

Estudio de la bronquitis crónica experimental en rata

P. Escartín, A. Romero, E. Goñalons y J. Colomé

Departamento de Farmacología
Centro de Investigación de Laboratorios Ferrer, S. L.
Barcelona

(Recibido el 16 de marzo de 1973)

P. ESCARTIN, A. ROMERO, E. GOÑALONS and J. COLOME. *Study of Experimental Chronic Bronchitis in Rat*. Rev. esp. Fisiol., 29, 259-266. 1973.

An experimental pattern is discussed, based on the inducement of bronchiectasis in rat, for the study of drugs with action on several pathologic states of the respiratory system. Therefore, the experimental animals are subjected to an atmosphere containing O_2S (300 p.p.m.) for 150 hours (5 hours/day and 6 days/week). For the quantitative determination of the lesion in the anaesthetized animal, a polygraphic recording of expansibility and pulmonary resistance is performed altogether with another parameters representing the respiratory dynamics. Parallelwise, the histopathologic study in trachea is performed, in order to observe the experimented alterations (Hematoxylin Eosine staining) and the location of mucoproteins (P.A.S. staining). The polygraphic recording has revealed the changes that were expected in a pathologic state of this kind, that is to say, a decrease of expansibility and an increase of the pulmonary resistance; both changes have resulted significative in a statistical way. The histopathologic alterations found, confirm the changes observed in the mentioned respiratory parameters, that is to say, disappearance of the cilium band, partial atrophy of the tracheal epithelium and cartilage, as well as hyperplasia of the mucosecretor elements.

La necesidad de reproducir en animal de experimentación una sintomatología análoga a una afección clínica de tipo bronquítico crónico, es de gran utilidad para el estudio de determinado grupo de fármacos de acción predominante sobre aparato respiratorio.

Sabido es que el anhídrido sulfuroso tiene un efecto irritante sobre la mucosa bronquial (13-15), provocando su inhalación un cuadro patológico denominado bronquitis crónica experimental (14).

La principal modificación que se ob-

serva en este tipo de afecciones respiratorias es la disminución de la capacidad del rendimiento pulmonar, siendo los factores determinantes de este hecho: obstrucción por mucoestasis, espasmo bronquial y disminución de las condiciones elásticas pulmonares.

La finalidad de este estudio es poner de manifiesto las alteraciones que un tratamiento crónico con anhídrido sulfuroso puede inducir en el sistema respiratorio de los animales de experimentación. Para ello se ha realizado un estudio sobre di-

námica respiratoria, mediante la determinación de resistencia y expansibilidad pulmonares, así como el estudio histopatológico que ha permitido observar las modificaciones aparecidas en las vías respiratorias.

Material y métodos

MÉTODO DE INDUCCIÓN DE LA BRONQUITIS CRÓNICA

Como animal de experimentación se ha utilizado la rata albina Sprague Dawley HaM/ICR, procedente de Charles River, machos, de pesos comprendidos entre 450 y 600 gramos.

Al objeto de provocar una afección que por sus características se asemeje a la bronquitis crónica en el hombre, se sometió a los animales a un tratamiento con anhídrido sulfuroso. Este se llevó a cabo introduciéndolos en una cámara por la que se hacía circular una mezcla de aire depurado y anhídrido sulfuroso, en una proporción de 300 p.p.m.

Estas condiciones se aplicaron durante 150 horas, a razón de 5 horas diarias y 6 días por semana, tiempo previsto para la obtención de la bronquitis.

ESTUDIO DE LA DINÁMICA RESPIRATORIA

Se pone de manifiesto la alteración de la dinámica respiratoria inducida por el tratamiento anteriormente expuesto, mediante la determinación de los siguientes parámetros: volumen de la ventilación pulmonar (V.V.), frecuencia respiratoria (F.R.), volumen minuto (V.M.), expansibilidad (E.P.) y resistencia pulmonar (R.P.). Para la obtención de los dos últimos es necesario el conocimiento de la presión intratorácica, que se obtiene mediante el registro de la presión intrapleural (P), del flujo de aire (FI) y del volumen de la ventilación pulmonar.

Técnica. — Existen diferentes métodos para realizar la medida de la presión intratorácica. ADVENIER (1), BOISSIER (5)

y COLGAN (6) la determinan mediante el registro de la presión esofágica; DIAMOND (7) mide la presión intrapleural con respecto a la intratraqueal y ANTHONISIEN (3) y ADMUR (2) registran la presión intrapleural con respecto a la atmosférica. Para la obtención de este parámetro se ensayaron todas las variantes mencionadas, escogiéndose finalmente la medición de la presión intrapleural frente a la atmosférica.

