

Un modelo morfométrico de neumonitis por hipersensibilidad en la rata vieja

J. de D. Escolar, E. Alfaro, P.A. Roche, C. Almajano* y B. Gallego

Departamento de Ciencias Morfológicas. Facultad de Medicina. *Sección de Anatomía Patológica. Hospital Real y Provincial. Zaragoza.

Se pretende desarrollar un modelo experimental de neumonitis por hipersensibilidad en la rata vieja. Para ello, se propone la siguiente hipótesis: la neumonitis por hipersensibilidad en la rata vieja se manifestará por alteraciones de la fórmula celular del lavado broncoalveolar y aumento del componente tisular del intersticio alveolar. Se han utilizado 60 animales con una media de edad de 18 meses organizados en 2 grupos: grupo 1, animales sanos, no tratados; grupo 2, animales enfermos, que se expusieron a seroalbúmina bovina (AB). Se realizó lavado broncoalveolar (BAL) y estudio morfométrico del pulmón. En el BAL se procedió al recuento porcentual de linfocitos, leucocitos polimorfonucleares y macrófagos alveolares; las variables morfométricas estudiadas fueron: índice de intersección lineal media (Lm), cuerda alveolar, grosor de pared, densidad de tejido y número de mediciones de cuerda alveolar. De los resultados se destaca que los animales enfermos presentaron, al compararlos con los sanos, un aumento del porcentaje de linfocitos del BAL, disminución del Lm, de la cuerda alveolar y del grosor de pared, junto a un aumento de la densidad de tejido y del número de mediciones, siendo todo ello estadísticamente significativo ($p < 0,001$). Estos resultados nos inducen a considerar que la exposición a AB en la rata vieja produce aumento de linfocitos en el BAL y del componente intersticial del alveolo, hallazgos que están relacionados con inflamación alveolointersticial.

Palabras clave: Neumonitis por hipersensibilidad. Rata. Morfometría. BAL.

Arch Bronconeumol 1995; 31: 264-269

Introducción

Los problemas sanitarios derivados del progresivo envejecimiento de la población están obligando a plantear nuevos objetivos de investigación. La hipóte-

Correspondencia: Dr. J. de D. Escolar Castellón.
Departamento de Ciencias Morfológicas. Facultad de Medicina.
Domingo Miral, s/n. 50009 Zaragoza.

Recibido: 13-6-94; aceptado para su publicación: 14-2-95.

Este estudio ha sido realizado con subvención del Ministerio de Educación y Ciencia. Dirección General de Investigación Científica y Técnica. N.º PM88-096.

A morphometric model of hypersensitivity pneumonitis in the aging rat

Our objective was to develop an experimental model of hypersensitivity pneumonitis in the aging rat. The following hypothesis was proposed: hypersensitivity pneumonitis in the aging rat will be evident in alterations in cells harvested by bronchoalveolar lavage (BAL) and in an increase in alveolar interstitial tissue. Sixty animals with a mean age of 18 months were divided into 2 groups. Group 1 contained healthy, untreated animals and group 2 contained unhealthy animals that had been exposed to bovine serum albumin (BS). BAL and morphometric analysis of the lung was performed. The percentage of lymphocytes, polymorphonuclear, leukocytes and alveolar macrophages were determined in BAL. The morphometric variables studied were mean linear intersection (Lm), length of alveolar cord, wall thickness, tissue density and number of measurements of alveolar cord. The results show that the unhealthy animals had higher ($p < 0.001$) percentages of lymphocytes in BAL, lower Lm, diminished alveolar cord and thinner walls, as well as greater tissue density and a higher number of measurements. All differences were statistically significant ($p < 0.001$). These results lead to the conclusion that exposure of the aging rat to BS produces an increase in lymphocytes in BAL and an increase in interstitial alveolar content, findings that are related to alveolar-interstitial inflammation.

