



Análisis del colapso alveolar en modelos experimentales de lesión pulmonar mediante procesamiento de imágenes histológicas en el Hospital de Clínicas Dr. Manuel Quintela, 2023.

Ciclo de Metodología Científica II-2023

Grupo 84

Faustina Correa¹, Leandro Diego¹, Martina Eiraldi¹,
Fabiana Escobar¹, Magdalena Rodríguez¹, Oriana Sena¹

Orientadores:

Leonel Malacrida^{2,3}, María José García^{2,3}

¹ *Ciclo de Metodología Científica II 2023-Facultad de Medicina-Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.*

² *Departamento de Fisiopatología, Facultad de Medicina, Montevideo, Uruguay.*

³ *Unidad de Bioimagenología Avanzada, IPMON/Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.*

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS	1
ÍNDICE DE FIGURAS.....	1
RESUMEN	2
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
OBJETIVOS.....	8
MATERIALES Y MÉTODOS	9
RESULTADOS	14
DISCUSIÓN	21
CONCLUSIONES.....	22
BIBLIOGRAFÍA.....	23
AGRADECIMIENTOS	27
ANEXOS	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Cortes histológicos de pulmones de ratones C57BL/6 no daño.....	14
Figura 2: Cortes histológicos de pulmones de ratones C57BL/6 instilados.....	14
Figura 3: Comparación entre grupo ND e INS de cada subgrupo de trabajo.....	15
Tabla 1: Test de t intra subgrupos.....	15
Figura 4: Análisis estadístico de la comparación intra subgrupos.....	16
Tabla 2: Comparación entre subgrupos.....	17
Tabla 3: ANOVA grupo ND.....	18
Tabla 4: ANOVA grupo INS.....	18
Tabla 5: ANOVA intra grupo.....	18
Figura 5: Análisis estadístico de la variabilidad intragrupo.....	19
Tabla 6: ANOVA ratón 104 INS.....	19
Figura 6: Análisis de colapso alveolar.....	20
Tabla 7: Relación Espacio alveolar (EA)/Área total (AT).....	20

RESUMEN

La Lesión Pulmonar Aguda (LPA) constituye una de las principales causas de insuficiencia respiratoria severa, con una mortalidad que alcanza el 50%. A lo largo de los años se han empleado diferentes modelos de experimentación animal que han sido muy útiles para estudiar y comprender los mecanismos de la lesión pulmonar. Uno de los aspectos más desafiantes del uso de modelos animales de LPA es la evaluación histológica de la lesión pulmonar. Una evaluación cuantitativa de múltiples características histológicas es fundamental para evaluar la extensión de la lesión pulmonar. Las principales características identificadas en la lesión pulmonar son el engrosamiento de la pared alveolar (tabique alveolar) y colapso alveolar (disminución de la proporción aire/tejido). Se realizaron medidas de grosor de tabique y de área de espacio alveolar para identificar presencia de edema pulmonar o colapso alveolar respectivamente en muestras histológicas de tejido pulmonar, provenientes de un modelo experimental de LPA inducida por LPS en ratones C57BL/6, obtenidas previamente de la investigación madre titulada: Microscopía no-lineal y por tiempo de vida en modelos experimentales de lesión pulmonar: Evaluación de su utilidad diagnóstica a través de “aprendizaje automático”. Se utilizó un microscopio de Epifluorescencia Nikon TiF LC para la obtención de las imágenes y el software de dominio público ImageJ para su análisis. El análisis histológico mostró un aumento del deterioro por colapso alveolar y aumento del grosor de tabiques en el grupo instilado con LPS. Este engrosamiento del tabique está relacionado con la aparición de edema pulmonar. Además, se analizaron posibles variaciones en las medidas tomadas por distintos observadores y cómo esta variabilidad puede comprometer la interpretación de los resultados. La comparación entre 3 subgrupos diferentes mostró diferencias estadísticamente significativas influyendo sobre los resultados finales.

Palabras clave: lesión pulmonar aguda (LPA), colapso alveolar, edema pulmonar, tabique pulmonar, lipopolisacárido (LPS).

ABSTRACT

Acute pulmonary injury (API) is one of the main causes of severe respiratory failure, with a mortality rate that reaches 50%. Throughout the years there have been different models of experimentation that have proved to be useful to study and comprehend the mechanisms of lung injury. One of the most challenging aspects in the usage of animal models of API is the histologic evaluation of the lung injury. A quantitative assessment of multiple histological characteristics is key to evaluate the extension of the lung injury. The presence of the main characteristics of lung injury can be identified for example by the thickening of the alveolar wall (alveolar septum) and alveolar collapse (decrease of the proportion air/tissue). Measurements were made of the septum thickness and the alveolar space to identify the presence of pulmonary edema or alveolar collapse respectively in histological samples from pulmonary tissue, which came from an experimental model of API induced by LPS in mice C57BL/6, obtained previously from the mother research titled: Non-linear microscopy and by lifetime in experimental models of lung injury: Assessment of their diagnostic utility through the “automatic learning”. A Nikon TIF LC microscope was utilized for the gathering of images and the public domain software ImageJ for its analysis. The histological analysis showed an increase in deterioration by alveolar collapse and septum thickness in the instilled group with LPS. This enlargement of the septum thickness is related to the appearance of pulmonary edema. Furthermore, possible variations of the measurements taken by different observers were analyzed and how this variability can compromise the interpretation of the data. The comparison between 3 different subgroups showed statistically significant differences influencing the final results.

Key words: acute pulmonary injury (API), alveolar collapse, pulmonary edema, tabique, lipopolysaccharide (LPS).

INTRODUCCIÓN

El sistema respiratorio está compuesto por dos pulmones y una serie de vías aéreas que lo comunican con el exterior. Dentro del pulmón las vías aéreas se ramifican disminuyendo su calibre hasta llegar a la unidad funcional del pulmón: el alvéolo. Este sistema cumple tres funciones principales: conducción del aire, filtración del aire e intercambio de gases, entre otras funciones.

Las vías aéreas del sistema respiratorio se dividen en una porción conductora y una respiratoria. La conductora está formada por las vías aéreas que conducen al sitio donde se da el intercambio de gases, mientras que la porción respiratoria es el lugar donde se da dicho intercambio. La extensión de la superficie disponible para el intercambio gaseoso se incrementa gracias a los alvéolos pulmonares. Estos son los espacios aéreos terminales del sistema respiratorio en los cuales se da el intercambio gaseoso entre el aire y la sangre. Cada alvéolo está rodeado por una red de capilares que aproxima la sangre al aire inhalado. Las paredes de la cavidad alveolar miden 0.2mm aproximadamente de diámetro y entre ellas están los tabiques interalveolares los cuales están compuestos por anillos de músculo liso.

Incidencia y definición de la Lesión Pulmonar Aguda

El Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo (SDRA) y la Lesión Pulmonar Aguda (LPA) constituyen las causas más importantes de insuficiencia respiratoria severa, con una mortalidad que alcanza el 30-60% según diferentes estudios ^{1,2,3,4}. Estas patologías constituyen cuadros frecuentes en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI). En Uruguay aproximadamente 25.000 pacientes al año ingresan a UCI. De ellos, hasta un 75% pueden requerir Asistencia Respiratoria Mecánica (ARM) debido a múltiples causas.

En 1994 se definió al SDRA como un cuadro de hipoxemia con PaO_2/FiO_2 (relación entre presión parcial arterial de oxígeno y fracción inspirada de oxígeno) menor a 200 mmHg, mientras que si la relación PaO_2/FiO_2 es inferior a 300 mmHg entonces se puede realizar un diagnóstico de LPA ⁵. La LPA puede afectar múltiples componentes del sistema respiratorio, incluyendo las vías respiratorias, el parénquima y la vasculatura pulmonar ⁶. Es una patología que clínicamente se presenta con hipoxemia aguda, edema pulmonar no cardiogénico y presencia de opacidades bilaterales radiológicas.

