un aumento de las corrientes de Cl<sup>-</sup> dependiente de Ca<sup>2+</sup>, pero sin aumentar la expresión de la proteína. TMEM16A activa a MAPK13 y la señalización de la vía RAS-RAF-MEK-ERK1/2, dando como resultado la expresión del gen de la mucina MUC5AC y la hiperplasia de células caliciformes.

Por otro lado, en un modelo *in vitro* de hiperplasia de células caliciformes inducidas por IL-13, se ha visto que GABA desempeña un papel esencial en la hiperplasia de células caliciformes y la sobreproducción de moco. Se conoce que el sistema nervioso en el pulmón inerva las células de las vías respiratorias del músculo liso y las células neuroendocrinas pulmonares (CNEP) (41). Las CNEP expresan ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) y péptido genético relacionado con la calcitonina (41). Existe evidencia de que la neurotrofina 4 (NT4) juega un importante papel en la sobreproducción de moco después de la exposición temprana a alérgenos al orquestar la invasión de CNEP (42). Una exposición temprana a alérgenos eleva los niveles de NT4, lo que provoca aumentos aberrantes en la invasión de CNEP que inducen la hipersecreción de GABA, en presencia de IL-13 (**figura 6**), la señalización de GABA puede ser necesaria para el mantenimiento de la diferenciación de las células caliciformes y la sobreproducción de moco, esto es debido a que la IL-13 puede

comprometer la función de barrera del epitelio, al dañar significativamente la diferenciación de las células ciliadas por una disminución en la expresión de ARNm de FOXJ1, de modo que el GABA localizado basalmente pueda difundirse al lado apical de las células epiteliales para interactuar con los receptores GABA, regulando la expresión de MUC5AC y la metaplasia de células caliciformes (41,42).

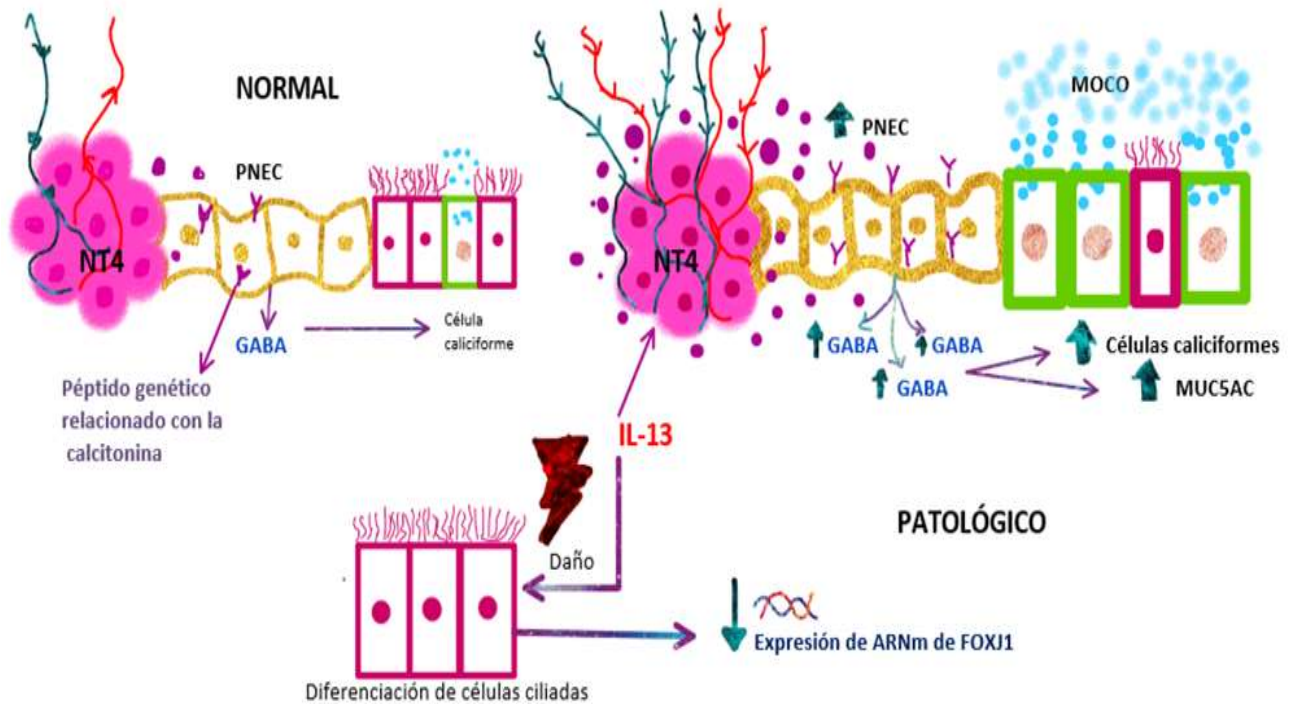


Figura 6. Vía de señalización IL13-NT4-CNEP-GABA: La exposición a IL-13 compromete la función de barrera del epitelio, al dañar la diferenciación de las células ciliadas por una disminución en la expresión de ARNm de FOXJ1, asimismo IL-13 eleva los niveles de NT4, lo que provoca aumentos aberrantes en la invasión de CNEP que inducen la hipersecreción de GABA, la cual es necesaria para la inducción de MUC5AC y la hiperplasia de células caliciformes. La figura fue modificada de (42).

Otra vía involucrada en la hiperplasia de células caliciformes es la vía de señalización WNT/Ryk. La Ryk (tirosina quinasa) funciona como un correceptor de Wnt, el cual juega un papel importante en el mantenimiento del equilibrio entre las poblaciones de células epiteliales de las vías respiratorias durante el desarrollo y la reparación. La señalización de Wnt desempeña un papel crítico durante el desarrollo y la homeostasis, incluso durante la proliferación y diferenciación celular, así como durante la morfogénesis tisular. Ryk se une a Wnt a través de su dominio WIF y modula las vías de señalización dependientes de  $\beta$ -catenina (canónicas) e independientes de  $\beta$ -catenina (no canónicas) para regular la polaridad celular, la migración celular, la determinación del destino celular y el desarrollo

esquelético, así como la neurogénesis y guía de axones. Se encontró que la deficiencia de RYK conduce a una disminución de la actividad de la señalización de WNT /  $\beta$ -catenina en el epitelio pulmonar, así como a una mayor expresión de genes asociados con la hiperplasia de células caliciformes en el epitelio pulmonar (incluidos MUC5AC, MUC5B y FOXA3, pero no SPDEF). La delección de RYK específica del epitelio causa hiperplasia de células caliciformes e hipersecreción de moco, pero no inflamación, lo que sugiere que las mutaciones que inactivan RYK son suficientes para impulsar la hiperplasia de células caliciformes (43).

En este trabajo nuestros resultados reportan que la nebulización con ECH logró aumentar significativamente el número de células caliciformes en el grupo control positivo respecto del grupo control negativo. De esta manera, se concluyó que el modelo de remodelación desarrollado cumple con las características del asma crónico: donde se puede valorar el grado de fibrosis, inflamación e hiperplasia de células caliciformes, siendo esta última variable uno de los objetivos de nuestro estudio. Si bien es cierto existen varias vías de señalización involucradas en la diferenciación de células caliciformes, la IL-13 a través de varios mecanismos activa dichas vías de señalización desempeñando un papel muy importante en la remodelación de la vía aérea generando metaplasia de células caliciformes y sobreproducción de moco, a través de los mecanismos descritos anteriormente.

