

Valoración morfométrica de pulmones de rata insuflados con líquido fijador a diferentes presiones próximas a la capacidad pulmonar total

J.D. Escolar Castellón^a, M.A. Escolar Castellón^a, C. Tejero Juste^b y P.A. Roche Roche^c

^aProfesor Titular y ^bDoctorando. Departamento de Ciencias Morfológicas. Universidad de Zaragoza.

^cProfesor Asociado Médico. Departamento de Medicina y Psiquiatría. Universidad de Zaragoza.

INTRODUCCIÓN: En la actualidad se acepta que la fijación pulmonar con líquido fijador por vía traqueal a 25 cm de presión de H₂O es la más idónea. Sin embargo, hay estudios que aparentemente no lo confirman.

MATERIAL Y MÉTODOS: Se ha utilizado ratas Fischer cuyos pulmones fueron insuflados con líquido fijador a cuatro diferentes presiones: 20, 25, 30 y 35 cmH₂O. Los pulmones fijados se procesaron para microscopia de luz y se estudiaron morfométricamente. Se cuantificaron las siguientes variables: volumen pulmonar, volumen de tejido, volumen aéreo, superficie alveolar interna (SAI), cuerda alveolar, para medir el tamaño del espacio aéreo distal y número de alvéolos. Los resultados se compararon estadísticamente.

RESULTADOS: El volumen pulmonar aumentó con la presión de insuflación, siendo significativo al elevar la presión 20 a 25 cm y de 30 a 35 cmH₂O. El volumen de aire no se modificó, pero sí el del tejido al incrementar la presión de 20 a 30 cmH₂O y de 30 a 35 cmH₂O. El aumento del volumen de tejido lo relacionamos con extravasación de líquido fijador al intersticio. El número de alvéolos aumentó con la presión siendo significativo al incrementar de 20 a 30 cm y de 30 a 35 cmH₂O. La SAI aumentó con la presión siendo significativo entre 20 cm y el resto de los grupos. La cuerda alveolar, que está en relación con el tamaño de los alvéolos, disminuyó de tamaño con la presión siendo significativo al pasar de 20 a 25 cm.

CONCLUSIÓN: La presión de 25 cmH₂O es la ideal para fijar los pulmones con líquido. Presiones inferiores distienden parcialmente el pulmón y presiones superiores pueden producir el paso de líquido al espacio intersticial.

Palabras clave: Rata, fijación pulmonar. Capacidad pulmonar total. Presión transpulmonar. Distensibilidad pulmonar. Morfometría.

(Arch Bronconeumol 2000; 36: 450-454)

The morphometric study of rat lungs after liquid-fixing to different pressures near total lung capacity

INTRODUCTION: Liquid lung fixing through the trachea to a pressure of 25 cmH₂O is currently accepted to be ideal. However, some studies do not seem to confirm that assumption.

MATERIAL AND METHODS: The lungs of Fischer rats were filled with fixing liquid to four different pressures: 20 cm, 25 cm, 30 cm and 35 cmH₂O. The fixed lungs were processed for inspection under a light microscope for morphometric study. The following variables were recorded: lung volume, tissue volume, air volume, internal alveolar surface (IAS), alveolar chord to measure the size of the distal air space, and the number of alveoli. Statistical comparisons were performed.

RESULTS: Lung volume increased with insufflation pressure, with significant differences related to pressure increases from 20 cm to 25 cm and from 30 cm to 35 cmH₂O. Air volume did not change, although tissue volume changed when pressure increased from 20 cm to 30 cmH₂O and from 30 cm to 35 cmH₂O. The increase of tissue volume was related to extravasation of interstitial fixer. The number of alveoli increased with pressure from 20 to 30 cm and from 30 to 35 cmH₂O. IAS increased with pressure from 20 cm and all the other pressures. Alveolar chord, which is related to size of alveoli, decreased significantly as pressure increased from 20 cm to 25 cm.

CONCLUSION: A pressure of 25 cmH₂O is ideal for liquid fixing of lung volumes. With lower pressures the lung is partially distended and with higher pressures the fluid can pass into the interstitial space.

