



UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA

“VALIDACION DE BIOMARCADORES PARA LA DETECCION TEMPRANA DE
LINFEDEMA PRIMARIO Y SECUNDARIO”.

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO
DE LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA

ALUMNO: CAMILA MEJIAS FLORES
PROFESOR GUIA: NOELIA ESCOBEDO MARAMBIO, PhD
PROFESOR CO-GUIA: RODRIGO MOORE CARRASCO, PhD

**AUTORIZACIÓN PARA LA PUBLICACIÓN
DE MEMORIAS DE PREGRADO Y TESIS DE POSTGRADO**

Yo, Camila Mejías Flores, cédula de Identidad N° 18.559.854-3, autor de la memoria o tesis que se señala a continuación, **(SI) NO** autorizo a la Universidad de Talca para publicar en forma total o parcial, tanto en formato papel y/o electrónico, copias de mi trabajo.

Esta autorización se otorga en el marco de la Ley N° 20.435 que modifica la Ley N° 17.336 sobre Propiedad Intelectual, con carácter gratuito y no exclusivo para la Universidad.

Título de la memoria o tesis:	"Validación de Biomarcadores para la detección temprana de Linfedema Primario y Secundario."
Unidad Académica:	Biogímica Clínica.
Carrera o Programa:	Tecnología Médica
Título y/o grado al que se opta:	Licenciado en Tecnología Médica.
Nota de calificación	6,9



Firma de Alumno

Rut:

18.559.854-3

Fecha:

28 / 02 / 2019

INDICE

1. RESUMEN	3
2. INTRODUCCIÓN	4
3.MARCO TEORICO	6
3.1 VASCULATURA LINFATICA	6
3.2 LINFEDEMA	9
3.2.1 LINFEDEMA PRIMARIO.....	12
3.2.2 LINFEDEMA SECUNDARIO	14
3.3. TRATAMIENTO DEL LINFEDEMA SECUNDARIO	16
3.4 COMPLICACIONES DEL LINFEDEMA	17
4. ACIDO HIALURONICO	18
5. LEUCOTRIENOS.....	20
6. QUIMIOQUINAS	23
7. OBJETIVOS.....	25
Objetivo General.....	25
Objetivos Específicos	25
8. MATERIALES Y METODOS	26
8.1 Ratones	26
8.1.1 Modelo de linfedema secundario	26
8.1.2 Protocolo de extracción de sangre/ suero	27
8.2 Análisis estadístico	27
8.3 Evaluación de biomarcadores mediante técnica de ELISA	28
8.4 Análisis de la vasculatura linfática por técnica de inmunofluorescencia	28
9. RESULTADOS.....	29
10.DISCUSION	42
11.CONCLUSION	46
12.BIBLIOGRAFIA	47

1. RESUMEN

La vasculatura linfática corresponde a un componente integral del sistema linfático. Esta vasculatura, es una red de vasos linfáticos que recorren todo el organismo y es la encargada de drenar los líquidos intersticiales y productos metabólicos (denominados linfa) y transportarlos hasta la vasculatura sanguínea.

Un problema que puede afectar la vasculatura linfática es producido por un deterioro en la capacidad de drenaje causado por la obstrucción o la hipoplasia linfática, generando la acumulación de líquido intersticial, conocido como linfedema, el cual afecta principalmente a mujeres.

El linfedema se puede dividir en dos tipos, linfedema primario si el defecto en la vasculatura linfática se debe a un defecto genético en factores que son esenciales para la maduración y formación de los vasos linfáticos; y linfedema secundario que es el más frecuente y supone el 90% del total de los linfedemas, donde la principal causa que lo origina es la obstrucción. Pese a los avances en farmacología y cirugías, el linfedema sigue siendo una patología crónica, progresiva y sin cura en la cual no existen marcadores tempranos de la enfermedad que sean capaces de detectar el desarrollo de este antes que se presente, por lo que es de suma importancia buscar marcadores moleculares de detección temprana de linfedema, para así revertir esta patología que afecta notablemente la calidad de vida de las personas que lo padecen.

En esta memoria de tesis, proponemos evaluar los niveles de las moléculas ácido hialurónico, quimioquina ligando 12 y leucotrieno B4 en sangre y mediante test de ELISA, en un modelo experimental de linfedema en cola de ratón, con el fin de determinar si estas moléculas sirven como predictores tempranos del desarrollo de esta enfermedad.

2. INTRODUCCIÓN

Nuestro organismo está formado por dos grandes sistemas vasculares, por un lado, está el sistema circulatorio en el cual circula sangre y la vasculatura linfática, donde circula linfa.

El sistema vascular linfático corresponde a una red de capilares unidireccionales que se encargan del transporte de la linfa. Esta red de vasos se conoce como vasculatura linfática y tiene como función principal mantener la homeostasis de los fluidos corporales, transportando la linfa rica en proteínas del espacio existente entre los tejidos y devolverla al torrente sanguíneo a través del conducto torácico. Entre otras de las funciones que presenta este sistema, destacan la absorción de grasa de la dieta a nivel del intestino, y el tráfico inmunológico, ya que, a través de estos conductos se produce el transporte de células presentadoras de antígenos para dirigir la respuesta inmune.

Este sistema está constituido por dos tipos de vasos linfáticos: capilares y colectores. Los capilares corresponden a los vasos de menor calibre y están conformados por una sola capa de células endoteliales linfáticas unidas entre sí por uniones laxas tipo botón y una membrana basal discontinua que permiten la entrada de moléculas, fluidos y células desde el espacio tisular al lumen del vaso. Estos capilares, se conectan a su vez con los colectores los cuales son vasos de mayor tamaño, también formados por células endoteliales pero conectadas por uniones mas estrechas tipo cierre. Estos vasos colectores, presentan válvulas para evitar el reflujo de linfa y una capa perivascular continua de músculo liso que proporciona actividad contráctil para la propulsión de la linfa hasta desembocar finalmente en el torrente sanguíneo, concretamente en la vena subclavia izquierda.

Existen varios defectos que pueden alterar la vasculatura linfática, en donde se puede ver afectada su morfología y funcionalidad. Una de estas alteraciones corresponde al linfedema, el cual se caracteriza por ser una condición clínica dada por la acumulación localizada de linfa (líquido rico en proteínas intersticiales, grasas, células inmunes y agua), que genera discapacidad y dolor en la zona afectada. De acuerdo a la causa que genera el daño en la vasculatura linfática, se ha clasificado a esta patología en linfedema primario y linfedema secundario. El primario, se origina por alteraciones genéticas que afectan genes que son necesarios para la formación y/o mantención de la vasculatura linfática, mientras que en el linfedema secundario, el daño producido en la vasculatura se debe a causas externas que provocan un deterioro en la capacidad de drenaje, generando la acumulación de linfa en distintas zonas del cuerpo.

Esta patología afecta alrededor de 200 millones de personas en el mundo, por lo que corresponde a un problema relevante, el cual no tiene cura, y que no existe forma para poder detectar de manera temprana el desarrollo de linfedema, ya que la mayoría de los casos en los cuales se diagnostica, el linfedema ya se ha desarrollado. Es por esto que se hace necesario buscar una forma de detección que permita predecir que una persona pueda desarrollar el linfedema, para así actuar de manera temprana y evitar las complicaciones asociadas al desarrollo de esta condición.

Es por lo mencionado anteriormente que se postula la hipótesis:

“Un cambio en los niveles en sangre de Ácido Hialurónico, Quimioquina Ligando 12 y /o Leucotrieno B4, preceden el desarrollo de Linfedema y funcionarían como biomarcadores de desarrollo temprano de la enfermedad en modelos murinos de Linfedema primario y secundario.”

3. MARCO TEORICO

3.1 VASCULATURA LINFATICA

El sistema circulatorio se compone de tres subsistemas: el arterial, el venoso y linfático. Este último sistema, corresponde a una red de capilares y vasos unidireccionales que posee como función principal recoger sustancias que deben retornar al sistema sanguíneo, pero que no pueden ser transportadas por las venas por estar constituido principalmente de proteínas de alto peso molecular. Además de esta función de mantener la homeostasis de los fluidos, la vasculatura linfática también ayuda al transporte y absorción de grasas desde la dieta, y proporciona el medio por donde se transportan distintas células inmunes, como células presentadoras de antígenos para orquestar la respuesta inmune.

La vasculatura linfática es un sistema de vasos unidireccionales que comienza con capilares linfáticos de extremo ciego y que están constituidos por una capa única de células endoteliales linfáticas (LEC) conectadas entre ellas por una estructura de uniones discontinuas conocida como uniones tipo botón. Estas LEC carecen de membrana basal continua, lo que permite la entrada de fluido intersticial y células al lumen del vaso, haciendo que estos capilares sean altamente permeables. A su vez, estos capilares linfáticos están en contacto directo con el tejido gracias a los filamentos conectivos que atan los vasos a la matriz extracelular circundante, y lo que permite la absorción del líquido cuando aumenta la presión del tejido externo. El líquido intersticial (llamado linfa cuando ingresa a los capilares linfáticos) luego se mueve hacia los vasos pre-colectores, los cuales son vasos linfáticos que conectan los capilares y los vasos colectores. Los vasos colectores corresponden a vasos linfáticos de mayor calibre, formados también por LEC y revestidos por pericitos, células contráctiles que proporcionan la fuerza de bombeo

para el movimiento de fluidos. También presentan válvulas intraluminales que permiten el fluido unidireccional de la linfa. Finalmente, los vasos colectores proporcionan el medio para que la linfa viaje a través de este sistema, para converger en el conducto torácico a través de la cual la linfa se transporta a la vena subclavia para volver nuevamente al torrente sanguíneo. (3)

Los conocimientos que se tienen acerca de la linfangiogénesis (crecimiento de vasos linfáticos a partir de vasos pre-existentes) han mejorado considerablemente en los últimos años gracias al progreso en la identificación de moléculas reguladoras y marcadores específicos del endotelio linfático. Es por esto que se han estudiado diversos genes implicados en la formación y/o mantención de la vasculatura linfática, como lo son el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), PROX1 y FOXC2. Estos genes son expresados progresivamente durante la embriogénesis de las células endoteliales linfáticas hasta la adquisición del fenotipo de las células del endotelio linfático. Posteriormente, muchos de estos productos genéticos son necesarios para la diferenciación del sistema linfático.

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), es una proteína señalizadora implicada en la formación del sistema circulatorio embrionario, y en la angiogénesis. Específicamente, el gen del receptor 3 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR3, *FLT4*) fue uno de los primeros marcadores endoteliales linfáticos descubiertos. Se expresa en todos los vasos tempranamente durante la embriogénesis y posteriormente su expresión se limita a los vasos linfáticos tanto en desarrollo como en los ya diferenciados (4). Se ha observado que una disrupción total de VEGFR3 en ratones conduce a la muerte embrionaria en el día E9.5 debido al desarrollo defectuoso de los vasos sanguíneos de gran calibre que conducen a una falla cardiovascular. Además se ha estudiado que la sobreexpresión de su ligando, el factor de crecimiento endotelial vascular C (VEGFC) induce hiperplasia selectiva de la vasculatura linfática (5). A pesar de la evidencia de que los factores angiogénicos, como VEGF, controlan varios aspectos del proceso de angiogénesis,

los mecanismos moleculares que subyacen a la regulación de los genes en los vasos linfáticos y los tejidos circundantes no se conocen completamente.

El factor de transcripción *Forkhead box protein C2* (FOXC2) es un reconocido regulador de la formación y maduración de los vasos colectores y las válvulas linfáticas (Norrmen et al 2009). La pérdida de FOXC2 en ratones conduce a defectos en la remodelación linfática, a la incapacidad de formar válvulas linfáticas y al aumento de la cobertura de los vasos linfáticos en pericitos (Petrova et al, 2004).