Por otra parte, en este trabajo brindamos evidencia que es posible medir semicuantitativamente las células caliciformes con un analizador de imágenes de código libre. Comparamos dos métodos y los resultados brindan evidencia que las mediciones de células caliciformes con el programa *Orbit*, brindan mayor consistencia y validez que las realizadas con *Moticam Image Plus*. Esto debido a que *Moticam* resultó tener muchos falsos positivos, porque a pesar de observarse una diferencia en la medición de los controles positivo respecto del negativo, hubo mucha dispersión en el grupo control negativo. Cabe mencionar que las mediciones iniciales se realizaron con *ImageJ* y fueron descartadas debido a su poca precisión y errores encontrados en ella, por lo que se suspendió el uso de dicho programa.

El tratamiento empleado en el presente estudio se realizó mediante la nebulización con surfactante enriquecido con PE. Los resultados indican que no hubo disminución en el número de células caliciformes en el grupo experimental respecto del grupo control positivo, rechazando así la hipótesis planteada. Este resultado contrasta con el efecto del surfactante

enriquecido con PE sobre la fibrosis en este modelo animal, en donde se observa una disminución de la deposición de colágena (3). Una de las razones que pueden justificar este resultado podría deberse a que la diferenciación de células caliciformes esta mediada por vías de señalización diferentes a las de la fibrosis, en donde uno de los principales agentes desencadenantes es la IL-13, la cual está involucrada tanto en la activación de la vía STAT-TMEM16A-ERK 1/2, como de la vía NT4-PNEC-GABA, en donde su activación va a regular la expresión de MUC5AC y la proliferación celular, igualmente otra vía de señalización involucrada en la metaplasia de células caliciformes y que no depende de la IL-13, es la vía WNT/RYK. La IL-13 promueve la expresión de un gen antiapoptótico (BCL2) en las células epiteliales (41), lo cual indica que reduce el porcentaje de células apoptóticas (33). A pesar de que la PE induce apoptosis al inhibir al receptor de Raf-1 el cual forma parte de la vía de señalización MAPK/ERK y está involucrada en la proliferación celular (2,44), en el presente trabajo no se observó una disminución significativa en el número de células caliciformes y esto puede ser provocado por la existencia de diferentes vías de señalización que inducen hiperplasia de células caliciformes, a la reducción del número de células apoptóticas provocados por la acción de la IL-13, así como también la pobre dosis-respuesta que tiene la PE en la disminución del número de células caliciformes.

Otro aspecto importante por destacar en el presente trabajo fue que se utilizó un preparado de surfactante pulmonar exógeno que contiene fosfolípidos, lípidos neutros, ácidos grasos y las proteínas SP-B y SP-C, pero carente de SP-A y SP-D (29). En diversos modelos *in vivo* de asma crónico, se respaldan los efectos beneficiosos de la administración de la proteína SP-D y surfactante exógeno. Por ejemplo, en un modelo de exposición repetitiva a lipopolisacáridos (LPS), el surfactante pulmonar exógeno beractante demostró regular las respuestas inflamatorias agudas, al inhibir la señalización de LPS, bloqueando la traslocación de TLR4 en células epiteliales pulmonares (45). Sin embargo, en otro modelo de asma crónico inducido por ácaros de polvo doméstico se compararon los efectos de la administración de SP-D y beractante y se observó que el tratamiento con SP-D exógeno puede tener efectos duales en el asma, dirigidos tanto a la inflamación como al desarrollo fibrótico, por el contrario, beractante no tuvo un efecto supresor. Asimismo, en un modelo de asma alérgica, donde se utilizaron corderos prematuros, los efectos del tratamiento fueron más pronunciados en animales tratados con beractante enriquecidos con SP-D frente a los que recibieron surfactante solo (46). Asimismo, se ha visto que la administración de SP-D en ratones sensibilizados y desafiados con OVA da como resultado una disminución significativa de la hiperplasia de células caliciformes (47), debido a que SP-D

revierte el cambio de células Th2 hacia un tipo Th1, además de que SP-D regula y controla los niveles de IL-13. Sin embargo, sigue sin esclarecerse el mecanismo por el cual SP-D regula los niveles de IL-13 (46,47). Puesto que en el presente estudio el preparado de surfactante pulmonar exógeno carece de la proteína SP-D, y a que se ha observado la eficacia de la administración de SP-D en la disminución significativa de la hiperplasia de células caliciformes, se propone la administración conjunta de surfactante exógeno enriquecido con fosfatidiletanolamina y la proteína SP-D para demostrar su posible efecto en la remodelación de la vía aérea, pero principalmente sobre la disminución del número de células caliciformes en un modelo de asma crónico.

Las limitaciones de nuestro trabajo están relacionadas con el modelo experimental. El modelo para asma crónico con remodelación de la vía aérea descrito originalmente, emplea ovoalbúmina grado IV (26), lo que resulta incosteable en nuestro medio. En su lugar, empleamos extracto crudo de huevo (ECH), que contiene alrededor del 80% de ovoalbúmina. Aun cuando demostramos que se desarrolla remodelación de la vía aérea, siempre es posible que se puedan inducir otros efectos por los compuestos presentes en el ECH. Actualmente estamos desarrollando un modelo de remodelación de la vía aérea con ácaro del polvo doméstico, más específico que el desarrollado con ECH, con buenos resultados y económicamente viable.

Las perspectivas a futuro del presente trabajo apuntan a que en futuras investigaciones se efectúen estudios de dosis-respuesta para averiguar la cantidad necesaria de PE para disminuir el número de células caliciformes, así como también demostrar el efecto que pueda tener en la regulación de los niveles de IL-13. Igualmente, se plantea el empleo de surfactante pulmonar exógeno enriquecido con PE y SP-D para probar su efecto en la hiperplasia de células caliciformes.

## **CONCLUSIONES**

- El modelo murino de medición de asma crónico inducido por extracto crudo de huevo (ECH) si aumentó significativamente el número de células caliciformes.
- Las mediciones de células caliciformes se llevaron a cabo con el programa Orbit, comparándolas con las mediciones realizadas con Moticam Image Plus, se observó la eficacia de Orbit frente a Moticam al ser un método más consistente y válido para la identificación y cuantificación de células caliciformes.
- El tratamiento de surfactante pulmonar enriquecido con fosfatidiletanolamina no disminuyó la hiperplasia de células caliciformes.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Chroneos Z.C., Chroneos Z.S. SVL. Pulmonary surfactant: An immunological perspective. *Cell Physiol Biochem*. 2010;25(1):13–26.
2. Vazquez-De-Lara LG, Tlatelpa-Romero B, Romero Y, Fernández-Tamayo N, Vazquez-De-Lara F, Justo-Janeiro JM, et al. Phosphatidylethanolamine induces an antifibrotic phenotype in normal human lung fibroblasts and ameliorates bleomycin-induced lung fibrosis in mice. *Int J Mol Sci*. 2018;19(9):1–16.
3. García-Alcundia, I; Vázquez de Lara, L; García-Mendoza, I; Díaz-Gómez, Y; Tlatelpa-Romero, B; Fernández-Tamayo N. Effect of inhaled surfactant enriched with phosphatidylethanolamine on matrix deposition in a murine model of airway inflammation and remodeling. *Eur Respir J [Internet]*. 2018;52(suppl 62):A1049. Available from: [https://erj.ersjournals.com/content/52/suppl\\_62/PA1049](https://erj.ersjournals.com/content/52/suppl_62/PA1049)
4. Galicia-Negrete, G.; Valencia-Falfan R. Mediators of inflammatory response in asthma and its association with obesity. *Rev Alerg Mex* 2017. 64(2):198–205.
5. Woo LN, Guo WY, Wang X, Young A, Salehi S, Hin A, et al. A 4-Week Model of House Dust Mite (HDM) Induced Allergic Airways Inflammation with Airway Remodeling. *Sci Rep*. 2018;8(1):6925.
6. Huerta-López J., Jiménez-Gutiérrez C, Del Olmo-Téllez H, Maza-López M. Remodelación de la vía aérea en asma. *Alergia, asma e Inmunol*. 2009;18(2):60–78.
7. Members of GINA committees. Global Strategy for Asthma Management and Prevention, 2018 [Internet]. cited 3-1-2019. Available from: <https://ginasthma.org/>
8. Members of the Global Asthma Report C. The Global Asthma Report 2018 [Internet]. cited 3-1-2019. Available from: <http://www.globalasthmanetwork.org/>
9. Fehrenbach H, Wagner C, Wegmann M. Airway remodeling in asthma: what really matters. *Cell Tissue Res*. 2017;367(3):551–69.
10. Organización Mundial de la Salud. asma [Internet]. *Temas de Salud: Asma*. 2018. p. 1–10. Available from: <https://www.who.int/topics/asthma/es/>
11. Navarrete Rodríguez E, Sienna Monge JLL, Pozo Beltrán CF. Asma en pediatría. *Rev la Fac Med la UNAM*. 2016;59(4):5–15.