Key words: Rats. Lung fixing. Total lung capacity. Transpulmonary pressure. Pulmonary distensibility. Morphometry.

Este trabajo ha sido realizado gracias a la ayuda de la DGEIC del Ministerio de Educación y Cultura n.º PM95-0186.

Correspondencia: Dr. J.D. Escolar Castellón.
Departamento de Ciencias Morfológicas.
Universidad de Zaragoza. Zaragoza.

Recibido: 13-12-99; aceptado para su publicación: 9-5-00.

Introducción

Las técnicas de fijación en morfología van dirigidas a conservar la arquitectura tisular y los elementos del tejido, sin que aparezcan elementos extraños que distorsionen los resultados del estudio. Hay un consenso en la

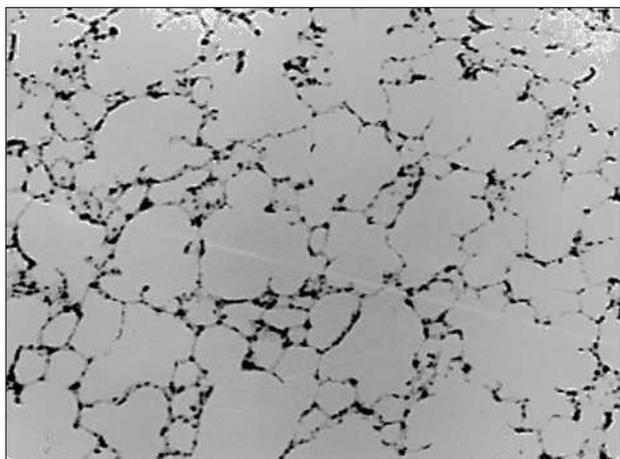


Fig. 1. Campo histológico de un pulmón digitalizado en 256 tonos de grises. Tinción azul de metileno, 100.

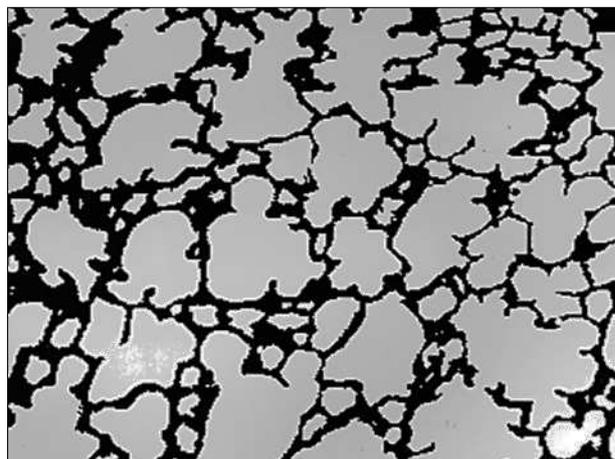


Fig. 2. Imagen anterior binarizada. Sobre esta imagen se cuantificaron las variables estudiadas.

mayoría de los autores de fijar los pulmones introduciendo fijador líquido por la tráquea a 25 cm de presión de H_2O . Para algunos autores esta presión transpulmonar (Ptp) se corresponde con capacidad pulmonar total (TLC)¹. Se considera que un pulmón ha alcanzado TLC cuando la curva presión-volumen (P-V) ha llegado a la inflexión de la fase de meseta^{1,2}.

Bachofen et al³ y Gil et al² insuflaron pulmones con suero salino y concluyeron que son necesarios 10 cm de presión de H_2O para alcanzar TLC. Forrest y Weibel⁴, Forrest⁵ y Pinkerton et al⁶ insuflan los pulmones para el estudio morfológico con fijador a 20 cmH_2O . Stanley et al⁷ en un estudio morfológico experimental demostraron enfisema en los pulmones manipulados, cuando se fijaban a 30 cm de Ptp, pero no lo pudieron demostrar si los fijaban 20 cmH_2O .

