

UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO

---



**Determinación de la reactividad bronquiolar en un modelo murino de síndrome de distrés respiratorio agudo por instilación de ácido clorhídrico**

Roque Ignacio Basoalto Escobar

**Tesis para optar al grado de Magíster en Fisiología**

Director de Tesis: Dr. Mauricio Henríquez Luna

Codirector de Tesis: Dr. Alejandro Bruhn Cruz

2018

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO**

**INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER**

**Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la  
Tesis de Magister presentada por el candidato**

**Roque Ignacio Basoalto Escobar**

**ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar  
al Grado de Magister en Fisiología en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día  
23 de abril del año 2018**

**Prof. Dr. Mauricio Henriquez Luna  
Director de Tesis  
Programa de Fisiología, ICBM  
Facultad de Medicina, Universidad de Chile**

**Prof. Dr. Alejandro Bruhn Cruz  
Codirector de Tesis  
Jefe Departamento de Medicina Intensiva  
Pontificia Universidad Católica de Chile**

**COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS**

**Prof. Dr. Marcelo Cano Cappellacci**

**Prof. Dr. Jaime Retamal Montes**

**Prof. Dr. German Ebensperger Darrouy  
Presidente Comisión**

## **Dedicatoria**

*A mi familia, amigos y profesores. A Marta Escobar por su eterna confianza  
y especialmente a Claudia por su paciencia y apoyo incondicional.*

## **Agradecimientos**

Debo agradecer a mi director y codirector de tesis Dr. Mauricio Henriquez y Dr. Alejandro Bruhn por confiar en mí y en este proyecto. A Dagoberto Soto y Marcelo Fonseca por ayudarme en todo el proceso, a mis profesores correctores Dr. German Ebensperger, Dr. Jaime Retamal, Dr. Marcelo Cano y Dr. Rodrigo Cornejo. A los amigos del laboratorio de dinámicas broncovasculares y amigos del laboratorio de medicina intensiva, por hacer cada día más ameno. Finalmente a mi familia y amigos por apoyarme y entenderme en todo momento.

## **Financiamiento**

Para la realización de esta tesis se contó con financiamiento de los proyectos FONDECYT N°1140468 y N°1161556. Además del aporte del proyecto Enlace ENL029/2017 y del departamento de Medicina Intensiva de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

## Índice

1. Resumen .....	8
2. Abstract .....	9
3. Introducción .....	10
3.1. Conceptos generales del SDRA.....	10
3.2. Resistencia de vías aéreas pequeñas en SDRA.....	11
3.3. Modelos experimentales de injuria pulmonar aguda .....	13
4. Hipótesis.....	15
5. Objetivo general .....	15
6. Objetivos específicos.....	15
7. Materiales y métodos .....	17
7.1. Presión arterial y frecuencia cardíaca .....	21
7.2. Temperatura corporal.....	21
7.3. Presión máxima de vía aérea.....	21
7.4. Gases en sangre arterial .....	21
7.5. Edema pulmonar (relación peso húmedo/peso seco).....	22
7.6. Preparación de las rebanadas de pulmón para video microscopía.....	23
7.7. Montaje de las rebanadas para perfusión .....	24
7.8. Registro y análisis de imágenes .....	26
8. Análisis estadístico.....	27
9. Resultados .....	28
9.1. Signos vitales .....	29
9.2. Intercambio gaseoso .....	31
9.3. Presión máxima de vía aérea.....	34
9.4. Edema pulmonar (relación peso húmedo/seco pulmonar).....	35
9.5. Reactividad Bronquiolar .....	36
9.5.1. Reactividad bronquiolar a Carbacol .....	36
9.5.2. Reactividad bronquiolar a histamina .....	39
9.5.3. Reactividad bronquiolar a carbacol más salbutamol .....	43
10. Discusión .....	46

11.	Conclusiones.....	51
12.	Bibliografía.....	53

## 1. Resumen

Introducción: El Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo (SDRA) es una forma aguda de daño pulmonar, caracterizado por hipoxemia y disminución de distensibilidad. Existen reportes de hiperreactividad de las vías respiratorias en modelos experimentales y en pacientes con SDRA, sin embargo, sólo se ha evaluado la resistencia total del sistema respiratorio, sin esclarecer si la hiperreactividad se produce en las vías aéreas mayores o en las vías aéreas pequeñas.

