



**INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN**

México Cd.Mx., a 7 de Agosto del 2018.

Dra. Norma Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la CINVA
Presente

Estimada Dra. Bobadilla:

Por este conducto me permito solicitar el cierre del protocolo: EVALUACIÓN DEL FACTOR INDUCIBLE DE HIPOXIA EN UN MODELO DE ISQUEMIA REPERFUSION PULMONAR EXPERIMENTAL EN ROEDOR con registro CINVA: CEX-1378-14/15-1, debido a que el protocolo ha concluido.

Sin otro particular por el momento, quedo de usted.

Atentamente,

DR. CARLOS BRAVO REYNA
Nombre y Firma del (a) Investigador (a)



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

México Cd. Mx a 7 de Agosto de 2018.

Dra. Norma Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la Comisión de Investigación en animales.
Presente.

Estimada Dra. Bobadilla

Por medio de la presente me permito informar que el proyecto titulado
**“EVALUACIÓN DEL FACTOR INDUCIBLE POR HIPOXIA EN UN MODELO DE
ISQUEMIA REPERFUSIÓN PULMONAR EXPERIMENTAL EN ROEDOR”.**

1. Cumplió con el objetivo de determinar la integridad del endotelio vascular pulmonar por medio del estudio histopatológico que se realizó en todos los grupos de estudio sometidos a los diferentes periodos de tiempo de I-R que el protocolo abarcaba.
2. Generó una tesis de licenciatura por parte del alumno **“J. Ricardo Arzeta Mastache”.**

Con respecto a la publicación de algún artículo en revista internacional desafortunadamente no se logró este objetivo debido a que la colonia de la cual provenían las ratas de estudio tuvo problemas de salud relacionadas con hipertensión y esta afectó de manera directa en los resultados que se pretendían obtener para el estudio del Factor Inducido por Hipoxia (HIF).

Finalmente se da por cerrado el protocolo y se anexan los documentos probatorios de la tesis de licenciatura y su resumen.

Sin más por el momento, quedo de usted.

Atentamente

Dr. Carlos Cesar Bravo Reyna
Departamento de Cirugía Experimental

Avenida Vasco de Quiroga No. 15
Colonia Belisario Domínguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
México, Distrito Federal
Tel. (52)54870900
www.incmnsz.mx

V. RESUMEN

Objetivo: Evaluar la progresión del daño histológico pulmonar en murino después de un periodo de isquemia de 45 minutos durante los primeros tres días de reperfusión.

Métodos: Un total de 63 ratas Wistar fueron sometidas a pinzamiento por 45 minutos de hilio pulmonar izquierdo y divididas en siete grupos (n=9) de acuerdo al tiempo de reperfusión (reperfusión 0, 1, 6, 12, 24, 48 y 72 horas). Se realizó histología y se evaluó el edema, la hemorragia, la infiltración de polimorfonucleares y el colapso del alveolo.

Resultados: La correlación edema-polimorfonucleares mostró dependencia (p-valor = 0.473). La prueba Ji-cuadrada mostró dependencia de las variables edema alveolar (p=0.0), hemorragia alveolar (p=0.034), PMN intraalveolares (p= 0.0) y colapso alveolar (p=0.001) respecto al tiempo de reperfusión. La prueba ANOVA mostró diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los grupos de edema alveolar (p=0.0), hemorragia alveolar (p=0.0) y colapso alveolar (p=0.005); excepto la variable PMN intraalveolares (p=0.09).

Discusión: Se concuerda con los antecedentes respecto al incremento del edema alveolar, la hemorragia alveolar y los PMN intraalveolares en las primeras cuatro horas postisquemia, y la ausencia de fibrosis y atelectasias en los primeros tres días postisquemia, pero el presente estudio no concuerda con a la observación de edema severo hasta el día tres.

Conclusiones: Los marcadores de daño pulmonar muestran dependencia estadística respecto al tiempo de reperfusión. Los marcadores de daño edema, hemorragia y polimorfonucleares presentan aparente incremento desde la primera hora y disminución después de las 48 horas, el colapso alveolar tiene un pico a las 6 y las 72 horas.

Referencias bibliográficas: Forgiarini LA, Jr., Grun G, Kretzmann NA, de Munoz GA, de Almeida A, Forgiarini LF, et al. When is injury potentially reversible in a lung ischemia-reperfusion model? The Journal of surgical research. 2013;179(1):168-74.

Palabras clave: pinzamiento, isquemia, reperfusión.



UAGro
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO



Facultad de Medicina

**“CAMBIOS HISTOPATOLÓGICOS EN UN MODELO MURINO
EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN PULMONAR AGUDA”**

TESIS
PARA OBTENER EL TITULO DE:

Médico Cirujano

PRESENTA:

CE

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Gonzalo Cruz Díaz

CO-DIRECTOR

Dr. Carlos Cesar Bravo Reyna

SINODALES:

Dr. Oscar Sánchez Adame

Dr. Miguel Ángel Ortega Domínguez

Dr. Octaviano Juárez Romero

ACAPULCO DE JUÁREZ, GRO., ABRIL 2018



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

Acuse

México Cd., Mx a 26 de abril de 2018.

No. Oficio CINVA 062-18

Dr. Carlos Bravo Reyna
Depto. Cirugía Experimental
Presente.

Estimado Dr. Bravo.:

Por este conducto le informo que su proyecto con título "EVALUACION DEL FACTOR INDUCIBLE DE HIPOXIA EN UN MODELO DE ISQUEMIA REPERFUSIÓN PULMONAR EXPERIMENTAL EN ROEDOR", con registro CINVA CEX-1378-14/15-1 finalizó en noviembre 2017. Por lo que le solicito de la manera más atenta me haga saber si el proyecto requerirá una prórroga. En caso afirmativo, favor de enviar a la CINVA el periodo de extensión que solicita y de requerir un mayor número de animales especificar y justificar como se utilizarán y los procedimientos experimentales que se llevarán a cabo con los mismos. En caso de no requerir una prórroga favor de llenar el formato de cierre del proyecto que se anexa a la presente (en hoja membretada e impresa) y adjunte los siguientes documentos indispensables para la conclusión del proyecto:

1. Informe final
2. Productos de Investigación derivados del proyecto (artículos, tesis, libros, capítulos de libro, patentes, presentaciones en congreso, entre otros).

Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente,

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales



1807 491E
INVEST. EXPERIMENTAL Y
BIOTERIO

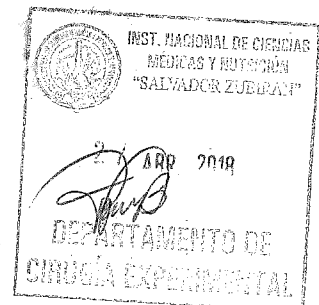
27 ABR 2018

INST. NAL. CIENCIAS MEDICAS
Y NUTRUCION INCMYN "S.Z."

c.c.p. M.V.Z. Mariela Contreras Escamilla, Jefa del DIEB

NABS/nom

Avenida Vasco de
Quiroga No. 15
Colonia Belisario
Domínguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
México, Distrito Federal
Tel. (52)54870900
www.incmnsz.mx





"2014, Año de Octavio Paz"

Ause

INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

México, D. F., a 27 de Noviembre del 2014.

Dr. Carlos Cesar Bravo Reyna
Depto. de Cirugía Experimental
Presente.

REF: CINVA 1378, Clave: CEX-1378-14/15-1

Estimado Dr. Bravo :

Habiendo dado respuesta de manera satisfactoria a todas las observaciones de su Protocolo de Investigación Experimental titulado:

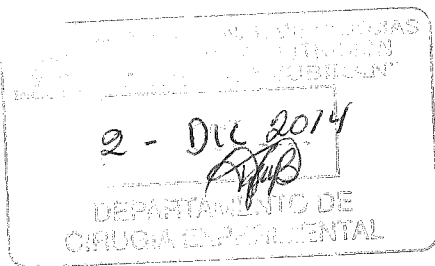
"EVALUACION DEL FACTOR INDUCIBLE DE HIPOXIA EN UN MODELO DE ISQUEMIA REPERFUSIÓN PULMONAR EXPERIMENTAL EN ROEDOR."

Este comité ha dictaminado **aprobarlo** a partir de esta fecha, solo se pide al investigador que justifique con bases estadísticas el tamaño de la muestra.