Key words: Hypersensitivity due to pneumonitis. Rat. Morphometry. BAL.

sis de partida no considera al anciano como un enfermo, sino como diferente al adulto; esto es, la vejez es una fase del desarrollo ontogénico.

El pulmón del anciano ha sido comparado con el del adulto^{1,2}. Tras estudios morfológicos realizados en la especie humana y en animales de experimentación, en particular la rata, se ha llegado a la conclusión que el pulmón del anciano, en relación con el del adulto, presenta dilatación de los espacios aéreos sin pérdida del componente tisular intersticial^{1,2}.

La neumonitis por hipersensibilidad (NH) incluye únicamente enfermedades alveolares e intersticiales

producidas como consecuencia de exposición intensa o prolongada a partículas orgánicas, de tamaño suficientemente pequeño para poder alcanzar el parénquima pulmonar³. Experimentalmente se ha reproducido en numerosos animales de laboratorio, administrando antígenos de distinta naturaleza, empleando diferentes técnicas, obteniendo resultados similares a los observados en la clínica humana. Morfológicamente la NH se caracteriza por presentar, entre otras manifestaciones, una inflamación alveolointersticial que se expresa por una alteración de la fórmula del lavado broncoalveolar (BAL) y un engrosamiento de las paredes alveolares. Todo esto ha sido estudiado en poblaciones jóvenes-adultas^{4,7}; sin embargo, la experiencia que se tiene de la NH en el anciano es más escasa y la mayoría de las referencias exponen un solo caso clínico, asociado casi siempre a una patología sobreañadida⁸⁻¹¹; todavía no se han realizado estudios de series de poblaciones viejas de los que se pueda deducir cómo es la NH en el anciano. Junto a esta carencia de datos clínicos, está el hecho de que no se ha descrito todavía un modelo de NH en el animal viejo.

En este trabajo se describe un modelo de NH en la rata vieja; se propone como hipótesis que la administración de un antígeno a un animal sensibilizado desencadenará una reacción inflamatoria que se expresará por una alteración de la fórmula del BAL, y un aumento del componente tisular del pulmón. El recuento celular del BAL se realizará de forma porcentual, mientras que la cuantificación del tejido intersticial alveolar se efectuará morfométricamente, a partir de un método derivado del clásico índice de intersección lineal media (Lm)^{12,13}. Basándonos en el trabajo de Pinkerton et al¹ asumimos que una rata con 18 meses de edad puede ser considerada vieja.

Material y métodos

Se han utilizado 60 ratas Wistar, de 18 meses de edad en el momento del sacrificio, con un rango de -3 y +8 meses. Los animales fueron escogidos al azar de nuestro animalario. Permanecieron durante todo el experimento en un ambiente a temperatura constante de 22 °C, siendo alimentados con piensos comerciales y agua *ad libitum*. Los animales se ordenaron en 2 grupos:

1. Treinta animales que no recibieron ningún tratamiento: grupo control.
2. Treinta animales a los que se les indujo una NH: grupo de animales tratados.

Tratamiento

Sensibilización. Se inyectaron en la almohadilla plantar de la rata 0,2 ml de albúmina bovina (AB) al $9 \times 10^{-6}\%$ en adyuvante completo de Freund al 50%; se realizaron 3 administraciones con 2 semanas de intervalo cada una. A las 6 semanas de la primera administración, se comprobó, por inmunoprecipitación en gel de agarosa, la presencia de anticuerpos frente a la AB en todos los animales tratados.

Inducción de la NH. Los animales se introdujeron en un ambiente de AB durante un mes, a razón de 8 horas diarias. Para ello, disponíamos de jaulas herméticas con flujo lami-

nar (medidas interiores: $23 \times 35 \times 57$ cm). El ambiente de AB se consiguió con un aparato Hudson cuyo depósito contenía una solución de AB al $18 \times 10^{-18}\%$ en suero fisiológico.