Prox1 (*Prospero homeobox 1*), corresponde a un factor de transcripción que controla el desarrollo de la vasculatura linfática. Los análisis genéticos, indican que se requiere de Prox1 para la inducción del destino de células endoteliales linfáticas. Ratones nulos para el gen Prox1 (Prox1^{-/-}) están completamente desprovistos de vasculatura linfática, por lo que mueren cerca de la fase embrionaria E14.5. Durante el desarrollo, la expresión de Prox1 marca el inicio del programa de formación y especificación de la vasculatura linfática. Estudios in vitro han demostrado que la sobreexpresión de Prox1 es suficiente para inducir un destino linfático en el endotelio vascular al suprimir la expresión de un gran número de transcritos específicos de la vasculatura sanguínea y actuando como un interruptor en el programa que especifica el destino de las células endoteliales linfáticas (LEC) (Hong et al. 2002; Petrova et al. 2002). Además de promover un fenotipo LEC, la actividad Prox1 se requiere también para mantener la identidad LEC. Por lo tanto, el fenotipo LEC depende de la actividad constante de Prox1 para su mantenimiento, y el destino de LEC es posiblemente plástico y reprogramable (Oliver & Srinivasan 2010).

3.2 LINFEDEMA

El linfedema corresponde un edema crónico, de más de tres meses de duración, debido a la acumulación de líquido intersticial causada por un mal drenaje linfático (8). Es consecuencia del desbalance entre la producción de linfa y su remoción a través de la vasculatura linfática. Se produce linfedema siempre que no existen vasos linfáticos o los existentes están subdesarrollados, obstruidos o son funcionalmente incompetentes.

Desde hace muchos años, diversos autores han buscado la relación que existe entre la acumulación de líquido y la vasculatura linfática, ya que el linfedema corresponde a una patología común, pero difícilmente diagnosticada que muchas veces se confunde con otras enfermedades como obesidad o insuficiencia venosa; también se puede deber a procesos inflamatorios, donde se presenta una respuesta inmune desregulada en el cual la deposición de tejido adiposo y la fibrosis promueven la alteración de la fisiología normal y pérdida de las funciones en la zona afectada.

Una de las causas que intervienen en la generación del linfedema, es la alteración de la carga linfática y los mecanismos de transporte de la linfa, lo que provoca que la capacidad de transporte de este fluido se vea sobrepasada y se acumule de manera anormal en distintas zonas, preferentemente las extremidades. Lo que ocurre en condiciones normales, es que la filtración y reabsorción de líquido intersticial se encuentran en equilibrio por lo que no se acumula exceso de líquido en la matriz extracelular; sin embargo al desarrollarse el linfedema se produce acumulación de residuos celulares y bloqueo de la vasculatura linfática que impide el transporte normal de células inmunes (9) contribuyendo al compromiso inmunológico local y provocando una vigilancia inmunológica disminuida. La inmunocompetencia alterada se debe en parte a que las células dendríticas, los linfocitos T y los macrófagos ejercen sus efectos inmunitarios al migrar desde sitios

periféricos a través de los linfáticos a los ganglios linfáticos regionales para establecer respuestas inmunitarias adaptativas / celulares (10).

Los pacientes que presentan un mayor riesgo de sufrir linfedema son aquellos que padecen de cáncer, a los cuales se les ha extirpado ganglios linfáticos de la ingle o axila, y también pacientes que han recibido tratamientos de radioterapia y que desarrollan esclerosis ganglionar producto del daño que se origina en la vasculatura linfática. Otro grupo que se encuentra propenso a padecer de linfedema son los pacientes que desarrollan obesidad, ya que presentan una cicatrización más lenta después de una cirugía.

El linfedema puede afectar diversas zonas del cuerpo, aunque la mayoría de los casos afecta extremidades inferiores, y en mucha menor proporción las extremidades superiores y los genitales. Algunos de los síntomas que presentan los pacientes con linfedema destacan la presencia de un edema blando depresible al tacto; piel blanca y tensa; alteraciones en la movilidad y en la circulación; asimetrías de las extremidades afectadas y que con el tiempo presentan aumento de volumen y pesadez de la zona afectada.

La disfunción linfática crónica se traduce gradualmente en inflamación, hiperplasia linfática y engrosamiento de la piel. El linfedema puede comenzar de forma insidiosa en períodos variables como ocurre después del tratamiento axilar y pasar de una condición apenas perceptible a una que involucra una extremidad severamente dañada y tejidos inflamados, donde el estancamiento de proteínas proporciona un medio excelente para episodios repetidos de linfangitis y celulitis, y conduce progresivamente a fibrosis intersticial irreversible, hiperqueratosis y la remodelación tisular. “Habitualmente el linfedema se produce como resultado de las disfunciones o alteraciones a distintos niveles de las vías de drenaje (capilares, colectores, ganglios o troncos linfáticos principales). En ocasiones, malformaciones linfáticas localizadas, que generalmente son asintomáticas, pueden interferir en el drenaje linfático produciendo un edema localizado” (11).

Existen estadios clínicos de linfedema, los que se basan en las manifestaciones clínicas que presentan los pacientes: el estadio 0, estadio I, estadio II y estadio III. El estadio 0 o subclínico puede existir por meses o años y pasar desapercibido. El estadio I (incipiente) se manifiesta porque la acumulación de fluidos disminuye al elevar la extremidad afectada, y el volumen del miembro aumenta menos de un 20%. En esta etapa, el edema se define como duro elástico y depresible a la palpación. El estadio II o avanzado, en el cual la acumulación de líquido no disminuye al elevar la zona afectada, y el exceso de volumen alcanza al 40 %, en este punto el edema no es depresible. Finalmente el estadio III o fibrótico el edema sigue siendo no depresible, pero se presenta un engrosamiento de la piel, aumento de los pliegues cutáneos y presencia de verrugosidades (12).

El linfedema corresponde a un problema importante que afecta a la población mundial. En Estados Unidos, uno de los países donde se conoce la incidencia de esta patología, se estima que afecta alrededor de 3 millones de personas y se presenta con mayor frecuencia en el género femenino.

En la bibliografía se encuentran diferentes sistemas de clasificación del linfedema basados en la clínica, la etiología, la topografía, la edad de inicio u otros aspectos, sin embargo la clasificación más aceptada es la propuesta por la *International Society of Lymphology* quien lo clasifica en linfedema primario y linfedema secundario dependiendo de cómo se origina.

3.2.1 LINFEDEMA PRIMARIO

El linfedema primario, es aquel que tiene su origen en algún defecto genético, lo que conlleva a un daño en la vasculatura linfática. Estas mutaciones genéticas, afectan genes que son necesario ya sea para la formación y/o mantención de la vasculatura linfática lo que conduce al subdesarrollo de los vasos linfáticos (hipoplasia o aplasia), y al mal funcionamiento de su capacidad de drenaje de la linfa.

El linfedema primario es raro, y puede ser una enfermedad aislada o parte de un síndrome más complejo y la mayoría de los casos, se heredan con un rasgo autosómico dominante.

La prevalencia de linfedema es difícil de estimar, presentándose casos de 1: 6000 a 10.000 nacidos vivos, con un predominio del género femenino, estimando que afecta a 10 mujeres, mientras que se presenta solo en 1 hombre (13).

El linfedema primario, se ha clasificado en tres tipos dependiendo de la edad de aparición de la patología. Cuando este se presenta al momento del nacimiento se asocia a la enfermedad de Milroy y se conoce como linfedema congénito. Cuando aparece después del nacimiento y antes de los 35 años de edad, se le conoce como linfedema precoz y este se observa en la enfermedad de Meige. Finalmente, el linfedema tardío es aquél que se vuelve clínicamente evidente después de los 35 años de edad. Este último se produce por una anomalía del desarrollo del sistema linfático, que se vuelve clínicamente evidente solo después de los 35 años y a menudo precipitado por un traumatismo, un proceso inflamatorio, infecciones o tras un periodo de inmovilidad. (18)

La enfermedad de Milroy, es debida a una mutación inactivadora sin sentido en el gen *Flt4* el cual codifica para el receptor VEGFR3. Esta mutación produce una hipoplasia en la vasculatura linfática y se caracteriza por la presencia de linfedemas

de las extremidades inferiores, presentes desde el nacimiento o que se desarrollan en el primer año de vida. Su incidencia es de 1 caso por cada 33.000 nacimientos y afecta por igual a ambos sexos. El edema, es bilateral, y por debajo de las rodillas, aunque puede ser asimétrico y localizado en miembros superiores, y aunque se han presentado casos de derrame pleural o ascitis quilosa en general no se asocia con anomalías linfáticas a otros niveles. (15)

El linfedema precoz en la enfermedad de Meige, es la forma más común de linfedema primario. También se presenta en mayor proporción en mujeres y el 70 % de los casos son unilaterales. A diferencia de la enfermedad de Milroy, este presenta casos esporádicos, debutando en la pubertad y afectando las extremidades bajo la rodilla.

Estudios realizados en modelos murinos, han demostrado que la pérdida de FOXC2 conduce a defectos en la remodelación linfática, y por ende una falla en la formación de las válvulas linfáticas, lo que causa una falla valvular con reflujo (16). En los seres humanos, las mutaciones inactivantes de FOXC2, producen Linfedema-distiquiasis, una forma de linfedema que se expresa en forma autosómica dominante. Aparece entre los 8 y 30 años, y se asocia a otros tipos de patologías, como varices, cardiopatías congénitas, anomalías vertebrales, hemangiomas y estrabismo. A diferencia del síndrome de Meige, que presenta una mayor incidencia en mujeres, en el linfedema-distiquiasis hay mayor afectación de los varones en la infancia, y mayor severidad. (17)

3.2.2 LINFEDEMA SECUNDARIO

El linfedema secundario se adquiere por daño u obstrucción de la vasculatura linfática, vasos que previamente se encontraban normales. Este daño puede ser producido por procesos de enfermedad, infección, traumatismo, cirugía, obesidad o como consecuencia de intervenciones terapéuticas asociadas al cáncer. Este daño afecta la función de la vasculatura, y permite la filtración del líquido drenante hacia los tejidos adyacentes, provocando la acumulación de estos y la generación del edema.

Este tipo de linfedema, generalmente afecta las extremidades inferiores y en menor medida las extremidades superiores, aunque también hay casos en los que se desarrolla en el pecho, cabeza y genitales, el cual va acompañado por una lesión color piel amarronada, dura, no depresible y áspera al tacto. Un signo típico de este tipo de linfedema, es el signo de *Kaposi Stemmer*, que consiste en la imposibilidad de pinzar la piel del dorso del segundo dedo del pie, mientras que en el paciente sin linfedema se pellizca el pliegue con facilidad (19). Lamentablemente, estos signos de detección solo sirven para confirmar la patología, pero no como método de detección temprana previo a la formación del edema.

La cirugía de cáncer de mama es la principal causa de linfedema secundario en países desarrollados producto de la remoción de nodos linfáticos o la radiación a la que son sometidos los pacientes con cáncer. “Las células tumorales metastásicas que con frecuencia se propagan a los ganglios linfáticos requieren cirugía y radioterapia, que destruye la red de vasos linfáticos y conducen a un deterioro del flujo linfático.” (20)

La predisposición a desarrollar linfedema post-linfadenectomía parece depender de factores genéticos, pero los genes de susceptibilidad no se han identificado hasta ahora (21). El daño a los linfáticos también puede resultar de infecciones bacterianas de la piel (como la erisipela) o de los vasos linfáticos (linfangitis), que

generalmente son causados por infecciones por estreptococos o estafilococos, respectivamente (21).