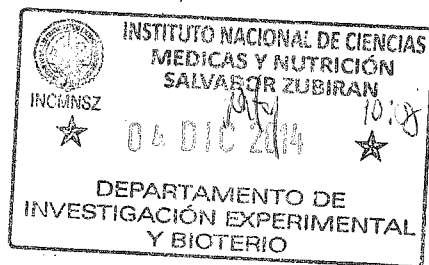
Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente,

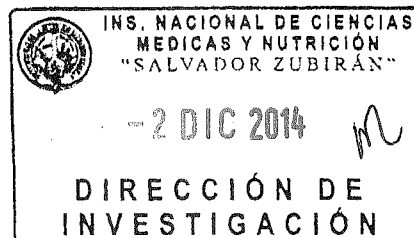
Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales



c.c.p. Dr. Gerardo Gamba, Director de Investigación
Dra. Ma. Elena Flores, Jefe del Bioterio



Vasco de Quiroga No. 15
Colonia Sección XVI
Delegación Tlalpan
México, D. F. 14000
Tel. (52) 54870900
www.incmnsz.mx



Octavio Paz



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

"2014, Año de Octavio Paz"

México, D.F., a 5 de noviembre de 2014

Dra. Norma Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales.
Presente.

Por medio de la presente me permito enviar las correcciones que la CINVA emitió al protocolo titulado "Evaluación del factor inducible de hipoxia en un modelo de isquemia-reperfusión pulmonar experimental en roedor" con número de registro: CINVA 1378, Clave: CEX-1378-14/15-1.

- a) Se sugiere revisar los errores ortográficos que presenta el protocolo.
Con respecto a los errores ortográficos se ha hecho una revisión y corrección de los mismos que la CINVA encontró.
- b) Los animales de experimentación no son pacientes, favor de corregir esto a lo largo del protocolo.
Se ha corregido la palabra paciente por "animal o roedor" donde se menciona a lo largo del texto.
- c) Revisar los lineamientos permitidos y dosis de anestesia. (Hawk TC, et al, 1999).

Se revisó la cita recomendada por la CINVA, sin embargo la dosis de ketamina no aparece en la especie Rattus norvegicus. Debido a esto se utilizó esta combinación y dosis anestésica (Ketamina 50-90 y xilacina 5-10 mg/kg I.P.) Curr Protoc Neurosci. Jan 2008. La dosis manejada en este protocolo de ketamina - xilacina (50-5 mg/ kg I.P.) como una dosis de inducción y posteriormente se mantendrá una dosis anestésica con isofluorane (2-3 concentración alveolar mínima)

- d) Donde se describe la inducción de anestesia, el párrafo está cortado y no lo contempla.
La información faltante con respecto al manejo anestésico ha sido adjuntada con los datos requeridos.
- e) Corregir ANOVA y no ANDEVA en el análisis estadístico.

En el análisis estadístico se utilizará ANOVA.

- f) Describir los criterios de punto final.



*Recibido
Martha Sierra
14/10/2014*

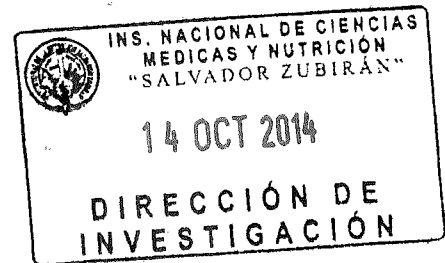
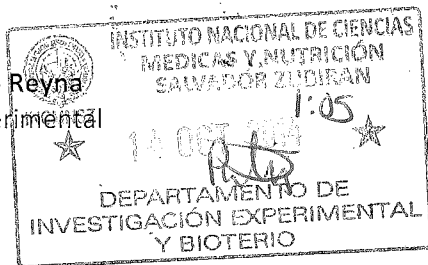
Ause

"2014, Año de Octavio Paz"

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

México, D. F., a 13 de octubre del 2014.

Dr. Carlos Cesar Bravo Reyna
Depto. de Cirugía Experimental
Presente.



Estimado Dr. Bravo:

Habiendo analizado detalladamente el Protocolo de Investigación Experimental titulado:

"Evaluación del factor inducible de hipoxia en un modelo de isquemia reperfusión pulmonar experimental en roedor."

Este comité ha dictaminado dejar **Pendiente** la aprobación hasta que se aclaren los siguientes puntos:

- a) Se sugiere revisar los errores ortográficos que presenta el protocolo
- b) Los animales de experimentación no son pacientes, favor de corregir esto a lo largo del protocolo.
- c) Revisar los lineamientos permitidos y dosis para analgesia y anestesia. (Hawk TC, et al, 1999).
- d) Donde se describe la inducción de anestesia, el párrafo está cortado y no lo contempla.
- e) Corregir ANOVA y no ANDEVA en el análisis estadístico.
- f) Describir los criterios de punto final?
- g) Describir como se sacrificarán los animales?
- h) Justificar porque utilizar una población heterogénea (hembras y machos). Se sugiere realizar los experimentos solo en machos o solo en hembras, dado que las hembras pueden tener una respuesta diferente frente a un fenómeno de isquemia/ reperfusión y si se usan solo hembras es muy importante determinar el ciclo estrogénico en el que se encuentran.
- i) Se sugiere hacer la inmunohistoquímica en el tejido pulmonar
- j) Justificar el número de animales incluyendo la mortalidad del procedimiento.
- k) Aclarar que los animales no regresarán al bioterio.

Es importante señalar que las correcciones deben hacerse en el Sistema de Latis y enviar una carta especificando la respuesta a cada punto solicitado.

Dictados



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

Su proyecto queda registrado en esta Institución como CINVA 1378, Clave: CEX-1378-14/15-1.

Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente,

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales

c.c.p. Dr. Gerardo Gamba, Director de Investigación
Dra. Ma. Elena Flores, Jefe del Bioterio



Instituto Nacional de Ciencias
Médicas y Nutrición
Salvador Zubirán

INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN

SALVADOR ZUBIRAN

Dirección de Investigación

FORMA ÚNICA PARA REGISTRO DE
PROYECTOS

FECHA DE RECEPCIÓN: 21/08/2014

CLAVE: CEX-1378-14/15-1

TÍTULO: Evaluación del factor inducible de hipoxia en un modelo de isquemia reperusión pulmonar experimental en roedor.

INVESTIGADOR RESPONSABLE: BRAVO REYNA CARLOS CESAR

DEPARTAMENTO O SERVICIO: DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA EXPERIMENTAL

TIPO DE INVESTIGACIÓN: INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL

PATROCINADORES:

Patrocinador	Cantidad







VIGENCIA DEL PROYECTO: Del 16/09/2014 al 13/07/2015

Trimestre 1

Trimestre 2

Trimestre 3

Trimestre 4

COSTO TOTALES DE LA INVESTIGACIÓN		INSTITUCIONES PARTICIPANTES	
Personal	\$ 0.00		
(sueldos y sobresueldos al personal)			
Equipos	\$ 0.00		
(de laboratorio, cómputo, transporte, etc.)			
Materiales	\$ 0.00		
(reactivos, consumibles, desechables, etc.)			
Animales	\$ 0.00		
(adquisición, cuidado, procedimientos, etc.)			
Estudios	\$ 0.00		
(de laboratorio, gabinete, especiales, etc.)			
Viaticos	\$ 0.00		
(reuniones científicas y trabajo de campo)			
Publicaciones	\$ 0.00		
(costo directos de publicación, sobregiro)			
		FIRMAS	
		 Investigador responsable	 Jefe de Departamento
		 Comité de Investigación en Humanos	 Comité de Investigación en Animales
		 Director de Investigación	 Director General
		Fecha de resolución 30-DIC-2014	



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

No. CINVA: CEX-1378-14/15-1
FOLIO DE REGISTRO:

Fecha de registro del Protocolo: 09/09/2014

Título del Protocolo:

Evaluación del factor inducible de hipoxia en un modelo de isquemia reperfusion pulmonar experimental en roedor

Propuesta: a) Nueva b) Renovación c) Segunda Revisión

Investigador Responsable del Proyecto.

Nombre del Investigador Titular	Carlos César Bravo Reyna
Institución de Adscripción	INCMNSZ
Departamento de Adscripción	Cirugía Experimental
Teléfono	54870900 ext. 2501
Correo electrónico	[REDACTED]

Investigadores que Participaran en el Protocolo

Nombre	Adscripción	Grado	Teléfono	e-mail
Diana Aguilar León	Departamento de Patología	Investigador en Ciencias Médicas	54870900 *2184	[REDACTED]
Gonzalo Torres Villalobos	Departamento Cirugía Experimental	Jefe de departamento Cirugía Experimental	54870900 *2501	[REDACTED]
Raúl Olmos Zúñiga	INER	Investigador en Ciencias Médicas		[REDACTED]
Rogelio Jasso Victoria	INER	Jefe de Departamento Cirugía Experimental		[REDACTED]
Patricio Santillán Doherty	INER	Dirección Médica		[REDACTED]

Estudiantes

Nombre	Adscripción	Grado a obtener	Teléfono	e-mail
CE		Licenciatura en Medicina		[REDACTED]



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

Vigencia del Protocolo.	Mes	Año
Fecha estimada de inicio del protocolo	Sept	2014
Fecha tentativa de finalización.	Junio	2015

PROTOCOLO PARA EL USO DE ANIMALES EN INVESTIGACIÓN.