A una propuesta mayoritaria de fijar los pulmones con líquido por la tráquea a 25 cm de presión de H_2O , se oponen otras minoritarias, que no deben desecharse a no ser que existan datos objetivos para ello. Estas experiencias nos llevan a replantearse el método de fijación del pulmón, con el objetivo de valorar cuál es la Ptp idónea para el estudio morfológico del pulmón, considerando *a priori* que la fijación idónea puede ser independiente de TLC. Para ello se propone en este estudio comparar pulmones de rata fijados por vía traqueal a diferentes Ptp de 20, 25, 30 y 35 cmH_2O .

Material y métodos

Se han utilizado 40 ratas Fischer 344 de 5 meses de edad. Los animales dispusieron de comida y bebida *ad libitum*.

Para el sacrificio, los animales fueron anestesiados con pentotal intraperitoneal (0,1 mg/kg de peso corporal). Una vez dormidos se realizó una toracotomía, abriendo el pericardio, para acceder al ventrículo derecho, por donde se introdujo solución salina para lavar el lecho vascular pulmonar. A continuación los pulmones fueron escindidos de la caja torácica y fijados por vía traqueal, con formalina al 10%, durante 48 h a cuatro diferentes presiones: 20, 25, 30 y 35 cmH_2O . Una vez fijado se calculó el volumen pulmonar por inmersión, expresado en cm^3 . Los pulmones se procesaron para microscopia de

luz, para lo que fueron deshidratados incluidos en parafina y cortados a 7 μ m. El estudio morfológico se sistematizó en tres fases⁸:

1. *Captura*. Se utilizaron un microscopio Nikon®, una cámara de vídeo Hitachi®, una tarjeta de captura Quick-image capture®, un ordenador Macintosh IICx®, y un programa NIH Image®. Las imágenes se capturaron en 256 tonos de grises y a 100 aumentos (fig. 1); se capturaron al azar 42 campos por animal.

2. *Tratamiento de las imágenes*. Se utilizó un programa NIH Image®. Las imágenes capturadas a 256 tonos de grises, se convirtieron en otras de dos colores, negro tejido, blanco resto (fig. 2).

3. *Cuantificación*. Sobre las imágenes de dos colores se cuantificaron las siguientes variables, con el programa NIH Image® y otro desarrollado por nosotros:

- Densidad de tejido. Es la proporción porcentual del color negro en una imagen.
- Perímetro alveolar interno. Es la longitud de la interlínea, color negro/color blanco. Se cuantificó en píxels.
- Cuerda alveolar. Es la distancia tomada al azar entre dos paredes de un mismo alvéolo. Es directamente proporcional al tamaño del espacio aéreo distal. Se expresa en μ m (fig. 1).

Calculadas estas variables y conocido el volumen pulmonar se hallaron las siguientes variables volumétricas:

- Volumen de tejido. Se obtuvo a partir del volumen pulmonar y la densidad de tejido. Es el volumen de tejido pulmonar distal. Se expresa en cm^3 .
- Volumen de aire. Se calculó restando al volumen pulmonar el volumen de tejido. Es el volumen de todos los espacios aéreos distales. Se expresa en cm^3 .
- Número de alvéolos. Es el número de alvéolos que hay en los dos pulmones de un mismo animal; el resultado se dividió por 10^{-7} . Para ello se asumió que el alvéolo tiene forma esférica y su diámetro medio es la cuerda alveolar.
- La superficie alveolar interna (SAI) se calculó a partir del volumen pulmonar y del perímetro alveolar interno, y se expresa en m^2 .

Estudio estadístico

Se presentan los valores medios y una desviación estándar. Cuando la distribución de los resultados se acercaban a la distribución normal se compararon con el test de ANOVA, si