La etiología de la LPA y el SDRA puede ser variada. Las infecciones pulmonares bacterianas o virales son la causa más común, seguidas de la sepsis de origen extra-respiratorio, la aspiración de contenido digestivo hacia la vía aérea y el trauma. El SDRA está asociado frecuentemente a disfunción orgánica múltiple (DOM), este se caracteriza por el desarrollo de edema pulmonar bilateral e hipoxemia grave en forma aguda debido al incremento en la permeabilidad de la membrana alvéolo-capilar ^{7,8}. Como consecuencia se produce la

inactivación del surfactante, atelectasia, por aumento de la tensión superficial mínima durante la espiración y alteración del intercambio gaseoso ⁹.

El impacto combinado de esta patología es una pérdida significativa de la capacidad residual funcional (FRC) con colapso pulmonar heterogéneo e inestabilidad con un volumen de cierre mayor que la apertura ¹⁰. Morfológicamente el SDRA se caracteriza por daño alveolar difuso (edema, inflamación, hemorragia y/o formación de membranas hialinas), esto puede conducir a una disfunción del órgano y potencialmente a la muerte del individuo ⁸.

Modelos experimentales de lesión pulmonar

A lo largo de los años se han empleado diferentes modelos de experimentación animal que han sido muy útiles para estudiar y comprender los mecanismos de la lesión pulmonar. Los modelos de ratón se utilizan ampliamente debido a la disponibilidad de reactivos específicos y a la posibilidad de producir ratones transgénicos y “knock-out” que mediante modificaciones genéticas permiten colaborar en la comprensión de los aspectos moleculares de distintas patologías ¹¹. En particular en el área de la lesión pulmonar se han empleado mucho para estudio de procesos inflamatorios, donde se han podido identificar diferentes proteínas que pueden acentuar o disminuir el efecto de un estímulo nocivo ^{12,13,14}. La mayoría de los modelos de LPA se basan en la reproducción de los mecanismos y las consecuencias de la lesión pulmonar en humanos, incluyendo uno o más de los cambios fisiológicos y patológicos característicos que ocurren: Alveolitis neutrofílica grave, depósito de membrana hialina y formación de microtrombos⁹. Los modelos se pueden dividir en dos grupos dependiendo de si producen un estímulo nocivo directo o indirecto en el pulmón. Los modelos en los que el pulmón se lesiona directamente incluyen la administración intratraqueal o intranasal de bacterias o productos bacterianos como LPS; la administración de un ácido como HCl o de partículas gástricas, la administración de altas fracciones de oxígeno inspiradas; lavado del surfactante pulmonar, hiperoxia o la inducción de isquemia/reperfusión. Mientras que dentro del segundo grupo podemos encontrar ejemplos como LPS intra-venoso (IV), isquemia/reperfusión mesentérica, sepsis por punción y ligadura cecal (CLP), ácido oleico IV. También existen modelos mixtos como es el caso de lavado salino y ventilación mecánica, o CLP combinado con hemorragia¹¹. Pensamos proponer el uso de un modelo experimental de LPA inducido por LPS en ratones para medir colapso alveolar y evaluar la utilidad de la espectroscopía de correlación de imágenes espacial como herramienta de análisis cuantitativa.

En los ratones C57BL/6 se ha podido demostrar que la administración de LPS ocasiona lesión en las barreras endoteliales y epiteliales, así como también la aparición de leucocitos; todo esto provoca la extravasación

del líquido vascular. Este proceso genera un aumento de la permeabilidad microvascular pulmonar lo cual es el sello distintivo de la LPA ⁸.

Análisis histológico de la lesión pulmonar

La American Thoracic Society ha definido que las características más relevantes de la LPA en modelos experimentales son la evidencia de lesión tisular y la evidencia de alteración de la barrera capilar alveolar. Uno de los aspectos más desafiantes del uso de modelos animales de LPA es la evaluación histológica de la lesión pulmonar. Una evaluación cuantitativa de múltiples características histológicas es fundamental para evaluar la extensión de la lesión pulmonar. La presencia de las principales características de la lesión pulmonar se pueden identificar mediante las medidas de acumulación de neutrófilos en el espacio alveolar o intersticial, formación de membranas hialinas, presencia de detritos proteínicos en el espacio alveolar (como hebras de fibrina), engrosamiento de la pared alveolar (tabique alveolar) y colapso alveolar (disminución de la proporción aire/tejido) ⁹. Tradicionalmente estas medidas se realizan de forma manual a partir de técnicas como, por ejemplo, las técnicas de estimaciones estereológicas. En el último tiempo, las nuevas tecnologías han permitido la digitalización de las imágenes y la información de un evento en términos de pixels. Esto ha facilitado la posibilidad de realizar medidas digitales de manera semi automática a través de diferentes softwares como ImageJ o Image-Pro-Plus ¹⁵.

Contexto del proyecto

La presente propuesta se enmarca dentro un área de investigación que se desarrolla en la Unidad de Bioimagenología Avanzada (Departamento de Fisiopatología) bajo la dirección del Dr. Leonel Malacrida. El mismo corresponde al proyecto de doctorado de la Mag. María José García que está enfocado en evaluar la utilidad de la microscopía no-lineal y de autofluorescencia resuelta en el tiempo (FLIM) como herramienta para la caracterización anatómo-patológica de tejido pulmonar proveniente de modelos de lesión pulmonar ¹⁶. El proyecto plantea el desarrollo de un nuevo método de diagnóstico de patologías respiratorias usando microscopía DIVER (multifotón y bajo gran dispersión) y el posterior análisis de los resultados utilizando métodos de “aprendizaje automático”. Para lograr este objetivo se desarrollaron modelos experimentales de Lesión Pulmonar Aguda (LPA) en ratones C57BL/6 y knock-out para ApoE. Este modelo experimental ha sido mayoritariamente utilizado en los estudios de patologías metabólicas, inflamación y envejecimiento ^{17,18,19}, sin embargo, más recientemente se ha empezado a evaluar como modelo de patología cardiopulmonar, asociado a la ocurrencia de inflamación y deterioro de la función pulmonar ^{20,21,22,23}. El modelo APOE KO con alimentación rica en grasas nos permite desarrollar un modelo

de LPA más “real”, donde los individuos presenten una patología de base que podría exacerbar o atenuar los estímulos de la LPA^{20,24,25}. Esto nos permite caracterizar modelos más complejos de LPA combinados con patologías secundarias. Además, de las medidas de autofluorescencia, fibrosis/lipidosis de las muestras de pulmón por el microscopio DIVER, se pretende caracterizar los modelos experimentales de lesión pulmonar en términos fisiopatológicos y bioquímicos. Por lo cual, además, se medirá la mecánica ventilatoria, la bioquímica y biofísica del surfactante pulmonar, así como la histología pulmonar. Dentro del análisis histológico convencional se medirá el colapso alveolar y edema pulmonar como indicadores de LPA. El protocolo de criado y dieta fue previamente aprobado por el Comité de Cuidado de Animales (Protocolo Número 014-14, responsable Carlos Escande) del Instituto Pasteur de Montevideo, Uruguay y todo el protocolo abordado en el proyecto fue aprobado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA) (Protocolo 714, responsable Leonel Malacrida). El desarrollo del modelo experimental de lesión pulmonar inducido por LPS en ratones C57BL/6 así como la caracterización del modelo experimental de lesión pulmonar en términos fisiopatológicos: medición de mecánica ventilatoria y la obtención de muestras histológicas de tejido pulmonar ya fue realizada por los responsables de la investigación (detalles en anexo). En la presente propuesta se plantea realizar el análisis histológico a partir de estas muestras.

OBJETIVOS

Objetivo General

Analizar el colapso alveolar en un modelo experimental de lesión pulmonar inducida por Lipopolisacárido (LPS) en ratones C57BL/6 a partir del procesamiento de imágenes histológicas. A su vez, analizar cómo influye el análisis de distintos observadores en los resultados obtenidos.