- 1) Institución en donde se realizará el proyecto.

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

- 2) Objetivos generales y específicos del protocolo:

OBJETIVO GENERAL

Determinar la expresión de HIF y citocinas pro-inflamatorias en tejido pulmonar sometido a isquemia-reperfusion durante un periodo de tiempo de 72 horas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Establecer un modelo de isquemia-reperfusion pulmonar unilateral in vivo en rata Wistar.

Determinar el HIF-1 α las citocinas: TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, iNOS y el NF κ B mediante la técnica de RT²PCR.

Evaluar la integridad del endotelio vascular pulmonar y el tipo de células presentes mediante histopatología e inmunohistoquímica.

- 3) Justificación del experimento y los procedimientos en el uso de animales:

La falla primaria al injerto pulmonar ocurre dentro de las primeras 72 horas pos-trasplante, a cause de una elevada resistencia en las presiones vasculares y la liberación de mediadores inflamatorios; mientras que el HIF se sobre expresa como una consecuencia de la isquemia y reperfusion del órgano, debido a este fenómeno se requiere estudiar el comportamiento de este factor dentro de las primeras 72 horas en un modelo animal (roedor) sometido a isquemia-reperfusion y su relación con diferentes citocinas pro-inflamatorias involucradas e este fenómeno.

El uso de roedores es utilizado debido a que es un modelo que no implica un alto costo su mantenimiento, difícil manejo, procedimientos quirúrgicos sencillos y disponibilidad de los animales por parte del DIEB.



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

4) Clasificación del proyecto de acuerdo al nivel de invasividad en los animales.

Categoría A

Experimentos o ejercicios de enseñanza que involucran animales invertebrados, embriones de vertebrados, huevos embrionados de aves o de reptiles hasta antes del 90% de su total desarrollo, órganos aislados, tejidos y células vivas.

Categoría B

Experimentos o ejercicios de enseñanza que se espera produzcan poca o ninguna angustia, incomodidad o dolor en especies animales vertebradas.

Categoría C

Experimentos o ejercicios de enseñanza que provocan angustia leve, molestia o dolor leve de corta duración en animales vertebrados. Los procedimientos dentro de esta categoría representan una atención adicional en proporción del nivel y la duración de las molestias, la angustia o el dolor inevitables. Los ejercicios de enseñanza que involucran procedimientos dentro de esta categoría requieren de una fuerte justificación de sus objetivos académicos.

Categoría D

Experimentos que provocan angustia, molestia o dolor significativo e inevitable en especies vertebradas. Los experimentos en esta categoría exigen la responsabilidad explícita del investigador para buscar diseños experimentales que aseguren que las molestias, la angustia o el dolor del animal se minimicen o se eliminen.

Categoría E

Procedimientos que involucran infligir angustia severa o dolor, por encima del umbral de tolerancia, en animales vertebrados conscientes, no anestesiados. Los experimentos en esta categoría no se aprobarán sin la justificación completa, profunda y detallada por parte del investigador responsable del proyecto.

El Investigador deberá consultar:

www.ccaac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Spanish/ANEX15B.pdf

Categoría:	A:	B:	C: XXXX	D:	E:
------------	----	----	---------	----	----

5) Justificación de la cantidad de animales participantes en el estudio tomando en cuenta los principios básicos de las tres "R's", remplazo, reducción y refinamiento.

Para mayor información el Investigador deberá consultar:

<http://ec.europa.eu/health/opinions/en/nqn-human-primates/glossary/tuv/three-rs-principle.htm>

Se ha realizado una revisión bibliográfica y se encontró que con esta muestra (n=9) es representativa para obtener datos que el estudio requiere.

6) Describir como se realizara la transportación o movilización de los animales experimentales fuera de las instalaciones del bioterio, en caso de ser necesario.

El departamento de cirugía experimental cuenta con un área de recuperación para roedores que tiene la luz controlada ; así como, aislamiento del medio externo y temperatura, donde se recuperaran los animales de estudio.



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

7) Mencione el número y las especies animales, así como el género que serán usados en las actividades de este protocolo.

Género – Especie. Fondo genético	Cantidad	Rango de peso	Rango de edad	Sexo
Rata Wista	63	300-350g	12-16 semanas	ambos
No. de Grupos experimentales:	7			
No. de animales por grupo:	9			
No. TOTAL DE ANIMALES:	63			

8) Especificar el tiempo que permanecerán los animales en el bioterio.
Los animales serán enviados al Departamento de Cirugía Experimental y no regresarán al bioterio

9) Procedimientos que se realizarán con los animales.

Procedimiento	NO	SI	Frecuencia, cantidad y vía.
Manipulación de la dieta y de agua.	x		
Toma de muestras biológicas.	x		
Colocación de cánulas y sondas.	x		
Técnica para observación y modificación de conducta.	x		
Inoculaciones de agentes biológicos y químicos.	x		
Procedimientos quirúrgicos con recuperación.		x	Toracotomía lateral
Procedimientos quirúrgicos sin recuperación.	x		Toracotomía lateral (grupo control)
Uso de adyuvantes (indicar cuáles)			
Restricción física			
Confinamiento o aislamiento		x	
Producción de anticuerpos monoclonales o policlonales.			
Inducción de lesiones		x	Isquemia-reperfusión pulmonar unilateral
Agentes teratogénicos o carcinogénicos			
Administración de sustancias químicas tóxicas			
Implantes o injertos			
Estudios estereotáxicos.			
Otros:			

10) Describir detalladamente los procedimientos a realizar incluyendo material, sujeción, vías de administración o toma de muestra, frecuencia, número de veces de muestreo,



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

volumen de aplicación y volumen de toma de muestra, etc.

11) Agentes analgésicos, anestésicos y/o tranquilizantes que se utilizarán:

Tipo	Agente	Dosis	Vía de admón..	Frecuencia.
Anestesia	Ketamina/xilaciña	50mg/5mg / kg	Intraperitoneal	Dosis única
Anestesia	Isoflurane	2% CAM	áerea	
Analgésia	Meloxicam	2mg/kg	Subcutánea	C/12 hrs
Antibioterapia	Amoxicilina	10 mg/kg	Intramuscular	c/24hrs
Anestesia	Pentobarbital sódico	40 mg/ kg	Intraperitoneal	Dosis única
Eutanasia	KCL	0.15g	Intracardiaca	Dosis única

12) ¿Qué parámetros empleará para conocer el grado de Anestesia o analgesia del agente a utilizar?

Durante la anestesia se maneja anestesia inhalada y se evaluará el grado de profundidad del animal (reflejo palpebral así como reflejos motores) debido a que la anestesia inhalada es bastante segura se puede profundizar o en su defecto cerrar el circuito para el re-establecimiento del animal al término del procedimiento quirúrgico. Para la evaluación del grado de analgesia se evaluará la cantidad de ingesta de alimento y agua, aislamiento del animal, calidad del pelo, arqueamiento y lamido de la zona de la herida quirúrgica.

13) Cuando el protocolo incluya procedimientos invasivos de categorías C, D y E (cirugías) especificar los cuidados pre y post-operatorios (utilización de antibióticos, analgésicos, limpieza y desinfección).

Se maneja analgesia con meloxicam cada 12 horas y antibioterapia profiláctica. El animal será embrocado y se realizará la antisepsia requerida para el procedimiento quirúrgico, también el material estará estéril para cada procedimiento.

14) Evaluación de signos de deterioro del bienestar de los animales.

Los parámetros generales a observar son:

- Cambios en peso corporal
- Apariencia física: pilo-erección, posturas indicativas de dolor, etc.
- Comportamiento: aparición de comportamientos estereotipados, agresividad, cambios en comportamiento social...
- Respuesta a estímulos externos
- Signos clínicos:
 - i. Respiración: normal, laboriosa...
 - ii. Temperatura
 - iii. Temblores
 - iv. Convulsiones
 - v. Descarga nasal, salivación

Escala: 0 si es normal, 1 si el parámetro en cuestión se ve ligeramente alterado, 2 si



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

está afectado y 3 si está muy afectado.				
Parámetro	0	1	2	3
a) Peso corporal	x			
b) Apariencia	x			
c) Signos clínicos (Temp., FC., FR., etc.)		x		
d) Conducta espontánea.		x		
e) Conducta provocada.	x			

- 15) ¿Cuáles serán los criterios para establecer el "punto final humanitario"?
Variación substancial del peso corporal y si Los valores como la postura, piloerección, comportamiento social puedan verse muy afectados

Criterios de punto final

Basándose en los parámetros seleccionados para evaluar la condición del animal hay que determinar en que momento se procederá a la eutanasia humanitaria del mismo. Los parámetros observados pueden "cuantificarse" asignando valores arbitrarios según la gravedad que presenten.