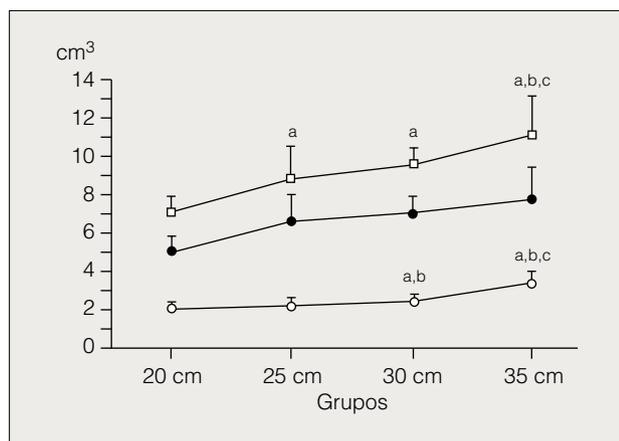


Fig. 3. Gráfica de los valores obtenidos en las variables: volumen pulmonar (cuadros blancos), volumen de aire (círculos negros), volumen de tejido (círculos blancos). Se presentan los valores medios y una desviación estándar. *p < 0,05 en relación con los pulmones fijados a 20 cm de presión de H₂O. ^bp < 0,05 en relación con los pulmones fijados a 25 cm de presión de H₂O. ^cp < 0,05 en relación con los pulmones fijados a 30 cm de presión de H₂O.

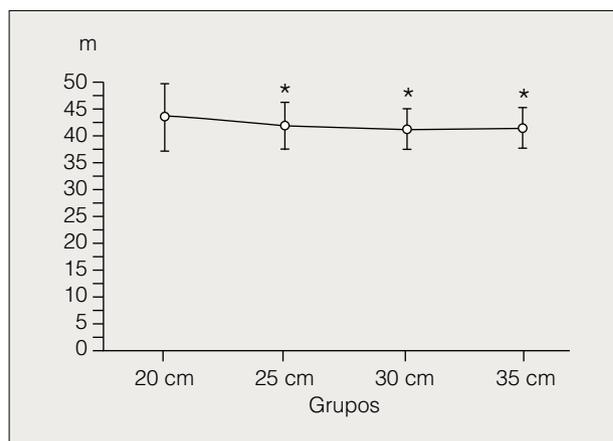


Fig. 5. Gráfica de los valores obtenidos en la variable cuerda alveolar. Se presentan los valores medios y una desviación estándar. *p < 0,05 en relación con los pulmones fijados a 20 cm de presión de H₂O.

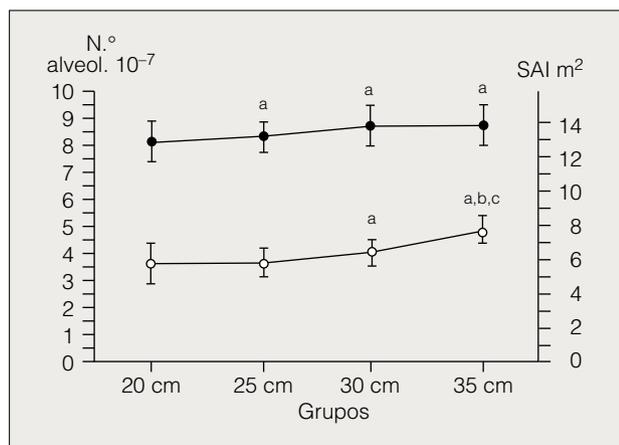


Fig. 4. Gráfica de los valores obtenidos en las variables: número de alvéolos (círculos negros), superficie alveolar interna (círculos blancos). Se presentan los valores medios y una desviación estándar. *p < 0,05 en relación con los pulmones fijados a 20 cm de presión de H₂O. ^bp < 0,05 en relación con los pulmones fijados a 25 cm de presión de H₂O. ^cp < 0,05 en relación con los pulmones fijados a 30 cm de presión de H₂O.

se alejaba se comparaban con el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Se consideraron valores significativos cuando p < 0,05. Se realizó análisis de la varianza (ANCOVA) de la variable volumen pulmonar introduciendo como covariables el volumen de tejido y el volumen de aire. El análisis de la varianza se realizó en el conjunto de todos los animales y en cada grupo de Ptp. Se utilizó el programa estadístico Star-View® 5.0.