Objetivos Específicos

- Entrenarse en el manejo de la microscopía de transmisión como herramienta fundamental para el análisis histológico.
- Caracterizar los diferentes grupos experimentales de lesión pulmonar en términos fisiopatológicos e histológicos.
- Obtener medidas de proporción aire/tejido (colapso alveolar) y espesor de la pared alveolar (edema pulmonar) en las muestras de tejido pulmonar control y patológicos utilizando software libre de análisis de imágenes (ImageJ).
- Analizar la variabilidad de medidas entre los diferentes subgrupos.
- Realizar el análisis estadístico de los datos obtenidos y la comparación de los distintos grupos experimentales y las diferentes variables en estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio experimental longitudinal, en imágenes histológicas de tejido pulmonar provenientes de un modelo experimental de LPA por instilación de LPS en ratones C57BL/6.

A partir de cortes de tejido pulmonar teñidos con hematoxilina y eosina se tomaron imágenes de microscopía de transmisión con un microscopio de Epifluorescencia Nikon TiF LC, usando un objetivo Olympus UPlanFL N 40x 0.75NA y el software NIS-Elements. El microscopio cuenta con una cámara Nikon Digital Sight DS-Fi1c (8 bits RGB), una platina motorizada x/y ASI modelo MS-2000. Se tomaron 10 imágenes aleatorias por cada muestra histológica de tejido que corresponde al pulmón de un ratón. Se analizaron 100 imágenes para cada grupo de estudio. Las imágenes se guardaron en nuestro servidor NAS Synology DS920+ Desktop (4 Bahías), 40TB.

Las imágenes se obtienen en formato RGB por lo que el primer paso del análisis consiste en convertir las imágenes RGB a imágenes en escala de gris y profundidad de 8 bits.

Para realizar la medida de grosor de tabique, se procede a seleccionar en la barra de herramientas la opción “straight”, función que permite realizar una línea recta en el ancho del tabique. Luego de lo cual se selecciona la opción “Analyze-Measure” que permitirá obtener el valor de ancho del tabique analizado. Este procedimiento debe realizarse para al menos 10 tabiques en una misma imagen, dando como resultado una tabla que expresa los valores de todos los tabiques que luego serán promediados. Los datos fueron tomados por tres subgrupos en medidas independientes. Los subgrupos fueron compuestos por dos integrantes cada uno, los cuales evaluaron las mismas imágenes correspondientes a pulmones de ratones no dañados (ND) y a instilados (INS). Cada uno de estos subgrupos reunió los datos obtenidos para realizar el siguiente análisis. Se analizan las siguientes variables: diferencias entre los grupos ND e INS, tomados por cada subgrupo de trabajo; y la diferencia en la toma de datos entre los tres subgrupos nombrados.

Para las mediciones de área de colapso alveolar las imágenes RGB obtenidas se convierten a escala de grises (8 bits) y posteriormente se procede a obtener una máscara de los píxeles de interés, en este caso el espacio alveolar (zonas claras), ajustando el rango de píxeles en el histograma de intensidad (threshold). Esto se transforma en una máscara al convertir la imagen intensidad en una binaria (blanco y negro), la cual será la información necesaria para proceder con el análisis. El color negro corresponde a la región de interés. Antes de obtener los datos es necesario eliminar los píxeles de ruido y suavizar. Con este fin se aplica un filtro close 11x11. Finalmente, una vez bien definida la imagen se realizará la medición de área, para eso, vamos a pseudocolor, seleccionamos la opción File y dividimos la imagen en 2 colores. La imagen

obtenida muestra ahora la zona de interés en color rojo y la opción Áreas permite obtener el valor del área de interés.

Análisis estadístico:

Primeramente, se estudió la normalidad de los datos. Si los datos pasaban el test T de normalidad entonces se procedía a realizar los test paramétricos. Los resultados obtenidos a partir de la histología (Medida de grosor de tabique y Colapso alveolar) se compararon y analizaron mediante un análisis de Varianza (ANOVA) cuando se trataba de comparaciones entre más de 3 grupos y test de "t" (student) cuando se compararon 2 grupos. Los resultados se expresarán como Media \pm desvío estándar. Se considerarán como valores significativamente diferentes valor $p < 0.05$. Se utilizará el software GraphPad Prism 4.01 para el análisis estadístico. Para la representación de los resultados estadísticos se utilizaron gráficas en violin plot y box and whiskers plot.

PROTOCOLO DE CALIBRACIÓN DE MICROSCOPIO:

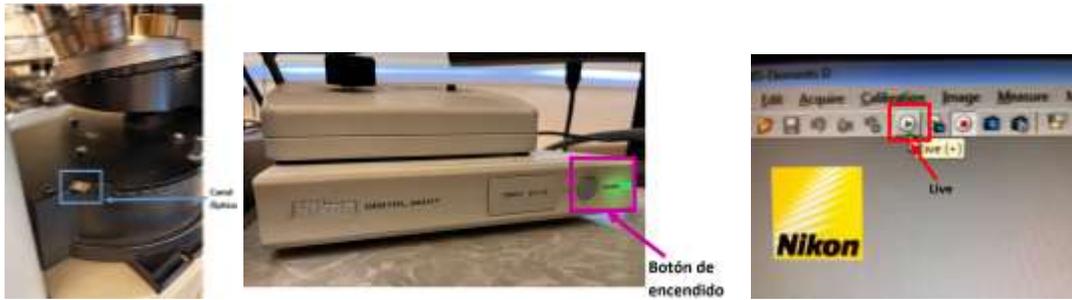
Este protocolo tiene como objetivo guiar el proceso de calibración del microscopio para obtener imágenes de alta calidad y precisión para el posterior análisis de muestras.

Materiales/Equipo:

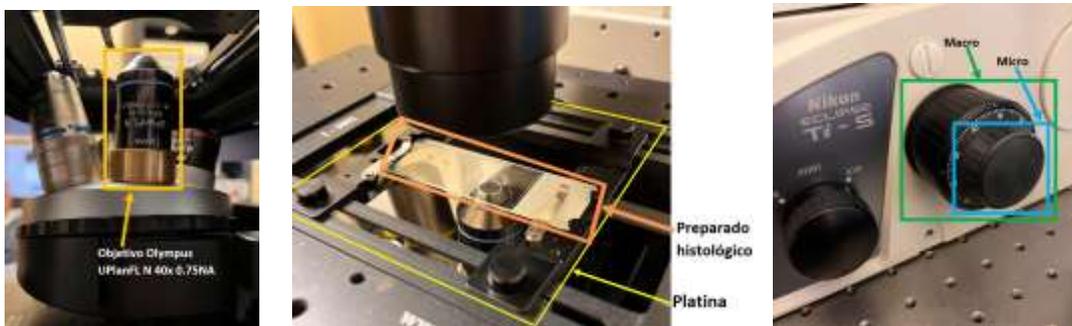
- Microscopio de Epifluorescencia Nikon TiF LC.
- Objetivo Olympus UPlanFL N 40x 0.75NA.
- Software NIS-Elements.

Procedimiento:

1. Conectar todos los componentes a utilizar: microscopio, computadora, asegurándose de que estén correctamente conectados. Seleccionar el canal óptico y verificar que la cámara del microscopio esté encendida y funcionando correctamente antes de continuar. Abrir el software NIS en la computadora y seleccionar la opción "live" para activar la visualización en tiempo real.



- Colocar el objetivo en el microscopio en su posición correspondiente, luego la platina. Asegurarse de que esté nivelada y en posición adecuada, para así colocar el preparado de manera invertida en el portaobjetos, (dado que la luz incide desde arriba y el objetivo está debajo del preparado). Iniciar el enfoque de la muestra utilizando en primer lugar el macro, y posteriormente el micro hasta obtener una imagen en foco, utilizando un núcleo del preparado como referencia.