La técnica se ha desarrollado de la siguiente forma: previa anestesia con etiluretano (1 g/kg i.p.) se procedió a la implantación de la cánula traqueal; el extremo libre de la misma se conecta a una pantalla neumotacométrica que está unida a un captador diferencial de presión de gases (H.P. n.º 270). De esta forma se obtiene el flujo respiratorio (FI.R.) y por integración de esta señal en un Preamplificador-Integrador (H.P. n.º 350-3.700 A) el volumen de la ventilación pulmonar (V.V.).

El registro de la presión intrapleural (fig. 1) se realizó introduciendo una aguja en el espacio pleural. La aguja implantada está unida por su otro extremo a un catéter que se conecta al captador diferencial de presión de líquidos (H.P. número 267 BC). En este momento se puede ya proceder al registro de los tres parámetros al mismo tiempo.

Cálculos de los parámetros. — El valor de la expansibilidad pulmonar viene dado por la relación existente entre la variación de volumen (ΔV) y la variación de presión (ΔP) para dos momentos del ciclo respiratorio, en los cuales el flujo de aire en las vías respiratorias es nulo (fig. 2 A).

$$EP = \frac{\Delta V}{\Delta P} = \text{ml/cm H}_2\text{O}$$

La resistencia pulmonar depende de las resistencias dinámicas al paso del aire y su valor viene dado por la relación existente entre la variación de presión intrapleural (ΔP) y la de flujo (ΔFI), para momentos de la inspiración y de la espiración

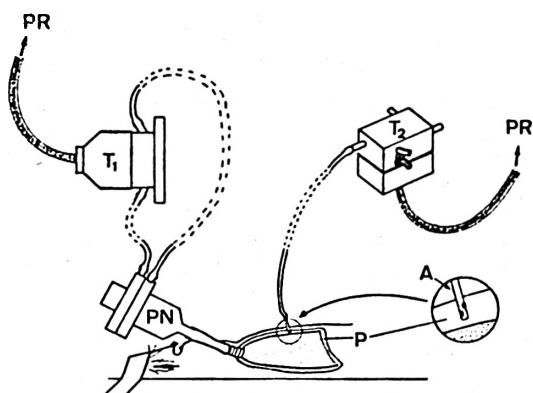


Fig. 1. Esquema del montaje realizado para el registro de flujo respiratorio, volumen de ventilación pulmonar y presión intrapleural. A: Aguja; P: Cavidad pleural; T₁: Transductor 270; T₂: Transductor 267BC; PN: Pantalla neumotacométrica; PR: Preamplificadores.

en que el volumen de aire existente en los pulmones es el mismo (fig. 2 B).

$$RP = \frac{\Delta P}{\Delta V} = \text{cm H}_2\text{O/ml/seg.}$$

La determinación de los valores de la expansibilidad y resistencia pulmonares se realiza según el método descrito por ADVENIER *et al.* (1) (fig. 2).

ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

Es lógico que ante factores que pudieran lesionar el epitelio respiratorio la secreción de mucus se vea incrementada. La observación de las alteraciones sufridas por los elementos mucossecretorios, junto con el aspecto de las estructuras histológicas vecinas, nos proporcionan los datos necesarios para la interpretación histopatológica del estado de las vías respiratorias.

De estas observaciones se puede deducir el grado de lesión provocado por el tratamiento al que se han sometido los animales.

Técnica. — Para la elección de los métodos de tinción adecuados, para la observación del mucus existente en sus lugares

de síntesis y del intraluminal, así como de los elementos mucossecretorios en general, se probaron distintos métodos descritos como selectivos para la tinción de los distintos tipos de mucinas componentes del moco (8, 11 y 12). Entre los colorantes ensayados se encuentran: el Azul de Toluidina, con reacción metacromática según el pH de la mucina a teñir; el Azul Alcian, que tiñe las mucinas ácidas de azul; el Negro Amido tiñe las mucinas neutras de azul oscuro; y el reactivo de Schiff, con oxidación previa mediante ácido peryódico, para mucinas neutras.