12. Mancilla-Hernández E, Medina-Ávalos MA, Barnica-Alvarado RH, Soto-Candia D, Guerrero-Venegas R, Zecua-Nájera Y. Prevalence of asthma and determination of symptoms as risk indicators. *Rev Alerg Mex.* 2015;62(4):271–8.
13. Russell RJ, Brightling C. Pathogenesis of asthma: implications for precision medicine. *Clin Sci.* 2017;131(14):1723–35.
14. Pazmiño FA, Navarrete-Jiménez ML. Immunologic mechanisms involved in the pathology of allergic asthma. *Rev la Fac Med Colomb.* 2014;62(2):265–77.
15. Liu G, Cooley MA, Nair PM, Donovan C, Hsu AC, Jarnicki AG, et al. Airway remodelling and inflammation in asthma are dependent on the extracellular matrix protein fibulin-1c. *J Pathol.* 2017;243(4):510–23.
16. Stokes JR, Casale TB. Characterization of asthma endotypes: implications for therapy. *Ann Allergy, Asthma Immunol.* 2016;117(2):121–5.
17. Lötvall J, Akdis CA, Bacharier LB, Bjermer L, Casale TB, Custovic A, et al. Asthma endotypes: A new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127(2):355–60.
18. Akella A, Deshpande SB. Pulmonary surfactants and their role in pathophysiology of lung disorders. *Indian J Exp Biol.* 2013;51(1):5–22.
19. Winkler C, Hohlfeld JM. Surfactant and allergic airway inflammation. *Swiss Med Wkly.* 2013;143:w13818.
20. Ghodrat M. Lung surfactants. *Am J Health Syst Pharm.* 2006;63(16):1504–21.
21. Chavarha M, KhoojInlan H, Schulwitz LE, Biswas SC, Rananavare SB, Hall SB. Hydrophobic surfactant proteins induce a phosphatidylethanolamine to form cubic phases. *Biophys J.* 2010;98(8):1549–57.
22. Casals C, Cañadas O. Role of lipid ordered/disordered phase coexistence in pulmonary surfactant function. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2012;1818(11):2550–62.
23. Kremlev SG; Phelps DS; Effect of SP-A and surfactant lipids on expression of cell surface markers in the THP-1 monocytic cell line. *Am J Physiol.* 1997;272(6):L1070–

- 7.
24. Sun Y, Yang R, Zhong JG, Fang F, Jiang JJ, Liu MY, et al. Aerosolised surfactant generated by a novel noninvasive apparatus reduced acute lung injury in rats. *Crit Care*. 2009;13(2):1–9.
  25. Khakzad MR, Mirsadraee M, Mohammadpour A, Ghafarzadegan K, Hadi R, Saghari M, et al. Effect of verapamil on bronchial goblet cells of asthma: An experimental study on sensitized animals. *Pulm Pharmacol Ther*. 2012;25(2):163–8.
  26. Fraga-Iriso R, Núñez-Naveira L, Brienza NS, Centeno-Cortés A, López-Peláez E, Vereza H, et al. Desarrollo de un modelo murino de inflamación y remodelación de vías respiratorias en asma experimental. *Arch Bronconeumol*. 2009;45(9):422–8.
  27. Dupont, WD; Plummer, WD J. Power and Sample Size Calculations A Review and Computer Program. *Control Clin Trials*. 1990;11(2):116–28.
  28. Shrout PE, Fleiss JL. Intraclass Correlations : Uses in Assessing Rater Reliability. *Psychol Bull*. 1979;86(2):420–8.
  29. Vázquez De Lara L, Becerril C, Montaña M, Ramos C, Maldonado V, Meléndez J, et al. Surfactant components modulate fibroblast apoptosis and type I collagen and collagenase-1 expression. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2000;279(5):L950–7.
  30. Guzmán-Silva, A; Vázquez de Lara, LG; Torres-Jácome, J; Vargaz-Guadarrama, A; Flores-Flores, M; Pezzat-Said, E; Lagunas-Martínez, A; Mendoza-Milla, C; Tanzi, F; Moccia, F; Berra-Romani R. Lung Surfactant Increases Free Cytosolic Levels of Ca<sup>2+</sup> in Human Lung Fibroblasts. *PLoS One*. 2015;10(7):e0134564.
  31. Kubo F, Ariestanti DM, Oki S, Fukuzawa T, Demizu R, Sato T, et al. Loss of the adhesion G-protein coupled receptor ADGRF5 in mice induces airway inflammation and the expression of CCL2 in lung endothelial cells. *Respir Res*. 2019;20(1):11.
  32. Rajavelu P, Chen G, Xu Y, Kitzmiller JA, Korfhagen TR, Whitsett JA. Airway epithelial SPDEF integrates goblet cell differentiation and pulmonary Th2 inflammation. *J Clin Invest*. 2015;125(5):2021–31.
  33. Ma J, Rubin BK, Voynow JA. Mucins, Mucus, and Goblet Cells. *Chest*.

2018;154(1):169–76.