La filariasis (elefantiasis) es una infección de los linfáticos por los gusanos parásitos *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* o *Brugia timori*, que conduce a la obstrucción y cicatrización de los vasos linfáticos y al linfedema crónico de las extremidades inferiores u órganos genitales. El inicio de la filariasis se desencadena por una reacción inflamatoria filarial específica que estimula la producción de VEGF, VEGFC y VEGFD, que conducen a una hiperplasia persistente de los vasos linfáticos (22). La filariasis es la principal causa de linfedema en todo el mundo y afecta a aproximadamente 100 millones de personas.

El linfedema secundario no tiene cura y se presenta con diferente proporción en distintas patologías, sin embargo, no existe una relación de por qué ciertos pacientes desarrollan el linfedema y otros no, aunque se conoce que un alto porcentaje de personas que se someten a la remoción de ganglios linfáticos, como consecuencia de cáncer, puede presentar este linfedema, lo que genera incapacidad, dolor y deformidad de la extremidad afectada.

3.3. TRATAMIENTO DEL LINFEDEMA SECUNDARIO

No existe en la actualidad un tratamiento curativo del linfedema. Esto sumado al hecho de que esta patología resulta imposible detectarla a tiempo ya que se diagnostica cuando ya se ha formado el linfedema, crean la necesidad de contar con una herramienta de diagnóstico temprano para su prevención. Actualmente el tratamiento del linfedema se basa en medidas paliativas, que tienen por objetivo disminuir el volumen de la extremidad afectada, reducir los síntomas y evitar la progresión y posibles complicaciones. El objetivo del tratamiento es alcanzar un balance entre la carga proteica linfática, y la capacidad de transporte de la linfa. Para ellos es necesario un tratamiento fisioterapéutico a largo plazo, donde se busca obtener una reducción del volumen, la recuperación funcional y, en la medida que sea posible, la desaparición del dolor; pero también mejorías en la condición de la piel, reducción de la fibrosis y en caso que hubiera, tratamiento de procesos infecciosos. Para esto, se recomienda la realización de fisioterapia descongestiva la cual consiste en un drenaje linfático manual o la compresión externa que busca potenciar el efecto de la válvula muscular y reducir la filtración capilar. También está recomendado como tratamiento, el uso de diuréticos que mejoran levemente el linfedema, dado que solo reducen la filtración capilar indirectamente a través de la disminución del flujo sanguíneo.

Uno de los principales avances, destaca la cirugía, ya que constituye una terapia paliativa que consiste en la escisión de tejidos, sin embargo, solo se realiza a pacientes con linfedema muy avanzado y que afectan miembros inferiores.

3.4 COMPLICACIONES DEL LINFEDEMA

Una de las principales complicaciones, corresponde al edema, que se asocia a pesadez y prurito, reducción de la movilidad y problemas estéticos. Las infecciones corresponden a la segunda causa de complicaciones en los pacientes con linfedema. Lo más común, es que presenten cuadros de celulitis y linfangitis, al igual que pueden presentar vómitos, fiebre y cefaleas. Además, la presencia de infecciones reiteradas puede conducir a un empeoramiento del linfedema y al mismo tiempo favorecer el desarrollo de nuevas infecciones, lo que afecta enormemente la calidad de vida de las personas que lo padecen.

Otra complicación corresponde al linfagiosarcoma, una neoplasia asociada al linfedema, pero de muy baja frecuencia, y que es común que se desarrollen en los brazos después de la cirugía por cáncer de mama, donde el principal riesgo de esta neoplasia se atribuye a un deterioro en los mecanismos de inmunovigilancia en el área afectada.

Como ya se mencionó anteriormente no existe un tratamiento para el linfedema, sino que solo medidas paliativas para mejorar la calidad de vida de las personas que lo padecen. Además, uno de los principales inconvenientes de esta patología es que resulta prácticamente imposible detectarla a tiempo, debido a la falta de marcadores moleculares que permitan determinar si un paciente es propenso o no a sufrir linfedema. Investigaciones recientes, han arrojado la presencia de ciertas moléculas las cuales se encuentran alterados en pacientes con linfedema como en modelos murinos de linfedema secundario, lo cual indica que pueden existir ciertas moléculas circulantes en pacientes con linfedema y que puedan utilizarse como marcadores predictivos tempranos del desarrollo de linfedema.

4. ACIDO HIALURONICO

El ácido hialurónico (HA), es un glicosaminoglicano de alto peso molecular compuesto por disacáridos repetitivos de ácido D- glucorónico y N-Acetil-D- Glucosamina, unidos por enlaces β (1-3) y que forma parte de la matriz extracelular del tejido conectivo. Su rol principal es la protección físico-química de la membrana plasmática y reducir la producción de citoquinas proinflamatoria. Además, destaca su capacidad para almacenar agua, aumentando hasta 50 veces su peso seco lo que le confiere alta elasticidad. Se encuentra ampliamente distribuido en distintos tejidos del cuerpo, donde es sintetizado para luego ser transportado en la linfa por los vasos linfáticos y catabolizado en los nodos linfáticos y en el hígado.

El HA se sintetiza en la membrana plasmática, por la acción de enzimas de membranas denominadas sintasas del ácido hialurónico, de las cuales hay 3 formas que se expresan en vertebrados (HAS1, HAS2 Y HAS3) y lo hacen de forma diferencial en los tejidos. La síntesis ocurre en la cara citosólica de la membrana plasmática donde se van ensamblando los monosacáridos, y a medida que se va sintetizando la cadena de ácido hialurónico va siendo transferida al espacio extracelular. (23)

HA se metaboliza en los ganglios linfáticos, antes de ingresar a la circulación sistémica, y se degrada aproximadamente un 30 % en el hígado, por lo que la vasculatura linfática corresponde a la principal vía de transporte de HA desde los tejidos.

Investigaciones recientes, han encontrado que pacientes con linfedema presentan niveles de HA más altos en los tejidos afectados en comparación con los normales. Teniendo en cuenta que la vasculatura linfática corresponde a la vía de tránsito del HA, por lo que cualquier daño que afecte dicha vasculatura genera cambios en el metabolismo y degradación del HA, esto generaría la acumulación en el intersticio de dicha molécula. A su vez, dificultaría el tráfico de células inmunes y

por consiguiente la liberación de citoquinas. Estos acontecimientos, dan lugar a cambios físicos asociados con el linfedema, generando incapacidad de las extremidades afectadas y dolor. (24)

También se han realizado estudios empelando un tratamiento con hialuronidasa, enzima encargada de la degradación del HA, en un modelo murino de linfedema. Se ha observado que el tratamiento con hialuronidasa genera beneficios terapéuticos en el desarrollo del edema, lo que confirma aún más la sospecha de que el HA podría ser considerado como un potencial biomarcador de daño linfático. (25)

5. LEUCOTRIENOS

Los Leucotrienos son mediadores lipídicos de corta duración y corresponden a un producto del metabolismo del ácido araquidónico (AA). Es producido por células blanco en respuesta a alguna infección, promoviendo la migración de neutrófilos y otras células inmunes al endotelio. Los leucotrienos corresponden a moléculas derivadas del AA, mediante la acción de la enzima 5-Lipooxigenasa. Deben su nombre a que fueron aislados desde leucocitos (leuko) y que hace alusión a tres enlaces conjugados en su estructura (trienos).

El AA, es liberado de los fosfolípidos de membrana gracias a la acción de la enzima Fosfolipasa A2, y puede ser metabolizado por dos vías enzimáticas. Por un lado, puede ejercer su acción la ciclooxigenasa (COX), de la cual van a derivar prostaglandinas y tromboxanos; y por acción de la Lipoxigenasa, se originan los Leucotrienos. Es por la acción de esta segunda vía enzimática, en la cual el AA, se transforma por la acción combinada de la 5-lipoxigenasa (5-LO), y de su proteína activante (FLAP) a nivel de la membrana celular en ácido- 5-hidroxi-peroxieicosatetraenoico (5-HPETE), y en Leucotrieno A4 (LTA4). Este último compuesto resulta inestable, por lo que es transformado inmediatamente por la acción de Leucotrieno A4 hidrolasa en leucotrieno B4 (LTB4), y leucotrieno C4 (LTC4), mediante procesos de hidrólisis. Ambas moléculas son transferidas al espacio extracelular donde el LTC4 es transformado de manera secuencial en leucotrieno D4 y leucotrieno E4 (26) (Figura 1).

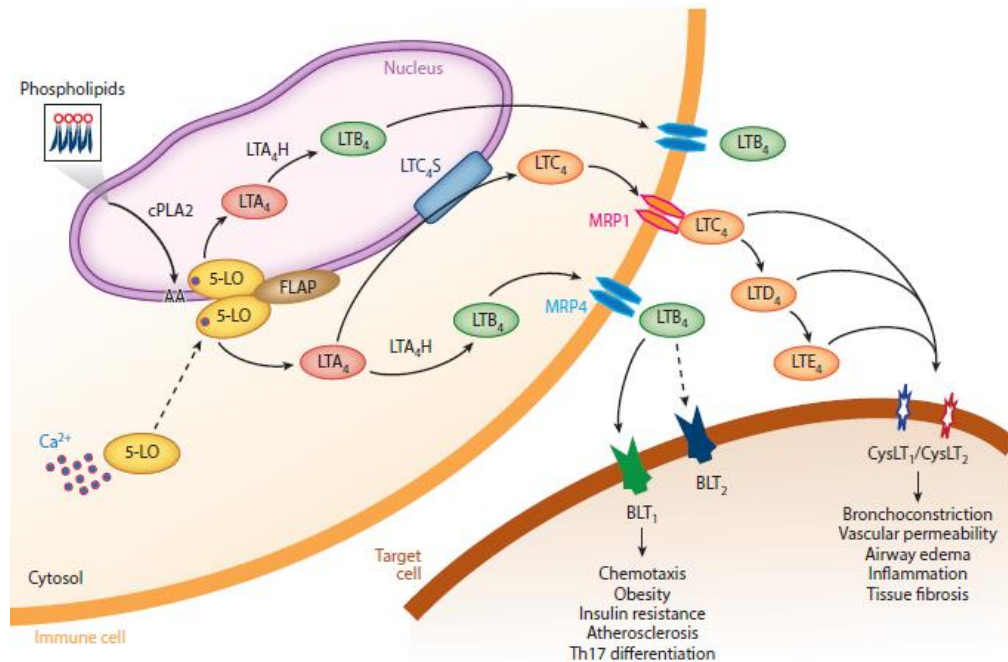


Figura 1: Proceso de síntesis de Leucotrienos. (Xinguo Jiang, Mark R. Nicolls, Wen Tian, and Stanley G. Rockson. Lymphatic Dysfunction, Leukotrienes, and Lymphedema.)

Los Leucotrienos realizan sus funciones uniéndose a receptores acoplados a proteína G, BLT1 Y BLT2 actúan como receptores para LTB₄, mientras que para la acción de LTC₄ Y LTD₄ se requieren de receptores de tipo cisteinil (CysLT₁ y CysLT₂).

BLT1 presenta una afinidad 20 veces mayor por LBT₄, por lo que la mayoría de las funciones biológicas se asocian a este receptor, es por esto, que las funciones de LTB₄ se consideran pro inflamatorias, ya que es un fuerte quimioatrayente y activador de leucocitos; sin embargo se ha descrito que las funciones de LTB₄ varían según la célula diana. Se ha visto, por ejemplo, que en células madres hematopoyéticas, LTB₄ puede inducir la diferenciación en células progenitoras y además se tiene evidencia que LTB₄ participa en enfermedades crónicas como

obesidad, diabetes tipo 2 o en la aterosclerosis, provocando el reclutamiento de monocitos y macrófagos que estimulan el proceso patológico.