Resultados

Los resultados de comparar los grupos entre sí se presentan en las figuras 3-5. De ellos destacamos: al ascender la Ptp el volumen pulmonar aumentó, siendo significativo el incremento de los pulmones fijados a 25, 30 y 35 cm respecto los fijados a 20 cm. También

fue significativo el incremento del volumen de los pulmones fijados a 35 cm con respecto a los otros tres grupos (fig. 3). El aumento del volumen pulmonar fue a expensas del incremento del volumen aéreo distal y del aumento del tejido; al incrementar la Ptp el volumen aéreo aumentó pero sólo fue significativo al pasar de 20 a 25 cm (fig. 3), mientras que el tejido pulmonar aumentó de 25 a 30 cm y de 30 a 35 cm (fig. 3). La SAI aumentó con la Ptp siendo significativo al incrementarse de 20 a 25 cm (fig. 4). El aumento de la SAI coincidió con una disminución de la cuerda alveolar que fue significativa, igualmente, al pasar de 20 a 25 cmH₂O (fig. 5). El número de espacios aéreos distales aumentó con la Ptp, siendo significativo al ascender de 20 a 30 cm y de 30 a 35 cmH₂O (fig. 4).

El análisis de la variancia evidenció siempre valores positivos (tabla I). De las dos covariables, el volumen de tejido obtuvo siempre valores más bajos que la covariable volumen de aire. El menor valor se mostró en los pulmones fijados a 20 cmH₂O.

TABLA I
Resultados del análisis de la variancia (ANCOVA) de la variable común pulmonar en el que se han utilizado como covariables el volumen de tejido y el volumen de aire. Se presentan los resultados en los cuatro grupos de Ptp y en el conjunto de todos los pulmones

Grupo	Covarianza	Covariable
20 cmH ₂ O	0,073	Tejido
	0,554	Aire
25 cmH ₂ O	0,678	Tejido
	2,31	Aire
30 cmH ₂ O	0,23	Tejido
	0,681	Aire
35 cmH ₂ O	1,015	Tejido
	3,418	Aire
Todos los pulmones	1,149	Tejido
	3,109	Aire

Discusión

En este experimento se ha podido demostrar que al incrementar la Ptp se ha producido un aumento de volumen pulmonar y una modificación de la arquitectura pulmonar, lo que nos obliga a entrar a discutir cuál es la Ptp idónea para fijar el pulmón.

Efectivamente, existen discrepancias de criterios sobre cuál es la mejor Ptp para fijar los pulmones escindidos y llenos de líquido: Gil et al² y Bachofen et al³ propusieron que los pulmones llenos de suero salino alcanzaban TLC por debajo de 10 cmH₂O. Assimacopoulos et al⁹ consideran que, cuando se administra el fijador líquido a través de la tráquea por encima de 15 cm H₂O, el pulmón no se distiende. Forrest y Weibel⁴ y Forrest⁵ fijan los pulmones a 20 cmH₂O. La mayoría de los estudios morfométricos se han hecho con los pulmones fijados a 25 cmH₂O. Por último, Stanley et al⁷ propone 30 cmH₂O para distender pulmones enfisematosos. En nuestro caso, al haber demostrado un aumento significativo del volumen pulmonar entre 20 y 25 cmH₂O y no haber significación entre 25 y 30 cm, nos lleva a considerar la posibilidad que en 25 cmH₂O de Ptp puede estar la inflexión de la fase de meseta de la curva P-V^{1,2}. Hemos encontrado otra inflexión al incrementar a 35 cmH₂O de presión, pero ésta se debe a un aumento del tejido, ya que el volumen de aire no evidenció diferencias significativas a partir de 25 cmH₂O. Por tanto, proponemos que 25 cmH₂O es la menor Ptp necesaria para que el pulmón alcance TLC.

