

Dilataciones bronquiales crónicas en diferentes colonias de ratas de laboratorio

Juan Carlos Miguel ¹, Ariana Erazo ¹, Fernanda Beduino ¹, Juan Carlos Picena ²,
María Isabel Luciano ³, Gustavo Pizzutti ⁴, María Cristina Tarrés ⁴,
Silvana Montenegro ⁴, Stella Maris Martínez ⁴

¹ Museo de Anatomía Normal, Facultad de Ciencias Médicas, Rosario, Argentina.

² Cátedra de Anatomía Patológica, Facultad de Ciencias Médicas, Rosario, Argentina.

³ Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias Médicas, Rosario, Argentina.

⁴ Cátedra de Biología, Facultad de Ciencias Médicas y Consejo de Investigaciones, Rosario, Argentina.

Ante la aparición espontánea de bronquiectasias en ratas macho eSS diabéticas, se examinaron los pulmones de ratas eSS de 3 a 6 meses de edad y los de ratas eumetabólicas de tres líneas: eSS endocriada con diabetes espontánea tipo 2 derivada de la cepa IIM; líneas e, m y α endocriadas, y Wistar eumetabólica y exocriada, agrupadas según sexo y edad. Se obtuvieron moldes de acrílico del árbol bronquial después de la inyección de una sustancia plástica. Los moldes se recortaron y se concentró la observación en las primeras cuatro ramificaciones bronquiales; se determinaron el diámetro y el volumen con una lente binocular de aumento. Además, se obtuvieron cortes histológicos. Aunque en todas las líneas se observaron bronquiectasias múltiples, principalmente fusiformes, la dilatación bronquial y la respuesta inflamatoria con los infiltrados linfocíticos fueron mucho más graves en los machos eSS de 180 días de edad. En el 70% de los casos (n=32) se aislaron bacterias en los pulmones, excepto en las ratas eSS. Se detectaron *Pseudomona* spp. (38%) y cocos Gram positivos en forma de *Staphylococcus* spp. coagulasa negativos (20%). No se encontraron hongos patógenos ni saprofitos. Si bien todas las líneas aparecen afectadas, la diabetes de eSS sería un factor agravante.

Palabras clave: rata, bronquiectasias, diabetes, pulmones.

Chronic bronchial dilatations in different colonies of laboratory rats

Bronchiectasis occurred naturally in 12-month-old spontaneously diabetic eSS male rats. The lungs of 3 and 6-month-old eSS rats were compared in eumetabolic eSS rats from three inbred lines consisting of inbred spontaneously diabetic eSS derived from IIM strain; these were compared with eumetabolic, outbred Wistar rats, paired by sex and age. Acrylic casts of bronchial tree were obtained after injection of a plastic substance. The casts were pruned to focus on the first four bronchial branchings. Diameter and volume of the conductive bronchial tree were determined using a binocular magnifier. Histological sections were obtained. All lines showed multiple bronchiectasis, mostly fusiform, bronchial dilatation and inflammatory response with lymphocytic infiltrates. These symptoms were much more severe in 180-day-old eSS males. Bacteria were isolated from the lungs in 70% of cases (n=32), except in eSS rats. *Pseudomona* spp. (38%) and Gram-positive cocci as coagulase-negative *Staphylococcus* spp. (20%) were detected. Neither pathogenic bacteria nor saprophyte fungi were found. Although all lines were affected, diabetes in eSS appears to be an aggravating factor.

Key words: rat, bronchiectasis, diabetes, lung.

Correspondencia:

Stella Maris Martínez

Facultad de Ciencias Médicas de Rosario, UNR. Santa Fe 3100, Rosario, Argentina. Tel.: 54-341-480 4558, interno 224/268; fax: 54-341-480 4577.

stellamartinez@mcg.org.ar

Recibido: 18/01/02; aceptado: 12/04/02

El diagnóstico de bronquiectasias ha disminuido en los países desarrollados aunque se desconoce su incidencia real (1). La prevalencia suele ser mayor entre la segunda y la sexta década de la vida, aunque los antecedentes suelen remontarse a la primera infancia (1).