34. Ostedgaard LS, Moninger TO, McMenimen JD, Sawin NM, Parker CP, Thornell IM, et al. Gel-forming mucins form distinct morphologic structures in airways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(26):6842–7.
35. Hara K, Kondo M, Tsuji M, Takeyama K, Tamaoki J. Clarithromycin suppresses IL-13-induced goblet cell metaplasia via the TMEM16A-dependent pathway in guinea pig airway epithelial cells. *Respir Investig*. 2019;57(1):79–88.
36. Qin Y, Jiang Y, Sheikh AS, Shen S, Liu J, Jiang D. Interleukin-13 stimulates MUC5AC expression via a STAT6-TMEM16A-ERK1/2 pathway in human airway epithelial cells. *Int Immunopharmacol*. 2016;40:106–14.
37. Liu CL, Shi GP. Calcium-activated chloride channel regulator 1 (CLCA1): More than a regulator of chloride transport and mucus production. *World Allergy Organ J*. 2019;12(11):100077.
38. Sala-Rabanal M, Yurtsever Z, Nichols CG, Brett TJ. Secreted CLCA1 modulates TMEM16A to activate Ca<sup>2+</sup>-dependent chloride currents in human cells. *Elife*. 2015;4(e05875):1–14.
39. Alevy YG, Patel AC, Romero AG, Patel DA, Tucker J, Roswit WT, et al. IL-13 - induced airway mucus production is attenuated by MAPK13 inhibition. *J Clin Invest*. 2012;122(12):4555–68.
40. Duvvuri, U.; Shiwarski, D.J.; Xiao, D.; Bertrand, C.; Huang, X.; Edinger RS. et. al. TMEM16A Induces MAPK and Contributes Directly to Tumorigenesis and Cancer Progression. *Am Assoc Cancer Res*. 2012;72(13):3270–81.
41. Barrios J, Kho AT, Aven L, Mitchel JA, Park JA, Randell SH, et al. Pulmonary neuroendocrine cells secrete  $\gamma$ -aminobutyric acid to induce goblet cell hyperplasia in primate models. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2019;60(6):687–94.
42. Barrios J, Patel KR, Aven L, Achey R, Minns MS, Lee Y, et al. Early life allergen-induced mucus overproduction requires augmented neural stimulation of pulmonary neuroendocrine cell secretion. *FASEB J*. 2017;31(9):4117–28.
43. Kim HT, Yin W, Nakamichi Y, Panza P, Grohmann B, Buettner C, et al. WNT/RYK

signaling restricts goblet cell differentiation during lung development and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(51):25697–706.

44. Colombo S, Martín-Sierra C, Melo T, Laranjeira P, Paiva A, Domingues P, et al. Modulation of the inflammatory response of immune cells in human peripheral blood by oxidized arachidonoyl aminophospholipids. *Arch Biochem Biophys*. 2018;660:64–71.
45. Glasser SW, Maxfield MD, Ruetschilling TL, Akinbi HT, Baatz JE, Kitzmiller JA, et al. Persistence of LPS-induced lung inflammation in surfactant protein-C-deficient mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013;49(5):845–54.
46. Sorensen GL. Surfactant protein D in respiratory and non-respiratory diseases. *Front Med*. 2018;5(18).
47. Qaseem AS, Sonar S, Mahajan L, Madan T, Sorensen GL, Shamji MH, et al. Linking surfactant protein SP-D and IL-13: Implications in asthma and allergy. *Mol Immunol*. 2013;54(1):98–107.

## ANEXOS

### ANEXO 1

#### **Análisis de imágenes con el programa Motic Image Plus 2.0 NC:**

Con el programa abierto, se eligieron y abrieron las imágenes que se deseaban medir, se seleccionó el botón “Medir” que se encuentra en la parte inferior izquierda y se seleccionó la opción “10x\_03\_20” para poder calibrar la imagen. (Figura 5)

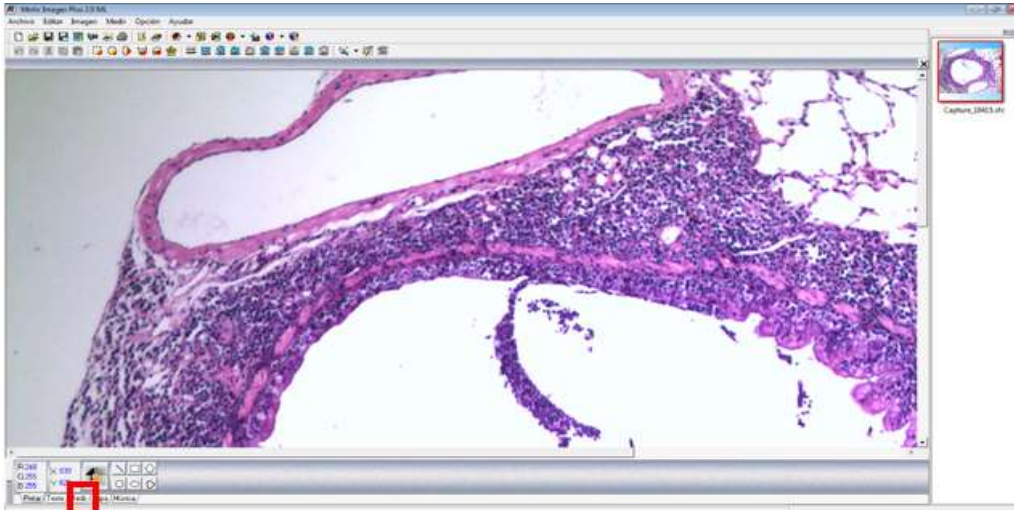


Figura 7. Selección y calibración de imagen. En el recuadro rojo se ve la opción de Medir donde se calibra la imagen a 10x\_03\_20

Hecho esto, se presionó el botón “Polígono irregular”, y en la fotografía se identificaron los bronquios que se midieron y se delimitó con ayuda del cursor el perímetro externo del bronquio y al soltarlo este nos proporcionó el perímetro y área externo del bronquio, se hizo lo mismo con el perímetro interno del mismo bronquio, los resultados obtenidos se guardaron en una base de datos. (Figura 6)

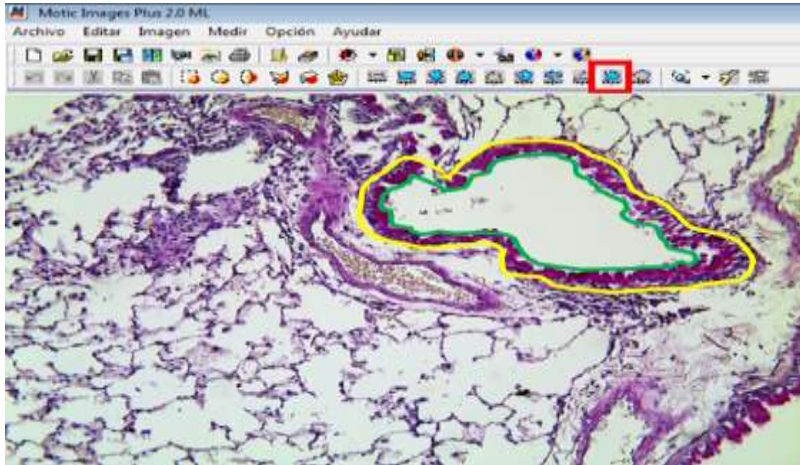


Figura 8. Medición de Perímetro bronquial. Se selecciona el "Polígono irregular" (cuadro rojo) para delimitar el perímetro interno (color verde) y el perímetro externo (color amarillo).

Finalmente, en la misma fotografía con ayuda de un contador de células manual se hizo la medición visual de células caliciformes que había en cada bronquio, y también los datos obtenidos se guardaron en la base de datos.