Una de las funciones mejor conocidas del LTB₄ es su actividad sobre los neutrófilos, ya que es capaz de promover la migración de polimorfonucleares, al mismo tiempo que bloquea la apoptosis de estos e induce la liberación de los gránulos de neutrófilos, con la generación de especies reactivas del oxígeno. (3)

Recientes investigaciones en modelos murinos, han presentado el papel de LTB₄ en la patogénesis del linfedema, y su contribución al proceso inflamatorio que permite el mantenimiento de la enfermedad. Tian y colaboradores (28) expusieron en su trabajo el rol de LTB₄ y cómo este se encuentra aumentado en suero de ratones inducidos por linfedema, ya que se ha evidenciado que un bloqueo de LTB₄ revierte el edema en un modelo de inducción de linfedema secundario, sugiriendo un rol inductor de edema, y evaluando a esta molécula como posible biomarcador temprano de linfedema.

6. QUIMIOQUINAS

Las quimioquinas corresponden a proteínas de pequeño peso molecular (8-10 kDa), con una estructura secundaria altamente conservada y que poseen como principal función regular la migración y activación de poblaciones de leucocitos circulantes hacia los sitios dañados.

Para que estas quimioquinas puedan ejercer su acción se requiere de la expresión de un receptor de quimioquina complementario. Estos receptores pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteína G, los que corresponden a receptores de 7 dominios transmembrana, que se unen a sus ligandos extracelulares e inician la señal intracelular. En el caso de las quimioquinas, cuando estas se unen a su receptor se crea una señal en la cascada del calcio que resulta en una activación de GTPasas pequeñas. Esto a su vez provoca una señal intracelular con efectos tales como activación de integrinas y polimerización de actina, resultando la formación de pseudópodos, polarización de la morfología celular y finalmente el movimiento de la célula. (29)

Las quimioquinas se agrupan de acuerdo a la composición de aminoácidos, especialmente a los dos primeros residuos de cisteínas. De acuerdo a esto, se clasifican principalmente en CC y CXC. CC se refiere a que presenta las dos primeras cisteínas amino terminales adyacentes. Un ejemplo de esta corresponde a la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1 O CCL2) que induce a los monocitos a liberarse al torrente sanguíneo, mientras que CXC, posee las dos primeras cisteínas separadas por otro aminoácido. También se pueden agrupar en base a su función, según sean inflamatorias u homeostáticas. Las primeras son producidas cuando un tejido libera citocinas inflamatorias, y funcionan reclutando leucocitos. Las homeostáticas, juegan un papel crucial en la migración de linfocitos, y en el desarrollo de órganos linfoides.

CCL12 corresponde a una proteína murina pequeña, perteneciente a la subfamilia de quimioquinas CC y que se caracteriza por ser un potente quimioatractivo de eosinófilos, monocitos y linfocitos, pero no de neutrófilos. CCL12 presenta dos homólogos murinos, CCL2 Y CCL12 con su receptor CCR2, el cual afecta el tráfico de las células inflamatorias.

Durante un proceso de infección, los macrófagos pueden producir grandes cantidades de CCL12, induciendo migración de células inmunes hacia el sitio de la infección. El bloqueo de CCL12/CCL2 en animales ha demostrado mejorías en una condición de acumulación de líquido en el tejido pleural del pulmón, producido por una filtración de líquido desde el tejido vascular, sugiriendo un rol inductor del edema en esta patología (30). Finalmente, y considerando resultados preliminares de nuestro laboratorio, en los que los niveles de CCL12 se encuentran aumentados en ratones heterocigotos para Prox1 (Prox1^{+/-}), un modelo animal con vasos linfáticos defectuosos y que se asemeja al linfedema primario, es que proponemos evaluar los niveles de CCL12 y su eventual participación en el desarrollo del linfedema.

7. OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el potencial predictor de desarrollo de linfedema de las moléculas de Ácido hialurónico (HA), Quimioquina ligando 12 (CCL12) y/o Leucotrieno B4 (LTB4) con el fin de generar un test diagnóstico de predicción de la enfermedad.

Objetivos Específicos

- Evaluar los niveles de las moléculas HA, CCL12 y LTB4 en sangre a distintos estadios de desarrollo de linfedema en modelos murinos de linfedema primario y secundario mediante test de ELISA.
- Correlacionar los niveles de estas moléculas con el desarrollo de la patología, a fin de determinar su poder predictor de la enfermedad.

8. MATERIALES Y METODOS

8.1 Ratones

Se utilizaron ratones machos y hembras *wild type (WT)* C57BL6 de 10 a 12 semanas de edad, a los cuales se les indujo experimentalmente un daño en la vasculatura linfática (linfedema secundario). Estos ratones se alojaron en el bioterio de la Universidad Autónoma, sede Talca, los cuales están sometidos a ciclos de luz oscuridad de 12 horas rotativas y acceso de comida y agua *ad libitum*.

8.1.1 Modelo de linfedema secundario

Para el grupo control, se utilizaron 5 ratones *WT* C57BL6 de 10 a 12 semanas de edad. El procedimiento experimental al cual se sometieron es el siguiente: los ratones fueron anestesiados mediante inhalación de isoflurano al 3% y se les realizó una incisión circunferencial completa a 1,5 cm de distancia de la base de la cola. A estos ratones solo se les realizó la incisión circunferencial sin cauterización para evitar el daño linfático. Para el grupo tratado (linfedema), se utilizaron 5 ratones *WT* C57BL6 de 10 a 12 semanas de edad, y el procedimiento para dañar la vasculatura linfática consiste en realizar la incisión completa a 1,5 cm de distancia de la base de la cola seguido de cauterización controlada, la cual ha sido descrita previamente en modelos murinos que produce el linfedema de la zona afectada. A todos los animales, se les efectuó registro fotográfico de la cola y la medición del diámetro de la cola con un pie de metros los días -1, día 0, 1, 2, 4, 5, 8, 14 y 22. Además se tomaron muestras de sangre en los días -1, 1, 2, 5, 8 y 22 para evaluar los cambios en los niveles de biomarcadores a medida que va evolucionando el linfedema (Figura 2). Las muestras de suero fueron guardadas a -20 °C, hasta el término del experimento.

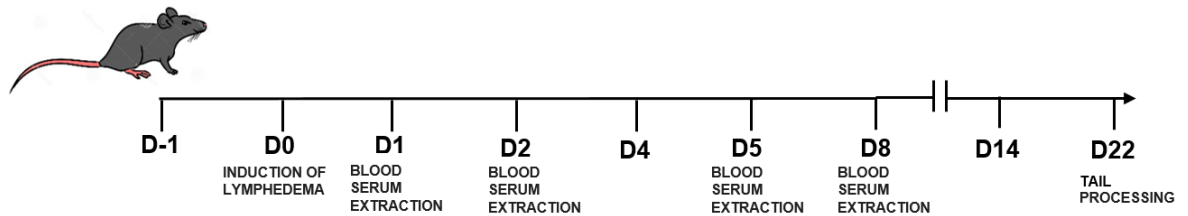


Figura 2: Esquema del diseño experimental para el modelo de linfedema secundario inducido en ratones *WT*

8.1.2 Protocolo de extracción de sangre/ suero

Se tomaron muestras de suero a los días -1, 1, 2, 5,8 y 22 a cada ratón, tanto del grupo control como tratado a través de sangrado retro-orbital con capilar de vidrio. Se obtuvieron aproximadamente 200 µl de sangre por animal. Para compensar la pérdida de sangre que sufren los animales y mantener la hidratación de estos, se inyectó 200 µl de suero fisiológico 0,9 % por vía subcutánea inmediatamente después de la recolección de sangre. La sangre se dejó por 45 minutos a 37 °C en cámara de cultivo y luego se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos para obtener suero, el cual fue guardado a -20° C hasta la realización de las mediciones.

8.2 Análisis estadístico

Para realizar los análisis de correlación, se utilizó el programa Graph Prism4, mediante el uso de la correlación de Pearson con un intervalo de confianza de 95%. Para análisis de comparación, se utilizó test t de student y ANOVA según corresponda.

8.3 Evaluación de biomarcadores mediante técnica de ELISA

Los biomarcadores que se analizaron corresponden al Acido Hialurónico (HA), Quimioquina C-C motivo ligando 12 (CCL12) y Leucotrieno B4 (LTB4). Estos fueron evaluados empleando la técnica de ELISA tipo sándwich en plasma de ambos modelos de linfedema. Para HA se utilizó el kit de detección de HA cuantitativo de *R&Dsystem* (número de catálogo: DGYAL0). Para la detección de CCL12 se empleó el kit de detección CCL12 cuantitativo de *R&Bsystem* (número de catálogo: MCC120) y para la detección de LTB4 el kit de detección de Leucotrieno B4 multi-especie (número de catálogo: EHLTB4) de Thermo Fisher. En todos los casos, se siguieron las instrucciones provistas por cada kit.

8.4 Análisis de la vasculatura linfática por técnica de inmunofluorescencia

Para analizar el daño sufrido en la vasculatura linfática y los cambios morfológicos que podrían ocurrir en ella, los animales fueron sacrificados a distintos días y se les extrajo 1 cm de cola del área de la incisión. Estos trozos de cola fueron fijados en solución de paraformaldehído al 4% en PBS durante toda la noche y lavadas al día siguiente en PBS. Posteriormente las muestras fueron descalcificadas en solución de EDTA 0,5 M pH 8.0 por 3 semanas bajo agitación constante. Finalmente, las muestras fueron deshidratadas en un gradiente de sacarosa en PBS y embebidas en OCT y almacenadas a -80°C para su posterior análisis. Las muestras fueron seccionadas en criostato a 30-40 µm de espesor. Las secciones transversales de las colas se teñeron (control y tratado) con anticuerpo primario dirigido contra Prox1 (*Rabbit*) en una concentración de 1:200, el cual tiñe los núcleos de las células endoteliales linfáticas. Adicionalmente, se utilizó un anticuerpo anti-Lyve1 (*Guinea pig*) a dilución 1: 1000. Ambos marcadores (Prox1 y Lyve1) se usaron como marcadores de vasculatura linfática. Las imágenes fueron visualizadas por microscopio de fluorescencia Olympus BX51.

9. RESULTADOS

9.1 Evaluación de la vasculatura linfática posterior a la inducción de linfedema secundario

Para evaluar el linfedema secundario, se trabajó con dos grupos de animales WT C57BL6: al grupo control se le realizó un corte superficial a 1,5 cm desde la base de la cola, mientras que, al grupo tratado, luego de este corte superficial se le realizó la cauterización de la herida, para provocar el daño en la vasculatura linfática e inducir linfedema secundario. Se midió el diámetro de la cola y se tomaron fotografías a distintos días, para evidenciar la evolución del linfedema (Figura 3).

La figura 3A es un ejemplo del grupo control donde se realiza el corte sin cauterización, observándose la ausencia de linfedema al día 5. La figura 3B muestra un ejemplo del grupo tratado, el cual, luego de la incisión se le realizó la cauterización de la herida, provocando daño a la vasculatura linfática y formación del linfedema, el cual se observa claramente al día 5. La evolución a distintos días de ambos grupos se observa en la figura 3C. El linfedema presenta un *peak* alrededor del día 4 y es aún evidente al día 22 (Figura 3C).