Se les considera el resultado de procesos inflamatorios crónicos frecuentemente asociados con enfermedades infecciosas de las vías aéreas pese a que su patogenia no se comprende aún del todo (2). Aproximadamente en la mitad de los casos se detectan factores predisponentes asociados, como anomalías congénitas y obstrucciones de la vía aérea de naturaleza estructural o inmunológica que contribuyen directa o indirectamente a su desarrollo (1).

Es sabido que las ratas de laboratorio pueden presentar bronquiectasias asociadas con fenómenos diversos tales como la enfermedad pulmonar crónica (3,4), diferentes tipos de contaminación ambiental (5,6) o como parte del fenómeno de rechazo crónico al trasplante de pulmón (7).

Durante estudios de necropsias efectuados en nuestro laboratorio, se observaron bronquiectasias en ratas eSS macho de más de un año de edad. La eSS es una línea endocriada de ratas albinas, originada y mantenida en el bioterio de la Cátedra de Biología de la Facultad de Ciencias Médicas de Rosario y derivada de la cepa IIM (8). Presenta una diabetes tipo 2, espontánea, sin obesidad, predominante en los machos, que desarrollan intolerancia a la glucosa desde la pubertad y progresiva con la edad, hiperglucemia e hiperinsulinemia compensadora hasta los 12 meses y, a continuación, hipoinsulinemia con graves alteraciones en la estructura del islote de Langerhans y de la célula beta, nefropatía diabética florida y cataratas bilaterales totales (9,10).

En este trabajo se informa sobre las dilataciones bronquiales verificadas en ratas eSS de ambos sexos y los resultados obtenidos en otras líneas de ratas eumetabólicas, endocriadas y exocriadas, procedentes de bioterios de las Facultades de Ciencias Médicas y de Ciencias Bioquímicas de la Universidad Nacional de Rosario.

Materiales y métodos

Se utilizaron ratas de 90 y de 180 días de los siguientes grupos:

- eSS endocriada y con diabetes espontánea tipo 2, del bioterio de cría y experimentación de la

Cátedra de Biología de la Facultad de Ciencias Médicas de Rosario. Se emplearon 16 machos de cada edad.

- e, m y α , líneas endocriadas eumetabólicas del bioterio de cría de la Facultad de Ciencias Médicas de Rosario. Al igual que eSS, son líneas desarrolladas en Argentina a partir de la cepa original IIM y registradas en *Rat News Letter* (11). Se emplearon 8 machos de cada edad y de cada línea.
- Wistar, eumetabólica y exocriada, perteneciente al bioterio de cría de la Facultad de Ciencias Bioquímicas. Se emplearon 8 machos de cada edad.

Los animales pertenecen a colonias con estatus microbiológico convencional, es decir, estatus no especificado. En los bioterios citados se mantienen regulados la temperatura, los ciclos luz-oscuridad y el recambio de aire. En todos los casos permanecieron alojados en jaulas colectivas suspendidas sin lecho desde los 21 días de edad. Los animales recibieron agua y alimento balanceado *ad libitum*. Este último en forma de *pellets* secos (Cargill rata-ratón®, Cargill Co., Buenos Aires), de los cuales cada 100 g contenían: proteínas, 25,1%; grasa, 3,5%; glúcidos (almidón), 43%; fibra, 6%; minerales, 8%, y vitaminas, 1,9% con una humedad de 12,5%. La densidad calórica fue de 304 Kcal/100 g.

Los animales permanecieron en sus respectivos bioterios hasta el momento de su traslado al laboratorio de la Cátedra de Biología donde se los sacrificó de inmediato con halotano. Se abrió el peto condroesternal, se liberó la tráquea por debajo de la laringe y se canuló. A continuación, previa ligadura del pedículo lobar, se practicó lobectomía rotatoria horaria sucesiva para obtener muestras destinadas a los estudios microbiológicos e histológicos. El procedimiento consistió en extraer el lóbulo superior del pulmón izquierdo al espécimen uno, el lóbulo inferior al espécimen dos, el lóbulo inferior del pulmón derecho al tres, el lóbulo medio al cuatro, el lóbulo superior al cinco y así sucesivamente. La asignación de la secuencia descrita se hizo al azar en cada línea genética.