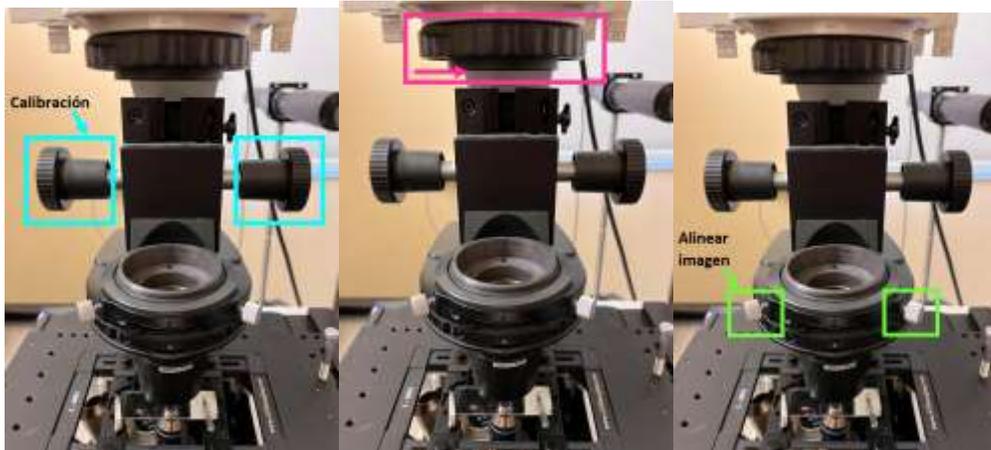


- Verificar que esté seleccionado el disco adecuado para la iluminación Kohler. Y proceder a realizar la alineación Kohler para lograr un plano de iluminación homogéneo.



- Cerrar el diaframa superior de manera tal que nos permite centrar y poner en foco el hexágono que se forma en la imagen. Usando el tornillo de foco del diaframa ajustar la distancia hasta obtener una imagen en enfoco. Utilizar los tornillos y ajustes para alinear la imagen y asegurarse de que esté correctamente iluminada.

- Moviendo los tornillos de alineación ajustar el diafragma en el centro de la imagen.



- Abrir el diafragma número 1 hasta que el hexágono se desplace ligeramente hacia afuera de nuestro campo de visión (Field of view).
- Ajustar el diafragma inferior hasta que se logre una imagen con el contraste adecuado.
- En el microscopio, cambiar la visualización de "EYE" a "SIDE" para obtener imágenes con la cámara.
- Re-ajustar el foco para la cámara y obtener 10 imágenes por muestra.



- Obtener la imágenes utilizando el software NIS de Nikon, guardar y nombrar cada archivo con su número de muestra correspondiente.
- Almacenar la imagen en la carpeta y formato adecuado:
"Carpeta María José > Carpeta MC 2023" > Convertir el formato del archivo a .Tiff

Al finalizar:

- Cerrar el software y desconectar todas las partes vinculadas con el microscopio.
- Retirar la muestra del stage motorizado.

3. Cubrir el microscopio con su cubierta protectora.

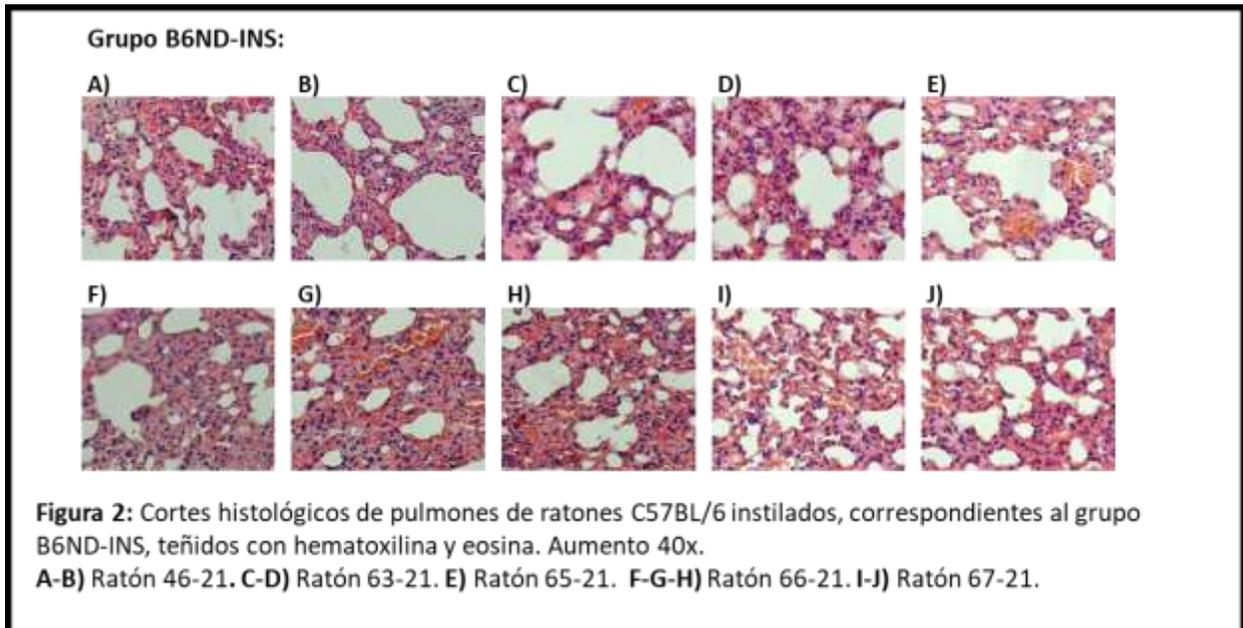
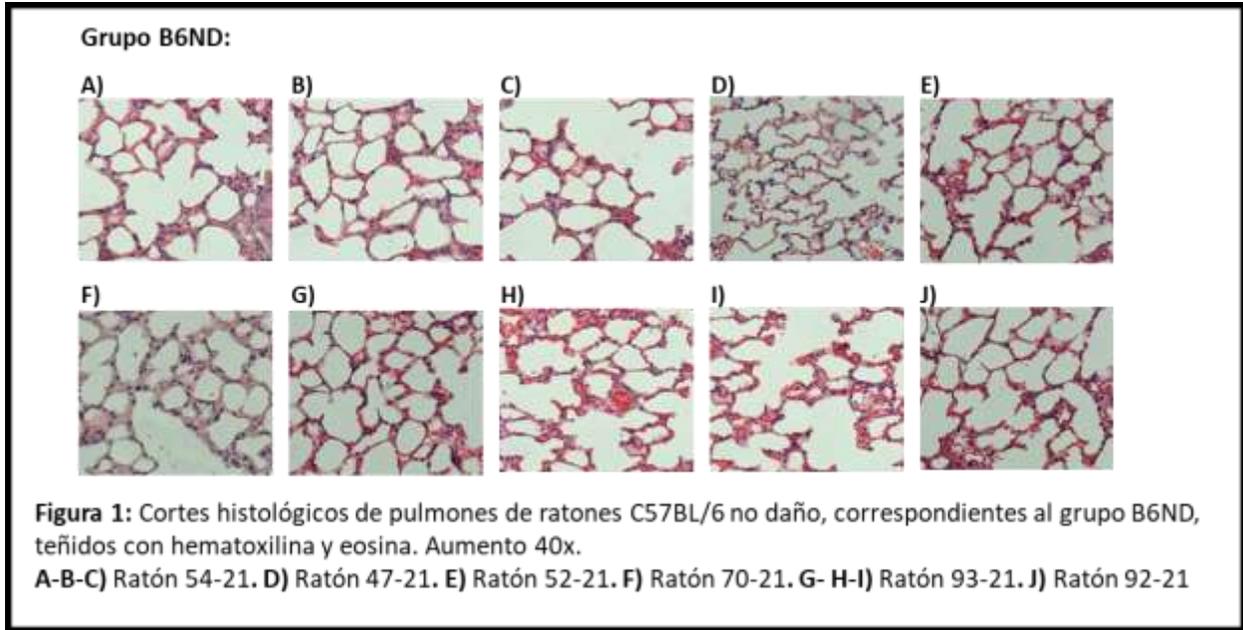


El protocolo asegura una calibración adecuada del microscopio para que la calidad de las imágenes obtenidas y su reproducibilidad en diferentes días permita un análisis comparativo.

RESULTADOS

1. Obtención de imágenes

Una vez entrenados en el uso de la microscopía de transmisión y de acuerdo al procedimiento planteado previamente se obtuvieron imágenes. A continuación, se seleccionaron 10 imágenes representativas del grupo control (B6ND) (Figura 1) y del grupo con LPA inducida por instilación de LPS (B6ND-INST) (Figura 2).