- a. Variación de peso corporal:
 1. Aceptable una disminución del 5-10% en un lapso corto.
 2. Moderada del 10-20%
 3. Substancial > al 20% (criterio de punto final).
- b. Los valores como la postura, piloerección, comportamiento social etc., pueden valorarse según la escala:
 1. 0 si es normal.
 2. 1 si el parámetro en cuestión se ve ligeramente alterado
 3. 2 si está afectado
 4. 3 si está muy afectado.

Hay que tener en cuenta que no existe un criterio de punto final adaptable a todos los procedimientos y es el **Investigador Responsable** del experimento el que, basándose en observaciones de ensayos piloto o por datos de experimentos similares ya publicados, debe confeccionar su propio protocolo de determinación de punto final de manera que cumpla la normativa vigente en cuanto a protección de los animales utilizados en experimentación y por otra se evite la pérdida de datos del estudio.

Para mayor información: Canadian Council on Animal Care
http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Appropriate_endpoint.pdf

- 16) ¿Cuál será el método de eutanasia que utilizará?
 Se anestesiara con pentobarbital sódico 40 mg/kg vía IP y posteriormente de manera directa se administrará KCl / 0.15 g vía intracardiaca debido a que se realizará una toracotomía y se hará de manera directa.

Recomendaciones para el Sacrificio Humanitario de los Animales de Experimentación.			
Especie	Método	Dosis	Vía
Ratón	Pentobarbital Asfixia con CO ₂	210 mg/kg	IV, IP
Rata	Pentobarbital Asfixia con CO ₂	120 mg/kg	IV, IP
Jerbo	Pentobarbital Asfixia con CO ₂	270 mg/kg	IV, IP
Conejo	Pentobarbital Pistola de perno cautivo Asfixia con CO ₂	120 mg/kg	IV, IP
Cerdo	Pentobarbital	90 mg/kg	IV



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

Rana	Pentobarbital	100 mg/kg	IP
------	---------------	-----------	----

* Método aceptado únicamente bajo ciertas condiciones establecidas por el comité. Su aplicación requiere una justificación científica por parte del Investigador Responsable

17) El protocolo representa riesgo biológico?

a) No **XX** b) Si

Si la respuesta es afirmativa, definir el Nivel de Bioseguridad para Animales (ABSL) requerido. Se recomienda consultar la clasificación del Center for Disease Control and Prevention.

http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/BMBl5_sect_V.pdf

18) ¿Cuál será el destino final de los animales utilizados en el proyecto experimental?

Los animales serán llevados a un congelador y posteriormente se procederá al manejo de desechos biológicos no infecciosos

Me comprometo a que mi grupo de investigación conducirá el protocolo de Investigación de acuerdo con los lineamientos éticos y humanitarios que rigen la experimentación con animales, así como cumplir los aspectos relativos al cuidado, manejo y uso de los animales de laboratorio que se describen en la NOM-062-ZOO-1999.

Nombre y firma del Investigador Responsable

Integrantes de la CINVA	Cargo	Firma
Dra. Norma Bobadilla Sandoval	Coordinadora	
Dr. Jorge Alberto Barrios Payán	Secretario	
M. en C. Octavio Villanueva Sánchez	Vocal	
Dra. Elena Zambrano González	Vocal	
Dr. Alejandro Zentella Dehesa	Vocal	
Dra. Nimbe Torres y Torres	Vocal	
Dr. Gonzalo Torres Villalobos	Vocal	
Dr. Rafael Hernández González	Vocal	
Dra. María Elena Flores Carrasco	Vocal Externo	

Evaluación del factor inducible de hipoxia en un modelo de isquemia reperusión pulmonar experimental en roedor.

Investigador responsable. M.C. Carlos César Bravo Reyna

Departamento de Cirugía Experimental

INTRODUCCIÓN.

La isquemia se define como el estado en donde la perfusión arterial de un órgano o un tejido es insuficiente para cumplir las demandas metabólicas fisiológicas, resultando en una disminución de la tensión de oxígeno al interior de las células, con pérdida subsecuente de la fosforilación oxidativa y disminución en la generación de Adenosintrifosfato. (ATP) (1). Por otra parte, el fenómeno Isquemia/Reperusión (IR) es definido como el daño celular que se da por la reperusión de un tejido isquémico viable y es caracterizado por los siguientes eventos metabólicos: acidosis celular, alteración del potencial de membrana, edema celular, desorganización del citoesqueleto, incremento de hipoxantina, disminución de ATP, sobreexpresión del factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF-1), incremento de proteínas de adhesión leucocitaria, aumento en la producción extracelular de adenosina, producción de especies reactivas de oxígeno; (ROS) y un aumento en la producción de citocinas como: $TNF\alpha$, IL-1 β , IL-6, IL-8 principalmente (2)(3)(4), concluyendo en daño tisular agudo irreparable.

Factor de Inducción de Hipoxia, (HIF).

Para satisfacer una demanda energética fisiológica de un organismo, es necesario un adecuado intercambio de oxígeno tisular y celular, y cualquier variación en esta conlleva a una serie de respuestas complejas a nivel molecular para mantener la homeostasis general. Al descender los niveles de PO_2 (mmHg) $<8\%$ y el $\%O_2 <1$, los sensores endógenos inician una respuesta en presencia a los cambios en la concentración de O_2 sobre-expresando el HIF (10.). El HIF es un complejo proteico que incrementa la expresión de factores transcripcionales específicos en presencia de bajas concentraciones de O_2 (11), la molécula es un heterodímero con dos subunidades α y β con un peso molecular de 120-130 kD y 91-94 kDa, respectivamente. El HIF-1 α se expresa en niveles muy bajos en condiciones de normoxia y en concentraciones normales de oxígeno en el organismo sin embargo, la subunidad α se encuentra en constante degradación por modificaciones pos-traduccionales dependiente de las hidroxilasas (PHD 1, 3, prolyl-hydroxylase domain) cuyo principal sustrato es el O_2 actuando sobre residuos prolina (402 y 564) y la asparagina (803), la cual es degradada por el factor inhibidor de hipoxia perteneciente a la misma familia de las PHDs, presentes en los dominios de degradación dependientes del oxígeno, (ODD) (12,

13) esto permite la unión de las proteínas Von Hippel Lindau (VHL) a los sitios hidroxilados de HIF-1 α , que forman parte del complejo E3 ubiquitin-ligasa, provocando así su correcta ubiquitinación y su posterior degradación celular.

Daño pulmonar por Isquemia-reperfusión

El daño ocasionado por isquemia-reperfusión en el pulmón es el resultado de una disfunción clínica significativa, asociada principalmente a procesos de origen traumático, como la aterosclerosis, el embolismo pulmonar, la trombosis pulmonar y también procedimientos quirúrgicos cardíacos como el bypass pulmonar y el trasplante pulmonar (5). Este último cobra mayor importancia ya que se considera una de las principales opciones terapéuticas aceptadas en la enfermedad pulmonar de tipo terminal (6). Sin embargo, la disfunción por isquemia-reperfusión pulmonar es sin duda la causa primaria de falla que presentan los injertos en un 15 a 30% del total de intervenciones, teniendo como resultado una morbilidad y mortalidad temprana; la cual es desarrollada dentro de las primeras 72 horas. La fisiopatología es caracterizada por un incremento en la resistencia vascular pulmonar, y en la permeabilidad celular conduciendo a la formación de edema. Asimismo, los cambios bioquímicos incluyen la liberación de productos asociados con el daño pulmonar (glutatión oxidasa) y una notable reducción de productos y subproductos sintetizados de forma fisiológica por el endotelio vascular pulmonar (GMPc, NA⁺/K⁺-adenosintrifostato ATPasa)(7, 8), finalmente los hallazgos microscópicos revelan alveolos con un marcado edema perivascular, así como una infiltración de leucocitos tanto intra-alveolar como intersticial con exudado de tipo proteico, ocasionando una disfunción endotelial (9).

Trasplante PULMONAR

La indicación absoluta para realizar un trasplante pulmonar es el desarrollo de enfermedad pulmonar terminal irreversible con deterioro progresivo hacia una insuficiencia respiratoria que interfiera con las actividades cotidianas del paciente de manera significativa (14). Un candidato a trasplante es aquel paciente cuya supervivencia no va a ser mayor de 12 a 18 meses en ausencia de comorbilidad significativa. Cabe destacar que la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es la principal indicación de trasplante pulmonar en todo el mundo y en México es una de las principales causas de morbilidad, la padece el 7.8% de la población mayor de 40 años (15) y es la 5^o causa de mortalidad en la población mayor de 65 años (16).