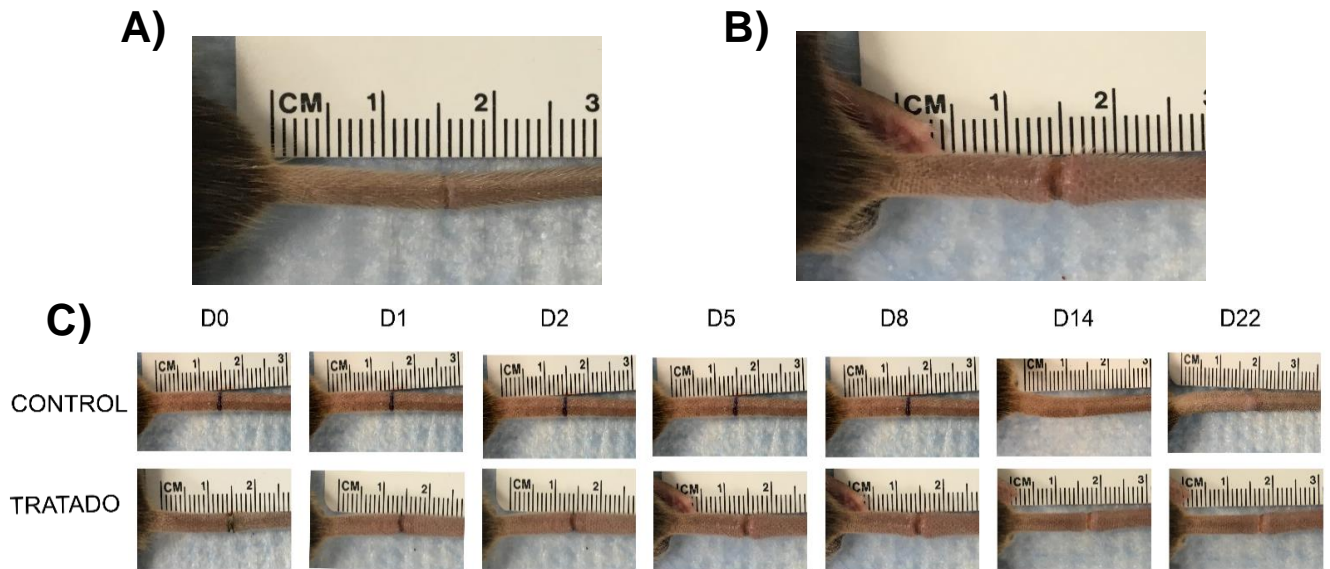


Figura 3: Modelo de Linfedema en cola de ratón en ratones WT C57BL6 de 10 a 12 semanas de edad. En 3A) se muestra un ratón control, al cual se le realiza el corte con bisturí, (1,5 cm de la base de la cola), con lo que se daña sólo la capa más externa de la piel, pero sin llegar a dañar capas más profundas donde se encuentran los vasos linfáticos. Fotografía representativa de día 5 de 10 ratones en 2 experimentos independientes. En 3B) se representa un ratón WT tratado que se sometió al corte, pero también a la cauterización de la zona afectada, con lo que se logra dañar la vasculatura linfática y la generación del linfedema secundario. Fotografía representativa de día 5 de 10 ratones en 2 experimentos independientes. 3C) Progreso de la lesión en grupo control y grupo tratado a los días 0,1,2,5,8,14 y 22.

El cambio observado en el diámetro de la cola fue registrado y cuantificado como porcentaje de cambio (Figura 4). Se observa que el grupo control (n= 10) mantiene el diámetro a lo largo de los días, conservando el diámetro de 3 mm (100%), lo que evidencia la ausencia de linfedema. En cambio, el grupo tratado (n= 10), se observa la acumulación de líquido y presencia de linfedema a partir del día 4 (Figura 4A).

A)

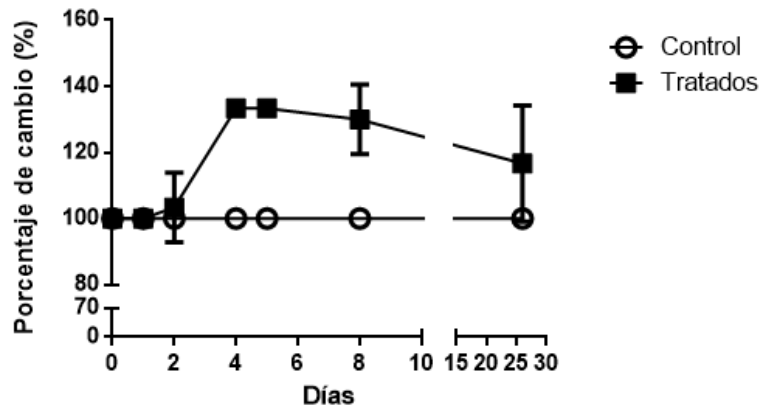


Figura 4. Desarrollo de linfedema a partir de día 4 post-inducción. A) Se muestra el porcentaje de cambio con respecto a la medida inicial del diámetro de la cola. Para ambos grupos se tiene n = 10 de dos experimentos independientes.

9.2 Evaluación del estado morfológico de la vasculatura linfática mediante inmunofluorescencia indirecta.

Se realizó tinción de inmunofluorescencia en secciones de cola de ratones en el área del linfedema a los días 1, 2 y 24, para evidenciar los cambios morfológicos de la vasculatura linfática. Se utilizó el marcador Lyve-1 que forma parte de la membrana de las células endoteliales que conforman el vaso linfático, y DAPI para teñir núcleos celulares. En el control de los distintos días, se observó poca cantidad de vasos linfáticos en la periferia de la sección sometido a tinción de Lyve-1, en aumentos de 10x y 40x. Por otro lado, en el grupo tratado se observó el aumento en el número y área de vasos linfáticos, junto con la remodelación de la vasculatura linfática. (Figura 5A) En la figura 5B, se muestra la cuantificación realizada al área de vasos linfático, versus área total del tejido analizado en los días 2 y 24. El día 1 no se pudo realizar la cuantificación por la destrucción de los vasos linfáticos después de la cirugía en el grupo tratado.

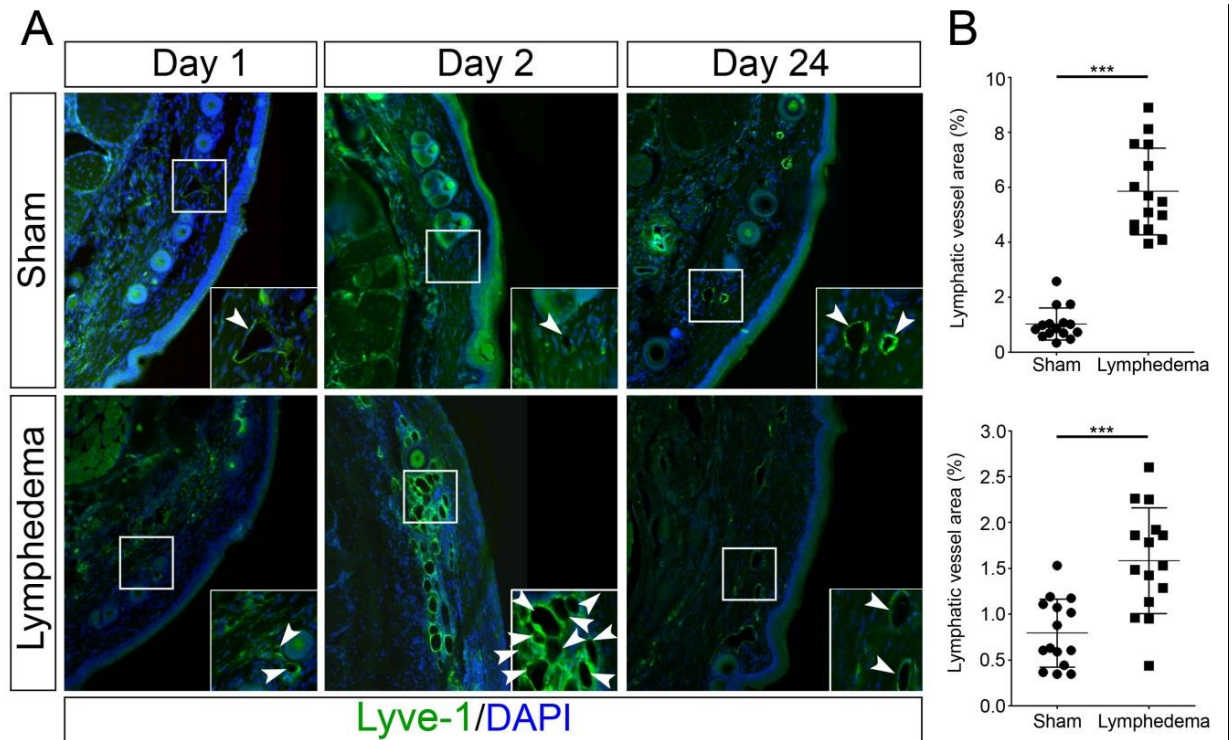


Figura 5. Ratones tratados presentan diferencias morfológicas en la vasculatura linfática al día 1, 2 y 24. Se analizaron secciones de cola en distintos días (1, 2 y 24) mediante inmunofluorescencia. A) Se observa el corte del ratón control en 10x y una magnificación a 40x en los días 1, 2 y 24 para el grupo control (Sham) y tratado (Lymphedema). B) Se realizó la cuantificación del área del vaso linfático durante el curso del linfedema en los días 2 (gráfico superior) y 24 (gráfico inferior). La tinción en verde corresponde a Lyve-1. Azul corresponde a DAPI. Las flechas indican la presencia de vasos linfáticos. Se observa la remodelación de la vasculatura linfática a partir del día 2. Se muestran los datos agrupados de 2 experimentos independientes ($n \geq 6$ ratones por grupo). Las barras de error indican DS. *** $p < 0,0001$ por prueba t de student.

9.3 Medición de posibles marcadores predictores de Linfedema

El principal objetivo del presente estudio es encontrar marcadores que puedan predecir la formación del Linfedema de manera temprana, por lo que solo se consideran para exposición de los resultados los días previos a la formación del Linfedema.

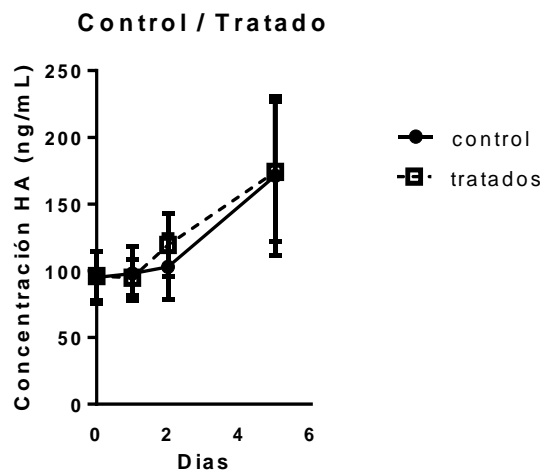


Figura 6. Concentración de Ácido Hialurónico en suero a los días 0,1, 2 y 5 post-operación. Ambos grupos siguen una tendencia similar sin diferencias significativas. Para ambos grupos se tiene $n = 10$ de dos experimentos independientes.

Medición de niveles de ácido hialurónico

El análisis de la concentración de Ácido Hialurónico (HA) nos muestra un aumento de su concentración en ambos grupos sin presentar diferencias significativas. Un análisis más detallado se muestra en las figuras 7 y 8.