2. Medidas de grosor de tabique

Se realizaron las medidas de grosor de tabique para ambos grupos por parte de los 3 subgrupos de trabajo. En la figura 3 se pueden observar los resultados finales de las medidas para el grupo ND, INS y para la relación ND/INS. En la tabla 1 se puede observar el análisis estadístico, se realizó un test de t para la comparación estadística de medias. Como resultado, se observó una diferencia estadísticamente significativa con un valor $P < 0,0001$ para cada uno de los grupos (INS-ND) correspondiente a cada subgrupo.

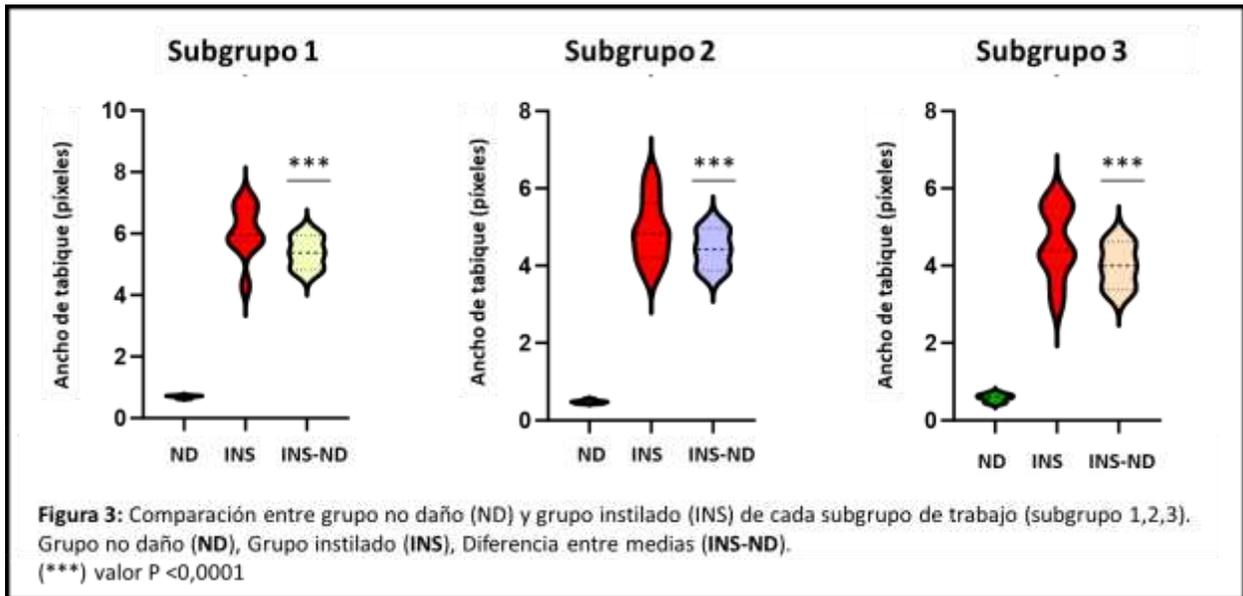


Tabla 1: Test de t intra subgrupos

T student	Subgrupo 1	Subgrupo 2	Subgrupo 3
Valor P	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Una o dos colas	Dos colas	Dos colas	Dos colas
Media ND	0,6974	0,4810	0,5826
Media INS	6,079	4,906	4,577
Delta \pm DE	5,381 \pm 0,2667	4,425 \pm 0,2605	3,995 \pm 0,2949
Intervalo de confianza 95%	4,821 – 5,942	3,878 – 4,973	3,375 – 4,614

Para entender la variabilidad de medida entre los tres subgrupos posteriormente se realizó la comparación entre los mismos. Para eso se utilizó un análisis estadístico de tipo ANOVA comparando los tres grupos ND y los tres grupos INS. Los resultados se pueden observar en las tablas 2 y 3, los cuales mostraron diferencias entre los grupos ND e INS estadísticamente significativa entre los diferentes subgrupos (Figura 4 y 5).

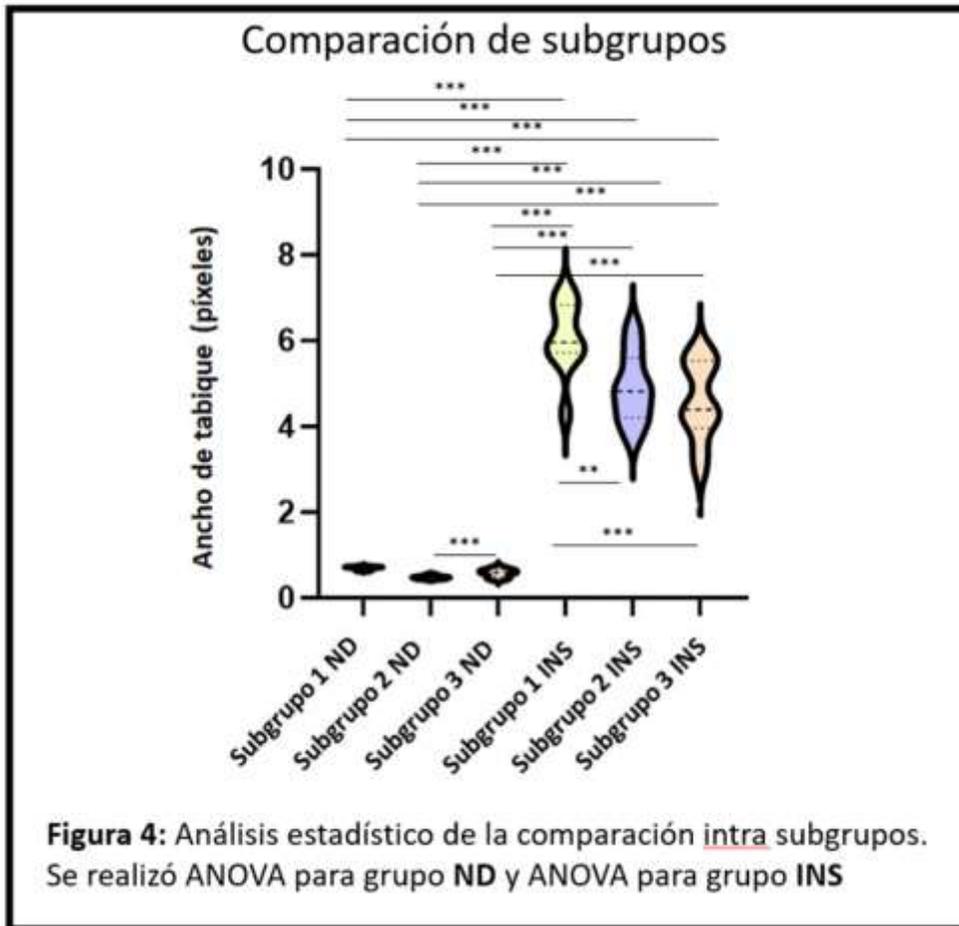


Tabla 2: Comparación entre subgrupos

Test de Tukey para múltiples comparaciones	Diferencia de medias	IC 95%	Valor P
Grupo 1 ND vs Grupo 2 ND	0,2164	-0,5944 to 1,027	0,9683
Grupo 1 ND vs Grupo 3 ND	0,1148	-0,6961 to 0,9257	0,9983
Grupo 1 ND vs Grupo 1 INS	-5,381	-6,192 to -4,570	<0,0001
Grupo 1 ND vs Grupo 2 INS	-4,209	-5,020 to -3,398	<0,0001
Grupo 1 ND vs Grupo 3 INS	-3,880	-4,691 to -3,069	<0,0001
Grupo 2 ND vs Grupo 3 ND	-0,1016	-0,9125 to 0,7092	0,9990
Grupo 2 ND vs Grupo 1 INS	-5,598	-6,409 to -4,787	<0,0001
Grupo 2 ND vs Grupo 2 INS	-4,425	-5,236 to -3,614	<0,0001
Grupo 2 ND vs Grupo 3 INS	-4,096	-4,907 to -3,285	<0,0001
Grupo 3 ND vs Grupo 1 INS	-5,496	-6,307 to -4,685	<0,0001
Grupo 3 ND vs Grupo 2 INS	-4,324	-5,134 to -3,513	<0,0001
Grupo 3 ND vs Grupo 3 INS	-3,995	-4,806 to -3,184	<0,0001
Grupo 1 INS vs Grupo 2 INS	1,173	0,3617 to 1,983	0,0011
Grupo 1 INS vs Grupo 3 INS	1,501	0,6905 to 2,312	<0,0001
Grupo 2 INS vs Grupo 3 INS	0,3289	-0,4820 to 1,140	0,8357

IC: Intervalo de confianza

Tabla 3: ANOVA grupo ND

Tabla ANOVA	SC	GL	MC	F (DFn, DFd)	Valor P
Entre-grupos (regresión)	0,2345	2	0,1173	F (2, 27) = 28,70	P<0,0001
Intra-grupos (residual)	0,1103	27	0,004086		
Total	0,3448	29			

SC: suma de cuadrados, GL: grados de libertad, MC: media cuadrática.