## ANEXO 2

### Análisis de imágenes con el programa ImageJ 1.52a

Una vez abierto el programa, se seleccionó en el menú, el botón “File”→“Open” para abrir las imágenes que se iban a analizar. (Figura 7)

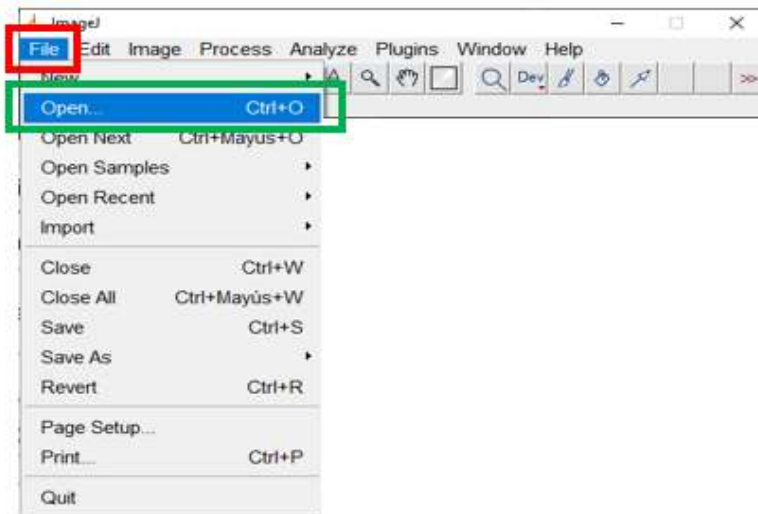


Figura 9. Selección de Imágenes. Para poder abrir una imagen, se selecciona el ícono File (rojo) y después el ícono de Open (verde).

Una vez abierta la imagen, se cortaba todo el parénquima, vasos sanguíneos y se dejaban intactos los bronquios que se analizaron. Las zonas que fueron cortadas se pintaron de blanco, al seleccionar en el menú el ícono con forma de lata de pintura. (Figura 8)

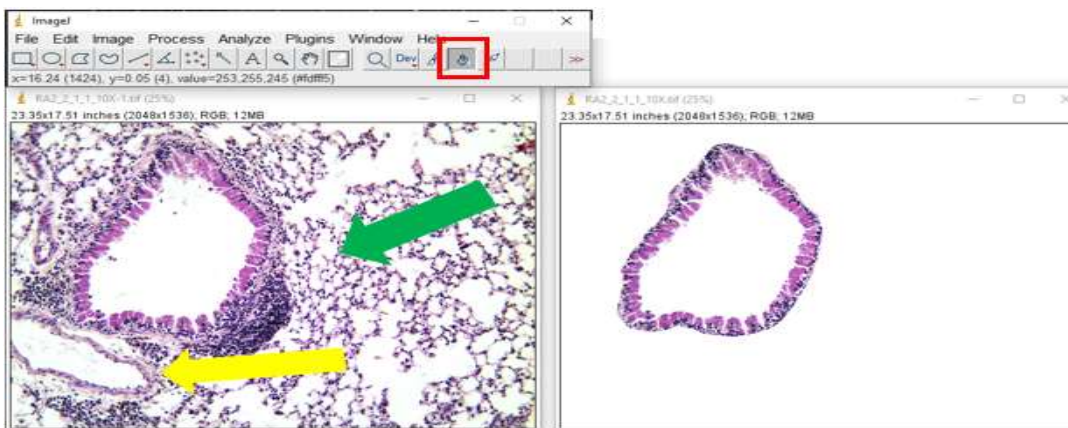


Figura 10. Selección de bronquios. Para delimitar el bronquio se cortó parénquima e infiltrado inflamatorio (flecha verde), vasos sanguíneos (flecha amarilla), y se pintó de blanco usando el icono que está en el recuadro rojo.

Una vez hecho esto, se seleccionó en el menú el botón “IMAGE”→“Adjust”→“Color Threshold”, para desplegar una ventana que indique el matiz, la saturación y brillo de la imagen . (Figura 9)

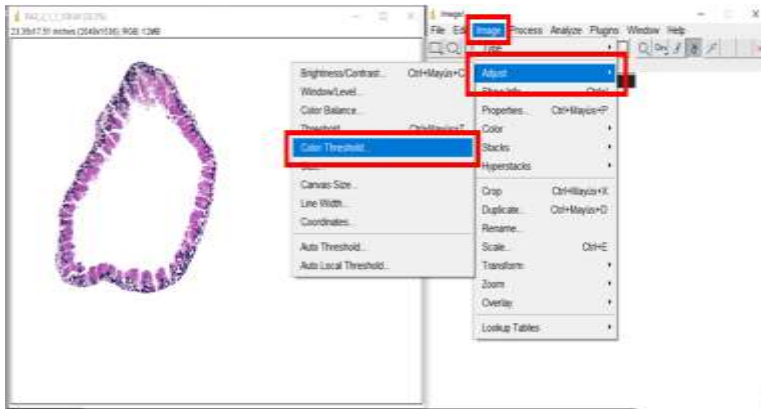


Figura 11. Color Threshold. Se selecciona el ícono de Image, Adjust y Color Threshold (recuadros color rojo), para poder desplegar una nueva ventana que permitirá identificar las zonas de interés.

Para realizar el conteo, se eligieron las regiones de interés en el bronquio las cuales en la imagen se aprecian de un color magenta (células caliciformes), se seleccionó en el menú el icono “Freehand selections” y con ayuda de este se delimitó una célula de otra, para seleccionar diferentes células caliciformes al mismo tiempo y que el programa detectara con mayor precisión las células caliciformes, se presionó la tecla SHIFT del teclado. (Figura 10)

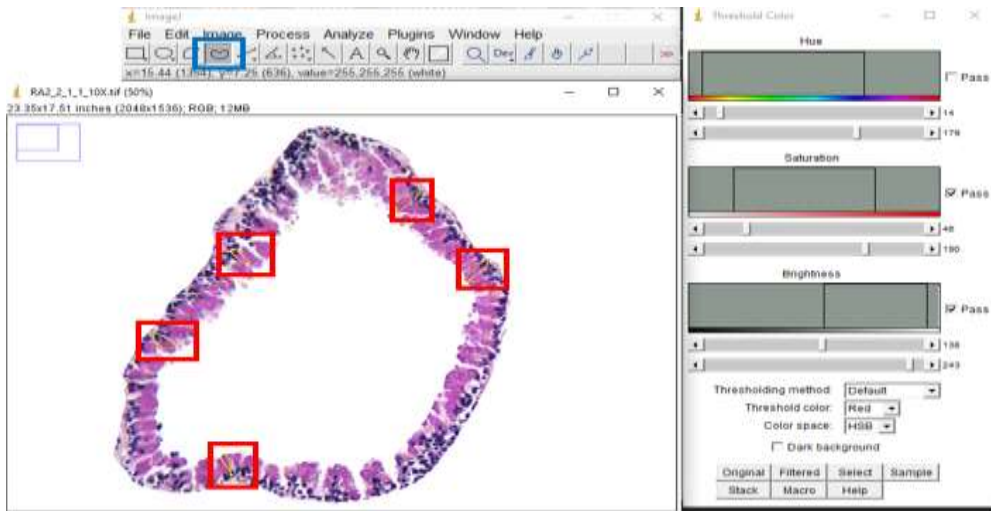


Figura 12. Selección de zonas de interés. Para delimitar las células caliciformes (cuadros color rojo) se utilizó la herramienta Freehand selections (cuadro azul) el cual permite hacer una selección manual de la zona de interés.