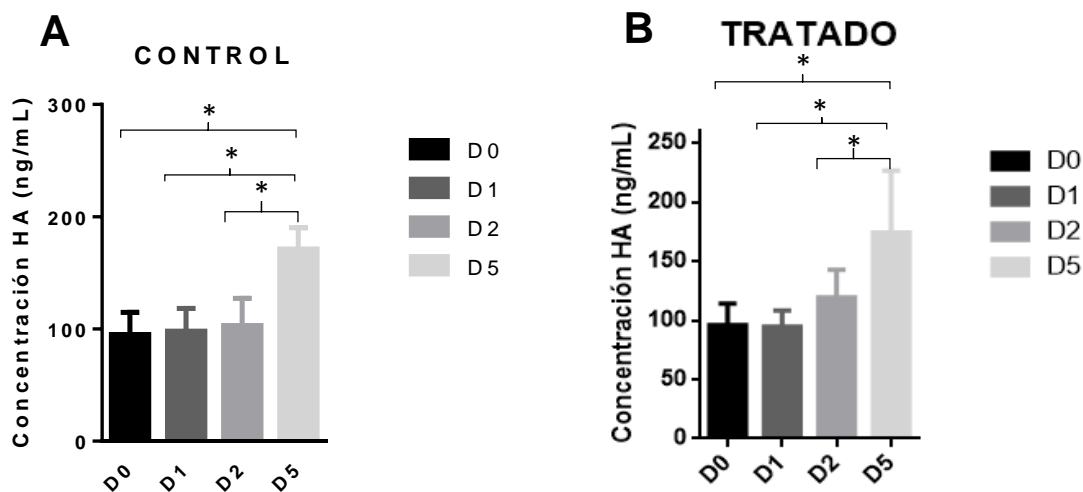


Figura 7. Progresión de los niveles de HA en los grupos Control y Tratados a los días 0, 1, 2 y 5. A) Niveles de HA en el grupo control con diferencia significativa entre el día 5 y los días 0, 1 y 2. B) Niveles de HA en el grupo tratado con diferencia significativa entre el día 5 y los días 0, 1 y 2. Para ambos grupos se tiene n = 10 de dos experimentos independientes.

En la Figura 7 se observan los niveles de HA en los días 0, 1, 2 y 5 de manera independiente en cada grupo: en el grupo control se pueden observar que las concentraciones de este van aumentando a medida que se va generando el linfedema. De acuerdo al análisis estadístico, se establece que existe diferencias significativas entre el día 5 y los días 0,1 y 2 (Figura 7A). Por otro lado, en el grupo tratado se observa que los niveles de este van en aumento a medida que avanzan

los días, lo que evidencia que a medida que se va generando el linfedema, las concentraciones de HA van en alza, encontrando diferencias significativas entre el día 5 y los días 0,1 y 2, sin embargo, no existen diferencias significativas, en comparación al grupo control (Figura 7B).

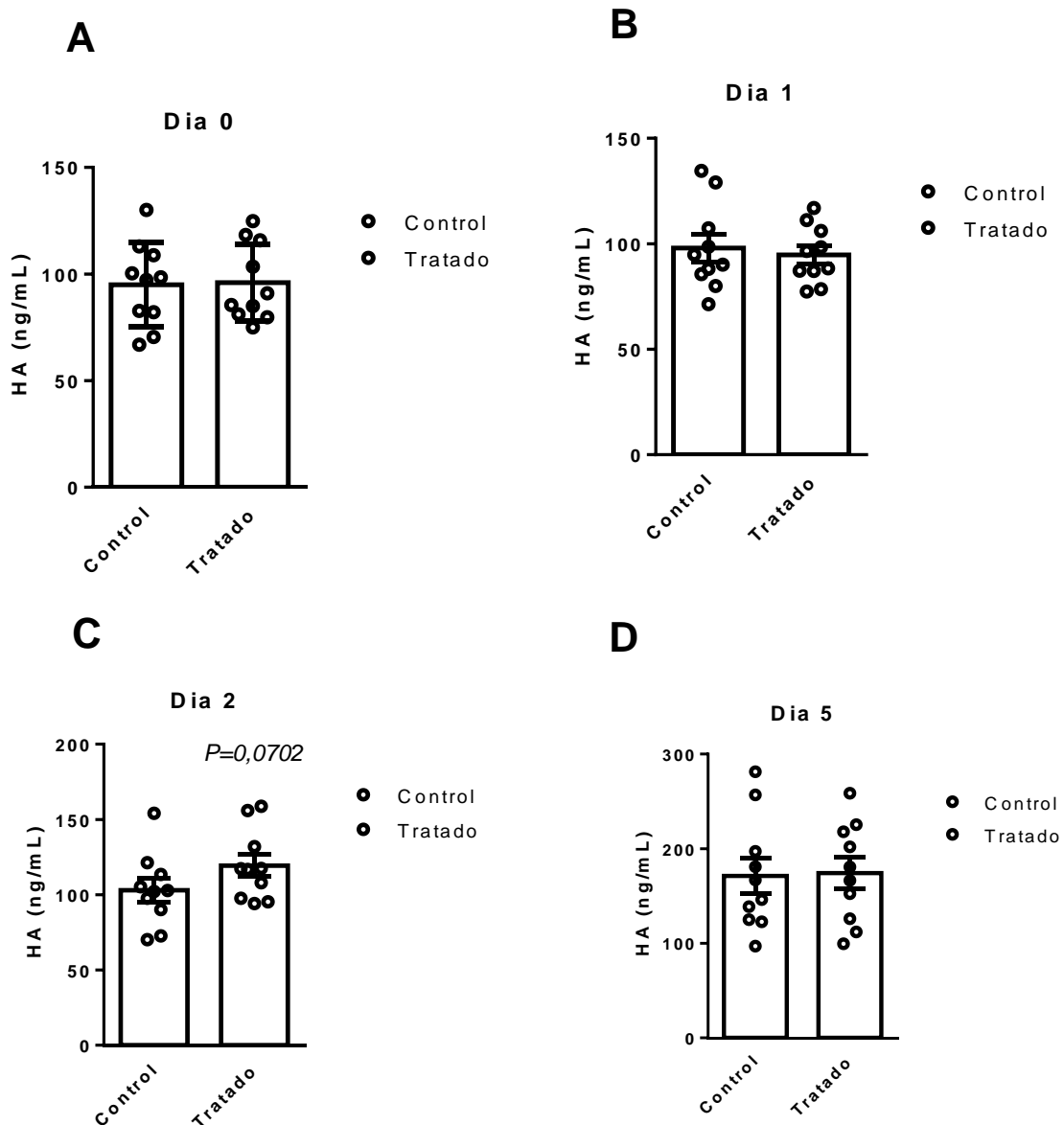


Figura 8: Análisis de concentración de HA mediante ELISA a días 0, 1, 2 y 5. No se encontraron diferencias significativas entre las mediciones, sin embargo, se observa una tendencia al alza en los

niveles de HA en el ratón tratado al día 2. Para ambos grupos se tiene n = 10 de dos experimentos independientes.

Al analizar día por día los niveles de HA en grupos tratados versus controles, se observa una tendencia al aumento de HA en grupo tratado a día 2, pero sin alcanzar significancia (Figura 8C). Estos resultados sugieren que HA por sí solo no es un buen predictor de la formación temprana de Linfedema.

Medición de niveles de Leucotrieno B4

Los resultados de las mediciones para conocer el nivel de Leucotrieno B4 (LTB4) mediante ELISA, muestra que el grupo control presenta valores de LTB4 más altos en comparación al grupo tratado. El mayor cambio se presenta al día 1 y 2, donde se observa una caída considerable en los niveles de LTB4 en ambos grupos (Figura 9).

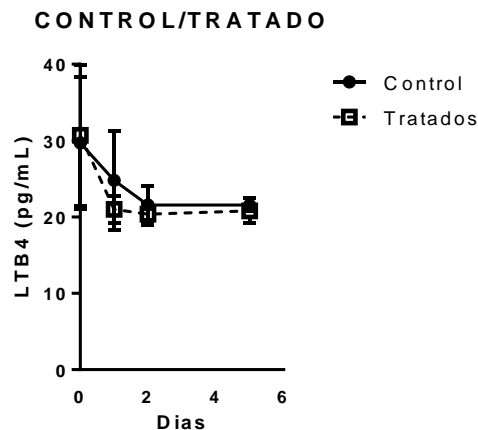


Figura 9. Concentración de Leucotrieno B4 a los días 0,1, 2 y 5. Se observa una marcada disminución de LTB4 en el grupo control a días tempranos post-operación. Para ambos grupos se tiene n = 10 de dos experimentos independientes.

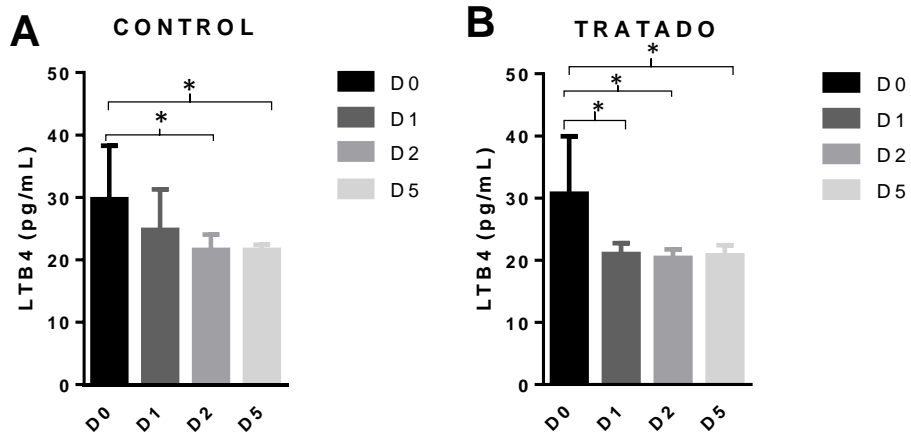


Figura 10. Progresión de los niveles de LTB4 en los grupos Control y Tratados a los días 0, 1, 2 y 5. A) Niveles de LTB4 en el grupo control con diferencia significativa entre el día 2 y el día 0, y también entre el día 0 y día 5. B) Niveles de LTB4 en el grupo tratado con diferencia significativa entre el día 0 y los días 1, 2 y 5. Para ambos grupos se tiene n = 10 de dos experimentos independientes.

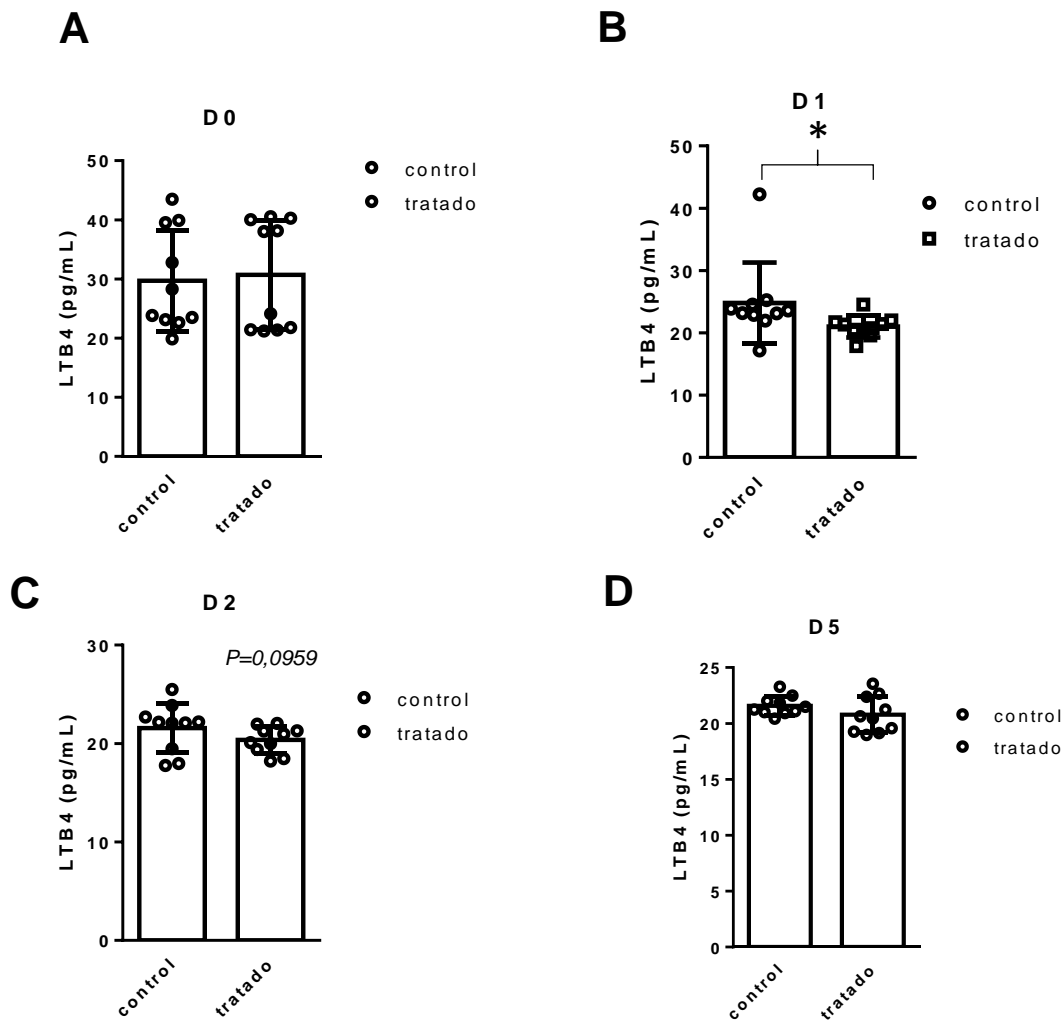


Figura 11: Análisis de concentración de LTB4 mediante ELISA a días 0, 1, 2 y 5 post inducción de linfedema. Se observa diferencia significativa al día 1. Para ambos grupos se tiene $n = 10$ de dos experimentos independientes.