Tabla 4: ANOVA grupo INS

Tabla ANOVA	SC	GL	MC	F (DFn, DFd)	Valor P
Entre-grupos (regresión)	12,46	2	6,229	F (2, 27) = 8,314	P=0,0015
Intra-grupos (residual)	20,23	27	0,7492		
Total	32,68	29			

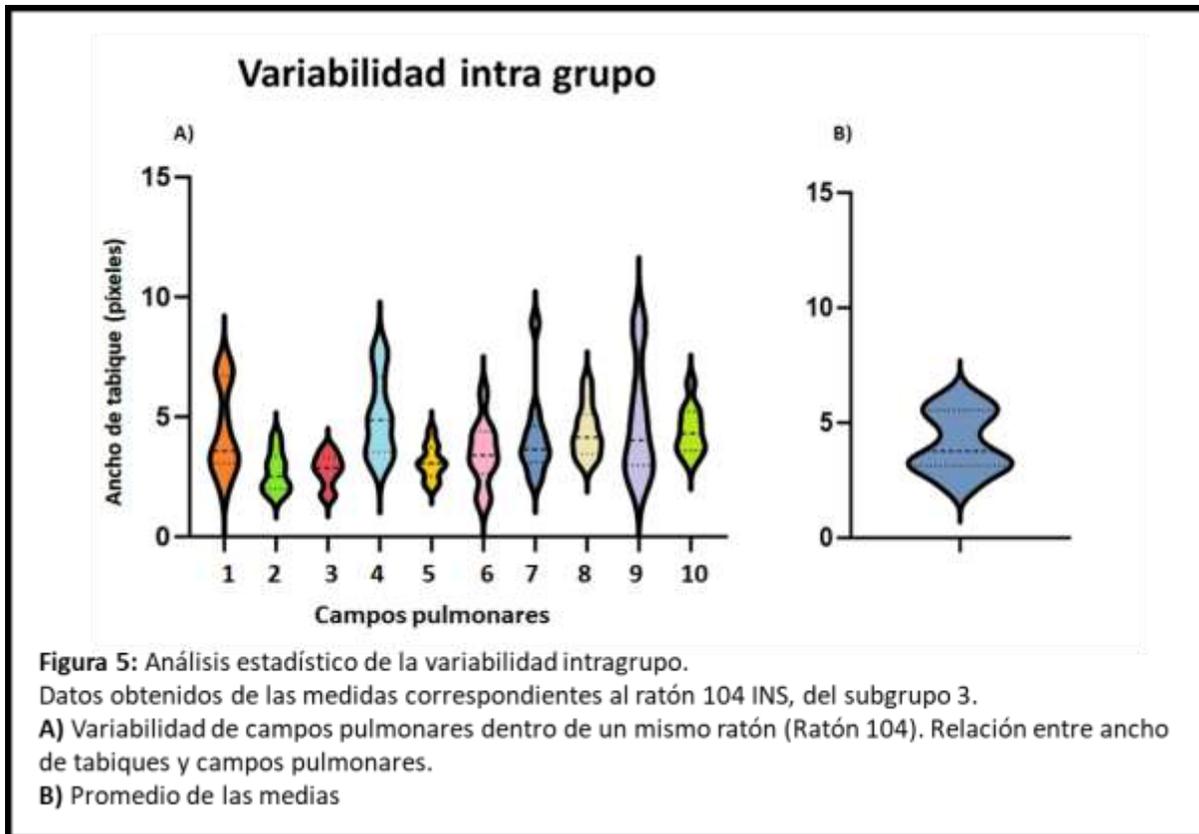
SC: suma de cuadrados, GL: grados de libertad, MC: media cuadrática.

Tabla 5: ANOVA INS-ND

Tabla ANOVA	SC	GL	MC	F(DFn,DFd)	Valor P
Entre grupos (regresión)	272,6	4	68,15	F(4,45)=150,9	P<0,0001
Intra-grupos (residual)	20,32	45	0,4516		
Total	292,9	49			

SC: suma de cuadrados, GL: grados de libertad, MC: media cuadrática.

Una vez realizado el análisis comparando los subgrupos de trabajo, y las diferencias que presentan tanto en ND como en INS, se analiza la diferencia de las medidas a partir del estudio de un único ratón. Con cada ratón se midieron 10 tabiques por imagen obtenida, y a su vez 10 imágenes por ratón, por lo cual cada promedio de estudio utilizado en los análisis previos era el resultado de 100 medidas. Se tomó al ratón 104 INS como referencia para analizar las 10 imágenes, de las cuales se tomaron 10 campos de cada una. En la figura 5A se puede observar la variabilidad en la medida del tabique a pesar de ser el mismo ratón. Mientras que en la figura 5B se observa el promedio de las mismas, el cual representa la medida única de estudio del ratón en los análisis previos.



Se estudió la variabilidad entre los campos de un mismo ratón mediante un ANOVA. Se obtuvo un valor P estadísticamente significativo de 0,0007. Estos resultados pueden observarse en la tabla 6.

La comparación entre-grupos representa la diferencia entre los distintos campos de un mismo ratón, mientras que el intra-grupos representa las variaciones entre las medidas del mismo campo.

Tabla 6: ANOVA ratón 104 INS

Tabla ANOVA	SC	GL	MC	F (DFn, DFd)	Valor p
Entre-grupos	61,29	8	7,661	F(8,81) = 3,842	P=0,0007
Intra-grupos	161,5	81	1,994		
Total	222,8	89			

SC: suma de cuadrados. GL: grados de libertad. MC: media cuadrática.

3. Medida de colapso alveolar

Se realizaron las medidas de colapso alveolar para ambos grupos de trabajo (Figura 6). Se analizó la relación espacio alveolar/área total utilizando un test de t para la comparación estadística de medias (Tabla 7). Como resultado, pudimos observar una diferencia estadísticamente significativa con un valor P <0,0001 para la relación EA/AT de los grupos INS-ND.

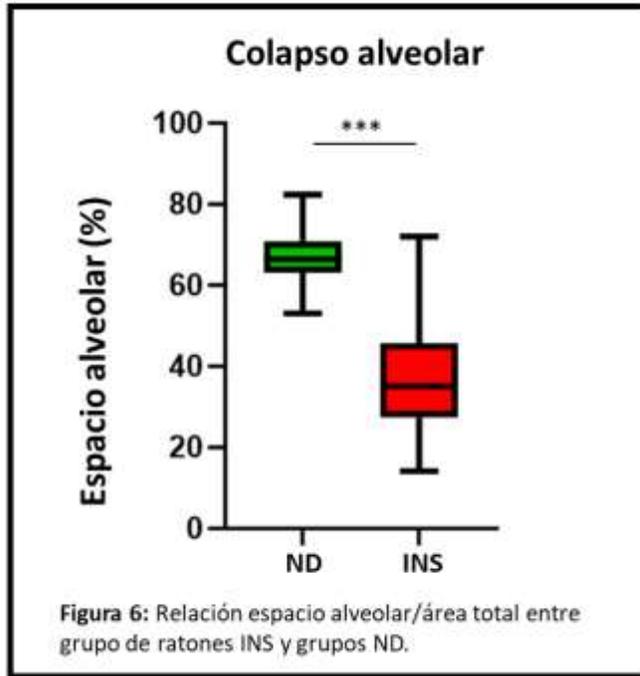


Tabla 7: Relación Espacio alveolar (EA)/Área total (AT)

T student	EA/AT
Valor P	<0,0001
Una o dos colas	Dos colas
Media ND	66,74
Media INS	37,19
Delta ± DE	-29,55 ± 1,443
Intervalo de confianza 95%	-32,40 ; -26,71

DISCUSIÓN

Uno de los ejes al inicio de la investigación fue comparar estadísticamente los distintos grupos experimentales y valorar qué variables inciden a la hora de registrar las medidas. Con este objetivo en mente lo primero que se planteó realizar fue valorar si existía una diferencia estadísticamente significativa entre los pulmones sometidos a una injuria pulmonar aguda (INS) y los no dañados (ND).