Tras repetidas pruebas con dichos colorantes se eligieron los 3 métodos siguientes:

a) P.A.S. (ácido peryódico-Schiff) según Hotchkiss-MacManus-Lillie: Se tra-

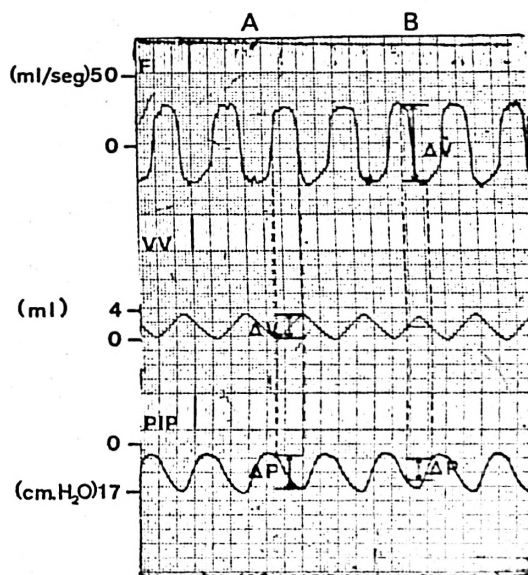


Fig. 2. Registro del flujo respiratorio, volumen de ventilación y presión intrapleural.

En «A» se representan las proyecciones realizadas, desde dos puntos de flujo nulo para la determinación de ΔV y ΔP (cálculo de la expansibilidad) y en «B» para dos momentos en que el volumen de aire contenido en el pulmón es el mismo, uno en la inspiración y otro en la espiración, para la determinación de ΔF y ΔP (cálculo de la resistencia).

ta de un método selectivo para la tinción de mucinas neutras. Estas quedan teñidas de color carmín-rojo tras una oxidación drástica con peryódico y tratamiento posterior con reactivo de Schiff.

Es de una gran claridad y fue adoptado para una observación global muy gráfica del mucus que se encuentra en la preparación; al no acompañarla de una coloración de contraste, el mucus teñido de rojo se localiza con suma facilidad.

b) *Reacción de P.A.S. asociada a Azul Alcían:* Es un método de gran utilidad para la interpretación de la calidad del mucus, puesto que éste queda teñido de distinto color según sea la proporción de mucinas que forman parte del mismo: equilibrio fuco-sialosulfomucinas. Así, las fucomucinas que constituyen las llamadas neutras son P.A.S. positivas y A. Alcían negativas, por lo que quedan teñidas de rojo.

Las sulfomucinas y las sialomucinas constituyen el grupo de mucinas ácidas, pero, mientras las primeras son P.A.S. positivas y A. Alcían positivas con lo que quedan de color violeta, las sialomucinas son P.A.S. negativas y A. Alcían positivas y quedan teñidas de color azul. De todo ello se puede deducir la composición dominante del mucus según el color resultante del mismo.

c) *Reacción de P.A.S. combinado con hematoxilina:* Este método ha sido adaptado con la finalidad de conseguir en una sola tinción la visualización clara, tanto de la localización del mucus como de las estructuras histológicas que lo secretan. Con dicho método, el mucus queda teñido de rojo-morado, mientras que los elementos histológicos quedan localizados por medio de sus núcleos en violeta oscuro. Esta técnica es la que nos ha dado mejores resultados para la observación y estudio del estado del epitelio respiratorio.

Las preparaciones procedentes de cada animal fueron teñidas por los tres métodos expuestos, así como con hematoxilina-

eosina, siempre que se consideró que esta tinción pudiera ser de utilidad.

Una vez elegidos y modificados convenientemente los métodos de tinción, se estudiaron con los mismos los diversos territorios que componen el árbol respiratorio de forma sistemática.

Se hicieron cortes sagitales y transversales de todos los lóbulos pulmonares para el estudio de vías respiratorias, observándose que tanto los bronquiolos como los bronquios secundarios no revelaban grandes alteraciones con el tratamiento de anhídrido sulfuroso, y que las que se observaban carecían de la constancia necesaria para su interpretación. Este hecho indujo a pensar que podrían ser más adecuadas las regiones altas del tracto respiratorio, dado que eran las que estaban sometidas de forma más inmediata a los efectos del SO_2 , y por otro lado su estudio a un mismo nivel anatómico en todos los animales, ofrecía una mayor sencillez y seguridad a fines comparativos.

Así, pues, se centró el estudio sobre tráquea, eligiéndose finalmente el tramo inferior de la misma, inmediato a su bifurcación.

Las piezas de tráquea se fijaron en formol al 10 % durante 48 horas, los bloques se incluyeron en parafina tipo «Paraplast», y se cortaron mediante un microtomo Minot, a un grosor de 4 a 5 micras.

Resultados

ESTUDIO DE LA DINÁMICA RESPIRATORIA

En la tabla I se expresan la media y límites fiduciales obtenidos para el lote control, junto con los del grupo que ha sido expuesto al tratamiento con anhídrido sulfuroso, constanding cada lote de nueve animales. En el cálculo de la media intervienen cuatro valores por animal que corresponden a registros realizados a tiempos determinados de la experiencia. Para eliminar de la media los valores aberrantes se ha aplicado el criterio de Chauvenet.