Sacrificio

Los animales se sacrificaron al día siguiente de la última exposición a AB. En primer lugar, se administró a los animales una dosis letal de Nembutal®; una vez comprobada en los mismos la ausencia total de reflejos, se realizó un orificio de traqueostomía por el que se introdujo un catéter (Venocath® 14 G) hasta el bronquio principal derecho, que serviría para realizar el BAL. A continuación, se efectuó una toracotomía para acceder a la cavidad torácica. Se ligó el hilio pulmonar izquierdo, separando su pulmón, que se procesó para estudio histológico.

Lavado broncoalveolar

Se siguió un procedimiento ya descrito¹⁴. Se realizó perfundiendo a través del catéter alojado en el bronquio principal derecho 4 partes alícuotas de 1 ml de solución salina, que se aspiraron a continuación. El producto obtenido, el 75% de lo perfundido, fue centrifugado. Con el precipitado se hizo una extensión que se contrastó con el método de Giemsa. Se procedió al recuento porcentual de macrófagos alveolares (MA), linfocitos y leucocitos polimorfonucleares (PMN).

Estudio histológico

El pulmón izquierdo se fijó por inmersión en formalina al 10%, con insuflación traqueal con el mismo fijador a presión positiva de 26 cm de agua. El bloque central del pulmón correspondiente al plano perpendicular al eje mayor, a nivel de la zona hilar (fig. 1), fue tallado y deshidratado por pases sucesivos en alcoholes de grado creciente, y posteriormente incluido en parafina. Se obtuvieron cortes de 7 μ de grosor, que se contrastaron con el método de PAS-azul alcian. Con esta sistemática se pudo realizar estudio morfométrico del

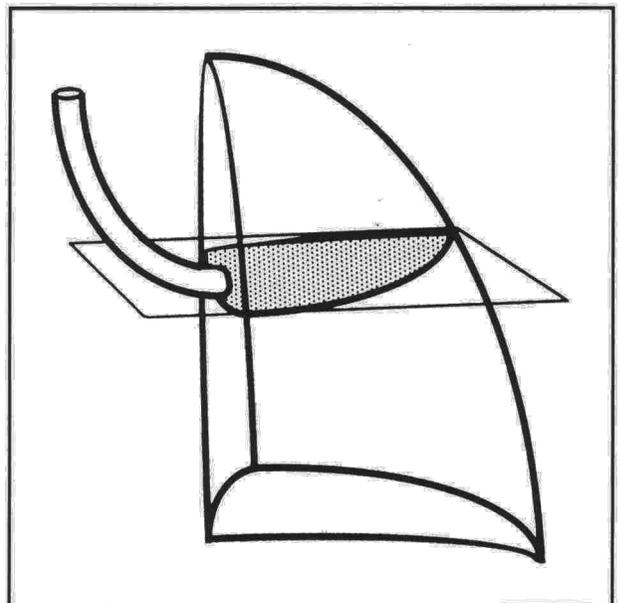


Fig. 1. Representación esquemática de un pulmón izquierdo en el que se presenta la zona del corte estudiado.

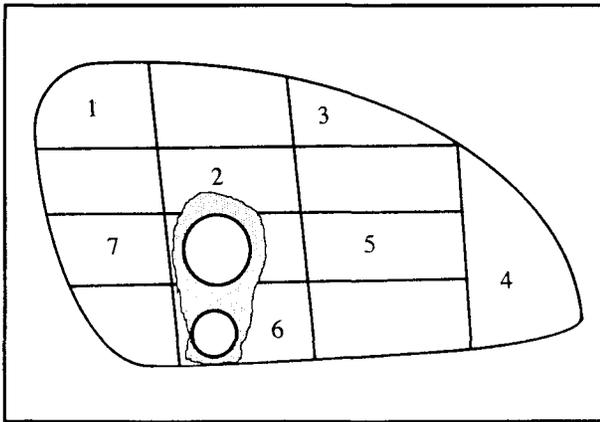


Fig. 2. Representación esquemática de un corte pulmonar dividido en 13 zonas. Están numeradas las 7 zonas estudiadas.

parénquima pulmonar según una variante de un método ya descrito¹⁴.