El resto de los árboles broncopulmonares se sometió a la técnica de inyección-corrosión para obtener moldes bronquiales. Como material de inyección se utilizó un acrílico sintético (Vaicel®, Vaidril S.A., Buenos Aires, Argentina) inyectado por la cánula traqueal mediante jeringa. La presión se aplicó en forma manual y lenta (alrededor de 10 cm de H₂O) hasta la visualización de los primeros alvéolos superficiales. Esta maniobra se realizó con los pulmones *in situ*, a fin de conservar la forma espacial del árbol bronquial. Luego del período de polimerización, los pulmones se retiraron de la caja torácica y se sumergieron en una solución acuosa de CIH al 50% a temperatura ambiente. Se empleó CIH comercial diluido en agua destilada. Los moldes se obtuvieron al tercer o cuarto día. Finalmente, se los lavó rociándolos con agua.

El estudio de los moldes se efectuó en forma directa y con una lupa estereoscópica (Wild M-3) de 6 a 40 aumentos. Se midió la longitud de las dilataciones mediante compases de doble punta y los diámetros, con calibres. Las grillas oculares se utilizaron para los elementos más pequeños. Las dilataciones de las primeras cuatro generaciones bronquiales se registraron sistemáticamente mediante fotografía directa y estereoscópica. Las generaciones siguientes se describieron en forma general.

Respecto de las dilataciones se consignó:

- ubicación, según el orden de generación bronquial;
- cantidad, discriminándola en escasa (de una a tres) y múltiple (más de tres en cada pulmón);
- forma, diferenciándola en cilíndrica, sacular, varicosa y forma mixta;
- diámetro mayor de la dilatación (D1) y diámetro original del bronquio (D2). Se consideró 'diámetro mayor de la dilatación' al diámetro máximo de la misma y 'diámetro original del bronquio' al previo a la dilatación;
- longitud de la dilatación (L1) y longitud total del bronquio (L2).

En cada caso se calcularon los cocientes D1/D2 y L1/L2. El tamaño de la dilatación se estimó a

través de la proporción de D1 respecto a D2. Se consideraron 'dilataciones pequeñas' los ensanchamientos de 25%; 'medianas', entre 25 y 50%, y 'grandes', las superiores a 50%.

Para efectuar la microscopía óptica de las paredes bronquiales, se obtuvieron cortes de 5 µm de espesor a partir de tacos incluidos en parafina. Las secciones se colorearon con hematoxilina-eosina y hematoxilina-PAS.

Para el estudio microbiológico, se extrajeron muestras siguiendo las normas de asepsia y se trasladaron en medio de Stuart para su procesamiento. Se investigaron bacterias aerobias, anaerobias y microaerófilas empleando medios de aislamiento, agar-sangre, cisteína lactosa deficiente en electrolitos, tioglicolato y medios selectivos diferenciales para su clasificación. Para el aislamiento de agentes micológicos, se usó medio de Sabouraud. No se investigaron virus ni parásitos y no se emplearon medios específicos diferenciales para la búsqueda de *Mycoplasma*.

El estudio se efectuó siguiendo los principios éticos recomendados internacionalmente para evitar el sufrimiento innecesario de los animales (12). Todos los procedimientos realizados fueron examinados y aprobados por la Comisión de Bioética de la Facultad de Ciencias Médicas de Rosario con el objeto de garantizar un trato adecuado de los animales.

Las comparaciones entre líneas de los diámetros y las longitudes de dilataciones bronquiales y de bronquios se realizaron mediante análisis de la varianza. Para los análisis de porcentajes se empleó la prueba de ji cuadrado (χ^2). El software utilizado fue SYSTAT (13).

Resultados

La morfología tridimensional mostró dilataciones bronquiales múltiples en todos los moldes examinados, si bien el grupo más afectado fue el de los animales eSS de 180 días. Pese a ser generalizadas, predominaron en los lóbulos medio e inferior del pulmón derecho. Se ubicaban a partir de los bronquios de segunda generación inmediatamente posteriores a las bifurcaciones bronquiales. Prevalcieron netamente las dilataciones bronquiales cilíndricas o cilíndrico

saculares con apariencia fusiforme (figuras 1 y 2).