Fig. 3. *Mucina teñida de azul localizada en cantidad discreta en las células caliciformes del epitelio.*

Tinción: P.A.S. — Azul Alcán. 160x.

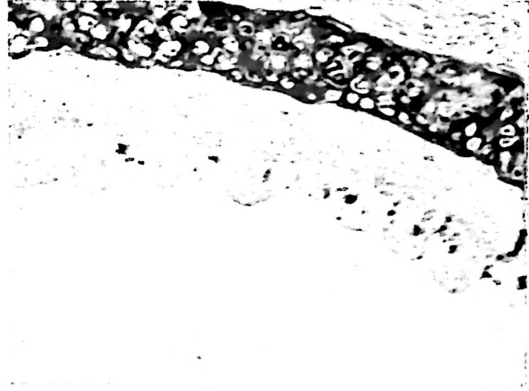


Fig. 4. *Hiperplasia e hipertrofia de células caliciformes.*

Obsérvese el gran incremento habido en el contenido de mucina (en color carmín) tanto en las células caliciformes como en la glándula que se localiza. Existen signos de vacuolización epitelial y de atrofia en cartilago.

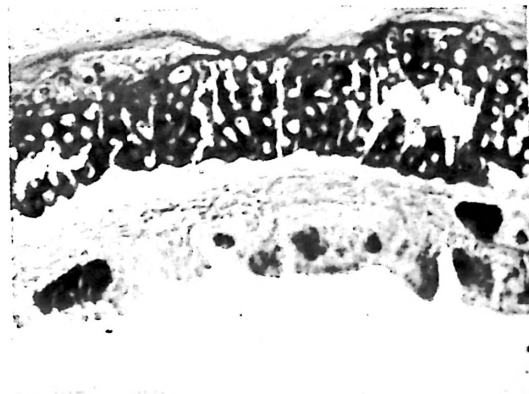


Fig. 5. *Estado inflamatorio de la mucosa.* Es de destacar el denso infiltrado de leucocitos y linfocitos en mucosa, los cuales, arrastrados por el mucus, han invadido asimismo la luz traqueal.

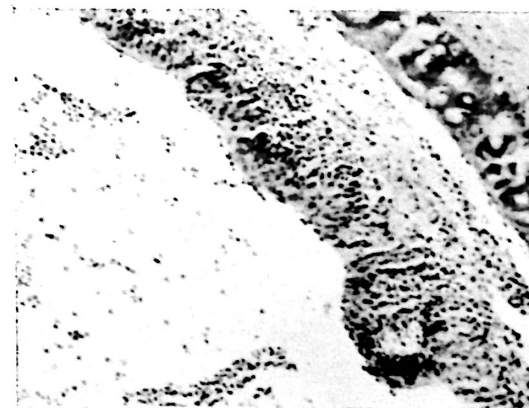


Tabla 1. *Parámetros respiratorios obtenidos para el lote de animales control y para el lote que se ha sometido al tratamiento con anhídrido sulfuroso.*

Media y límites fiduciales y significación estadística de la comparación de estas medias, por medio del cálculo de la «t» de Student.

Parámetros	Lote control		Lote SO ₂		P
	M ± et (P = 0,05)	N	M ± et (P = 0,05)	N	
Expansibilidad (ml/cm H ₂ O)	0,50 ± 0,09	32	0,28 ± 0,09	31	< 0,001
Resistencia (cm H ₂ O/ml/seg)	0,14 ± 0,05	30	0,25 ± 0,11	33	< 0,001
Volumen ventilación (ml)	4,37 ± 0,69	31	3,90 ± 0,40	30	< 0,005
Frecuencia (RPM)	140,72 ± 20,48	32	106,85 ± 35,42	34	< 0,001
Volumen minuto (ml/min.)	607,57 ± 81,45	31	414,73 ± 163,95	34	< 0,001

Se observa una alteración de las condiciones respiratorias en el lote que ha estado sometido al tratamiento con SO₂, apareciendo una reducción de la dinámica respiratoria, ya que en éste están disminuidas la expansibilidad pulmonar, el volumen de ventilación pulmonar, la frecuencia respiratoria y el volumen minuto, al mismo tiempo que la resistencia pulmonar está aumentada, la cual indica una reducción de las condiciones elásticas pulmonares.