Objetivo: Establecer un modelo de injuria pulmonar aguda secundaria a instilación de HCl, asistido con ventilación mecánica en ratas, y evaluar el impacto del modelo sobre la reactividad bronquiolar en respuesta a agonistas broncoconstrictores.

Métodos: Se indujo injuria pulmonar aguda por instilación de HCl en 6 ratas, mientras otras 6 fueron instiladas con NaCl 0,9% (control). Posteriormente los animales fueron ventilados por 4 horas bajo anestesia general. Tras ser eutanasiados se extrajo tejido pulmonar y mediante una técnica de rebanadas de pulmón *ex vivo* y video microscopía de contraste de fase, se evaluó la respuesta broncoconstrictora a histamina y carbacol en bronquiolos de 100 $\mu$ m a 200 $\mu$ m de diámetro.

Resultados: Las ratas con injuria pulmonar aguda mostraron hipoxemia persistente y edema pulmonar. Las curvas dosis respuesta a carbacol mostraron aumento en la respuesta broncoconstrictora en el grupo con injuria pulmonar aguda, observándose diferencias significativas respecto del grupo control a dosis de 1 $\mu$ M, 10  $\mu$ M y 100  $\mu$ M. Las curvas de respuesta a histamina fueron exponenciales y también mostraron aumento de la respuesta broncoconstrictora en el grupo con injuria pulmonar aguda, pero esta diferencia sólo se hizo evidente a la dosis más alta (100  $\mu$ M). Salbutamol no logró revertir la broncoconstricción producida por carbacol 50  $\mu$ M en ninguno de los grupos de estudio.

Conclusión: El modelo de injuria pulmonar aguda por instilación de HCl en ratas presenta aumento de reactividad de la vía aérea pequeña a carbacol e histamina.

## 2. Abstract

Introduction: Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) is an acute form of lung damage, characterized by hypoxemia and decreased compliance. There are reports of airway hyperresponsiveness in experimental models and in patients with ARDS, however, only the total resistance of the respiratory system has been evaluated, without clarifying whether the airway hyperresponsiveness occurs in the major airways or in the small airways.

Objective: To establish a model of acute lung injury secondary to HCl instillation, assisted with mechanical ventilation in rats, and to evaluate the impact of the model on the bronchoconstrictive response to agonists.

Methods: Acute pulmonary injury was induced by HCl instillation in 6 rats, while 6 others were instilled with 0.9% NaCl (control). Subsequently the animals were ventilated for 4 hours under general anesthesia. After animal euthanasia, lung tissue was extracted, and precision cut lung slice technique was made to evaluate *ex vivo* small airway constriction using phase contrast video microscopy, the response under to histamine and carbachol stimulation was evaluated in airways between 100 $\mu$ m to 200 $\mu$ m of diameter.

Results: Rats with acute lung injury showed persistent hypoxemia and pulmonary edema. The dose response curves to carbachol showed an airway hyperresponsiveness in the group with acute lung injury. There were significant differences in comparison with the control group at doses of 1 $\mu$ M, 10 $\mu$ M and 100 $\mu$ M. The histamine dose response fitted to exponential curves also showed an airway hyperresponsiveness in the group with acute lung injury, but this difference was statistically different the highest histamine dose (100  $\mu$ M). Salbutamol was unable to revert the carbachol-induced airway constriction in both groups of animals in this study.

Conclusion: The HCl instillation induced-acute lung injury rat model shows hyperresponsiveness of the small airway to carbachol and histamine.

### **3. Introducción**

#### **3.1. Conceptos generales del SDRA**

El Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo (SDRA) representa aproximadamente el 10% de los ingresos a las unidades de cuidados intensivos, de los cuales el 79% requieren ventilación mecánica (VM) invasiva, presentando una tasa de mortalidad hospitalaria cercana al 40%. Los principales gatillantes de este síndrome son la neumonía, sepsis extrapulmonar y aspiración gástrica, con un 59%, 16% y 14% respectivamente[1].

El SDRA puede generarse a partir de una injuria directa en el parénquima pulmonar o debido a alteraciones sistémicas extrapulmonares que son transmitidas por la circulación hacia el sistema respiratorio [2, 3]. Clínicamente se caracteriza por una insuficiencia respiratoria que se inicia rápidamente dentro de las 72 horas posteriores a la injuria, asociado a hipoxemia refractaria a la administración de oxígeno, con opacidades radiológicas bilaterales, y edema pulmonar cuyo origen no sea explicable por falla cardíaca o sobrecarga de fluidos [4].

