

LOBECTOMÍA EN RATAS. MODELO QUIRÚRGICO EXPERIMENTAL. RESULTADOS EN LA DENSIDAD ALVEOLAR*

Drs. Mónica Martínez M.¹, Nelson Velázquez S.², Emilio Flores A.¹,
Andrés Navarrete H.³, Felipe Zúñiga H.¹, Pedro Zitko M.¹,
Cristián García B.³, Sergio González B.⁴, Sergio Zúñiga R.¹

¹ División de Cirugía, Departamento de Cirugía Pediátrica y Cirugía General, Hospital Clínico Universidad Católica de Chile.

² Laboratorio de Neuroetología, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

³ Departamento de Rayos, Hospital Clínico Universidad Católica de Chile.

⁴ Departamento de Anatomía Patológica, Hospital Clínico Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile.

Abstract

Development of a rat model of lung lobectomy

Background: Surgical lung resection is required for multiple pulmonary diseases. After these procedures, the lung experiences a compensatory growth, which can be studied in animal models such as rats. **Aim:** To develop a surgical model of lung lobectomy in rats. **Material and Methods:** Forty seven rats of the strain *Rattus norvegicus* were used. Animals were anesthetized with atropine, ketamine and xylacine. The airway was managed with a facial mask to avoid intubation. An anesthetic evaluation protocol was followed and animals were oxygenated using a cephalic veil. Forty rats were subjected to a right lobectomy and seven animals were sham operated. Rats subjected to lobectomy were sacrificed at one, two, three and four weeks after operation. **Results:** All operated rats survived. There were significant differences in the number of alveolar intersections among rats subjected to lobectomy and sacrificed at three weeks compared to sham operated animals, with a lower number of alveoli among the former. **Conclusions:** We were able to develop the model of lobectomy, however we failed to demonstrate a compensatory growth among rats subjected to lobectomy.

Key words: Lobectomy, experimental surgery, rat.

Resumen

Introducción: En la literatura está documentado que diferentes mamíferos tienen la capacidad de crecimiento compensatorio post resección pulmonar parcial. **Objetivo:** Crear un modelo quirúrgico de lobectomía en ratas, factible de desarrollar en nuestro medio, exponiendo algunas originalidades en relación a procedi-

*Recibido el 13 de octubre de 2013 y aceptado para publicación el 10 de noviembre de 2013.

Los autores no refieren conflictos de interés

Correspondencia: Dr. Sergio Zúñiga R.
Marcoleta 350, Santiago, Chile.
zunigaorama@gmail.com

mientos de ventilación pulmonar, comunicando los resultados de la densidad alveolar obtenidos. **Animales y Métodos:** Se utilizaron 47 ratas *Rattus norvegicus*. Se aplicó como anestesia Atropina, Quetamina y Xilacina. Para el manejo de la vía aérea se diseñó: 1. Un sistema de ventilación con máscara facial tipo ambú evitando así la intubación traqueal. 2. Un protocolo de evaluación anestésica. 3. Un halo para oxigenar. 4. Se modificó un estetoscopio para realizar auscultación animal. Se practicó una lobectomía pulmonar derecha. Los sujetos fueron separados en Grupo Control (n = 7) y Grupo Experimental (n = 40), estos últimos, separados en cuatro grupos (n = 10, cada grupo), que fueron sacrificados en las semana 1, 2, 3 y 4. **Resultados:** Se logró 100% de sobrevida. El número de intersecciones alveolares mostró diferencias significativas entre el grupo control y el grupo experimental sacrificado en la semana 3 ($p = 0,0016$), con un menor número de alvéolos en el grupo experimental. **Conclusión:** Es factible realizar un modelo de cirugía pulmonar en ratas, con obtención de un 100% de sobrevida. Esto se logra por adecuaciones en el manejo pre e intra-operatorio. No se pudo demostrar que exista aumento significativo en el número de alvéolos, posiblemente por el bajo número de casos realizados.