Cuando el pulmón se distiende, su arquitectura microscópica sufre modificaciones. Efectivamente, en un principio se relacionaba la insuflación pulmonar con un simple aumento de volumen de los espacios aéreos distales^{10,11}. Actualmente, el aumento del volumen pulmonar se asocia con el reclutamiento alveolar^{9,12,13}. Éste es un proceso complejo en el que el aumento del volumen pulmonar se relaciona con la apertura de nuevas unidades aéreas distales; para que eso se produzca es necesario que las paredes alveolares, que estaban previamente plegadas, se desplieguen. El resultado es mayor número de alvéolos, siendo éstos más pequeños¹⁴. El desplegamiento de las paredes alveolares produce un mayor incremento que el que produciría el simple aumento del volumen de los espacios aéreos distales. El aumento de la SAI ha sido descrito siempre asociado con la insuflación pulmonar^{2,11}. En este experimento hemos podido evidenciar, al incrementar la Ptp de 20 a 25 cm, acortamiento de la cuerda alveolar, lo que relacionamos con disminución del tamaño de los espacios aéreos distales, y aumento de la SAI. Esto nos hace proponer que al subir la Ptp de 20 a 25 cmH₂O se ha producido un aumento del volumen pulmonar y un desplegamiento de paredes alveolares, aunque si bien el número de alveólos no evidenció aumento significativo. Para nosotros, los pulmones fijados a 20 cm no ha desplegado correctamente sus paredes.

Al incrementar la Ptp de 25 a 30 cm sólo se apreció aumento significativo del tejido que también se observó al incrementar la presión a 35 cm. El volumen pulmonar ha sido calculado a partir del volumen de aire y

el volumen de tejido, por lo que estas variables están en colinealidad. Al relacionar las dos primeras variables con el volumen pulmonar, mediante el test de ANCOVA, hemos obtenido siempre valores positivos, siendo los más bajos los del volumen de tejido, sobre todo en los pulmones fijados a 20 cmH₂O. El resultado del ANCOVA sugiere que el volumen del pulmón depende del volumen de tejido y del volumen de aire, siendo el volumen de aire el que tiene más peso sobre el volumen de aire. La influencia del volumen de tejido sobre el volumen pulmonar aumenta cuando se sobrepasa TLC. Por todo esto, en el modelo de fijación propuesto en este experimento, el volumen de tejido puede modificarse con la Ptp, lo que puede influir en el volumen de tejido pulmonar. Proponemos que el aumento del tejido obtenido en los animales fijados a 30 y 35 cmH₂O es un artefacto, consecuencia de un traspaso de líquido desde el espacio aéreo al tejido. Debe recordarse que la membrana que separa al tejido del alvéolo es semipermeable, lo que permite el traspaso de agua a su través. Efectivamente, ha sido descrito que se puede producir edema pulmonar de dos formas: al aumentar la presión de fijación o bien al utilizar fijadores con diferentes presiones osmóticas^{15,16}. En nuestro caso postulamos que al introducir líquido con Ptp alta se ha producido edema intersticial, hecho que lo hemos podido medir morfométricamente como aumento del volumen de tejido. El reclutamiento observado en los pulmones fijados a 35 cm puede ser consecuencia de la pequeña distensión pulmonar producida por el aumento de la Ptp.

Proponemos que la Ptp idónea para la fijación con líquido por vía traqueal es de 25 cmH₂O, aduciendo dos razones: a) a 20 cmH₂O de Ptp las paredes alveolares están plegadas, y b) presiones iguales o superiores a 30 cmH₂O producen aumento del volumen de tejido, lo que consideramos un efecto indeseable que nos condiciona a proponer como artefacto el incremento de tejido producido por el aumento de la Ptp por encima de 25 cmH₂O.

El modelo de pulmón escindido de tórax y perfundido con fijador por la tráquea, que se utiliza para el estudio morfológico, no se acerca mucho a un estado fisiológico ideal. Efectivamente, la distensibilidad pulmonar depende de muchos factores como son: el tipo de fijador utilizado, el flujo inicial de fijación, si se realiza la fijación con los pulmones *in situ* o escindidos, la presión pulmonar, la presión sanguínea pulmonar al comienzo de la fijación¹⁷, la temperatura¹⁸, la osmolaridad del fijador¹⁹, etc. Por no complicar en exceso el experimento, se han procurado mantener constantes todas esas posibles variables siendo la presión de administración del fijador la única variable modificada, por ser el único dato que se describe en todos los trabajos. Realizar un modelo que se acerque más a un “estado fisiológico” requeriría una tecnología más complicada. Consideramos que teniendo como referencia los resultados obtenidos a 25 cmH₂O, sería conveniente continuar los estudios para conseguir un modelo morfológico del pulmón, que se aproxime más a una situación fisiológica.