La falta de donadores de pulmón es uno de los factores más importantes que limitan la aplicación generalizada del trasplante pulmonar (17). Se obtienen órganos para trasplantes solamente del 40% de los potenciales donadores, el pulmón constituye únicamente el 7% de todos los órganos procurados y solamente el 10% de todos los donadores cadavéricos tiene condiciones apropiadas para el trasplante (14). Los pacientes con muerte cerebral son incapaces de proteger la vía aérea por lo que a menudo broncoaspiran y requieren ventilación mecánica, condiciones que aumentan el riesgo de infección pulmonar y limitan aún más la cantidad de pulmones para trasplante. Los criterios específicos clásicamente utilizados para considerar una procuración pulmonar ideal deben mostrar una adecuada función pulmonar y ausencia de infección o daño pulmonar intercurrente (18).

Una vez que los pulmones son procurados, se almacenan en condiciones hipotérmicas con el fin de disminuir los requerimientos energéticos y el índice metabólico hasta su trasplante en el receptor, este período de isquemia hipotérmica es idealmente de 4 a 8 horas. A pesar de que la hipotermia es esencial en la preservación pulmonar, aún siguen apareciendo una serie de eventos tales como el estrés oxidativo (19); inactivación de la bomba sodio/potasio ATPasa ($\text{Na}^+ / \text{K}^+ \text{ATPasa}$), así como liberación de endotelina-1 y mediadores pro-inflamatorios que alteran el endotelio capilar, como consecuencia existe un incremento en la resistencia vascular pulmonar, aumento de la permeabilidad del lecho microvascular, desbalance en el intercambio gaseoso, daño endotelial, diapedesis de neutrófilos y finalmente edema, por lo que se apoya la teoría de que el daño en la Falla aguda al injerto está ocasionado principalmente por el fenómeno IR.

JUSTIFICACION.

La falla primaria al injerto pulmonar representa la complicación más común durante las primeras 72 horas posteriores al trasplante pulmonar. La falla primaria es el resultado del fenómeno de isquemia reperfusión, fenómeno caracterizado por una respuesta inflamatoria sobreaguda que lleva a formación de edema y en consecuencia a una falla tisular (8,4). A pesar de una disminución en el metabolismo celular mediante el uso de modernos métodos de preservación (soluciones de preservación, hipotermia, acarreadores de radicales libres, etc.) la expresión de factores transcripcionales inducidos por la hipoxia no han sido completamente dilucidados para una posible inhibición o sobreexpresión, la cual podría ser benéfica para el tejido.

Debido a que el factor HIF-1 α está involucrado en la respuesta a la hipoxia, en la homeostasis del O_2 , en la isquemia del miocardio, en isquemia cerebral, en

isquemia de la retina, en hipertensión pulmonar, en isquemia reperfusión pulmonar y en procesos tumorales (20). Resulta claro pensar que su estudio y la relación que tiene con otros factores y citocinas; pro ó anti-inflamatorias puede ser de utilidad para posteriormente llevar a cabo otro tipo de estudios relacionados con su inhibición o sobre-expresión.

HIPOTESIS

Al cuantificar el HIF, y su relación con diferentes factores y citocinas proinflamatorias (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, iNOS y el NF κ B), durante los diferentes tiempos de isquemia-reperfusión podría determinarse el grado de daño en el endotelio vascular pulmonar en las primeras 72 horas.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la expresión de HIF y citocinas pro-inflamatorias en tejido pulmonar sometido a isquemia-reperfusión durante un periodo de tiempo de 72 horas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Establecer un modelo de isquemia-reperfusión pulmonar unilateral in vivo en rata Wistar.

Determinar el HIF-1 α las citocinas: TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, iNOS y el NF κ B mediante la técnica de RT-PCR.

Evaluar la integridad del endotelio vascular pulmonar y el tipo de células presentes mediante histopatología e inmunohistoquímica.

MATERIAL Y METODOS

Animales.

Para este estudio se utilizarán 54 ratas Wistar de ambos sexos pesando (300-350 gr) y clínicamente sanas. Estos animales serán sujetos a isquemia reperfusión de acuerdo al grupo de estudio.

Los animales serán manejados de acuerdo a la NOM 062-ZOO-1999 con referencia al uso y cuidado de los animales de laboratorio y autorizado previamente por el Comité de Investigación en Animales del INCMNSZ. El estudio será de tipo Experimental, Prospectivo y Transversal.

Anestesia y técnica quirúrgica.

La inducción anestésica se realizara mediante la inyección de ketamina/xilacina /10mg/5mg/ kg vía IP). Acto seguido se intubaran de manera oro-traqueal con un catéter # 16 G y se conectarán a un respirador para roedores (Kent Scientific RSP 1002), se mantendrá la anestesia con un CAM de isofluorane al 2% y oxígeno al 100 %. Se manejará un volumen corriente de 6-8 ml/ kg y una presión positiva al final de la expiración de 2-2.5 cm de H₂O y una frecuencia respiratoria de 60 RPM.

Se colocará el paciente en decúbito lateral derecho y se rasurará y se hará antisepsia en el área correspondiente a la incisión en el tórax, después se realizará una incisión de 1.5 cm de longitud entre el 4-5 espacio intercostal para abordar de manera directa el hilio pulmonar. Acto seguido se desconectará el ventilador durante 30 segundos para disecar la arteria, vena y bronquio pulmonar izquierdo. Se colocará un microclamp para cortar el flujo circulatorio y aéreo, de esta manera se empezará el tiempo de isquemia con una duración de 45 minutos y posteriormente se retirará el pinzamiento e iniciara la fase de reperfusión. Para finalizar el procedimiento quirúrgico se insuflará el pulmón a su capacidad total para cerrar la cavidad torácica y recuperar la presión negativa. Se manejará antibioterapia con Amoxicilina 10 mg/kg IM 24 horas previas al procedimiento quirúrgico y cada 24 hrs; la analgesia será manejada con meloxicam a una dosis de 2mg/kg SC c/12 hrs.

Dependiendo del grupo de estudio se determinara el tiempo de reperfusión que será de 1hr, 6hrs, 12hrs, 24hrs, 48hrs y 72hrs más un grupo control. Al término de cada periodo se anestesiara el paciente con pentobarbital sódico vía I.P. (40mg/kg) y se realizara eutanasia con KCL (0.15g/ 0.5 ml dosis total) vía intracardiaca. Se tomaran muestras de tejido pulmonar y se conservaran en nitrógeno a -70°C y se realizara reacción de la polimerasa en cadena en tiempo real (RT-PCR) para la determinación de HIF1- α y citocinas (NFkB, iNOS, TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8). Otras muestras se conservaran en formaldehido y paraformaldehido para la realización de histopatología e inmunohistoquímica.

Grupos de estudio

Estos grupos fueron estimados, por medio de la fórmula de cálculos de muestra para probar hipótesis en estudios que comparan dos medias (21) (22).

Grupo control (n= 9) Animales con toracotomía, disección del hilio pulmonar y sin pinzamiento.

Grupo I-R 1 hr (n=9) Animales sometidos a Isquemia Pulmonar 45 min y 1 hr. de reperfusión.

Grupo I-R 6hrs (n=9) Animales sometidos a Isquemia Pulmonar 45 min y 6 horas de reperfusión.

Grupo I-R 12hrs (n=9) Animales sometidos a Isquemia Pulmonar 45 min y 12 hrs de reperfusión.

Grupo I-R 24 hrs (n=9) Animales sometidos a Isquemia Pulmonar 45 min y 24 hrs de reperfusión.

Grupo I-R 48 hrs (n=9) Animales sometidos a Isquemia Pulmonar 45 min y 48 hrs de reperfusión.

Grupo I-R 72 hrs (n=9) Animales sometidos a Isquemia Pulmonar 45 min y 72 hrs de reperfusión.

Caracterización de células pulmonares:

- Morfología, mediante la tinción de hematoxilina-eosina se evaluará la estructura del pulmón, especialmente la conservación del endotelio vascular pulmonar,

Análisis génico de la población pulmonar:

- Mediante RT-PCR tiempo real se evaluará la presencia o ausencia del ARNm de genes involucrados con el daño por isquemia-reperfusión (HIF-1 α , iNOS, NF κ B, TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8).

Análisis estadístico

Se llevara a cabo mediante pruebas paramétricas: ANDEVA y prueba de TUKEY para comparación de medias entre grupos. Para los estudios inmunohistoquímicos se realizaran pruebas no paramétricas; Kruskal-Wallis.

Referencias.