Palabras clave: Lobectomía en ratas, neumonectomía en ratas, anestesia en ratas, crecimiento compensatorio pulmonar en ratas.

Introducción

El pulmón es una estructura bastante singular, ya que durante el nacimiento presenta un cambio asombroso en su adaptación al reemplazar líquido por aire, lo que al parecer, no causaría efectos en el tejido pulmonar. Además se nace con una fracción de los alvéolos del adulto, los que terminan de formarse mediante la maduración microvascular y la alveolización, ambos procesos, muy similares tanto en humanos como animales, sobre todo, en ratas¹.

La cirugía resectiva pulmonar, constituye el tratamiento de múltiples patologías benignas y malignas, tanto en niños como en adultos. Se ha visto que el pulmón restablece su masa, estructura y función posterior a estas cirugías, lo que llamamos, crecimiento compensatorio. Este desarrollo compensatorio se ha estudiado en diferentes animales, en los que la rata es quien muestra una asombrosa similitud con los humanos, tanto en la anatomía, como en el desarrollo funcional pulmonar¹, por tanto, dicho animal es un buen modelo para estudiar la forma como se produce este incremento, si existe simplemente hipertrofia, hiperplasia alveolar o mezcla de ambos mecanismos, después de una lobectomía pulmonar.

La mayoría de los modelos descritos de lobectomía pulmonar en ratas son costosos y difíciles de llevar a cabo. Por esto, nuestros objetivos fueron desarrollar un modelo quirúrgico factible de realizar en nuestro medio, practicar la experiencia y comunicar los resultados obtenidos.

Material y Método

Se diseñó un modelo quirúrgico de lobectomía en ratas, con la particularidad anestésica de evitar la intubación, dado la dificultad, alto costo y mortalidad de este último procedimiento. Las cirugías fueron realizadas por un cirujano pediátrico, con experien-

cia en patología pulmonar en niños.

El protocolo de implementación fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad, con los cánones establecidos para ello.

Sujetos experimentales

Se utilizaron 47 ratas de la especie *Rattus norvegicus*, cepa Sprague-Dawley, obtenidas en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile, de una edad promedio de 1 mes, y un peso entre 150-250 g. Los animales fueron mantenidos en jaulas individuales con ciclo de luz y vigilia, y con alimentación y agua *ad libitum*.

Anestesia

Se aplicó Atropina 0,01 mg/kg intraperitoneal como premedicación anestésica, con el fin de atenuar la bradicardia producida al abrir la cavidad torácica de los animales. Para la cirugía, los sujetos fueron anestesiados con Quetamina 0,5 mg/kg y Xilacina 0,4 mg/kg intraperitoneal. Se realizó el manejo de la vía aérea utilizando un sistema de ventilación con máscara facial tipo ambú (Figuras 1 y 2), con un tubo plástico (parte rígida de un gotario) y un matraz de suero vacío, conectados entre sí por bajadas de suero, y hacia la red de oxígeno central, para aplicar presión positiva, evitando así la intubación traqueal. Además, como anestesia local se aplicó Lidocaína 0,66% en la zona de la incisión.

Se diseñó un protocolo de evaluación anestésica y una hoja de evolución, que se aplicaba durante la cirugía y en el seguimiento diario del animal hasta el día de su sacrificio.

Además, en el postoperatorio inmediato, para proporcionar un ambiente "oxigenado", se fabricó un "halo cefálico" de plástico dentro del cual se mantenía a la rata hasta que despertase y se moviera (Figura 3).