Con el fin de conocer la significación de los cambios aparecidos se ha realizado la comparación de ambos lotes mediante el cálculo estadístico de la «t» de Student, determinando la probabilidad (P) para cada uno de los parámetros.

ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

Lote de ratas control. — El aspecto del epitelio respiratorio es normal, con banda ciliada abundante y uniforme. La proporción de células caliciformes es normal, y el aspecto de las glándulas mucíparas es, asimismo, el típico. Tampoco se observan alteraciones a niveles más internos: corion, túnica media, etc. No hay indicios de tapones mucosos en luz traqueal (fig. 3).

Lote de ratas tratadas con SO₂. — En este lote se observan alteraciones de tipo patológico a distintos niveles.

El epitelio traqueal presenta signos de deshidratación y descamación subsiguientes,

lo que, al ser pseudoestratificado implica su pérdida en zonas variables del perímetro traqueal. En dichas zonas desprovistas de epitelio respiratorio no se observan indicios de desarrollo incipiente alguno de células epiteliales germinativas; este hecho se interpreta como una inhibición debida al anhídrido sulfuroso sobre las mismas.

En las zonas en las que se observa la presencia de epitelio, éste presenta una acusada reducción de la banda ciliada, haciéndose escasa y discontinua, y en frecuentes casos llega a faltar por completo. Asimismo, dicho epitelio se caracteriza por una marcada hiperplasia de células caliciformes. Las glándulas mucíparas se hallan repletas de mucina, con aparición de ésta en la luz traqueal, engrosando algo más de lo normal la película de mucus que reviste el epitelio. En corion es destacable un abundante infiltrado leucocitario, signo evidente de inflamación (figuras 4 y 5).

Discusión

El motivo de este trabajo ha sido la obtención de un cuadro patológico experimental que reproduzca la sintomatología de una bronquitis crónica, así como la forma de determinarla, y con ello poseer un modelo para el estudio de fármacos con acción predominante sobre afecciones respiratorias de este tipo.

De los resultados obtenidos se concluye

la efectividad del tratamiento seguido con anhídrido sulfuroso, para la inducción de bronquitis crónica, pues ocasiona:

1) Aumento de la resistencia pulmonar; 2) Disminución de la expansibilidad pulmonar; y 3) Alteraciones histopatológicas: desaparición de banda ciliada, atrofia parcial del epitelio respiratorio, así como marcada hiperplasia de los elementos mucosecretorios. De todo ello se deduce que nos hallamos ante un buen modelo experimental para el estudio de fármacos secretomotores, mucolíticos, broncodilatadores, etcétera.

Resumen

Se estudian las posibilidades de un modelo experimental para el estudio de fármacos sobre aparato respiratorio. Las ratas se someten durante 150 horas (5 horas/día y 6 días/semana) a una atmósfera conteniendo SO_2 (300 p.p.m.). Dicho tratamiento determina una disminución de la expansibilidad y un aumento de la resistencia pulmonares. Las alteraciones histopatológicas encontradas confirman las modificaciones de dichos parámetros respiratorios.

Bibliografía

1. ADVENIER, CH.: *J. Pharm.*, **1**, 416, 1970.
2. AMDUR, M. O.: *Am. J. Physiol.*, **192**, 364, 1958.
3. ANTHONISEN, N. R.: *J. Appl. Physiol.*, **18**, 539, 1963.
4. BATTISTA, S. y col.: *Tox. Applied Pharm.*, **22**, 59, 1972.
5. BOISSIER, F. R.: *Arch. Int. Pharmacol. Thérapie*, **187**, 394, 1970.
6. COLGAN, F. J.: *J. Appl. Physiol.*, **192**, 803, 1964.
7. DIAMOND, L.: *Arch. Int. Pharmacodyn.*, **168**, 239, 1967.
8. DI FIORE: «Diagnóstico Histológico», tomo I, Ed. «El Ateneo», 1963.
9. GUNTHER, W.: *Fortschritte Med.*, **83**, 701, 1965.
10. JUNGE, W.: *Med. Klinik*, **57**, 53, 1966.
11. MARTOJA, R. y MARTOJA-PIERSON, M.: «Técnicas de Histología Animal», Ed. Toray-Masson, S. A., Barcelona, 1970.
12. POLICARD, A.: «Traité de Microscopie». Masson et Cie., Editeurs, Paris, 1957.
13. QUEVAUVILLER, A.: *Prod. Probl. Pharm.*, **27**, 267, 1972.
14. REID, L.: *Brit. J. Exp. Path.*, **44**, 437, 1963.
15. VU NGOC HUYNH: *C. R. Biol.*, **160**, 1849, 1966.