1. Frangogiannis N. G., 2007, "Chemokines in ischemia and reperfusion. ThrombHaemost" 97:738-747.

2. Novick, R. J., K. E. Gehman, I. S. Ali, et al. 1996, "Lung preservation: the importance of endothelial and alveolar type II cell integrity". *Ann Thorac Surg* Vol62:302-314.
3. Ghofrani, H. A., R. Voswinckel, F. Reichenberger, et al. 2004, "Differences in hemodynamic and oxygenation responses to three different phosphodiesterase-5 inhibitors in patients with pulmonary arterial hypertension: a randomized prospective study". *J Am Coll Cardiol* Vol44:1488-1496.
4. Yeginsu A., Ergin M., 2009, "Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in cold ischemic lung preservation". *Exp Clin Transplant* Vol7:94-98.
5. Kumar P., Shen Q., Pivetti C., Lee E., Mack H., Yuan W. and S. Y., 2009, "Molecular mechanisms of endothelial hyperpermeability: implications in inflammation", *Expert reviews in molecular medicine*, Vol. 11; 1-20.
6. Santana N., Martín J., López A., Rodríguez P., Ponce M., Freixinet J., 2004, "Trasplante pulmonar en ratas. Un modelo viable de estudio experimental", *Arch Bronconeumol*;40(10):438-42.
7. Den Hengst A., Gielis F., Lin Y., Van SchilP., De Windt J., Moens An L. 2010, Lung ischemia-reperfusion injury: a molecular and clinical view on a complex pathophysiological process,
8. Weyker P., Christopher A. J. Webb, Kiamanesh D., Brigid F., 2012, "Lung Ischemia Reperfusion Injury: A Bench-to-Bedside Review", *Seminars in Cardiothoracic and Vascular Anesthesia* 17(1) 28– 43.
9. Calvin S.H. Ng., Song W., Arifi A., Yim A., 2006, "Inflammatory Response to Pulmonary Ischemia-Reperfusion Injury" *Surgery Today* 36:205–214
10. Koh M.Y., Powis G., 2012, Passing the baton; the HIF switch. *Trends Biochem Sci*.mSep;37(9):364-72.
11. Wagner P., 2011, *El factor HIF-1 inducido por la hipoxia y la sensibilidad al oxígeno: Rol del hierro intracelular. Acta méd. peruana*, vol.28, no.3, p.163-168.
12. Caramelo C., Peña J., Castilla A., Justo S., De Solis A., Neria F., Silvia P., Francisco R. GonzalezP., 2006, Respuesta a la hipoxia. Un mecanismo sistémico basado en el control de la expresión génica. *Medicina buenosaires*, Vol 66, pag, 155-166.
13. Shimoda L., Semenza L., 2011, HIF and the Lung Role of Hypoxia-inducible Factors in Pulmonary Development and Disease, *Am J Respir Crit Care Med* Vol 183. pp 152–156.
14. Santillan-Doherty, P., R. Jasso-Victoria, R. Olmos-Zuniga, et al., 2005 Lung transplantation]. *Rev Invest Clin*;57:350-357
15. Menezes, A. M., R. Perez-Padilla, J. R. Jardim, et al., 2005, Chronic obstructive pulmonary disease in five Latin American cities (the PLATINO study): a prevalence study. *Lancet*;366:1875-1881
16. [http:// y/www.inegi.gob.mx/lib/estadisticas.asp?s=inegi](http://y/www.inegi.gob.mx/lib/estadisticas.asp?s=inegi).
17. Santillan-Doherty, P., R. Jasso-Victoria, H. Diliz-Perez, et al., 1993, Lung procurement in Mexico. *Transplant Proc*;25:3137-3138
18. Orens, J. B., A. Boehler, M. de Perrot, et al., 2003, A review of lung transplant donor acceptability criteria. *J Heart Lung Transplant* 22:1183-1200.

19. Cuzzocrea, S., D. P. Riley, A. P. Caputi, et al., 2001, Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev*;53:135-159
20. Fraga A., Ribeiro R., Medeiros R., 2009, Tumor hypoxia: the role of HIF. *Actas Urol Esp.*; 33(9):941-51
21. Aguilar S., 2005, Fórmulas para el cálculo de la muestra en investigaciones de salud, *Salud en Tabasco*, vol. 11, núm. 1-2, enero-agosto. Secretaría de Salud del Estado de Tabasco México. pp. 333-338
- 22.- Guerra J., 2013, Evaluación y comparación del efecto del sildenafil y tadalafil en un modelo animal *ex vivo* de isquemia-reperfusión pulmonar, Tesis de Maestría en Ciencias Médicas, México DF. Instituto Politécnico Nacional, pp 45.

Evaluación del factor inducible de hipoxia en un modelo de isquemia reperusión pulmonar experimental en roedor.

INTRODUCCIÓN.

La isquemia se define como el estado en donde la perfusión arterial de un órgano o un tejido es insuficiente para cumplir las demandas metabólicas fisiológicas, resultando en una disminución de la tensión de oxígeno al interior de las células, con pérdida subsecuente de la fosforilación oxidativa y disminución en la generación de Adenosintrifosfato. (ATP) (1). Por otra parte, el fenómeno Isquemia/Reperusión (IR) es definido como el daño celular que se da por la reperusión de un tejido isquémico viable y es caracterizado por los siguientes eventos metabólicos: acidosis celular, alteración del potencial de membrana, edema celular, desorganización del citoesqueleto, incremento de hipoxantina, disminución de ATP, sobreexpresión del factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF-1), incremento de proteínas de adhesión leucocitaria, aumento en la producción extracelular de adenosina, producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y un aumento en la producción de citocinas como: $TNF\alpha$, IL-1 β , IL-6, IL-8 principalmente (2)(3)(4), concluyendo en daño tisular agudo irreparable.

Factor Inducible de Hipoxia, (HIF).

Para satisfacer una demanda energética fisiológica de un organismo, es necesario un adecuado intercambio de oxígeno tisular y celular, cualquier variación en esta conlleva a una serie de respuestas complejas a nivel molecular para mantener la homeostasis general. Al descender los niveles de PO_2 (mmHg) $<8\%$ y el $\%O_2 <1$, los sensores endógenos inician una respuesta en presencia a los cambios en la concentración de O_2 sobre-expresando el HIF (10). El HIF es un complejo proteico que incrementa la expresión de factores transcripcionales específicos en presencia de bajas concentraciones de O_2 (11), la molécula es un heterodímero con dos subunidades α y β con un peso molecular de 120-130 kD y 91-94 kDa, respectivamente. El HIF-1 α se expresa en niveles muy bajos en condiciones de normoxia y en concentraciones normales de oxígeno en el organismo, sin embargo, la subunidad α se encuentra en constante degradación por modificaciones pos-trasduccionales dependiente de las hidroxilasas (PHD 1, 3, prolyl-hydroxylase domain) cuyo principal sustrato es el O_2 hidroxilando residuos de prolina (402 y 564) presentes en los dominios de degradación dependientes del oxígeno (ODD) y de asparagina (803), la cual es degradada por el factor inhibidor de hipoxia perteneciente a la misma familia de las PHDs (12, 13), esto permite la unión de las proteínas Von Hippel Lindau (VHL) a los sitios hidroxilados de HIF-1 α , que forman parte del complejo E3 ubiquitin-ligasa, provocando así su correcta ubiquitinación y su posterior degradación celular.

Daño pulmonar por Isquemia-reperfusión

El daño ocasionado por isquemia-reperfusión en el pulmón es el resultado de una disfunción clínica significativa, asociada principalmente a procesos de origen traumático, como la aterosclerosis, el embolismo pulmonar, la trombosis pulmonar y también procedimientos quirúrgicos cardíacos como el bypass pulmonar y el trasplante pulmonar (5). Este último cobra mayor importancia ya que se considera una de las principales opciones terapéuticas aceptadas en la enfermedad pulmonar de tipo terminal (6). Sin embargo, la disfunción por isquemia-reperfusión pulmonar es sin duda la causa primaria de falla que presentan los injertos en un 15 a 30% del total de intervenciones, teniendo como resultado una morbilidad y mortalidad temprana; la cual es desarrollada dentro de las primeras 72 horas. La fisiopatología es caracterizada por un incremento en la resistencia vascular pulmonar, y en la permeabilidad celular conduciendo a la formación de edema. Asimismo, los cambios bioquímicos incluyen la liberación de productos asociados con el daño pulmonar (glutión oxidasa), y una notable reducción de productos y subproductos sintetizados de forma fisiológica por el endotelio vascular pulmonar (GMPc, NA^+/K^+ adenosintrifostato ATPasa) (7, 8), finalmente los hallazgos microscópicos revelan alveolos con un marcado edema perivascular, así como una infiltración de leucocitos tanto intra-alveolar como intersticial con exudado de tipo proteico, ocasionando una disfunción endotelial (9). Al bajar la concentración de O_2 , el HIF 1 α deja de ser hidroxilado y suspende su degradación, esto permite la dimerización con HIF1 β y la expresión de factores angiogénicos como VEGF, FGFb, HGF.

Trasplante PULMONAR

La indicación absoluta para realizar un trasplante pulmonar es el desarrollo de enfermedad pulmonar terminal irreversible con deterioro progresivo hacia una insuficiencia respiratoria que interfiera con las actividades cotidianas del paciente de manera significativa (14). Un candidato a trasplante es aquel paciente cuya supervivencia es no mayor de 12 a 18 meses en ausencia de comorbilidad significativa extrapulmonar. Cabe destacar que la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es la principal indicación de trasplante pulmonar en todo el mundo y en México es una de las principales causas de morbilidad, la padece el 7.8% de la población mayor de 40 años (15) y es la 5° causa de mortalidad en la población mayor de 65 años (16).