Existió una diferencia significativa entre los grosores de tabique de los pulmones no dañados (ND) y los instilados (INS), esto se debe a los efectos que la injuria pulmonar aguda puede tener sobre pulmones sanos, como se abordó en la introducción.

También, se puede apreciar indirectamente una diferencia entre el promedio de las medidas de los 3 subgrupos, donde dos de los mismos tuvieron gráficas bimodales y uno se asemeja a una distribución normal, con lo cual se comienza a observar una variabilidad entre subgrupo al tomar las mismas.

Al comparar entre los subgrupos se obtuvieron diferencias significativas en los resultados medidos, efecto que se plantea pueda deberse al sesgo de cada observador, dado que los tres subgrupos midieron las mismas imágenes, tomadas bajo las mismas condiciones.

Sin embargo, el sesgo de cada observador no es la única variable que pudo haber afectado los resultados. En el análisis intragrupo de un único ratón INS vemos como, en un mismo observador, los distintos campos medidos presentan heterogeneidad de valores, esto puede deberse a que el daño en el pulmón no se distribuye de manera homogénea, ya que los sectores más apicales y mejor ventilados se dañarán más (mayor grosor de tabique) que los sectores basales menos ventilados (menor grosor de tabique), y no todos los campos fueron obtenidos de un mismo sector.

Por último, también hay otros factores a considerar en la globalidad del estudio, como pueden ser: en qué condiciones se instilaron a los ratones, la situación basal de cada ratón, la condición de los instrumentos de medida, entre otros.

Posteriormente, se midió el área total, área sin tejido (espacio alveolar) y área con tejido, se estimó el colapso alveolar a partir de la relación espacio alveolar/área total. Se observó que la proporción de espacio alveolar es mayor en los ratones ND que en los INS. Esta diferencia se explica dado que los ratones INS presentan un grosor de tabique aumentado en comparación con los ND. A su vez, se aprecia una mayor variabilidad en la distribución de los datos en el grupo de INS, dado que el daño afecta de manera heterogénea al tejido pulmonar en contraste con el grupo ND el cual tiene una distribución de datos más agrupada.

CONCLUSIONES

En primer lugar, se logró el manejo de la microscopía de transmisión, generando un protocolo de calibración, lo cual constituyó el pilar fundamental de la investigación.

Fue posible caracterizar los grupos experimentales mediante una búsqueda bibliográfica previa sobre lesión pulmonar aguda, lo cual aportó información útil a la hora de reconocer distintas estructuras histológicas.

Posteriormente, se obtuvieron las medidas de colapso y edema pulmonar en los grupos ND e INS utilizando un software libre de análisis de imágenes, para el cual hubo una instancia previa de aprendizaje brindada por los tutores.

Por último, se realizó el análisis estadístico de los datos obtenidos, donde se puso en evidencia como la lesión pulmonar aguda puede afectar los tejidos, así como valorar qué factores inciden en el colapso alveolar.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rubenfeld, G. D., & Herridge, M. S. (2007). Epidemiology and outcomes of acute lung injury. *Chest*, 131(2), 554–562.
2. Villar J, Blanco J, Añón J.M, Santos-Bouza A, Blanch L, Ambrós A , et al. The ALIEN study: incidence and outcome of acute respiratory distress syndrome in the era of lung protective ventilation. *Intensive Care Med*, 37 (2011), pp. 1932-1941
3. de Souza Xavier Costa, N., Ribeiro Júnior, G., Dos Santos Alemany, A. A., Belotti, L., Zati, D. H., Frota Cavalcante, M., Matera Veras, M., Ribeiro, S., Kallás, E. G., Nascimento Saldiva, P. H., Dolhnikoff, M., & Ferraz da Silva, L. F. (2017). Early and late pulmonary effects of nebulized LPS in mice: An acute lung injury model. *PloS one*, 12(9), e0185474.
4. Angulo, M., Vacca, A., Rodríguez, R., Marin, M. N., Suárez, A. L., Jorge, G., Nosiglia, O., Cambón, V., Ríos, A., Iglesias, M., Seija, M., Escande, C., Hurtado, J., & Briva, A. (2022). Peripheral and respiratory muscle impairment during murine acute lung injury. *Physiological reports*, 10(17), e15449.
5. Bernard, G. R., Artigas, A., Brigham, K. L., Carlet, J., Falke, K., Hudson, L., Lamy, M., Legall, J. R., Morris, A., & Spragg, R. (1994). The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 149(3 Pt 1), 818–824.
6. Bezerra, F. S., Lanzetti, M., Nesi, R. T., Nagato, A. C., Silva, C. P. E., Kennedy-Feitosa, E., Melo, A. C., Cattani-Cavaliere, I., Porto, L. C., & Valenca, S. S. (2023). Oxidative Stress and Inflammation in Acute and Chronic Lung Injuries. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 12(3), 548.
7. Matthay, M. A., Ware, L. B., & Zimmerman, G. A. (2012). The acute respiratory distress syndrome. *The Journal of clinical investigation*, 122(8), 2731–2740.

8. Chen, H., Wu, S., Lu, R., Zhang, Y. G., Zheng, Y., & Sun, J. (2014). Pulmonary permeability assessed by fluorescent-labeled dextran instilled intranasally into mice with LPS-induced acute lung injury. *PloS one*, 9(7), e101925.
9. Matute-Bello, G., Downey, G., Moore, B. B., Groshong, S. D., Matthay, M. A., Slutsky, A. S., Kuebler, W. M., & Acute Lung Injury in Animals Study Group (2011). An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 44(5), 725–738.
10. Nieman, G. F., Andrews, P., Satalin, J., Wilcox, K., Kollisch-Singule, M., Madden, M., Aiash, H., Blair, S. J., Gatto, L. A., & Habashi, N. M. (2018). Acute lung injury: how to stabilize a broken lung. *Critical care (London, England)*, 22(1), 136.
11. Matute-Bello, G., Frevert, C. W., & Martin, T. R. (2008). Animal models of acute lung injury. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 295(3), L379–L399.
12. Imai, Y., Kuba, K., Rao, S., Huan, Y., Guo, F., Guan, B., Yang, P., Sarao, R., Wada, T., Leong-Poi, H., Crackower, M. A., Fukamizu, A., Hui, C. C., Hein, L., Uhlig, S., Slutsky, A. S., Jiang, C., & Penninger, J. M. (2005). Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature*, 436(7047), 112–116. <https://doi.org/10.1038/nature03712>
13. Ikegami, M., Scoville, E. A., Grant, S., Korfhagen, T., Brondyk, W., Scheule, R. K., & Whitsett, J. A. (2007). Surfactant protein-D and surfactant inhibit endotoxin-induced pulmonary inflammation. *Chest*, 132(5), 1447–1454. doi.org/10.1378/chest.07-0864
14. Puntorieri, V., McCaig, L. A., Howlett, C. J., Yao, L. J., Lewis, J. F., Yamashita, C. M., & Veldhuizen, R. A. (2016). Lack of matrix metalloproteinase 3 in mouse models of lung injury ameliorates the pulmonary inflammatory response in female but not in male mice. *Experimental lung research*, 42(7), 365–379.
15. Briva, A., Santos, C., Malacrida, L., Rocchiccioli, F., Soto, J., Angulo, M., Batthyany, C., Cairoli, E., & Piriz, H. (2011). Adenosine triphosphate-dependent calcium signaling during ventilator-induced