Agradecimiento

Los autores agradecen a la auxiliar de laboratorio Concepción Navarro Samperi la manipulación del material histológico y al profesor de bioestadística Martínez Terrez el asesoramiento estadístico.

BIBLIOGRAFÍA

1. Lum H, Mitzner H. A species comparison of alveolar size and surface forces. *J Appl Physiol* 1987; 62: 1865-1871.
2. Gil J, Bachofen H, Gehr P, Weibel ER. Alveolar volume-surface area relation in air- and saline-filled lungs fixed by vascular perfusion. *J Appl Physiol* 1979; 47: 990-1001.
3. Bachofen H, Hildebrat J, Bachofen M. Pressure-volume curves of air- and liquid-filled excised lung-surface tension in situ. *J Appl Physiol* 1970; 29: 422-431.
4. Forrest JB, Weibel ER. Morphometric estimation of pulmonary diffusion capacity. *Respir Physiol* 1975; 24: 191-202.
5. Forrest JB. Lung tissue plasticity: morphometric analysis of anisotropic strain in liquid filled lungs. *Respir Physiol* 1976; 27: 223-239.
6. Pinkerton KE, Barry BE, O'Neil J, Raub JA, Pratt PC, Crapo JD. Morphologic changes in the lung during the lifespan of Fischer 344 rats. *AJ Anat* 1982; 164: 155-174.
7. Stanley NN, Alper R, Cunningham EL, Cherniack NS, Kefalides NA. Effects of a molecular change in collagen on lung structure and mechanical function. *J Clin Invest* 1975; 55: 1195-1201.
8. Escolar JD, Tejero C, Escolar MA, Montalvo F, Garisa R. Methodological contribution for the morphometric study of the lung: approximation to the ideal sample size and quantification. *Anat Rec* 1997; 247: 501-511.
9. Assimacopoulos A, Guggenheim R, Kapanci Y. Changes in alveolar capillary configuration at different levels of lung inflation in the rat. An ultrastructural and morphometric study. *Lab Invest* 1996; 34: 10-22.
10. Storey W, Staub AC. Ventilation of terminal air units. *J Appl Physiol* 1962; 17: 391-397.
11. D'Angelo E. Local alveolar size and transpulmonary pressure in situ and in isolated lungs. *Respir Physiol* 1972; 14: 251-266.
12. Okada O, Presson RG, Kevin K, Godbey S, Cpen RL, Wagner WW. Capillary perfusion patterns in single alveolar walls. *J Appl Physiol* 1992; 72: 183-184.
13. Cheng W, DeLong DS, Franz GN, Petsonk EL, Frazer DG. Contribution of opening and closing of units to lung hysteresis. *Respir Physiol* 1995; 102: 205-215.
14. Lum H, Huang I, Mitzner W. Morphological evidence for alveolar recruitment during inflation at high transpulmonary pressure. *J Appl Physiol* 1990; 68: 2280-2286.
15. Conhaim RL, Lai-Fook SJ, Eaton A. Sequence of interstitial liquid accumulation in liquid-inflated sheep lung lobes. *J Appl Physiol* 1989; 66: 2659-2666.
16. Wu DXY, Weibel ER, Bachofen H. Lung lesions in experimental hydrostatic pulmonary edema: An electron microscopic and morphometric study. *Exp Lung Res* 1995; 21: 711-730.
17. Hayatdavoudi G, Crapo JD, Miller FJ, O'Neil J. Factor determining degree of inflation in intratracheally fixed rat lungs. *J Appl Physiol Respirat Environ Exercise Physiol* 1980; 48: 389-393.
18. Jones TA, Petsonk EL, Frazer DG. Effect of temperature on pressure-volume hysteresis of excised lung. *Respiration Physiology* 1996; 106: 47-55.
19. Bachofen H, Ammann A, Wangenstein D, Weibel ER. Perfusion fixation lungs for structure-function analysis: credits and limitations. *J Appl Physiol Respirat Environ Exercise Physiol* 1982; 53: 528-533.