Al comparar los niveles de LTB4 de ambos grupos individualmente con respecto al día (Figura 11), se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y tratado al día 1, con $p = 0,0467$ y una tendencia a la disminución al día 2 ($p=0.1$). El resto de los días no presentan diferencias significativas.

En base a los resultados anteriores, sería posible decir que los niveles de LTB4 sanguíneos tienen una débil característica predictora del desarrollo de linfedema.

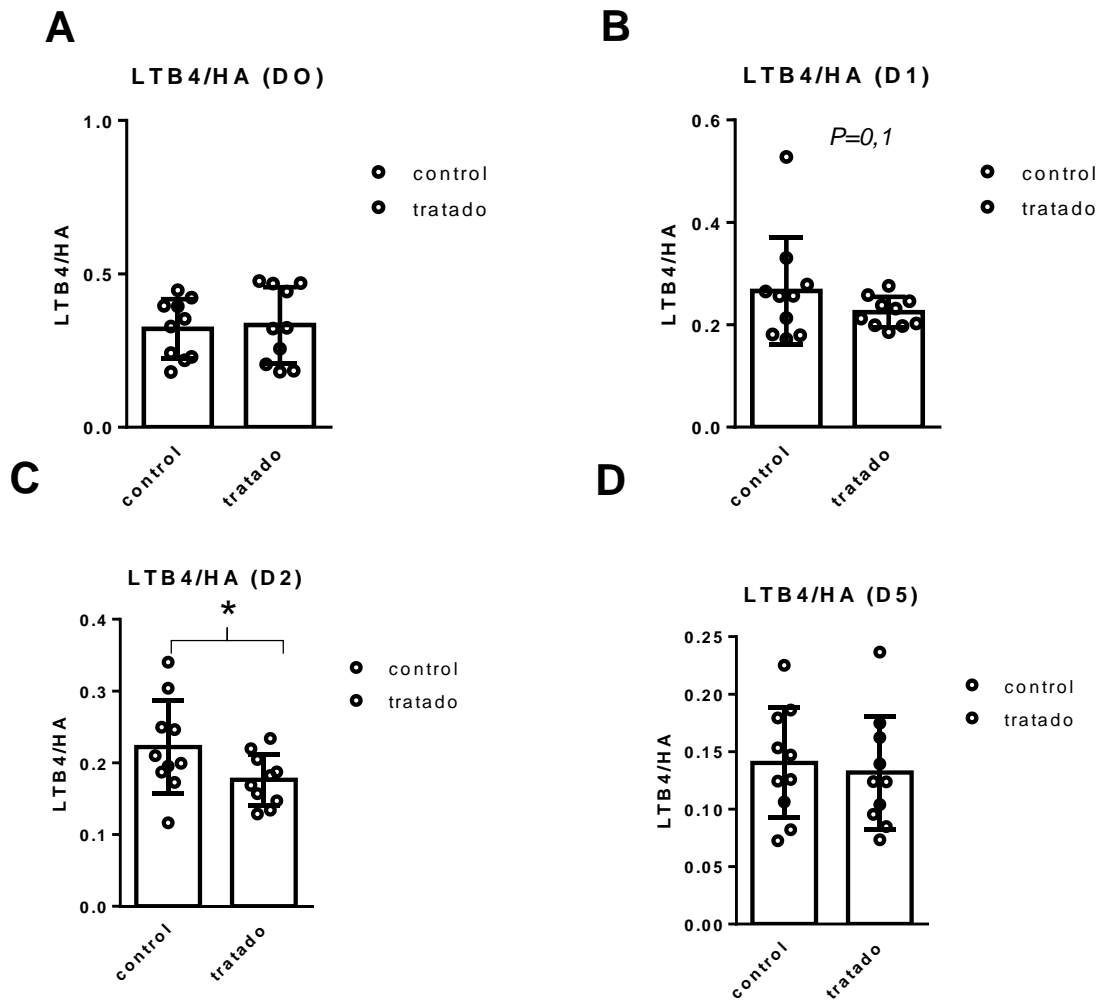


Figura 12: Evaluación de la relación LTB4/HA mediante ELISA a días 0, 1, 2 y 5. Se observa diferencia significativa al día 2. Para ambos grupos se tiene $n = 10$ de dos experimentos independientes.

Como ambos marcadores por separado no mostraron diferencias significativas, se evaluó una relación entre ambos y su capacidad predictora (Figura 12). Al analizar la relación LTB4/HA, se observa una marcada disminución del grupo tratado versus control al día 2 ($p=0.0337$), y una tendencia a la disminución al día 1 ($p=0,1$). Más aún, al analizar esta relación con el grado de gravedad del linfedema, definida como:

$$\text{Score} = \frac{\text{Día de aparición de linfedema}}{\text{Duración de linfedema}}$$

Se observa una correlación inversa, mientras menor es la relación LTB4/HA, más grave será el desarrollo de linfedema (Figura 12). Es posible por tanto concluir que la relación LTB4/HA es un buen marcador predictor de desarrollo de linfedema secundario en ratón, y, por ende, tiene potencial para convertirse en un biomarcador predictor de linfedema en humanos.

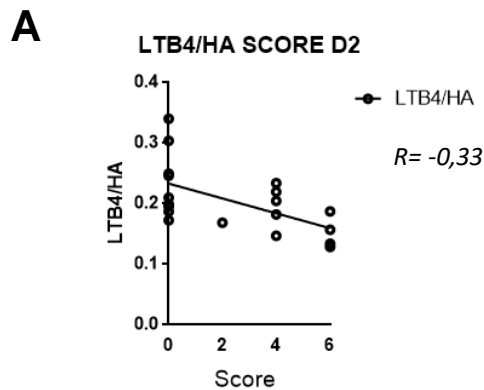


Figura 13: Análisis de concentración entre relación LTB4/HA al día 2 y el score asignado a cada animal. Se correlacionan los niveles bajos de LTB4/HA con la gravedad del linfedema, dado por un score mayor.

Medición de niveles de Quimioquina CCL12

Las mediciones de Quimioquina CCL12 se realizaron por ELISA sándwich. Los valores se encontraron por debajo del límite de detección, por lo que no se obtuvieron resultados.

10. DISCUSION

En el presente trabajo realizado, se analizó el comportamiento que presentaban tres posibles marcadores en el desarrollo del linfedema secundario: el Ácido Hialurónico, Leucotrieno B4 y Quimioquina CCL12.

Los estudios se realizaron en un modelo murino de linfedema secundario. Se dividieron en dos grupos: grupo control, al cual se le realizó un corte a 1,5 cm de la base de la cola para evadir el daño linfático y el grupo tratado al cual se le cauterizó el lugar del corte para provocar daño en la vasculatura linfática de la dermis, y con esto provocar el aumento progresivo de edema en la cola en los ratones afectados generando el linfedema. Este modelo de inducción de linfedema de cola, es un modelo que se encuentra bien establecido en la literatura, ya que corresponde a un método no invasivo y simple de realizar.

Quimioquina CCL12 se ha visto implicado en procesos de inflamación por lo que se analizaron los niveles en el modelo de linfedema, sin embargo, los valores que encontramos fueron por debajo del límite de detección permitido por el kit, por lo que no pudimos utilizar CCL12 como posible marcador.

Ácido Hialurónico (HA) ha sido descrito en la literatura como un posible marcador predictor de linfedema ya que los estudios clínicos han revelado que los pacientes con linfedema exhiben 8 veces más HA acumulado en sus brazos y piernas en comparación con los pacientes control. En nuestros resultados mostraron que los niveles de HA aumentan a medida que se va desarrollando el linfedema. Considerando que solo se midieron los niveles de este metabolito antes del desarrollo de los signos del linfedema, no se observan diferencias significativas con el grupo control. . Previa investigación han descrito que la concentración de HA en el líquido intersticial de una extremidad con linfedema, fueron significativamente más altos que en el líquido intersticial, suero y linfa de las extremidades normales, por lo que se postula que el HA se estanca en las extremidades con un drenaje

linfático deficiente (30). Otro estudio propuesto por Liu, N.F y colaboradores establecieron que los niveles de HA en el líquido intersticial de una extremidad linfedematosa fueron significativamente más altos en comparación a la extremidad normal, por lo que sugieren que el bloqueo de drenaje de la vasculatura linfática puede afectar la degradación del HA y el estancamiento de este en la extremidad puede ejercer un efecto perjudicial (24). Otros estudios en los cuales se ha examinado el rol de ciertas citoquinas pro inflamatorias en la patogenia del linfedema, se ha visto que los cambios morfológicos que presentaban se debían principalmente a la inflamación persistente, lo que generaba fibrosis en los tejidos afectados. Es por esto que se ha utilizado como tratamiento hialuronidasa, enzima encargada de la degradación del HA y se han observado en estudios realizados tanto in vivo como in vitro que la hialuronidasa reduce significativamente los niveles de HA en las capas de la dermis y subdermis por lo que se espera que se reduzca el volumen del linfedema. (25)

En el caso de Leucotrieno B4, se estudiaron los niveles de este marcador en el grupo control, el que no presentaba linfedema y el grupo tratado (el que se le indujo la formación de linfedema) y se observó que el grupo control presentaba valores de LTB4 en suero más altos en comparación al grupo tratado. Además observamos que el mayor cambio se presentaba en los días 1 y 2 observándose una caída considerable en los niveles de LTB4 en ambos grupos lo que evidencia que a medida que va aumentando el edema los niveles de LTB4 van disminuyendo, proponiendo que aquellos pacientes que presenten niveles bajos de LTB4 podrían tener una mayor probabilidad de desarrollar linfedema, sin embargo, en la literatura los estudios realizados en los cuales se han utilizados inhibidores de 5-lipooxigenasa, enzima clave en la síntesis de Leucotrieno B4 se ha observado un efecto beneficioso al inhibir esta enzima, ya que el antagonismo de LTB4 revirtió el edema mejoró la función de la vasculatura linfática y restauró la arquitectura de la vasculatura en un modelo de cola murino de linfedema (27). En este estudio, a

diferencia de los resultados obtenidos en este trabajo, se observa que las concentraciones de LTB4 en suero más bajas promovieron el crecimiento de células endoteliales linfáticas, mientras que las concentraciones más altas inhibieron la linfagiogénesis e indujeron la apoptosis, por lo que se estableció que el LTB4 era perjudicial para la remodelación linfática (27.) En este mismo estudio postulan que LTB4 funcionaría como una importante molécula implicada en la cicatrización durante las etapas iniciales de la reparación del tejido postquirúrgico y que cuando la concentración de LTB4 aumenta en un rango patológico elevado tiene la capacidad de disminuir la función de las células endoteliales, exacerbar la disfunción vascular linfática y promover la progresión de la enfermedad, y además se establece que los niveles séricos de LTB4 están significativamente elevados en pacientes con linfedema humano.(27)

Se han estudiado los mecanismos que explican el impacto de LTB4 en las enfermedades linfáticas adquiridas llegando a determinar que concentraciones más altas de LTB4 (400 nM) inhiben el RNAm de VEGFR3 al igual que la expresión y fosforilación de este, además, mayores concentraciones de LTB4 inhiben la señalización de Notch una vía que se sabe es importante para el desarrollo y mantención de la vasculatura linfática. (31)

Como ambos marcadores HA y LTB4 fueron por si solos predictores débiles del desarrollo de linfedema, es que realizamos la correlación entre ambas moléculas para buscar una mejor asociación y permitir en un futuro, que la relación de estos sea capaz de predecir si un paciente puede desarrollar linfedema. Como se expuso en los resultados, se observó una correlación entre ambos, ya que, por un lado los niveles de HA van en alza a medida que va aumentando el edema y LTB4 va disminuyendo. Los valores de ambos marcadores son inversamente proporcionales, es por esto que se establece que dicha razón tiende a disminuir a medida que se va generando el linfedema, y que además es capaz de predecir la severidad con la cual se desarrollará.