La falta de donadores de pulmón es uno de los factores más importantes que limitan la aplicación generalizada del trasplante pulmonar (17). Se obtienen órganos para trasplantes solamente del 40% de los potenciales donadores, el pulmón constituye únicamente el 7% de todos los órganos procurados y solamente el 10% de todos los donadores cadavéricos tiene condiciones apropiadas para el trasplante (14). Los pacientes con muerte cerebral son incapaces de proteger la vía aérea por lo que a menudo broncoaspiran y requieren ventilación mecánica, condiciones que aumentan el riesgo de infección pulmonar y limitan aún más la cantidad de pulmones para trasplante. Los criterios específicos clásicamente utilizados para considerar una procuración pulmonar ideal deben mostrar una adecuada función pulmonar y ausencia de infección o daño pulmonar intercurrente (18).

Una vez que los pulmones son procurados, se almacenan en condiciones hipotérmicas con el fin de disminuir los requerimientos energéticos y el índice metabólico hasta su trasplante en el receptor, este período de isquemia hipotérmica es idealmente de 4 a 8 horas. A pesar de que la hipotermia es esencial en la preservación pulmonar, aún siguen apareciendo una serie de eventos tales como el estrés oxidativo (19); inactivación de la bomba sodio/potasio ATPasa ($\text{Na}^+ / \text{K}^+ \text{ATPasa}$), así como liberación de endotelina-1 y mediadores pro-inflamatorios que alteran el endotelio capilar, como consecuencia existe un incremento en la resistencia vascular pulmonar, aumento de la permeabilidad del lecho microvascular, desbalance en el intercambio gaseoso, daño endotelial, diapedesis de neutrófilos y finalmente edema, por lo que se apoya la teoría de que el daño en la falla aguda al injerto está ocasionado principalmente por el fenómeno IR.

JUSTIFICACION.

La falla primaria al injerto pulmonar representa la complicación más común durante las primeras 48 horas posteriores al trasplante pulmonar. La falla primaria es el resultado del fenómeno de IR, fenómeno caracterizado por una respuesta inflamatoria sobreaguda que lleva a formación de edema y en consecuencia a una falla tisular (8,4). A pesar de una disminución en el metabolismo celular mediante el uso de modernos métodos de preservación (soluciones de preservación, hipotermia, acarreadores de radicales libres, etc.) la expresión de factores transcripcionales inducidos por la hipoxia no han sido completamente dilucidados para una posible inhibición o sobreexpresión, la cual podría ser benéfica para el tejido.

Debido a que el factor HIF-1 α está involucrado en la respuesta a la hipoxia, en la homeostasis del O_2 , en la isquemia del miocardio, isquemia cerebral, isquemia de

la retina, hipertensión pulmonar, isquemia reperusión pulmonar y en procesos tumorales (20). Resulta claro pensar que su estudio y la relación que tiene con otros factores y citocinas pro y anti-inflamatorias puede ser de utilidad para llevar a cabo otro tipo de estudios relacionados con su inhibición o sobre-expresión.

HIPOTESIS

Al cuantificar el HIF, y su relación con diferentes factores y citocinas proinflamatorias (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, iNOS y el NFkB), durante los diferentes tiempos de IR podría determinarse el grado de daño en el endotelio vascular pulmonar en las primeras 72 horas.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la expresión de HIF y citocinas pro-inflamatorias en tejido pulmonar sometido a isquemia-reperusión durante un periodo de tiempo de 48 horas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Establecer un modelo de IR pulmonar unilateral in vivo en rata Wistar.

Determinar el RNAm el HIF-1 α , NFkB, las citocinas; TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, iNOS mediante la técnica de RT-PCR.

Evaluar la integridad del endotelio vascular pulmonar y el tipo de células presentes mediante histopatología e inmunohistoquímica.

MATERIAL Y METODOS

Animales.

Para este estudio se utilizarán 63 ratas Wistar de sexo macho (300-350 gr) y clínicamente sanas. Estos animales serán sujetos a IR de acuerdo al grupo de estudio.

Los animales serán manejados de acuerdo a la NOM 062-ZOO-1999 con referencia al uso y cuidado de los animales de laboratorio y autorizado previamente por el Comité de Investigación en Animales del INCMNSZ. El estudio será de tipo Experimental, Prospectivo y Transversal.

Criterios de inclusión.

Se incluirán ratas clínicamente sanas y de sexo macho.

Criterios de exclusión

Ratas que sean hembras y que no estén clínicamente sanas serán excluidas del estudio.

Criterios de eliminación y punto final.

Animales que presenten signos de enfermedad respiratoria al momento del procedimiento quirúrgico o que presenten lesiones en el pulmón izquierdo al momento de realizar la toracotomía lateral. Durante el periodo pos-quirúrgico se manejará analgesia con meloxicam a la dosis recomendada en la metodología; si algún animal presenta distress respiratorio en las primeras dos horas posquirúrgicas se realizará eutanasia como punto final. Durante las 6, 12, 24, 48 y 72 horas pos-cirugía se observará de manera individual a cada animal que no muestre pelo hirsuto, aislamiento hacia un rincón de la caja, inapetencia (anorexia), agresividad como signos de dolor. En caso de observar todos estos signos se tomará como punto final para realizar eutanasia en el animal.

Anestesia y técnica quirúrgica.

La inducción anestésica se realizará mediante la inyección de ketamina-xilacina (50mg y 5 mg / kg vía IP). Acto seguido se intubaran de manera orotraqueal con un catéter # 16 G y se conectarán a un respirador para roedores (Kent Scientific RSP 1002), se mantendrá la anestesia con un CAM de isoflurane al 2% y oxígeno al 100 %. Se manejará un volumen corriente de 6-8 ml/ kg y una presión positiva al final de la expiración de 2-2.5 cm de H₂O y una frecuencia respiratoria de 70-80 RPM.

Se colocará la rata en decúbito lateral derecho y se rasurará y se hará antisepsia en el área correspondiente a la incisión en el tórax, después se realizará una incisión de 1.5 cm de longitud entre el 4-5 espacio intercostal para abordar de manera directa el hilio pulmonar. Acto seguido se desconectará el ventilador durante 30 segundos para disecar la arteria, vena y bronquio pulmonar izquierdo. Se colocará un microclamp para cortar el flujo circulatorio y aéreo, de esta manera se empezará el tiempo de isquemia durante 45 minutos, posteriormente se retirará el pinzamiento e iniciará la fase de reperfusión. Para finalizar el procedimiento quirúrgico se insuflará el pulmón a su capacidad total para cerrar la cavidad torácica y recuperar la presión negativa. Se manejará antibioterapia con Amoxicilina 10 mg/kg IM 24 horas previas al procedimiento quirúrgico y cada 24 hrs; la analgesia será manejada con meloxicam a una dosis de 2mg/kg SC c/12 hrs.

Dependiendo del grupo de estudio se determinara el tiempo de reperfusión que será de 1hr, 6hrs, 12hrs, 24hrs, 48hrs y 72 hrs más un grupo control. Al término de cada periodo se anestesiara la rata con pentobarbital sódico vía I.P. (50mg/kg) y se realizara eutanasia con KCL (0.15g/ 0.5 ml dosis total) vía intracardiaca. Se tomaran muestras de tejido pulmonar y se conservaran en nitrógeno a -80°C y se realizara reacción de la polimerasa en cadena en tiempo real (RT-PCR) para la determinación de HIF1- α y citocinas (NF κ B; iNOS, TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8). Otras muestras se conservaran en formaldehido y paraformaldehido para la realización de histopatología e inmunohistoquímica.

Finalmente los animales serán colocados en bolsas amarillas para residuos biológicos no infecciosos y se llevarán a un congelador destinado para el desecho de dichos residuos.

Grupos de estudio

Estos grupos fueron estimados por medio de la fórmula de cálculos de muestra para probar hipótesis en estudios que comparan dos medias (21) (22).

Grupo control (n= 9) Animales con toracotomía, disección del hilio pulmonar y sin pinzamiento.

Grupo I-R 1 hr (n=9) Animales sometidos a Isquemia Pulmonar 45 min y 1 hr. de reperfusión.

Grupo I-R 6hrs (n=9) Animales sometidos a Isquemia Pulmonar 45 min y 6 horas de reperfusión.

Grupo I-R 12hrs (n=9) Animales sometidos a Isquemia Pulmonar 45 min y 12 hrs de reperfusión.

Grupo I-R 24 hrs (n=9) Animales sometidos a Isquemia Pulmonar 45 min y 24 hrs de reperfusión.

Grupo I-R 48 hrs (n=9) Animales sometidos a Isquemia Pulmonar 45 min y 48 hrs de reperfusión.