El SDRA se caracteriza fisiopatológicamente por daño pulmonar agudo y respuesta inflamatoria difusa, en donde se produce una disrupción de la membrana alveolo capilar lo cual aumenta su permeabilidad. Esta alteración en la permeabilidad lleva a una producción de edema rico en proteínas al interior de espacios alveolares y formación de membranas hialinas, dando como resultado alteraciones en la relación ventilación/perfusión (V/Q) [5].

La VM tiene un rol clave en el soporte vital de los pacientes con SDRA, permitiendo revertir la hipoxemia. Sin embargo, el uso de VM tiene el potencial de amplificar el daño pulmonar, fenómeno conocido como daño inducido por ventilación mecánica (VILI, del inglés

*ventilator-induced lung injury*) [6], lo cual lleva a un aumento de la permeabilidad alveolo capilar promoviendo fenómenos de translocación de mediadores inflamatorios, bacterias o lipopolisacáridos (LPS) a la circulación sistémica [7]. La principal estrategia para prevenir el VILI en pacientes con SDRA es la limitación del volumen corriente [8].

### **3.2. Resistencia de vías aéreas pequeñas en SDRA**

El SDRA se caracteriza mecánicamente por baja distensibilidad pulmonar en donde la resistencia de vía aérea generalmente se reporta como normal. Si bien algunos estudios han reportado la presencia de presión positiva intrínseca al final de espiración (PEEPi), el cual es un parámetro clínico que evidencia limitación del flujo espiratorio [9-12], ésta es de bajo grado [13], y comúnmente ha sido asociado a ciertos aspectos de programación de la VM, lo cual está determinado por la elevada ventilación minuto que requieren estos pacientes [14, 15] más que por el aumento de resistencia.

Sin embargo, una resistencia normal no necesariamente refleja indemnidad de la vía aérea, sobre todo porque la evaluación de resistencia es una medición global que está determinada principalmente por las vías aéreas mayores [16]. Debemos considerar que a medida que avanzamos por el árbol bronquial existe gran ramificación de las vías respiratorias, las cuales van disminuyendo su lumen pero aumentando considerablemente el área total de sección transversal, lo que determina que la resistencia de las vías aéreas pequeñas (<200  $\mu$ M) sólo sea entre un 10% y 20% de la resistencia total [16]. Además, cabe mencionar que la vía aérea pequeña no cuenta con tejido cartilaginoso que limite los efectos broncoconstrictores. De hecho, existe evidencia de que en pacientes con SDRA habría

alteraciones en las vías aéreas pequeñas [11], e incluso remodelación con aumento en el grosor de la pared bronquiolar, por expansión de la matriz extracelular [17]. La matriz extracelular es proveedora de mediadores inflamatorios y factores de crecimiento, los cuales al ser liberados pueden modular la actividad de la musculatura lisa de la vía aérea [18-20]. Este fenómeno de disfunción de las vías aéreas está altamente descrito en las enfermedades pulmonares inflamatorias obstructivas crónicas [21], pero pacientes con SDRA también muestran evidencia de disfunción de vía aérea caracterizada por limitación de flujo espiratorio e hiperinflación dinámica, en donde esta alteración funcional ha sido atribuida a la obstrucción y cierre de las vías aéreas pequeñas [17].

Si bien las alteraciones de vías aéreas pequeñas descritas en el SDRA podrían tener poco impacto en la mecánica global, cualquier fenómeno o alteración a este nivel podría tener efectos a nivel regional e influir en la heterogeneidad de la ventilación, además de alteraciones de la relación V/Q.

En efecto, si bien en el SDRA el principal mecanismo de hipoxemia es el cortocircuito pulmonar (zonas profundidas que carecen de ventilación) también existe evidencia de que una parte importante de las unidades pulmonares tiene disminución de la relación V/Q. Esto podría estar explicado por edema parcial que no alcanza a producir colapso, o por cambios en la reactividad de la musculatura lisa que genere alteraciones en la resistencia de las vías aéreas pequeñas.