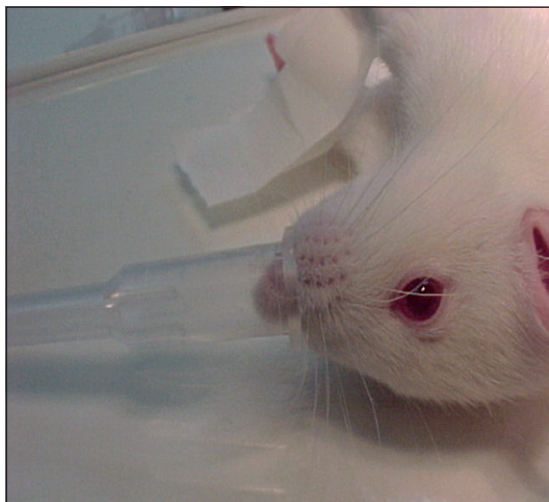


Figura 1. Ventilación con máscara facial realizado con plástico de gotario.



Figura 2. Matraz de suero utilizado como ambú, conectando la vía aérea de la rata a la red de oxígeno central.



Figura 3. "Halo" para proporcionar oxígeno.



Figura 4. Fonendoscopio adaptado para una mejor auscultación.

Para lograr una adecuada auscultación intra y postoperatoria se cambió la campana del fonendoscopio por otro tubo plástico (parte rígida de otro gotario) (Figura 4).

La temperatura, ventilación, oxigenoterapia, estado de su pelaje y diuresis fueron controlados en todos los sujetos operados hasta la recuperación de su movilidad habitual.

Cirugía

Una vez inmovilizada la rata, se rasuraba su pelaje en la región torácica, en la zona en la cual se realizaría la cirugía. Luego de la infiltración anestésica local, se realizaba una incisión en la piel de la pared torácica anterolateral derecha, con disección por planos. La musculatura era separada, realizándose

además un bloqueo nervioso intercostal local con Lidocaina 0,66% (Figura 5). Una vez abierto el tórax en un espacio intercostal, se identificaba el lóbulo medio o inferior pulmonar, el cual era extirpado a nivel del hilio pulmonar previa instalación de un clip pequeño (Figura 6). Una vez revisada la hemostasia, se practicaba la sutura de la pared con vicryl 4/0, y se aspiraba la cavidad torácica (aspiración del neumotórax), utilizando para ello un teflón número 22 y una jeringa de 10 cc para hacer el vacío (Figura 7). Al estar cerrada la piel se esperaba la recuperación con el "halo cefálico" instalado, que proveía a los animales de un ambiente oxigenado. Se realizaba auscultación pulmonar y cardíaca de manera rutinaria. En esa etapa se empleaba también un calentador ambiental. Una vez recuperada la diuresis y algunos

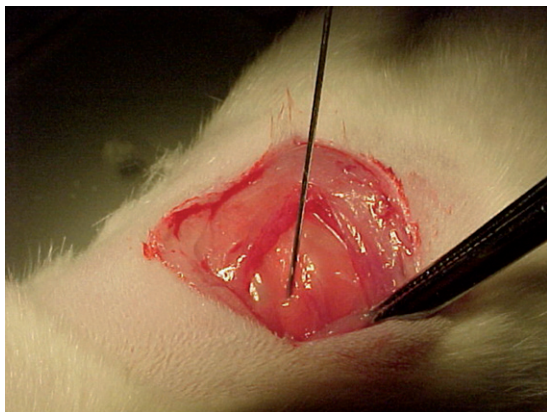


Figura 5. Diseción plano muscular e infiltración con lidocaína.

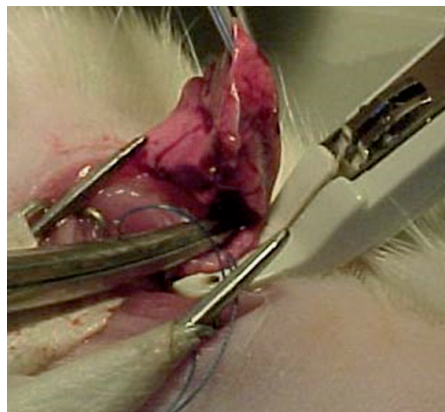


Figura 6. Sección del lóbulo luego de aplicar clip.