- lung injury is amplified by hypercapnia. *Experimental lung research*, 37(8), 471–481.
16. García M.J. Tesis de Maestría PEDECIBA-Biología. Comportamiento dinámico del surfactante pulmonar en un modelo de lesión inducido por la ventilación mecánica. Montevideo 2020.
 17. Meir, K. S., & Leitersdorf, E. (2004). Atherosclerosis in the apolipoprotein-E-deficient mouse: a decade of progress. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 24(6), 1006–1014.
 18. Escande, C., Nin, V., Pirtskhalava, T., Chini, C. C., Tchkonina, T., Kirkland, J. L., & Chini, E. N. (2015). Deleted in breast cancer 1 limits adipose tissue fat accumulation and plays a key role in the development of metabolic syndrome phenotype. *Diabetes*, 64(1), 12–22.
 19. Chini, C. C., Espindola-Netto, J. M., Mondal, G., Guerrico, A. M., Nin, V., Escande, C., Sola-Penna, M., Zhang, J. S., Billadeau, D. D., & Chini, E. N. (2016). SIRT1-Activating Compounds (STAC) Negatively Regulate Pancreatic Cancer Cell Growth and Viability Through a SIRT1 Lysosomal-Dependent Pathway. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 22(10), 2496–2507.
 20. Yamashita, CM, Fessler, MB, Vasanthamohan, L., Lac, J., Madenspacher, J., McCaig, L., Yao, L., Wang, L., Puntorieri, V., Mehta, S., Lewis, JF y Veldhuizen, RA (2014). Los ratones con deficiencia de apolipoproteína E son susceptibles al desarrollo de lesión pulmonar aguda. *Respiración; revisión internacional de enfermedades torácicas*, 87 (5), 416–427.
 21. Lo Sasso G, Schlage WK, Boué S, Veljkovic E, Peitsch MC, Hoeng JJ *Transl Med*. The Apoe(-/-) mouse model: a suitable model to study cardiovascular and respiratory diseases in the context of cigarette smoke exposure and harm reduction. 2016 May 20;14(1):146.
 22. Yao, X., Gordon, E. M., Figueroa, D. M., Barochia, A. V., & Levine, S. J. (2016). Emerging Roles of Apolipoprotein E and Apolipoprotein A-I in the Pathogenesis and Treatment of Lung Disease. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 55(2), 159–169.

23. Fessler M. B. (2017). A New Frontier in Immunometabolism. Cholesterol in Lung Health and Disease. *Annals of the American Thoracic Society*, 14(Supplement_5), S399–S405.
24. Poulain, M., Doucet, M., Major, G. C., Drapeau, V., Sériès, F., Boulet, L. P., Tremblay, A., & Maltais, F. (2006). The effect of obesity on chronic respiratory diseases: pathophysiology and therapeutic strategies. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*, 174(9), 1293–1299.
25. Guenette, J. A., Jensen, D., & O'Donnell, D. E. (2010). Respiratory function and the obesity paradox. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 13(6), 618–624.
26. Malacrida, L. Tesis doctoral “Surfactante Pulmonar durante la Lesión Pulmonar Aguda: desde la fisiopatología a los aspectos biofísicos de su disfunción”. Montevideo 2014.

AGRADECIMIENTOS

De parte de todos los integrantes del grupo, un enorme agradecimiento a los orientadores Dr. Leonel Malacrida y Mag. María José García, por la dedicación y apoyo en la realización de este proyecto.

Agradecer al Departamento de Fisiopatología y la Unidad de Bioimagenología Avanzada donde se encuentran los equipamientos para realizar la investigación planteada en este trabajo.

ANEXOS

Estrategia y metodología de investigación para la obtención de las muestras.

Modelo experimental:

Como modelo experimental se plantea usar ratones C57BL/6. Los animales fueron incluidos en el protocolo a partir de las 8 semanas de edad previa examinación de rasgos fenotipos normales. Los animales se separaron aleatoriamente en dos grupos que denominamos control y LPS. Se alimentaron por 14 semanas ad libitum con dieta normal y se alojaron en condiciones libres de patógenos específicos hasta dos días antes del experimento (bioterio del Institut Pasteur de Montevideo). Los animales fueron pesados periódicamente (cada semana) para evaluar el incremento en la masa corporal e incluirlos en los grupos animales de peso aproximadamente igual. Dos días antes del experimento los animales fueron transferidos al bioterio de mantenimiento del Departamento de Fisiopatología donde se realizaron los experimentos de mecánica ventilatoria. Se usó un n=10 por grupo experimental.

Modelo de lesión pulmonar por LPS:

Se utilizó un modelo de instilación intratraqueal de lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* (O55:B5 L2880, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), previamente empleado por Files y colaboradores (Files-2012). Ratones C57BL/6 fueron anestesiados mediante inhalación de isoflurano (100 mg / kg). Luego de corroborar un adecuado plano anestésico, los animales se suspendieron a 45° en una tabla para intubación orotraqueal. Un catéter (20G) fue introducido a través de las cuerdas vocales y se instalaron 3 µg/g de LPS o un volumen equivalente de suero fisiológico (SF). Los ratones recibieron 10 µL/g de SF subcutáneo como resucitación preventiva y libre acceso a agua y comida. Este modelo se caracteriza por el desarrollo de una lesión pulmonar aguda (LPA) subletal, que es máxima a los 3-4 días y se resuelve progresivamente en el transcurso de 10 días. Los animales se evaluaron en términos de la mecánica ventilatoria (MV) a los 4 días post-LPS²⁶.

Mecánica ventilatoria (MV):

Previamente a la MV los animales fueron sometidos a anestesia general con pentobarbital sódico (50 mg/kg i.p.), se incluyó anestesia local en la región del cuello para disección anterior y exposición del sector cervical traqueal (Lidocaína, 3 cc). Se realizó una incisión parcial anterior de la misma con bisturí para colocar un catéter plástico que funcionó como sonda traqueal. La misma se fijó con sutura de lino y se administró O₂ suplementario a través de una pieza en "T" mientras se administra relajante muscular (Atracurio, intraperitoneal 5 mg/kg) con posterior conexión a un ventilador para pequeños animales

(Samay MVR 17), con mezcla de O₂ para asegurar vitalidad del animal. La MV se realizó utilizando el protocolo previamente descrito por Malacrida y colaboradores, el cual consiste en la obstrucción al final de la expiración y estudio de la relajación en las presiones traqueal y transpulmonar ²⁶. Para lo cual es necesario incluir en la vía aérea un neumotacógrafo con un sensor de presión diferencial para medir flujo (PNEU01 World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL, USA) y un segundo sensor de presión para medir la presión traqueal (PNEU05 World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL, USA), además una sonda gástrica fue conectada a un sensor de presión para medir la presión transpulmonar (Statham P23BC, Hato Rey, Puerto Rico, EE. UU). Con el análisis la MV se calcularon los diferentes parámetros de mecánica respiratoria (sistema respiratorio, pulmón y torácico) que se utilizaron para evaluar los diferentes grupos de animales ²⁶. Posteriormente al protocolo de MV se realizó la eutanasia del animal mediante exsanguinación en el peritoneo de la aorta descendente o cava inferior. Los pulmones fueron extraídos en bloque y fijados en paraformaldehído al 10%. Todo el protocolo con animales fue aprobado por la Comisión de Ética en el Uso de Animales, (Exp. Nº 070153-000571-19).

Histología:

Luego de medir la mecánica respiratoria se extrajeron los pulmones y se fijaron en formol durante 24hs. Se deshidrató el tejido en 5 pasajes de 30 minutos con alcohol de graduación creciente (alcohol 50°, 70°, 96° e isopropílico) y un pasaje de 30 minutos por cloroformo. Posteriormente se embebieron en parafina y se realizaron cortes histológicos seriados (Aproximadamente 20 cortes por lámina). El tejido pulmonar fue teñido con hematoxilina y eosina.