El cuadro 1 resume los datos correspondientes a los diámetros y longitudes de dilataciones y bronquios de todos los grupos. No se comprobaron diferencias significativas por edades por lo que los datos fueron agrupados por línea. Los ANOVA indican que, respecto de las otras líneas, las ratas eSS tienen bronquios de menor diámetro ($P < 0,05$), dilataciones bronquiales de mayor diámetro ($P < 0,05$) y un valor superior del cociente D1/D2 ($P < 0,01$). eSS tuvo, además, menor porcentaje de dilataciones chicas (10%) respecto de las líneas no diabéticas (40%) y mayor porcentaje de dilataciones medianas y grandes (83%) respecto del resto (57%) ($\chi^2 = 6,98$, $P < 0,001$).

La microscopía óptica mostró en los animales eSS de 90 días zonas de dilatación bronquial junto con áreas de atelectasia y moderados focos de infiltrados mononucleares peribronquiales, así como focos bronconeumónicos dispersos o confluentes. Los de 180 días presentaron en forma constante extensas áreas de bronquiectasias de gran tamaño y zonas de atelectasia alternando con áreas de hiperinsuflación (figura 3).

En los Wistar se observaron discretas dilataciones fusiformes con leves infiltrados

linfocitarios peribronquiales y perivasculares y pequeñas zonas de atelectasia. Las líneas e, m y α exhibieron, en general, imágenes semejantes a las de Wistar si bien se observaron algunas bronquiectasias de gran tamaño. No fue posible visualizar diferencias por edad.

Respecto de la investigación microbiológica, los cultivos efectuados fueron negativos en las ratas eSS. Por el contrario, se aislaron gérmenes en el 70% de las muestras de los animales de 180 días de las demás líneas. Los gérmenes más frecuentes fueron *Pseudomonas* sp. (38%) y *Staphylococcus coagulasa* negativos (20%). No se realizó estudio diferencial entre *Staphylococcus saprofiticus* y *Staphylococcus epidermidis*. No se hallaron hongos saprófitos ni patógenos. Se comprobó un efecto agravante de la edad respecto de la presencia de gérmenes (90 días: 39% vs. 180 días: 70%; $P < 0,01$).

Discusión

Se ha señalado que los pacientes diabéticos tipo 1 presentan ocasionalmente anomalías pulmonares por envejecimiento acelerado del colágeno (14). Si bien el síndrome diabético de la rata eSS es de tipo 2, se ha verificado en los machos engrosamiento del colágeno de la piel en relación con la intensidad de la hiperglucemia y el



Figura 1. Molde exfoliado que muestra dilataciones cilíndrico-fusiformes en bronquios de segunda y tercera generación; rata eSS de 180 días; fotografía tomada con lupa estereoscópica a 6,4 aumentos e iluminación directa.

Cuadro 1. Diámetro mayor de la dilatación bronquial (D1), diámetro original del bronquio (D2), cociente (D1/D2), longitud de la dilatación (L1), longitud total del bronquio (L2) y cociente (L1/L2) en ratas diabéticas eSS, en ratas de las líneas eumetabólicas e, m, a y en Wistar exocriadas.

Línea	D1	D2	D1/D2	L1	L2	L1/L2
eSS	3,97±0,51	1,61±0,39	2,49±0,37	6,59±1,67	4,98±1,45	0,75±0,08
e, m, a	2,61±0,43	1,92±0,23	1,39±0,40	6,45±1,34	4,93±0,95	0,76±0,08
Wistar	2,45±0,37	2,00±0,26	1,21±0,33	6,37±1,90	5,09±1,56	0,74±0,73
P	<0,01	<0,05	<0,001	NS	NS	NS

Los datos corresponden a la media ± una desviación estándar y se expresan en mm.