Existe poca información acerca de la reactividad de las vías aéreas pequeñas en el SDRA. En un reporte de siete pacientes que habían cursado previamente con SDRA, evaluados con test de metacolina al alta, se detectó que en dos de ellos existía hiperreactividad

bronquial [22]. Por otra parte, se ha observado que existe aumento en la resistencia de las vías respiratorias en respuesta a metacolina en ratones con injuria pulmonar aguda por lipopolisacárido (LPS) [23]. También se ha descrito que la resistencia de vía aérea en pacientes con SDRA puede ser disminuida con salbutamol [24]. La vía aérea pequeña es considerada la parte más sensible a mediadores contráctiles de toda la vía aérea, lo que la convierte en un blanco potencial en aquellas patologías que evidencian algún grado de contracción de la musculatura lisa a este nivel [25].

En síntesis, la evidencia disponible respecto al compromiso de las vías aéreas pequeñas en el SDRA es escasa. La mayor parte de los estudios sólo ha evaluado la resistencia global del sistema respiratorio y la reactividad en respuesta a metacolina. Esto se debe en gran medida a la dificultad que presenta la evaluación de la vía aérea pequeña. Tampoco existen datos de cómo cambia la sensibilidad a otros broncoconstrictores como histamina y carbacol.

### **3.3. Modelos experimentales de injuria pulmonar aguda**

Se han utilizado diferentes especies animales como modelos de injuria pulmonar aguda (IPA) para poder reproducir de forma fehaciente el SDRA, incluyendo los cambios morfológicos y fisiopatológicos. Hasta hace poco la utilización de ratas para estos modelos era limitada por el tamaño y la dificultad para monitorización invasiva, pero en la actualidad esto ha sido mejorado por el desarrollo de la tecnología.

Por otra parte, la forma de inducción de la IPA también cobra relevancia, ya que existen variados métodos, dentro de los cuales destaca el de instilación de ácido clorhídrico (HCl) el

cual genera una alteración química a nivel del epitelio pulmonar. Este modelo es llamativo por las similitudes al SDRA, en donde existe disrupción de la barrera alveolo capilar con infiltración de neutrófilos [26-31], con subsecuente influjo de fluidos extracelulares hacia el espacio alveolar que conduce a una respuesta inflamatoria y edema pulmonar [28]. Este modelo ofrece algunas ventajas en términos de reproducibilidad y de relativa estabilidad sistémica, comparado con otros modelos como LPS o inoculación de bacterias [26].

#### **4. Hipótesis**

En un modelo de ratas Sprague Dawley con injuria pulmonar aguda producida por instilación de HCl, asistido con ventilación mecánica, existe aumento de la reactividad de vías aéreas pequeñas en respuesta a agonistas broncoconstrictores.

#### **5. Objetivo general**

Establecer un modelo de injuria pulmonar aguda secundaria a instilación de HCl, asistido con ventilación mecánica en ratas, y evaluar el impacto del modelo sobre la reactividad bronquiolar en respuesta a agonistas broncoconstrictores.

#### **6. Objetivos específicos**

1. Determinar el impacto de la injuria pulmonar aguda inducido por instilación de HCl sobre el intercambio gaseoso mediante presión parcial de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> medidos en sangre arterial.
2. Cuantificar el edema pulmonar de la injuria pulmonar aguda, inducida por instilación de HCl mediante tasa peso húmedo/peso seco del tejido pulmonar, comparado con un grupo control.
3. Comparar la respuesta broncoconstrictora inducida por carbacol e histamina en rebanadas de pulmón *ex-vivo* de ratas con injuria pulmonar aguda inducida por instilación de HCl y control.

4. Comparar el efecto broncodilatador de salbutamol en distintas dosis, en bronquiolos con contracción producida por 50 $\mu$ M de carbacol en grupo de injuria pulmonar aguda y control.

## 7. Materiales y métodos

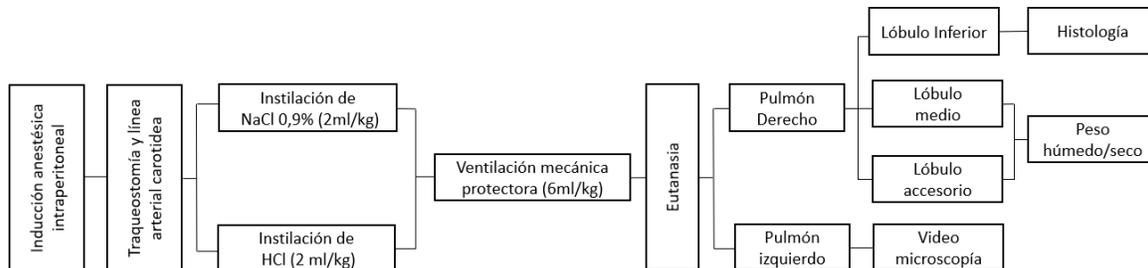
La estimación del tamaño de la muestra se calculó en relación a la comparación de dos medias para un test unilateral, con un nivel de confianza del 95%, poder estadístico de 80%, precisión de 0,5, varianza de 0,1 y una proporción esperada de pérdidas del 15% se obtuvo un tamaño de muestra de 6 animales por grupo experimental.