Los cortes pulmonares elegidos para el estudio se dividieron en 13 zonas, de las que se seleccionaron 7 (fig. 2). En cada una de las 7 zonas se eligió, al azar, un campo microscópico sin vía aérea ni vaso importante en su interior. En cada uno de los campos microscópicos se cuantificaron las siguientes variables:

1. Longitud de la cuerda alveolar. Este valor se obtuvo midiendo la longitud existente entre dos paredes de un mismo alveolo¹⁵. Para ello, sobre una tableta gráfica (Summagraphics® Bit Bad® Plus) se colocaron 7 líneas paralelas equidistantes, que se superponían sobre la imagen del microscopio (fig. 3) con la ayuda de una cámara clara, adaptada a un microscopio Nikon®, ocular de 10 × y objetivo de 40 ×. Sobre las líneas se dibujaba la distancia existente entre 2 paredes alveolares de un mismo alveolo; la tableta gráfica estaba conectada a un ordenador Macintosh® II cx. Un programa diseñado por nosotros cuantificaba las longitudes de la cuerda alveolar. Los valores se expresan en µm.

2. Número de cuerdas alveolares.

Conocido el valor medio de la cuerda alveolar por campo, el número de mediciones, así como la longitud total de las 7 rectas sobre las que se hacían las mediciones, pudimos obtener las siguientes variables:

3. Índice de intersección lineal media (Lm):

$$Lm = \frac{\sum L}{n^{1/2}}$$

4. Densidad total de tejido por campo (DT):

$$DT = \sum L - \sum La$$

5. El grosor medio de la pared alveolar por campo (PA):

$$PA = \frac{\sum L - \sum La}{n}$$

Donde $\sum L$ = suma de las longitudes de las 7 rectas del campo, $\sum La$ = suma de todas las longitudes de las cuerdas alveolares de cada campo microscópico, y n = número de mediciones.

Análisis estadístico

En el texto todos los datos se expresan en su media ± una desviación normal. Los resultados de la variable longitud de cuerda alveolar, Lm, densidad total de tejido por campo y número de cuerdas alveolares, se aproximaron a la distribución normal según los índices de Kurtosis y Skewness, por lo que se compararon con el test de la t de Student. Las variables grosor medio de la pared alveolar y las de las diferentes poblaciones celulares del BAL fueron comparadas con el test

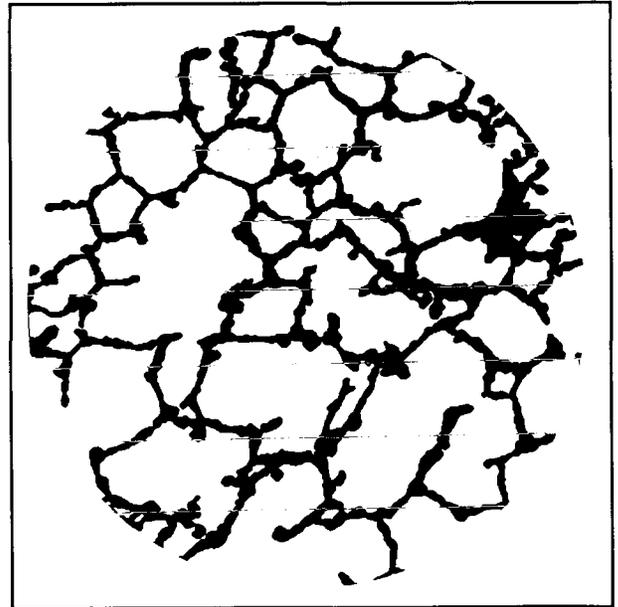


Fig. 3. Representación esquemática de la cuantificación de las diferentes cuerdas alveolares (líneas negras) de un campo microscópico; grosor de pared: líneas blancas; densidad de tejido: suma de todas las líneas blancas de un campo microscópico.