Una vez que fueron seleccionadas las regiones de interés, en la ventana de Color Threshold, se seleccionó en la parte inferior el ícono “Sample” para que leyera todas las áreas de interés y proceder a realizar la medición. (Figura 11)

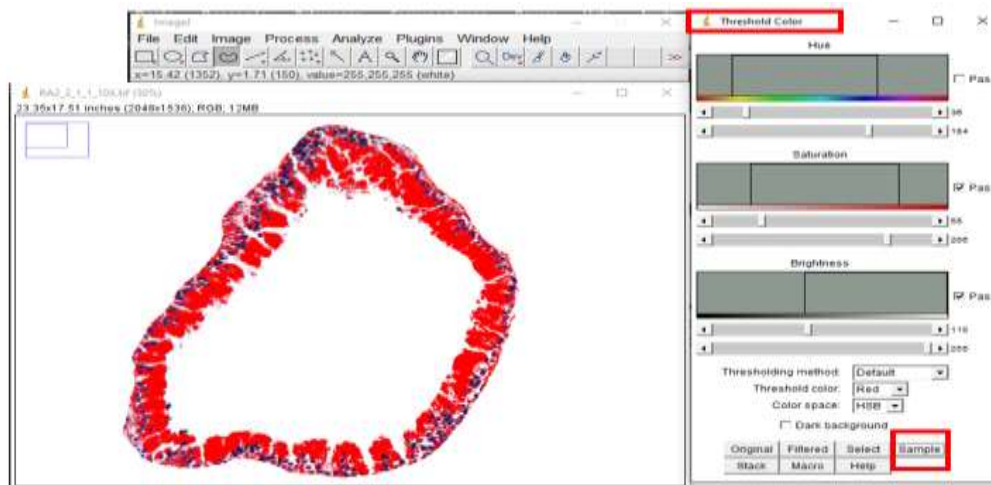


Figura 13. Detección de color. Se seleccionó el ícono “Sample” (cuadro rojo) posterior a la elección de zonas de interés para detectar el color (magenta) y poder analizar la selección hecha, por lo cual programa pinta de color rojo todas las regiones de interés (células caliciformes).

Para el análisis de las zonas de interés (de color rojo en la imagen), en el menú principal se seleccionó el ícono “Analyze”→”Analyze Particles”, en el cual se

desplegó una ventana donde se ajustaron los siguientes parámetros: Size (inch<sup>2</sup>), Pixel Units, Show, Summarize, Exclude on edges, In situ Show. Para comenzar el análisis se seleccionó el ícono “OK” (Figura 12)

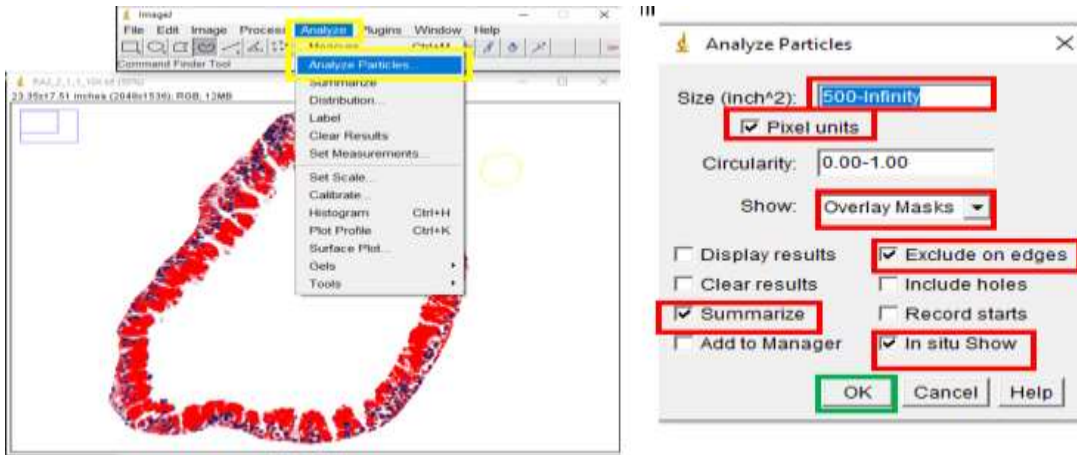


Figura 14. Ajuste de parámetros. Se seleccionó el ícono “Analyze”, “Analyze Particles” (cuadros amarillos) para desplegar una ventana y ajustar los parámetros (cuadros rojos) para iniciar el análisis de las zonas de interés (cuadro verde)

Una vez que se ajustaron los parámetros, se desplegaron los resultados en una nueva ventana, los cuales se guardaron en una base de datos.

### ANEXO 3

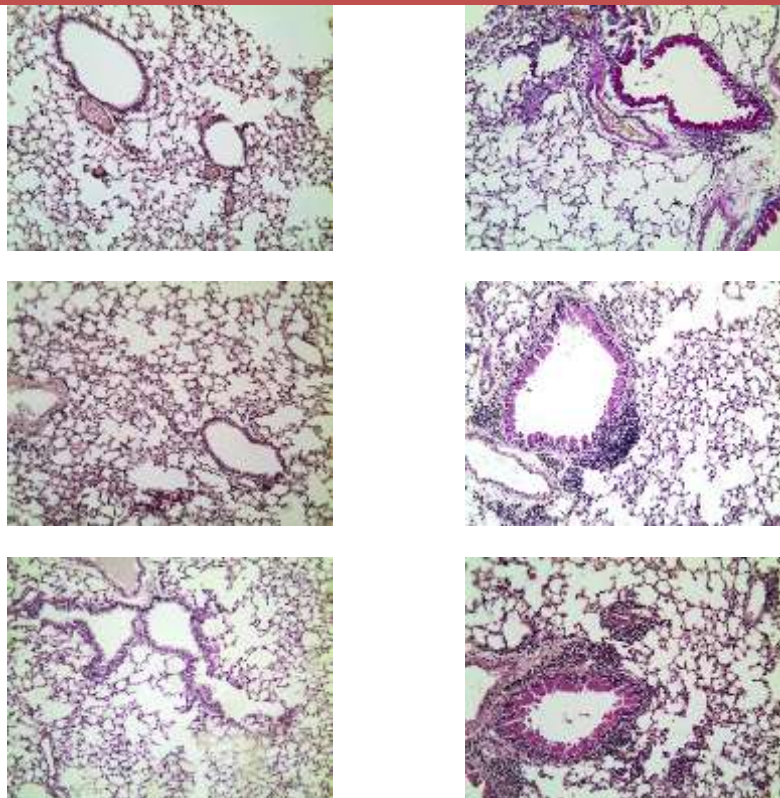
#### Análisis de imágenes con el programa Orbit Image Analysis Version 3.15 (2008-2019):

Para desarrollar el algoritmo de cuantificación con *Orbit*, el patólogo experto seleccionó 5 fotografías que tuvieran bronquios con células caliciformes y 5 fotografías con bronquios que tuvieran células epiteliales, pero sin células caliciformes, la tinción PAS tiñe principalmente mucopolisacáridos, por lo que brinda una coloración magenta a las células caliciformes que como se sabe producen mucinógeno, que cuando se hidrata recibe el nombre de mucina. Para la elección de las fotografías también se tomó como parámetro la cantidad de tinción que absorbió cada laminilla y que afectó la coloración visible en cada fotografía por lo que se eligieron fotografías con distintos tipos de coloración, desde tonos claros hasta tonos más fuertes para poder hacer una medición más exacta y que el programa detectara estas variaciones de color. (Figura 13)