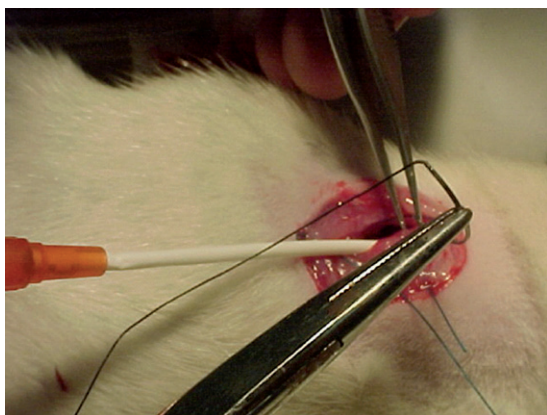


Figura 7. Aspiración del neumotórax con trócar.

movimientos corporales, las ratas eran devueltas a su jaula y controladas hasta que se observaran activas y alertas. El volumen pulmonar postoperatorio y la ausencia de neumotórax, fue controlado mediante una radiografía de tórax en algunos individuos operados (Figura 8). Todas las ratas sobrevivieron al procedimiento y se recuperaron satisfactoriamente.

Los sujetos fueron separados en Grupo Control ($n = 7$) y Grupo Experimental ($n = 40$). El Grupo Experimental a su vez fue separado en cuatro grupos ($n = 10$, cada grupo). Todas las ratas de este último grupo fueron sometidas a una toracotomía derecha anterolateral para la extirpación del lóbulo medio o inferior del pulmón derecho. Las ratas del grupo control fueron sometidas a una cirugía *Sham* que

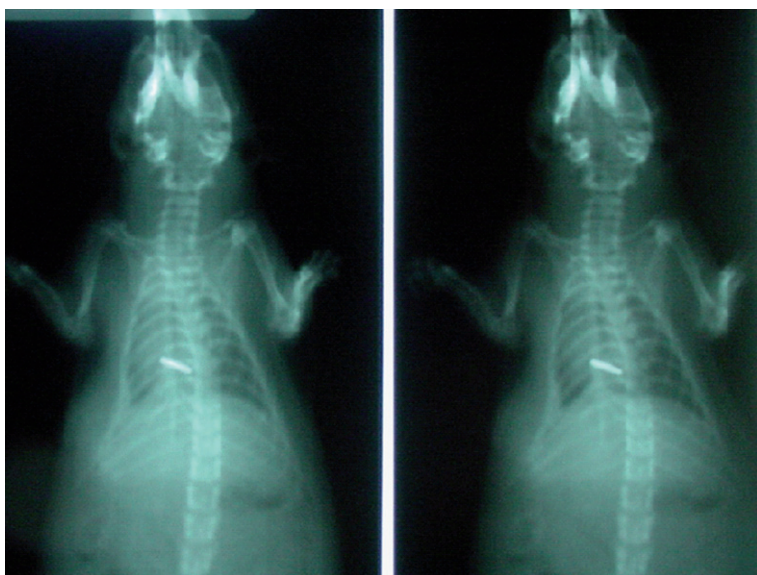


Figura 8. Radiografías de tórax en las que no se evidencia neumotórax.

consistió en la misma cirugía practicada a los individuos del grupo experimental pero sin extirpación de ningún lóbulo pulmonar. Los sujetos del grupo experimental fueron sacrificados dentro de la semana 1, 2, 3 y 4, según el grupo al cual pertenecieron. Las ratas fueron sacrificadas utilizando Pentobarbital 50 mg/kg intraperitoneal.