no paramétrico de la U de Mann-Whitney. También se hizo estudio de correlación con el resultado de las variables morfo-métricas; los tests de correlación realizados fueron: el coeficiente de correlación de Spearman para relacionar la variable grosor de pared con el resto, y el test de correlación simple entre las variables longitud de la cuerda alveolar, densidad de tejido, Lm y número de cuerdas alveolares. Se consideraron significativos en todos los casos valores inferiores a 0,05. El estudio estadístico se realizó en un ordenador Macintosh® II cx con el programa StatView® II.

Resultados

Lavado broncoalveolar (tabla I)

El recuento porcentual de células del BAL mostró, en el grupo de animales enfermos, un aumento significativo (p < 0,001) de linfocitos (51 ± 20,2) y disminución de PMN (4,62 ± 6,62) también significativa (p < 0,05) respecto al grupo de animales sanos (linfocitos: 36,04 ± 15,34; PMN: 8,83 ± 18,60).

TABLA I
Resultados del lavado broncoalveolar

	Linfocitos	PMN	MA
Control	36,04 ± 15,34 **	8,83 ± 18,60 *	54,38 ± 19,75 **
Tratado	51 ± 20,20	4,62 ± 6,62	44,64 ± 18,99

Media ± una desviación normal de los valores obtenidos del recuento porcentual del lavado broncoalveolar. PMN: leucocitos polimorfonucleares. MA: macrófagos alveolares. *p < 0,05; **p < 0,001 al comparar con el grupo control.

Variables alveolointersticiales (tabla II)

El Lm mostró valores significativamente ($p < 0,001$) más bajos en los animales tratados ($60,79 \pm 21,7$), al compararlos con los de los animales control ($88,57 \pm 22,02$). Este descenso del Lm se acompañó, en los animales del grupo tratado, de una menor longitud de la cuerda alveolar ($39,52 \pm 9,32$) y menor grosor de la pared alveolar ($21,28 \pm 15,1$), en relación con el grupo control (cuerda alveolar: $59,62 \pm 21,95$; grosor de pared: $28,95 \pm 18,06$); estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0,001$). La densidad de tejido por campos estaba aumentada significativamente ($p < 0,001$) en el grupo tratado ($885,86 \pm 311,55$) respecto al grupo control ($782,9 \pm 400,19$). Por último, el número de alveolos fue significativamente superior ($p < 0,001$) en los animales tratados ($41,6 \pm 14$) comparado con los controles ($27,03 \pm 6$).

Tests de correlación (tabla III)

Nos llamó la atención que al relacionar las diferentes variables morfométricas entre sí, se obtuvieron los índices más altos en el grupo de animales tratados. Los resultados obtenidos se encuentran representados en la tabla III, y sólo vamos a destacar aquí los valores que, en ambos grupos, fueron significativos y obtuvieron un índice superior en valor absoluto a 0,6. El Lm alcanzó valores muy altos al relacionarlo con el número de cuerdas, pero de signo negativo ($r \geq -0,94$); también se relacionó el Lm, pero de forma directa, con la longitud de la cuerda alveolar ($r \geq 0,66$). La cuerda alveolar se relacionó negativamente con el número de

cuerdas ($r \geq -0,66$). Al relacionar densidad de tejido con el grosor de pared, se obtuvieron índices altos y positivos ($Rho \geq 0,86$).

Discusión

Nuestros resultados están a favor de la hipótesis enunciada, ya que los animales tratados, además de presentar alteraciones en la fórmula celular del BAL, mostraron claros indicios de tener aumentado el componente tisular del pulmón.