Se usaron ratas macho adultas de raza Sprague Dawley con un peso entre 300 a 350 gramos, con las cuales se formaron dos grupos experimentales (Figura 1):

- Grupo Control: Ratas que fueron instiladas con NaCl al 0,9% (2 ml/kg) conectadas a VM con estrategia protectora por 4 horas\* (n = 6).
- Grupo Injuria pulmonar aguda (IPA): Ratas que fueron instiladas con ácido clorhídrico\*\* y posteriormente conectadas a VM con estrategia protectora por 4 horas (n = 6).

\* La estrategia protectora de VM utilizada fue en modo volumen control, 7 ml/kg de peso con frecuencia respiratoria de 95 por minuto y PEEP de 2 cmH<sub>2</sub>O.

\*\* La instilación con ácido clorhídrico (pH 1.5 y 0,1 N) por la traqueostomía con una inclinación de 45° para la inducción de la IPA.

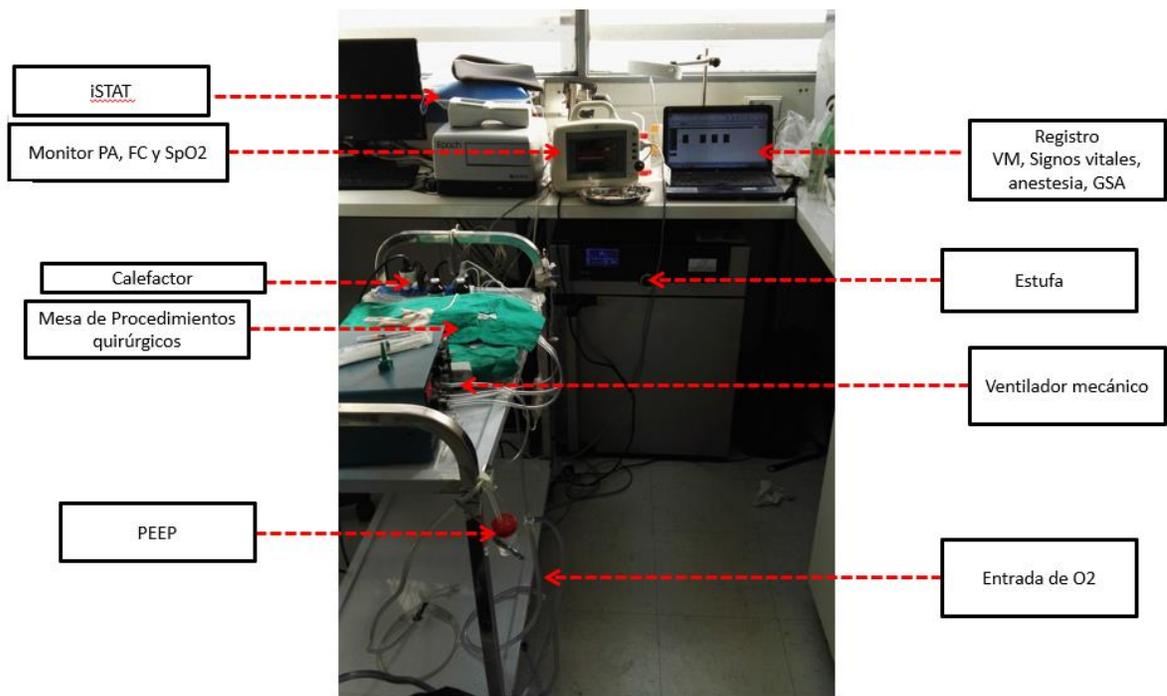


**Figura 1.** Diagrama de flujo del modelo experimental.

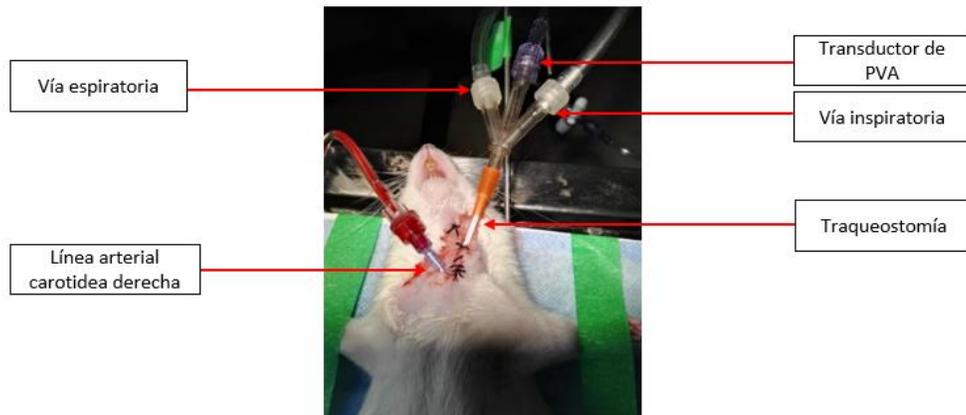
Para la obtención de los resultados se montó un modelo de injuria pulmonar aguda asistido con ventilación mecánica invasiva, monitorización de temperatura corporal ( $T^{\circ}$ ), saturación de oxígeno de pulso ( $SpO_2$ ), presión máxima de vía aérea ( $P_{max}$ ), presión arterial (PA) y frecuencia cardíaca (Fig. 2). Las ratas fueron anestesiadas con ketamina y xilacina (51 y 5.1 mg.kg respectivamente) intraperitoneal (IP), luego se realizó traqueostomía con bránula de 14 gauge y posteriormente fueron conectadas a un ventilador mecánico para animales pequeños (SAR-830 series, CWE Inc., PA, USA) con una derivación para transductor de presión de vía aérea (PVA). Una vez conectados al ventilador mecánico se instaló una línea arterial carotídea derecha con una bránula 22 gauge, para control de presión