**PAS**

*Células epiteliales*

*Células caliciformes*



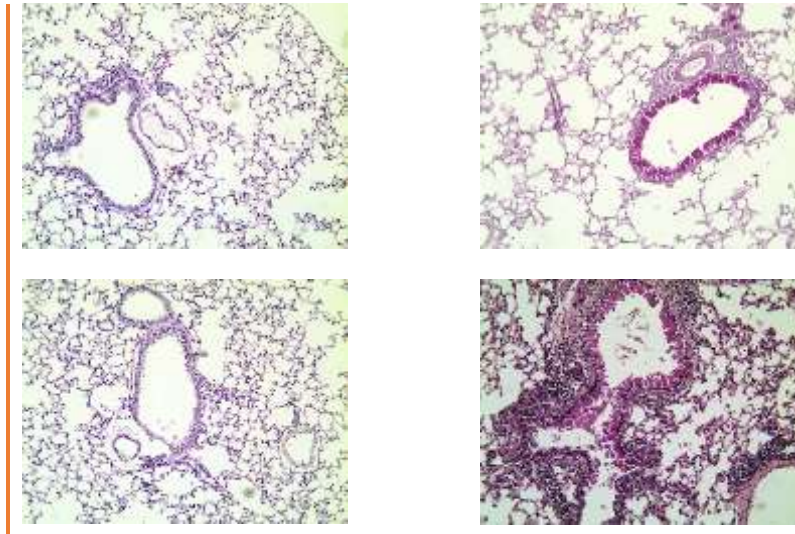


Figura 15. Microfotografías representativas de tejido pulmonar con células epiteliales y células caliciformes: en la columna de la izquierda, las fotografías de bronquios normales no tienen presencia de células caliciformes, y en la columna de la derecha se aprecian fotografías con remodelación de la vía aérea y abundantes células caliciformes. La tinción utilizada es PAS, que brinda una coloración magenta a las células caliciformes.

Posterior a la selección de imágenes, se utilizó el segundo módulo **Exclusion model** para clasificar los diferentes tejidos presentes en la imagen en 2 tipos de clases: Exclusion e Inclusion, que permitió un análisis más detallado al ahorrar tiempo en analizar el fondo o tejidos no necesarios para la medición. Para realizarlo, primero se cargó la fotografía al programa seleccionando en la barra de tareas la opción “Image” → “Open image from a file system”, y se seleccionaron las fotografías antes mencionadas. Posteriormente en la barra de tareas, se seleccionó la opción “Setup classes” para definir por colores las clases a identificar como *Inclusion* y *Exclusion*. Las células caliciformes y las células epiteliales se clasificaron como tejidos de *Inclusion*, los vasos, alveolos, infiltrado inflamatorio y el fondo se clasificaron como tejidos de *Exclusion*. (Figura 14)

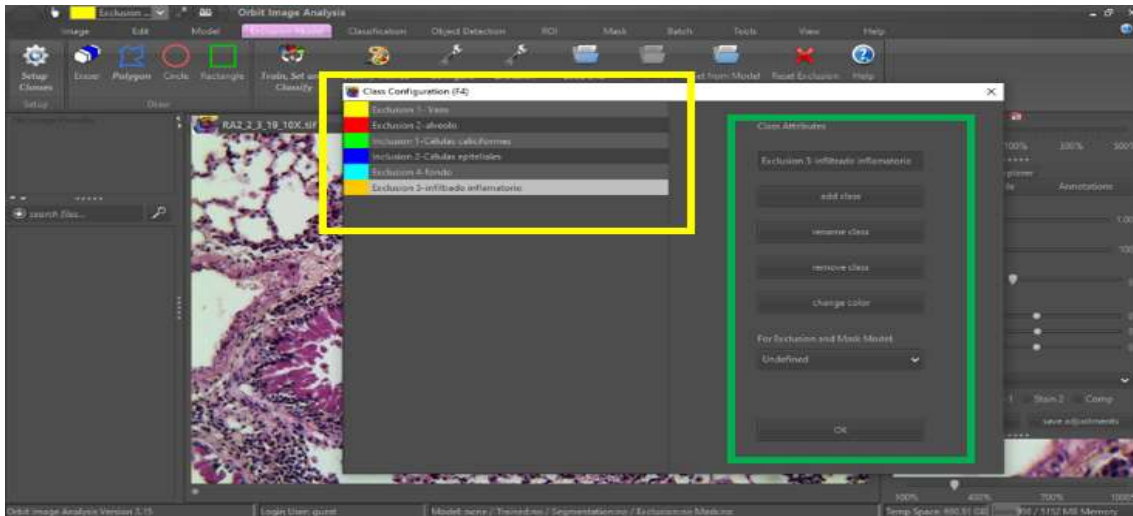


Figura 16. Configuración de las clases a evaluar. Se selecciona el color (cuadro amarillo), se nombra con la clase exclusión o inclusión y la estructura (cuadro verde).

Posterior a la configuración de clases, se comienza con la clasificación de los tejidos por estructuras, ya sea *Exlcusion* o *Inclusion*. La delimitación de regiones de interés se realiza al seleccionar el color que se configuró para cada clase y estructura, se selecciona en la barra de tareas la opción de “Polygon” y se contornea el perímetro de las estructuras que se desean clasificar. Este proceso se realizó en las 10 fotografías que se seleccionaron para entrenar al modelo de exclusión. Una vez delimitado y clasificado las estructuras en clases, se selecciona la opción de “*Classify Trained Exclusion Model*” para entrenar al modelo, y se guarda como modelo de exclusión. (Figura 15)

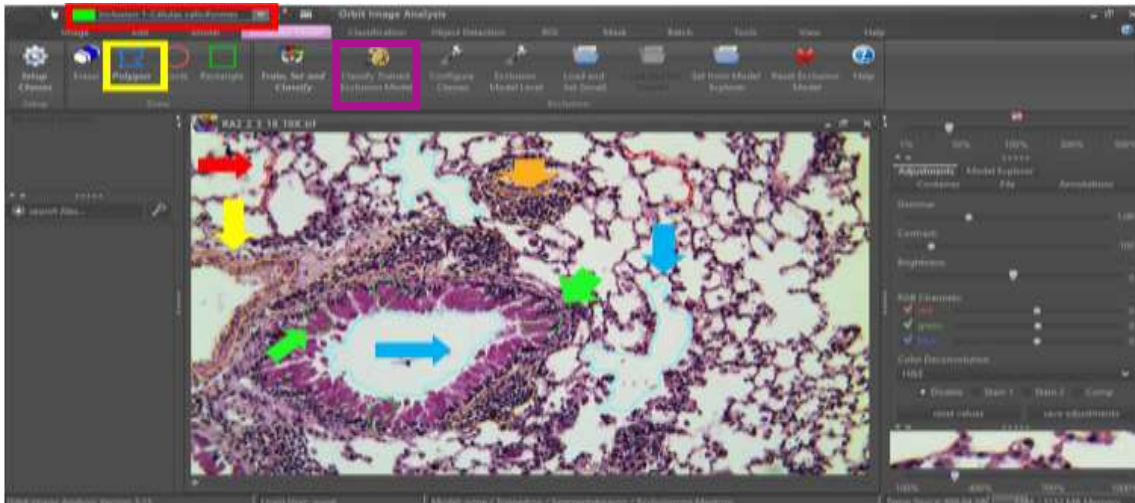


Figura 17. Clasificación de estructuras en clases de Inclusion y Exclusion. Se selecciona el tipo de clase (cuadro rojo), y con el Polygon (cuadro amarillo) se delimitan las estructuras, Exclusion: alveolos (flecha roja), infiltrado inflamatorio (flecha naranja), vasos (flecha amarilla), fondo (flecha azul), Inclusion: células caliciformes (flecha verde). Para terminar, se selecciona la opción Classify Trained Exclusion Model (cuadro morado).