El daño de la vasculatura linfática va seguida por una linfangiogénesis rápida, ya que se observó al día 1 una menor cantidad de vasos linfáticos en comparación al día 2 de realizada la cirugía. Para evidenciar el aumento en el área de los vasos, se analizó el porcentaje del tejido total (sección) en el día 2 y 24. Estudios realizados en modelos de linfedema secundario similares al realizado en este trabajo, han observado que el daño en la vasculatura linfática y la hinchazón posterior del tejido, mostraron cambios morfológicos marcados en los linfáticos dérmicos causados por la proliferación de LEC y el posterior agrandamiento de los vasos linfáticos. Al observar los vasos linfáticos durante el edema reveló que la morfología de los vasos estaba alterada, con una hiperplasia durante el periodo en que la hinchazón era mayor. (32)

A pesar de nuestros resultados obtenidos, en la literatura no existen trabajos que avalen dichos resultados, por lo que es necesario realizar más estudios para determinar la validez de dicha razón.

11. CONCLUSION

Concluimos que el HA y LTB4 corresponden a dos moléculas con potencial de poder ser utilizadas en conjunto como predictores del desarrollo de linfedema. El HA presenta un aumento en sus niveles a medida que se va generando el edema, mientras que el LTB4 tiene un comportamiento inverso, es decir, disminuye a medida que se va formando el edema, sin embargo, ambos marcadores por si solos, son predictores débiles del desarrollo de linfedema, por lo que se proponemos realizar una correlación entre ambos dada por la concentración de LTB4/HA. Esta razón podría ser evaluada en muestras humanas con la finalidad de predecir la posibilidad de desarrollar linfedema y la severidad con la cual se puede presentar. Si esta relación tiende a disminuir, existiría una mayor probabilidad de desarrollar linfedema y la severidad de este sería mayor, sin embargo, se necesitan realizar mayores estudios para determinar la real implicancia de esta razón.

12. BIBLIOGRAFIA

1. Oliver G. 2004. Lymphatic vasculature development. *Nat. Rev. Immun.* 4:35–45. [Internet]. [Citado el: 11 Octubre 2018]. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nri1258>
2. Escobedo, N., & Oliver, G. (2016). Lymphangiogenesis: Origin, specification, and cell fate determination. [Internet]. [Citado el: 12 Octubre 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27298093>
3. Xinguo Jiang, Mark R. Nicolls, Wen Tian, and Stanley G. Rockson. Lymphatic Dysfunction, Leukotrienes, and Lymphedema. [Internet]. [Citado el: 11 Octubre 2018]. Disponible en: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-physiol-022516-034008>
4. Irrthum, A., Karkkainen, M. J., Devriendt, K., Alitalo, K., & Vikkula, M. (2000). Congenital hereditary lymphedema caused by a mutation that inactivates VEGFR3 tyrosine kinase. [Internet]. [Citado el: 12 Octubre 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10856194>
5. Rauniyar, K., Jha, S. K., & Jeltsch, M. (2018). Biology of vascular endothelial Growth Factor C in the Morphogenesis of Lymphatic vessels. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. [Internet]. [Citado el: 20 Octubre 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5816233/>
6. Kume, T. (2008). Foxc2 transcription factor: a newly described regulator of angiogenesis. *Trends in cardiovascular medicine*, 18(6), 224-228. [Internet]. [Citado el: 20 Octubre 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2674371/>
7. Petrova, T. V., Mäkinen, T., Mäkelä, T. P., Saarela, J., Virtanen, I., Ferrell, R. E., & Alitalo, K. (2002). Lymphatic endothelial reprogramming of vascular endothelial cells

by the Prox-1 homeobox transcription factor. [Internet]. [Citado el: 05 Octubre 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12198161>

8. Varela Donoso, G. Lanzas Melendo, M.A. Atín Arratíbel, M.V. González López-Arza, Capítulo I: generalidades de los linfedema y de la circulación linfática: patogenia y fisiopatología [Internet] [Citado el: 05-octubre de 2018]. Disponible en: <http://pesquisa.bvsalud.org/bvsvs/resource/pt/ibc-143548>.

9. Keast DH, Despatis M, Allen JO, Brassard. AChronic edema/lymphoedema: under-recognised and under-treated. [Internet]. [Citado el: 05-octubre de 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24618210>.

10. Ji, R. C.Lymphatic endothelial cells, lymphedematous lymphangiogenesis, and molecular control of edema formation. [Internet]. [Citado el: 15 Diciembre 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19093784>

11. Cobo, M. C., Blanco, M. L., Hernández, M. G., de Miguel Benadiba, C., & Álvarez, B. A. Linfedema primario. Rehabilitación. [Internet]. [Citado el: 15 Diciembre 2018]. Disponible en:

12. Arias-Cuadrado, A., Álvarez-Vázquez, M. J., Martín-Mourelle, R., & Jiménez, C. V. D. (2010). Clínica, clasificación y estadiaje del linfedema. [Internet]. [Citado el: 10 Diciembre 2018]. Disponible en: <http://www.limfacentre.com/wp-content/uploads/clinica-clasificacion-y-estadiaje-2010.pdf>

13. Grada, A. A., & Phillips, T. J. (2017). Lymphedema: pathophysiology and clinical manifestations. [Internet]. [Citado el: 15 Diciembre 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29132848>

14. Stanley G, Rockson SG. Diagnosis and management of lymphatic vascular disease. [Internet]. 2008; 52: 799-806. [Citado el: 05-octubre de 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18755341>.

15. Daniel-Spiegel E, Ghalamkarpour A, Spiegel R, Weiner E, Vikkula M, Shalev E, et al. Hydrops fetalis: an unusual prenatal presentation of hereditary congenital lymphedema. [Internet]. [Citado el: 20 Diciembre 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16231305>
16. Norrmén, C., Ivanov, K. I., Cheng, J., Zangger, N., Delorenzi, M., Jaquet, M., & Augustin, H. G. (2009). FOXC2 controls formation and maturation of lymphatic collecting vessels through cooperation with NFATc1. [Internet]. [Citado el: 16 Diciembre 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19398761>
17. Fang J, Dagenais S, Erickson R, Arlt M, Glynn M, Gorski J et al. Mutations in FOXC2 (MFH-1), a Forkhead Family Transcription Factor, Are Responsible for the Hereditary Lymphedema-Distichiasis Syndrome. 2018. [Internet]. [Citado el: 16 Diciembre 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11078474>
18. Bolcal C, Lyem H, Sargin M, Mataraci I, Doganci S, Kilic S. Primary and secondary lymphoedema in male patients with oedema in lower limbs. [Internet]. [Citado el: 15 Diciembre 2018]. Disponible en: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1258/026835506778253328>
19. Rockson SG. Diagnosis and Management of Lymphatic Vascular Disease. [Internet] 2008;52(10):799-806. [Citado el: 15 Diciembre 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18755341>
20. Alitalo, T. Tammela, T.V. Petrova. Lymphangiogenesis in development and human disease. [Internet]. [Citado el: 15 Diciembre 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16355212>
21. Radhakrishnan, S.G. Rockson. The clinical spectrum of lymphatic disease [Internet]. [Citado el: 15 Diciembre 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18519969>

- 22.M. Pfarr, A.Y. Debrah, S. Specht, A. Hoerauf. Filariasis and lymphedema. [Internet]. [Citado el: 04 Diciembre 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19825106>
- 23.La célula. Ampliaciones. Ácido hialurónico. Atlas de Histología Vegetal y Animal [Internet]. Mmegias.webs.uvigo.es. 2018 [Citado el 4 Diciembre 2018]. Disponible en: <https://mmegias.webs.uvigo.es/5-celulas/ampliaciones/2-hialuronico.php>.
24. Liu, N.F. et al. Metabolism of hyaluronic acid and extremity lymphedema. [Internet] [Citado el: 12 Diciembre de 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=metabolism+af+hyaluronic+acid+and+extremity+lymphedema>.
25. Jeong, H.J. et al. Hyaluronidase treatment of acute lymphedema in a mouse tail model. Lymphology. [Internet] [Citado el: 12 Diciembre de 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16834456>
26. Mendoza Amatller A, Gorena Antezana S. Antileucotrienos y asma [Internet]. Scielo.org.bo. 2018 [Citado el 4 de Diciembre 2018]. Disponible en: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1024-06752007000200006).
27. Tian W, Rockson SG, Jiang X, Kim J, Begaye A, Shuffle EM, Tu AB, Cribb M, Nepiyushchikh Z, Feroze AH, Zamanian RT, Dhillon GS, Voelkel NF, Peters-Golden M, Leukotriene B₄ antagonism ameliorates experimental lymphedema. [Internet] [Citado el: 15 Octubre 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Leukotriene+B+4+antagonism+ameliorates+experimental+lymphedema>
28. Quimiocinas: Introducción. Inmunología. [Internet]. Inmunología. 2018 [Citado el 4 Diciembre 2018]. Disponible en: <http://inmunologia.eu/receptores-y-moleculas/quimiocinas-introduccion>

29. Marazioti, A. et al. Beneficial impact of CCL12 neutralization on experimental malignant pleural. [Internet]. [Citado el: 20 Octubre 2018]. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0071207>
30. Lui, N.F & Zhang, L.R. Changes of tissue fluid hyaluronan (hyaluronic acid) in peripheral lymphedema. *Lymphology*. [Internet] [Citado el: 12 Diciembre de 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9949388>
31. Xinguo Jiang, Mark R. Nicolls, Wen Tian, and Stanley G. Rockson. Lymphatic Dysfunction, Leukotrienes, and Lymphedema. [Internet] [Citado el: 23 Diciembre de 2018]. Disponible en: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-physiol-022516-034008>
32. Joseph M. Rutkowski, Monica Moya, Jimmy Johannes, Jeremy Goldman, and Melody A. Swartz. Secondary lymphedema in the mouse tail: Lymphatic hyperplasia, VEGF-C upregulation, and the protective role of MMP-9. [Internet] [Citado el: 15 Enero de 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2676671/>