arterial y extracción de muestras de sangre arterial (fig. 3 y 4). El animal se mantuvo anestesiado con ketamina IP 51 mg.kg cada 30 minutos y bloqueo neuromuscular 1 mg/kg cada 20 minutos y oxígeno al 100%. Además, los animales se mantuvieron con temperatura controlada para evitar la hipotermia y en posición supina.



Figura. 2: Imagen de la monitorización de una rata previo a la instilación de HCl. Curva roja: Presión arterial; Curva amarilla: Presión de vía aérea; Curva celeste: Saturación de oxígeno de pulso (SpO<sub>2</sub>).



**Figura 3.** Montaje del modelo experimental y sus componentes.



**Figura 4.** Rata sprague dawley conectada a ventilación mecánica y monitorización invasiva.

### **7.1. Presión arterial y frecuencia cardíaca**

Se monitorizó de forma continua la PA, y frecuencia cardiaca y se registraron valores de presión arterial sistólica (PAS), presión arterial diastólica (PAD) y presión arterial media (PAM) en los siguientes tiempos: 0, 30, 60, 120, 180, y 240 minutos (fig. 5)

### **7.2. Temperatura corporal**

Se realizaron evaluaciones de temperatura corporal con un termómetro rectal en los siguientes tiempos; 0, 30, 60, 120, 180, y 240 minutos, con el fin de mantener al animal en un rango de temperatura optima ( $36^{\circ}$  a  $39^{\circ}$ ) para lo cual se utilizó un calefactor con graduación de temperatura.

### **7.3. Presión máxima de vía aérea**

Se monitorizó de forma continua la presión arterial de vía aérea (PVA) con un transductor de presión conectado a la traqueostomía (TQT) y se registró la presión máxima de vía aérea (Pmax) en los siguientes tiempos: 0, 30, 60, 120, 180, y 240 minutos; y se utilizó el valor máximo de la curva para estimar la Pmax (Fig. 2).