Una vez que se entrenó al modelo de exclusión, se utilizó el primer módulo **Tissue Classification** que permitió clasificar únicamente las células caliciformes y las células epiteliales que ya habían sido clasificadas previamente como tejido de *Inclusion* y con ello hacer una medición más detallada y precisa. Para realizarlo, en la barra de tareas, se seleccionó la opción “Classification”, posteriormente se seleccionó la opción “Configure classes” para definir por colores las clases a identificar (Células caliciformes y Células epiteliales). (Figura 16)

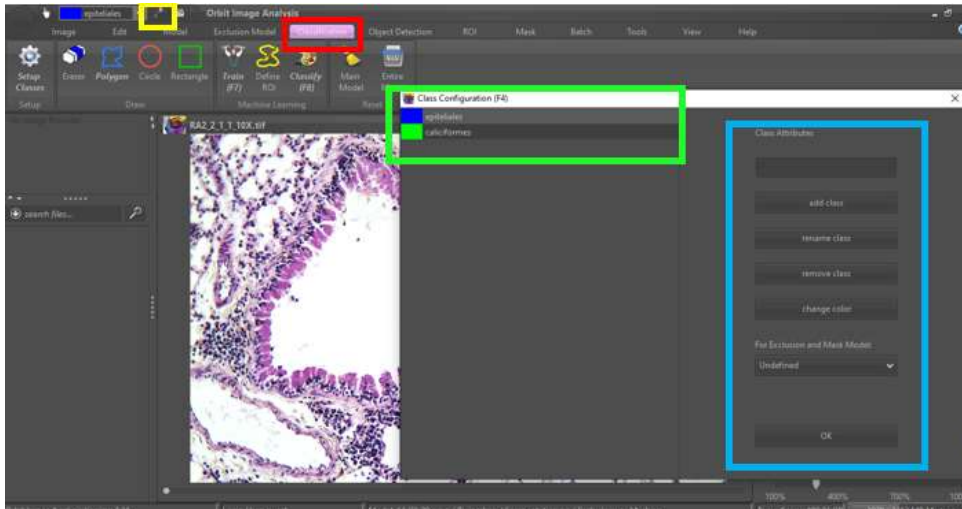


Figura 18. Configuración de clases a evaluar. Se selecciona Classification (cuadro rojo) y luego Configure classes (cuadro amarillo) para seleccionar el color (cuadro verde) y dar un nombre a la estructura correspondiente (cuadro azul).

Posterior a la configuración de clases, se delimitan las regiones de interés (células caliciformes y células epiteliales) al seleccionar el color que se configuró para cada clase y estructura, azul para las células epiteliales y verde para las células caliciformes, se selecciona en la barra de tareas la opción de “Polygon” y se contornea el perímetro de las estructuras. Este proceso se realizó con las mismas 10 fotografías que se seleccionaron para realizar el algoritmo de cuantificación. Una vez delimitado y clasificado las estructuras en clases, se selecciona la opción de “Train” para terminar de entrenar al modelo de clasificación. (Figura 17)

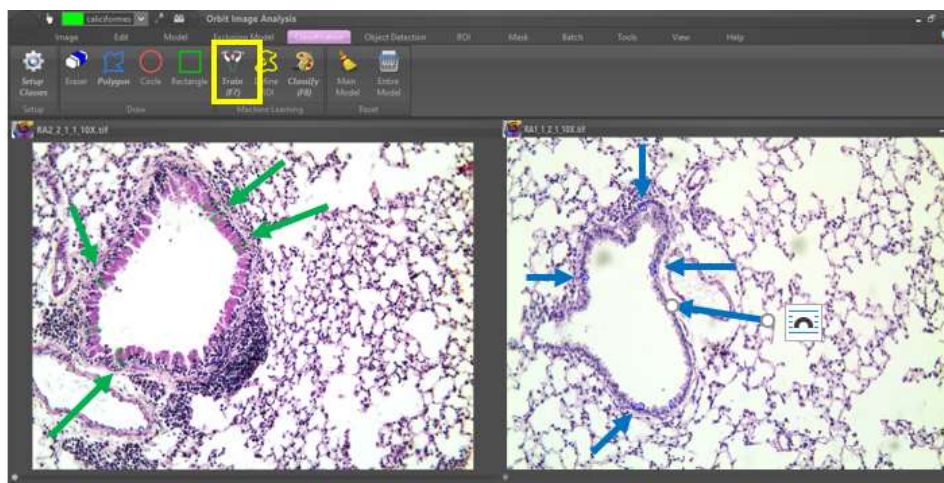


Figura 19. Clasificación de las áreas representativas para cada clase de tejido. Las flechas verdes nos indican la clasificación de células caliciformes y las flechas azules la clasificación

de células epiteliales. Para finalizar se selecciona Train (cuadro amarillo) para entrenar al modelo.

Una vez entrenados los modelos de exclusión y clasificación, se utilizó la herramienta “*Region Of Interest (ROI)*” para definir solamente el contorno del bronquio, seleccionando la opción “*Define ROI*” y con ello tratar de evitar que el programa detecte tejido similar a los ya clasificados, fuera de la zona delimitada. Seguidamente se seleccionó la opción “*Classify*” para clasificar el algoritmo de cuantificación completo, y se despliega una ventana con los resultados del análisis, donde se mostraron las proporciones por cada clase, que, sumadas dan como resultado 1. (Figura 18)

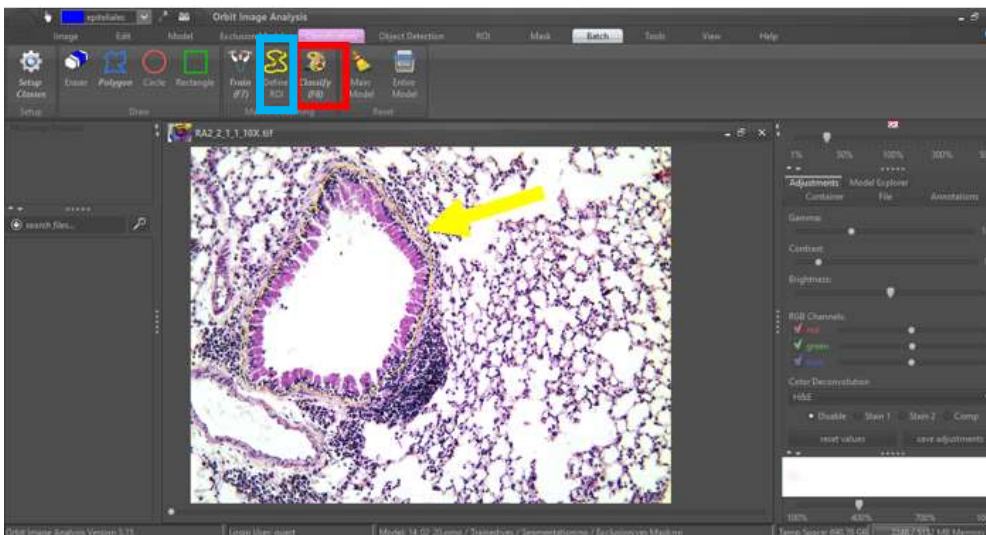


Figura 20. Definición del área de interés a analizar. Se selecciona ROI (cuadro azul) y se delimita el contorno del bronquio (flecha amarilla). Y para analizar el bronquio delimitado se selecciona la opción Classify (cuadro rojo).