Las NH tanto clínicas como experimentales muestran entre otras características un aumento de linfocitos en el BAL^{9,10}; este incremento está relacionado con la puesta en marcha de mecanismos inmunológicos desencadenados ante la exposición a antígenos por vía aérea^{16,17}. Nuestros animales enfermos tienen alterada la fórmula del BAL, destacando el aumento de linfocitos. El aumento de linfocitos sugiere la presencia de inflamación alveolointersticial.

El Lm es, hasta el momento, la técnica morfométrica más utilizada para el diagnóstico del enfisema, habiéndose diseñado un sistema informático para su cuantificación automática¹⁸. El hecho de que los animales del grupo control presentaran el Lm mayor que los animales enfermos solamente nos sugiere la posibilidad de que existan diferencias estructurales entre los dos grupos de animales utilizados. La significativa disminución en los valores obtenidos en las variables cuerda alveolar y grosor de pared en el grupo de animales enfermos hace considerar la posibilidad de que los pulmones de los animales de ese grupo presenten alveolos más pequeños y de paredes más delgadas. Efectivamente, Lum et al¹⁵ y McCartney et

TABLA II
Resultados de las variables morfométricas

	Lm	Cuerda alveolar	Grosor pared	Densidad tejido	Número cuerdas
Control	88,57 ± 22,02 *	59,62 ± 21,95 *	28,95 ± 18,06 *	782,9 ± 400,19 *	27,03 ± 6 *
Tratado	60,79 ± 21,7	39,52 ± 9,32	21,28 ± 15,1	885,86 ± 311,55	41,6 ± 14

Lm: intersección linear media.

Media ± una desviación normal de los valores obtenidos de las variables morfométricas.

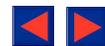
*p < 0,001 al comparar con el grupo control.

TABLA III
Índices de correlación de las variables morfométricas

Variable	Grupo	Lm	Cuerda alveolar	Grosor pared	Densidad tejido
Cuerda Alveolar	Control	0,663			
	Tratado	0,814			
Grosor Pared	Control		0,934		
	Tratado		0,551		
Densidad Tejido	Control			-0,758	0,862
	Tratado			0,904	
Número Cuerdas	Control	-0,942			
	Tratado	-0,996	-0,831	-0,774	-0,704

Lm: intersección linear media.

Sólo se presentan los valores significativos.



al¹⁹ relacionan la longitud de la cuerda alveolar con el tamaño del alveolo; sin embargo, ninguno de estos autores mide el grosor de la pared, pero se ha aconsejado la conveniencia de su cuantificación¹⁵. Los bajos índices de correlación obtenidos, al relacionar la cuerda alveolar con el grosor de la pared, hacen considerar que no existe una gran dependencia entre estas dos variables; estos datos sugieren que el tamaño del alveolo no depende del grosor de su pared.

En el diseño de este trabajo se planteaba como hipótesis que los posibles cambios estructurales que se pudieran producir en los pulmones de los animales enfermos se debían a un fenómeno inflamatorio. En este sentido, las variaciones en la fórmula citológica del BAL, encontrada en estos animales, están a favor de la puesta en marcha de un mecanismo inflamatorio relacionado con una respuesta inmune; la inflamación tisular cursa con un aumento de la permeabilidad vascular que condiciona un depósito de sustancias y células inflamatorias en los tejidos, que se expresaría como un aumento del grosor de la pared alveolar y del tejido pulmonar. Nos llama la atención que, en los animales tratados, la pared del alveolo sea más delgada y la densidad de tejido aumente, siendo las dos variables dependientes en proporción directa (índices de correlación altos y positivos). Lum et al¹⁵ tras insuflar pulmones de roedores a diferentes presiones encontraron alveolos más pequeños en los pulmones que se insuflaron a mayor presión; aunque estos autores no midieron el grosor de la pared, proponen como hipótesis que la mayor presión desplegaría alveolos que con presiones más bajas permanecerían colapsados. Para Lum et al¹⁵, el resultado de insuflar a mayor presión sería un aumento en el número de alveolos, los cuales tendrían menor tamaño y paredes más delgadas. Según esto, no se puede descartar que los animales enfermos presentaran diferente elasticidad pulmonar a la del animal sano; esta elasticidad permitiría que los alveolos de los pulmones de nuestros animales enfermos se desplegaran mejor, y su resultado se manifestaría aumentando el número de mediciones, disminuyendo la cuerda alveolar y el grosor de las paredes alveolares. No tenemos la seguridad de cómo se organiza la arquitectura de los espacios aéreos distales del pulmón de nuestras ratas viejas tratadas en comparación con la de las ratas viejas sanas.