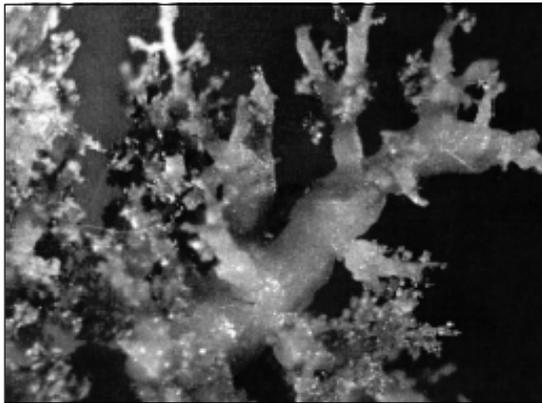


Figura 2. Molde exfoliado que muestra dilataciones cilíndrico-fusiformes en bronquios de segunda, tercera, cuarta y quinta generación; rata eSS de 180 días; fotografía tomada con lupa estereoscópica a 6,4 aumentos e iluminación directa.

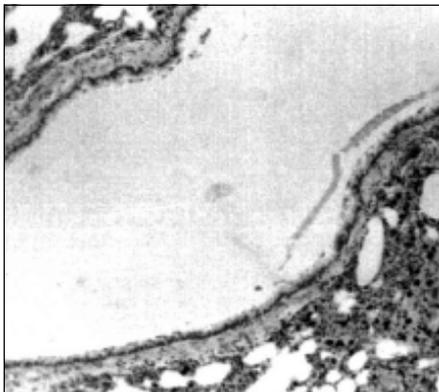


Figura 3. Gran bronquiectasia fusiforme en un corte longitudinal; el parénquima vecino presenta áreas de atelectasia en parches; rata eSS de 180 días: HE 40X.

tiempo de exposición a la misma (15). De existir este tipo de alteración en los bronquios de eSS, podría contribuir a explicar la mayor gravedad de las lesiones en los animales de más edad, en los que se sabe que la hiperglucemia es más intensa (8). Debe destacarse que el menor

diámetro de los bronquios de eSS actuaría facilitando la instalación de procesos obstructivos.

En los animales Wistar, los únicos exocriados, las dilataciones bronquiales fueron menos llamativas que en todos los demás casos. Sin embargo, no se pueden atribuir a un mero proceso de envejecimiento, ya que no hubo mayores diferencias entre los 90 y los 180 días. Por otra parte, se trató de dilataciones bronquiales con presencia de infiltrados linfocitarios peribronquiales y desarrollo de gérmenes, cuadro bien diferente al proceso de aumento del espacio aéreo observado en animales Wistar de 56 semanas y atribuido a modificaciones de la pared alveolar debidas a la edad (16).

Respecto de los gérmenes aislados en las muestras de tejido, *Pseudomonas* sp. fueron los más frecuentes. Es interesante señalar que Kon y colaboradores, trabajando sobre un modelo de cavidad aérea subcutánea en la rata, demostraron que la elastasa producida por *Pseudomonas aeruginosa*, un patógeno oportunista frecuente en pacientes con enfermedades pulmonares subyacentes del tipo de las bronquiectasias, actuaría como un factor inmunoprovocador reforzando el proceso inflamatorio (17).

Resulta llamativa la falta de desarrollo de gérmenes en las muestras provenientes de eSS, máxime tratándose de una línea diabética. Conviene destacar, además, que si bien eSS se cría en un bioterio convencional, se han extremado los esfuerzos de control sanitario debido a su patología metabólica. Asimismo, no puede descartarse la existencia de gérmenes cuyo diagnóstico requiere medios de cultivo diferentes a los empleados en este estudio, por

ejemplo, cultivos celulares. Por otra parte, las metaplasia pavimentosa del epitelio bronquial y la existencia de densos infiltrados mononucleares presentes en eSS son semejantes a los hallazgos efectuados en ratas no diabéticas por Lapa e Silva y colaboradores, quienes atribuyeron un rol importante a la respuesta inmune en el desarrollo de la bronquiectasia (18).

En conclusión, este trabajo destaca el hallazgo de dilataciones bronquiales múltiples, muchas veces infectadas en ratas diabéticas y eumetabólicas, genéticamente emparentadas o no, endocriadas o exocriadas, provenientes de tres bioteros convencionales. Si bien pueden representar un serio inconveniente en experimentos que involucran la histofisiología pulmonar (3), se podrían llegar a utilizar como modelo experimental de las bronquiectasias humanas, una patología aún insuficientemente comprendida.