Posterior al sacrificio, el pulmón remanente en las ratas del grupo experimental y el pulmón completo en las ratas del Grupo Control fueron extirpados. Los pulmones extirpados fueron fijados con formalina 10% para realizar los cortes histológicos de esta estructura. Los cortes fueron montados en portaobjetos embebidos en Albúmina y teñidos con Hematoxilina/Eosina y Tricromato de Masson. Para estimar el número de alvéolos presentes en los pulmones del grupo control y experimental según la semana de sacrificio postoperatorio, obtuvimos micrografías de los cortes histológicos de (tamaño micrografía: 10 x 15 cm; aumento: 100X) y elegimos la micrografía central de uno de los lóbulos extirpados en cada individuo. Para estimar la densidad alveolar en estas micrografías nosotros construimos una gradilla del mismo tamaño que las fotografías, consistente de una serie discontinua de líneas de 10 mm de largo separadas horizontalmente por 0,4 mm. y verticalmente por 15 mm. Esta gradilla fue sobrepuesta a cada una de las fotografías, realizándose un conteo del número de alvéolos que coincidieron con las líneas de la gradilla. Este conteo fue realizado por cinco experimentadores diferentes para los grupos experimentales y cuatro para el grupo control, que fueron *ciegos* al grupo de pertenencia del sujeto experimental del cual provenía el corte de pulmón analizado. A partir de estos datos, se eliminaron los valores mínimos y máximos registrados para cada rata. Se calculó el promedio entre los valores de las intersecciones alveolares que permanecieron en el análisis.

Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos fueron realizados usando el programa STATISTICA 8 para Microsoft Windows, usando ANOVA y t de Student.

Resultados

Todas las ratas, ya fueran control o experimentales, se recuperaron exitosamente después de la intervención quirúrgica a la cual fueron sometidas (*sham* o lobectomía pulmonar, respectivamente), siendo rigurosamente evaluadas. No hubo muertes durante las semanas de observación.

Después de eliminar los valores mínimos y máximos, los valores de las intersecciones alveo-

lares no mostraron diferencias significativas entre los experimentadores que midieron esta variable en los grupos experimentales ($p = 0,0722$). La estimación del número de alvéolos a través del conteo de intersecciones alveolares con la gradilla sobre las micrografías mostró diferencias significativas entre los grupos experimentales ($p = 0,0012$). El número de intersecciones alveolares mostró diferencias significativas entre el grupo control y el grupo experimental sacrificado en la semana 3 postoperatoria ($p = 0,0016$) y entre los grupos experimentales sacrificados en las semanas 1 y 3 ($p = 0,0064$), siendo el conteo de alvéolos en los grupos experimentales, significativamente menor.

Dado que nosotros realizamos el conteo alveolar en micrografías del mismo tamaño y aumento, el posible efecto del tamaño del pulmón en los distintos grupos experimentales es eliminado.

Discusión

El pulmón es un órgano que se termina de desarrollar post nacimiento. Se estima que nace con menos de 50 millones de alvéolos, llegando a contener más de 300 millones en el adulto, por lo que la alveolización es claramente un factor post natal¹. Es por eso que se estima que en los humanos, el 85% de la neo alveolización ocurre después del nacimiento.

La lobectomía e incluso la neumonectomía, es por lo general, el tratamiento de las malformaciones broncopulmonares en niños y es el tratamiento definitivo para las patologías neoplásicas en el adulto. Afortunadamente, los mamíferos tienen la capacidad de compensar la pérdida de tejido pulmonar², documentado este crecimiento pulmonar compensatorio tras neumonectomía unilateral en perros, conejos, hurones, ratas y ratones³, permitiendo la completa restauración del intercambio gaseoso. Ahora bien, este crecimiento pulmonar compensatorio, juega un papel importante, sobre todo en niños menores de 5 años, donde la normalización de la función ventilatoria post lobectomías es total⁴.

Se ha publicado que en perros inmaduros se logra una total restauración del tejido perdido post neumonectomía. En cambio, en perros adultos, es necesario reseca sobre un 55% del tejido pulmonar, para provocar el crecimiento pulmonar post neumonectomía³.

El crecimiento pulmonar puede diferir según edad, sexo, estado hormonal o la calidad del tejido pulmonar⁵. Existen estudios que explican esta compensación a través de la creación de nuevos alvéolos en el pulmón residual⁶, mientras que otros, lo explican exclusivamente o en su mayoría, por crecimiento de los alvéolos restantes⁷.