Grupo I-R 72 hrs (n=9) Animales sometidos a Isquemia Pulmonar 45 min y 72 hrs de reperfusión.

Caracterización de células pulmonares:

Morfología, mediante la tinción de hematoxilina-eosina se evaluará la estructura del pulmón, especialmente la conservación del endotelio vascular pulmonar. Se

realizará inmunohistoquímica para determinar que células del pulmón están liberando las diferentes citocinas de estudio.

Análisis génico de la población pulmonar:

Mediante RT-PCR tiempo real se evaluará la presencia o ausencia del ARNm de genes involucrados con el daño por isquemia-reperfusión (HIF-1 α , iNOS, NFk B, TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8).

Análisis estadístico

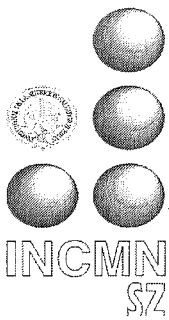
- Se llevara a cabo mediante pruebas paramétricas: ANOVA y prueba de TUKEY para comparación de medias entre grupos. Para los estudios inmunohistoquímicos se realizaran pruebas no paramétricas; Kruskal-Wallis.

Referencias.

1. Frangogiannis N. G., 2007, "Chemokines in ischemia and reperfusion. *ThrombHaemost*" 97:738-747.
2. Novick, R. J., K. E. Gehman, I. S. Ali, et al. 1996, "Lung preservation: the importance of endothelial and alveolar type II cell integrity". *Ann ThoracSurgVol62*:302-314.
3. Ghofrani, H. A., R. Voswinckel, F. Reichenberger, et al. 2004, "Differences in hemodynamic and oxygenation responses to three different phosphodiesterase-5 inhibitors in patients with pulmonary arterial hypertension: a randomized prospective study". *J Am CollCardiolVol44*:1488-1496.
4. Yeginsu A., Ergin M., 2009, "Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in cold ischemic lung preservation". *ExpClinTransplantVol7*:94-98.
5. Kumar P., Shen Q., Pivetti C., Lee E., Mack H., Yuan W. and S. Y., 2009, "Molecular mechanisms of endothelial hyperpermeability: implications in inflammation", *Expert reviews in molecular medicine*, Vol. 11; 1-20.
6. Santana N., Martín J., López A., Rodríguez P., Ponce M., Freixinet J., 2004, "Trasplante pulmonar en ratas. Un modelo viable de estudio experimental", *Arch Bronconeumol*;40(10):438-42.
7. Den Hengst A., Gielis F., Lin Y., Van SchilP., De Windt J., Moens An L. 2010, Lung ischemia-reperfusion injury: a molecular and clinical view on a complex pathophysiological process,
8. Weyker P., Christopher A. J. Webb, Kiamanesh D., Brigid F., 2012, "Lung Ischemia Reperfusion Injury: A Bench-to-Bedside Review", *Seminars in Cardiothoracic and Vascular Anesthesia* 17(1) 28– 43.
9. Calvin S.H. Ng., Song W., Arifi A., Yim A., 2006, "Inflammatory Response to Pulmonary Ischemia–Reperfusion Injury" *Surgery Today* 36:205–214

10. Koh M.Y., Powis G., 2012, Passing the baton: the HIF switch. *Trends Biochem Sci.* 37(9):364-72.
11. Wagner P., 2011, *El factor HIF-1 inducido por la hipoxia y la sensibilidad al oxígeno: Rol del hierro intracelular.* *Acta méd. peruana*, vol.28, no.3, p.163-168.
12. Caramelo C., Peña J., Castilla A., Justo S., De Solis A., Neria F., Silvia P., Francisco R. Gonzalez P., 2006, Respuesta a la hipoxia. Un mecanismo sistémico basado en el control de la expresión génica. *Medicina Buenos Aires*, Vol ;66, pag, 155-166.
13. Shimoda L., Semenza L., 2011, HIF and the Lung Role of Hypoxia-inducible Factors in Pulmonary Development and Disease, *Am J Respir Crit Care Med* Vol 183. pp 152–156.
14. Santillan-Doherty, P., R. Jasso-Victoria, R. Olmos-Zuniga, *et al.*, 2005 Lung transplantation]. *Rev Invest Clin*;57:350-357
15. Menezes, A. M., R. Perez-Padilla, J. R. Jardim, *et al.*, 2005, Chronic obstructive pulmonary disease in five Latin American cities (the PLATINO study): a prevalence study. *Lancet*;366:1875-1881
16. [http:// y/www.inegi.gob.mx/lib/estadisticas.asp?s=inegi](http://y/www.inegi.gob.mx/lib/estadisticas.asp?s=inegi).
17. Santillan-Doherty, P., R. Jasso-Victoria, H. Diliz-Perez, *et al.*, 1993, Lung procurement in Mexico. *Transplant Proc*;25:3137-3138
18. Orens, J. B., A. Boehler, M. de Perrot, *et al.*, 2003, A review of lung transplant donor acceptability criteria. *J Heart Lung Transplant* 22:1183-1200.
19. Cuzzocrea, S., D. P. Riley, A. P. Caputi, *et al.*, 2001, Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev*;53:135-159
20. Fraga A., Ribeiro R., Medeiros R., 2009, Tumor hypoxia: the role of HIF. *Actas Urol Esp.*; 33(9):941-51
21. Aguilar S., 2005, Fórmulas para el cálculo de la muestra en investigaciones de salud, *Salud en Tabasco*, vol. 11, núm. 1-2, enero-agosto. Secretaría de Salud del Estado de Tabasco México. pp. 333-338

- 29.- Guerra J., 2013, Evaluación y comparación del efecto del sildenafil y tadalafil en un modelo animal *ex vivo* de isquemia-reperfusión pulmonar, Tesis de Maestría en Ciencias Médicas, México DF. Instituto Politécnico Nacional, pp 45.



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
"SALVADOR ZUBIRÁN"

México, D.F. a 26 de agosto de 2014

DECLARACIÓN DE LOS INVESTIGADORES

TÍTULO DEL PROYECTO: Evaluación del factor inducible de hipoxia en un modelo experimental en ROEDOR.

Clave de Registro: CEX-1378-14/15-1

Los investigadores que participamos en el proyecto arriba mencionado sometemos voluntariamente a evaluación dicho proyecto ante la Comisión de Investigación en Animales y declaramos libremente:

- Que conocemos todos los aspectos del estudio y contamos con la capacidad de llevarlo a buen término.
- Que la revisión minuciosa de los antecedentes científicos del proyecto justifican su realización y nos comprometemos a mantener un estándar científico elevado que permita obtener información útil para la sociedad.
- Que conocemos los riesgos potenciales a los que exponemos al personal técnico, investigadores y los animales mismos involucrados en el proceso experimental, que se encuentran tanto en contacto directo como indirecto en el lugar donde se realiza la investigación. Por lo anterior, se establecen en el protocolo las medidas precautorias necesarias.
- Que pondremos el bienestar de los animales sujetos de investigación y la seguridad del personal en contacto con ellos por encima de cualquier otro objetivo.
- Que nos conduciremos de acuerdo con EL PRINCIPIO GENERAL DE LAS TRES R's descrito en el Manual del Usuario del SISTEMA ELECTRÓNICO DE REGISTRO DE PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN: Comisión de Investigación en Animales, numeral 13 (http://132.247.8.50/latis_invp/archivos/Manual.pdf). Asimismo, nos someteremos a los estándares de comportamiento ético y científico aceptados nacional e internacionalmente según lo establecido por la Ley General de Salud y el Reglamento en Materia de Investigación para la Salud de México, La NOM 062-ZOO-1999: "Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio" (publicada por SAGARPA en el Diario Oficial, 22 de agosto del 2001), y los lineamientos para el buen uso de los animales recopilados por el Consejo Internacional para La Ciencia de los Animales de Laboratorio en colaboración con la Organización Mundial de la Salud (ICLAS-WHO, <http://www.iclas.org/harmonization.htm>).

Nombre del investigador	Firma
Carlos C. Bravo Reyna	
Diana E. Aguliar Leon	
Gonzalo Torres Villalobos	
Raúl Olmos Zuñiga	

- A) SE TESTA NOMBRE DE PERSONAS FISICAS QUE NO SE TIENE LA CERTEZA DE SER SERVIDORES PÚBLICOS TODA VEZ QUE SE TRATA DE DATOS PERSONALES DE ACUERDO AL ARTÍCULO 113 FRACCIÓN I DE LA L.F.T.I.P.**
- B) SE TESTA FIRMA DE PERSONAS FISICAS QUE NO SE TIENE LA CERTEZA DE SER SERVIDORES PÚBLICOS TODA VEZ QUE SE TRATA DE DATOS PERSONALES DE ACUERDO AL ARTÍCULO 113 FRACCIÓN I DE LA L.F.T.I.P.**