Referencias

1. **Scala R, Aronne D, Palumbo U, Montella L, Giacobbe R, Martucci P, et al.** Prevalence, age distribution and aetiology of bronchiectasis: a retrospective study of 144 symptomatic patients. *Arch Chest Dis* 2000;55:101-5.
2. **Zheng L, Tipoe G, Lam WK, Ho J.C, Shum I, Ooi GC, et al.** Endothelin-1 in stable bronchiectasis. *Eur Respir J* 2000;16:146-9.
3. **Carvahlo Pinto C, Dib Gremiao C, Costa Mochiaro P, Gilioli R, Queiroz de Carvahlo E.** Control sanitario en animales de laboratorio: un enfoque en infección pulmonar. *Animales de Experimentación* 1997;3:26-9.
4. **Slauson DO, Hahn FF.** Criteria for development of animal models of diseases of the respiratory system: the comparative approach in respiratory disease model development. *Am J Pathol* 1980;101(Suppl3):S103-12.
5. **Keast D, Sheppard NP, Papadimitriou JM.** Some biological properties of respirable iron ore dust. *Environ Res* 1987;42:455-8.
6. **Wester PW, van der Hedjen CA, Bisschop A, van Esch GJ, Wegman RC, de Vries T.** Carcinogenicity study in rats with a mixture of eleven volatile halogenated hydrocarbon drinking water contaminants. *Sci Total Environ* 1985;47:427-32.
7. **Matsumura Y, Marchevsky A, Zuo XJ, Kass RM, Matloff JM, Jordan SC.** Assessment of pathological changes associated with chronic allograft rejection and tolerance in two experimental models of rat lung. *Transplantation* 1995;59:509-17.
8. **Martínez SM, Tarrés MC, Montenegro S, Milo R, Picena JC, Figueroa N, et al.** Spontaneous diabetes in eSS rats. *Acta Diabetol Lat* 1988;25:303-13.
9. **Martínez SM, Tarrés MC, Picena JC, Montenegro SM, Gagliardino JJ, Gómez-Dumm CLA, et al.** eSS rat, an animal model for the study of spontaneous non-insulin-dependent diabetes. En: Shafrir E, editor. *Lessons from animal diabetes IV*. First edition. Kent, UK: Smith-Gordon; 1993. p.75-90.
10. **Tarrés MC, Martínez SM, Montenegro S, Llorens A, Picena JC, Naves A.** The eSS rat. A model of non-insulin-dependent human diabetes. *Am J Pathol* 1992; 141:761-3.
11. **Calderari S, Font MT, Garroq O, Martínez SM, Morini JC, Puche R et al.** The inbred IIM/Fm stock. *Rat News Lett* 1991;25:28-9.
12. **Committee on Care and Use of Laboratory Animals Resources.** Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication n° 86-23. Bethesda, Maryland: National Institutes of Health; 1985.
13. **Wilkinson L.** SYSTAT: The System for Statistics. Evanston, IL.: SYSTAT, Inc.; 1990.
14. **Hamlin CR, Khon RR, Lushin JH.** Apparent accelerated aging of collagen in diabetes mellitus. *Diabetes* 1985;24: 902-5.
15. **Martínez SM, Tarrés MC, Montenegro SM, Revelant G, Figueroa N, Alonso D, et al.** Intermittent dietary restriction in eSS diabetic rats. Effects on metabolic control and skin morphology. *Acta Diabetol Lat* 1990;27: 329-36.
16. **Escolar J, Gallego B, Tejero C, Escolar A.** Changes occurring with increasing age in the rat: morphometrical study. *Anat Rec* 1994;239:287-96.
17. **Kon Y, Tsukada H, Hasegawa T, Igarashi K, Wada K, Suzuki E, et al.** The role of *Pseudomonas aeruginosa* elastase as a potent inflammatory factor in a rat air pouch inflammatory model. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999; 25:313-21.
18. **Lapa e Silva JR, Guerreiro D, Noble P, Poulter LW, Cole PJ.** Immunopathology of experimental bronchiectasis. *Am J Res Cell Mol Biol* 1989;1:297-304.