Voswinckel et al, logra demostrar en su trabajo, que tras una neumectomía unilateral en ratas adultas, sigue un rápido crecimiento compensatorio en el pulmón remanente, el cual incluye proliferación celular (tanto de las células septales como incluso de las células endoteliales, células epiteliales, células de músculo liso y fibroblastos)³. Esto conduce a la restauración de una superficie alveolar de tamaño adecuado y de los parámetros de función respiratoria³.

Fernández et al, demuestran en su trabajo, que el crecimiento compensatorio puede ser reiniciado en los pulmones que se han sometido previamente a crecimiento compensatorio post neumectomía, sin embargo, este crecimiento es más hipertrófico y desarrollan hipertensión pulmonar a pesar del crecimiento compensatorio. Esto último, principalmente asociado a la remoción de más del 50% del tejido pulmonar⁸.

Tanto en humanos como en ratas, la formación de alveolos tienen en común, que se forman inicialmente creciendo hacia el interior de los tabiques o crestas secundarias de las paredes de sus precursores más grandes, los sáculos^{1,9}, es por ello que el modelo de cirugía pulmonar en ratas es un buen modelo para el estudio de crecimiento compensatorio pulmonar.

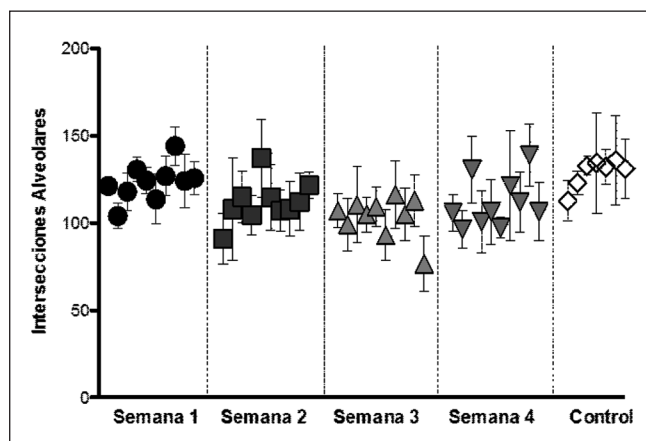


Figura 9. Intersecciones alveolares del total de animales.

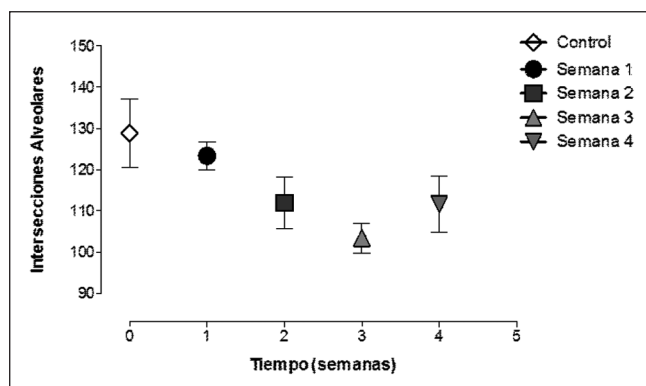


Figura 10. Intersecciones alveolares resumidos por semana.

En nuestro trabajo, no logramos demostrar que se produzca un crecimiento compensatorio pulmonar, pues obtuvimos una diferencia significativamente menor en el conteo de alvéolos en las ratas experimentales sacrificadas entre la primera y cuarta semana, versus las ratas control (Figura 9). Ahora bien, al graficar el número de alvéolos resumidos por semanas, logramos ver que entre la tercera y cuarta semana, la curva muestra un aumento no significativo en el número de alvéolos (Figura 10). Es probable, que aumentando las semanas de tiempo postoperatorio (más allá de la cuarta semana), podríamos encontrar un aumento significativo del número de alvéolos, que vemos insinuado en el gráfico anterior.