El incremento de la variable densidad de tejido, obtenido en los animales tratados, está a favor, con independencia del tamaño del alveolo y del grosor de su pared, del aumento del componente tisular alveolar que es un dato propuesto como expresión de inflamación^{4,7}. Para Lum et al¹⁵, la disminución del tamaño del alveolo y del grosor de la pared alveolar, junto con el reclutamiento alveolar, se relaciona con una mejor insuflación pulmonar; proponemos que en pulmones iguales, una mejor insuflación pulmonar puede producir una mayor distensión de las paredes alveolares, que podría a su vez expresarse como una disminución de la densidad de tejido total por campo; el hecho de que estos animales tratados presenten la densidad de tejido por campo aumentada, a pesar de que sus al-

veolos pudieran estar más distendidos que los del grupo control, es un dato que para nosotros está a favor del aumento del componente intersticial alveolar.

No podemos comparar la vertiente conceptual de nuestros resultados con los de otros autores, ya que no hemos encontrado ninguna referencia bibliográfica en la que se plantee enfermedad pulmonar intersticial experimental en el anciano. Se han realizado estudios de NH en poblaciones viejas^{20,21}; sin embargo, estos han sido epidemiológicos, por lo que sus conclusiones no pueden compararse con las nuestras. Se han documentado casos, pero con descripciones histopatológicas muy ambiguas. En ellas se describe infiltración intersticial difusa⁸, o bien se refieren a sus hallazgos como compatibles con neumonitis^{10,22}. Estas descripciones ambiguas, junto con las diferencias de método para la obtención del material histológico, que suele ser mediante broncoscopia^{1,22}, nos obligan a plantear que existe un cierto desconocimiento del modelo histopatológico de la NH en el anciano, pues los estudios realizados hasta la actualidad son insuficientes.

Podemos concluir con la afirmación de que nuestro modelo de neumonitis por hipersensibilidad en la rata vieja plantea la existencia de inflamación intersticial pulmonar, ya que la fórmula citológica del BAL se ha alterado y el componente tisular del intersticio ha aumentado. Sin embargo, no tenemos la seguridad de cómo es la auténtica arquitectura alveolar en el pulmón de la rata vieja; esto es, si el alveolo en los animales viejos enfermos es más pequeño y sus paredes más delgadas que en la rata sana. Nuestros resultados nos obligan a continuar con este tipo de estudios, tanto en la perspectiva técnica, la morfometría, como en la vertiente conceptual de la enfermedad pulmonar intersticial en el anciano.