Por otro lado, consideramos que la creación de un sistema de ventilación con máscara facial tipo ambú, (que evita la intubación traqueal), es un aporte novedoso para el manejo intra operatorio de las ratas, en cualquier modelo quirúrgico en esta especie, al no tener muertes tanto intra como post operatorias. Esto junto a la implementación de un protocolo de evaluación anestésica continua durante la cirugía, el “halo” para oxigenar y la modificación del estetoscopio para mejorar la auscultación, nos permitió tener un resultado exitoso en la sobrevivencia de estos animales.

Estamos conscientes que este trabajo tiene varios errores de metodología, como el haber inyectado formalina directamente en la tráquea y sacar la muestra en bloque, no sólo el tejido pulmonar, además de la falta de comparación con algún grupo control sacrificado en cada semana del grupo experimental y el no haber observado más tiempo el grupo final experimental, todo esto atribuible a la falta de experiencia en investigación en animales.

Este tipo de modelo, abre la puerta al estudio de la fisiopatología de la neo alveolización, para a futuro, lograr aplicar esta técnica a enfermedades pulmonares y lograr restablecer una función pulmonar completa en pulmones dañados, como ocurre en patologías tan prevalentes como el enfisema.

Conclusión

Creemos que el aporte está en el haber aplicado el manejo quirúrgico del recién

nacido a los animales, como el calentamiento intra y post operatorio, oxigenación, aspiración del neumotórax y máscara facial, entre otros.

A pesar de no encontrar la existencia de un crecimiento compensatorio pulmonar en nuestro modelo, dejamos la puerta abierta a nuevos experimentos, mejorando los detalles técnicos que planteamos anteriormente.

Este modelo intentó además acercar al residente de cirugía al método experimental animal y al manejo delicado de tejidos complejos, como es el pulmonar, previo al inicio de esta disciplina en humanos.

Referencias

1. Burri PH. Structural aspects of postnatal lung development: alveolar formation and growth. *Biol Neonate* 2006; 89:313-22.
2. Fehrenbach H, Voswinckel R, Michl V, Mehling T, Fehrenbach A, Seeger W, et al. Neoalveolarisation contributes to compensatory lung growth following pneumonectomy in mice. *Eur Respir J*. 2008;31:515-22.
3. Voswinckel R, Motejl V, Fehrenbach A, Wegmann M, Mehling T, Fehrenbach H, Characterization of post-pneumonectomy lung growth in adult mice. *Eur Respir J*. 2004;24:524-32.
4. Laros CD, Westermann CJ. Dilatation, compensatory growth, or both after pneumonectomy during childhood and adolescence. A thirty-year follow-up study. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1987;93:570-6.
5. Hsia CC. Signals and mechanisms of compensatory lung growth. *J Appl Physiol*. 2004 97:1992-8.
6. Langston C, Sachdeva P, Cowan MJ, Haines J, Crystal RG, Thurlbeck WM. Alveolar multiplication in the contralateral lung after unilateral pneumonectomy in the rabbit. *Am Rev Respir Dis*. 1977;115:7-13.
7. Sekhon HS, Thurlbeck WM. A comparative study of postpneumonectomy compensatory lung response in growing male and female rats. *J Appl Physiol*. 1992;73:446-51.
8. Fernández LG, Mehta CK, Kron IL, MD, Laubach VE. Reinitiation of compensatory lung growth after subsequent lung resection. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2007;134:1300-5.
9. Li J, Masood A, Yi M, Mau M, Belcastro R, Ivanovska J, et al. The IGF-I/IGF- R1 pathway regulates postnatal lung growth and is a nonspecific regulator of alveologenesis in the neonatal rat. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2013;304: L626-L637.
10. Makanya AN, Tschanz SA, Haenni B, Burri PH. Functional respiratory morphology in the newborn quokka wallaby (*Setonix brachyurus*). *J Anat*. 2007; 211:26-36.
11. Brown LM, Rannels SR, Rannels DE. Implications of post-pneumonectomy compensatory lung growth in pulmonary physiology and disease. *Respir Res*. 2001;2:340-7.