BIBLIOGRAFÍA

1. Pinkerton KE, Barry BE, O'Neill JJ, Raub JA, Pratt PC, Crapo JD. Morphologic changes in the lung during the lifespan of fischer 344 rats. *Am J Anat* 1982; 164: 155-174.
2. Snider GL, Kleinerman J, Thurlbeck WM, Bengali ZH. The definition of emphysema. Report of a National Heart, Lung, and Blood Institute, Division of Lung Diseases Workshop. *Am Rev Respir Dis* 1985; 132: 182-185.
3. Salvaggio JE, Karr RM. Hypersensitivity pneumonitis; state of the rat. *Chest* 1979; 75: 270-276.
4. Warren JS, Yabroff KR, Remick DG, Kunkel SL, Chensue SW, Kunkel RG et al. Tumor necrosis factor participates in the pathogenesis of acute immune complex alveolitis in the rat. *J Clin Invest* 1989; 84: 1.873-1.882.
5. Johnson KJ, Ward PA. Role of oxygen metabolites in immune complex injury of lung. *J Immunol* 1981; 126: 2.365-2.369.
6. Schuyler MR, Kleinerman J, Pensky JR, Brandt C, Schmitt D. Pulmonary response to repeated exposure to *Micropolyspora faeni*. *Am Rev Respir Dis* 1983; 128: 1.071-1.076.
7. Richerson HB, Suelzer MT, Swanson PA, Butler JE, Kopp WC, Rose EF. Chronic hypersensitivity pneumonitis produced in the rabbit by the adjuvant effect of inhaled muramyl dipeptide (MDP). *Am J Pathol* 1982; 106: 409-420.



8. Ijichi T, Maruyama I, Moris S, Nomoto M, Osame M. Two cases of HTLV associated myelopathy (HAM) complicated with Sjögren's syndrome, T-lymphocyte alveolitis and arthropathy [resumen]. *Rinsho-Shikeigaku* 1990; 30: 765-770.
9. Ito S, Shima K, Sahaski K, Suzuki M, Tunekawa H, Torii Y et al. A case of pigeon breeders disease [resumen]. *Nippon Kyobu Shikkai Zasshi* 1990; 28: 379-385.
10. Tsukiyama K, Tasaka Y, Nakajima M, Hino J, Nakahama C, Okimoto N et al. A case of pneumonitis due to shosaiko-to. *Nippon Kyobu Shikkai Zasshi* 1989; 27: 1.556-1.561.
11. Araki J, Kaku M, Mashimoto H, Fukuda Y, Asai S. A case of HTLV-1 associated myelopathy with pulmonary involvement. *Nippon Kyobu Shikkai Zasshi* 1989; 27: 1.375-1.379.
12. Dunnill MS. Quantitative methods in the study of pulmonary pathology. *Thorax* 1962; 17: 320-328.
13. Weibel ER. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Labor Invest* 1963; 12: 131-155.
14. Escolar Castellón JD, Roche Roche PA, Escolar Castellón A, Miñana Amada C. Experimental, semiquantitative and morphometric study, of the modifications produced in allergic alveolitis and in Goodpasture's syndrome due to exposure to cigarette smoke. *Histol Histopath* 1991; 6: 535-547.
15. Lum H, Huang I, Mitzner W. Morphological evidence for alveolar recruitment during inflation at high transpulmonary pressure. *J Appl Physiol* 1990; 68: 2.280-2.286.
16. Crystal RG, Bitterman PB, Rennard SI, Hance AJ, Keogh BA. Interstitial lung diseases of unknown cause: disorder characterized by chronic inflammation of the lower respiratory tract. *N Engl J Med* 1984; 310: 154-235.
17. Reynolds HY. Bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135: 250-263.
18. Gilloly M, Lamb D. Parrow New automated technique for assessing emphysema on histological sections. *J Clin Pathol* 1991; 44: 1.007-1.011.
19. McCartney A, Fox B, Partridge T, Macrae K, Tetley T, Phillips G et al. Emphysema in the blotchy mouse: a morphometric study. *J Pathol* 1988; 156: 77-81.
20. Barbee RA, Callies D, Dickie HA, Rankin J. The long-term prognosis in farmer's lung. *Am Rev Respir Dis* 1968; 67: 223-231.
21. Cuthbert OD, Gordon MF. Ten years follow up of farmers with farmer's lung. *Brit Jour Ind Med* 1983; 40: 173-176.
22. Oda H, Doutsu Y, Hiratani K, Miyazaki T, Komory B, Hayashi T et al. A case of apidine-induced pneumonitis. *Nippon Kyobu Shikkai Zasshi* 1990; 28: 183-188.