### **7.4. Gases en sangre arterial**

Para los exámenes de gases en sangre arterial (GSA) se extrajeron 0,2 ml desde la línea arterial, volumen que fue restituido por volumen de NaCl 0,9%. Las muestras fueron procesadas inmediatamente con analizador de GSA i-STAT (Abbott Laboratories, Abbott

Park, IL, USA). Se evaluaron parámetros de presión parcial de oxígeno ( $\text{PaO}_2$ ), presión parcial de  $\text{CO}_2$  ( $\text{PaCO}_2$ ), pH, porcentaje de saturación de oxígeno y lactato en los siguientes tiempos: 0, 30, 60, 120, 180 y 240 minutos (Fig. 5).

#### **7.5. Edema pulmonar (relación peso húmedo/peso seco)**

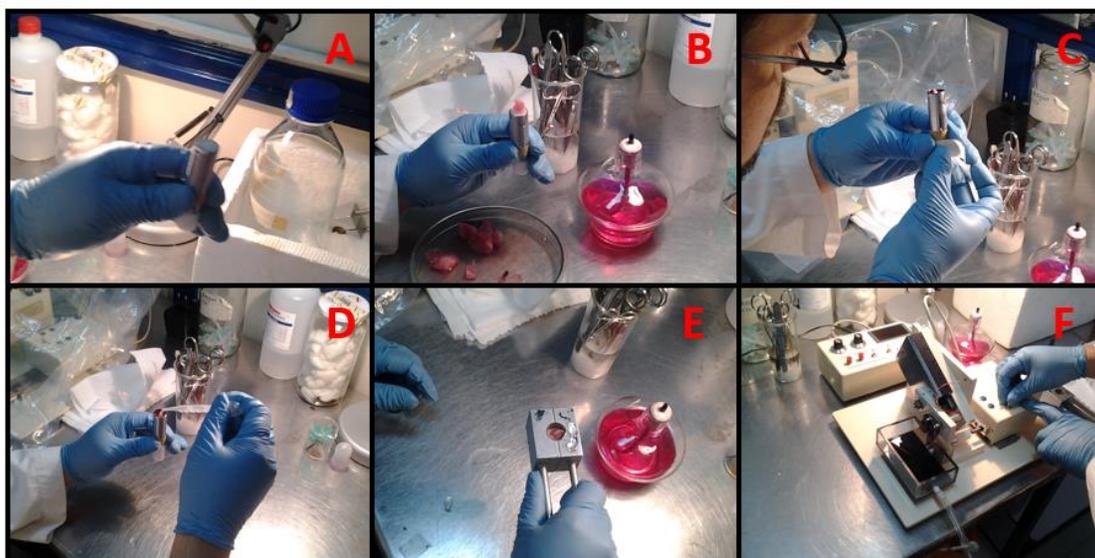
Se extrajo el lóbulo medio y accesorio derecho de cada animal, se pesó en balanza analítica, valor que representa el peso húmedo pulmonar y posteriormente se secó en una estufa a  $60^\circ \text{C}$  por 72 horas (tiempo en el cual se estabiliza el peso seco). Para el cálculo se dividió el peso húmedo por el peso seco, de esta forma se obtuvo la relación peso húmedo/peso seco (H/S).

Una vez terminado el periodo experimental los animales fueron sacrificados con ketamina y xilacina (180 y 18 mg.kg). Se realizó una esternotomía para la extracción de los pulmones, los lóbulos medio y accesorio se utilizaron para relación peso H/S (Fig. 1). El pulmón izquierdo se insufló con agarosa al 2 % correspondiente al 2,25% del peso corporal de la rata, el cual fue mantenido en un frasco de vidrio estéril HBSS 1X y puesto en una caja antiderrame con hielo para el traslado del laboratorio con un tiempo estimado de 30 minutos el cual es necesario para la solidificación de la agarosa dentro del tejido pulmonar. Este protocolo fue aprobado por el comité de bioética de la Pontificia Universidad Católica De Chile (N° de protocolo 170117001).

## 7.6. Preparación de las rebanadas de pulmón para video microscopía

Se realizaron cortes de la zona más distal de las muestras, las dimensiones de los cortes fueron aproximadamente 0,5 cm x 1,0 cm. Posteriormente se agregó gelatina líquida al 6% a 40° C, se montó el corte previamente seleccionado esperando 30 segundos para la solidificación de la gelatina. Para la fijación definitiva se introdujo dentro de un tubo de acero hasta que la muestra quedo al límite del tubo, posteriormente se rellenó el tubo de acero con gelatina hasta dejar la muestra cubierta completamente. Se fijó el taco acrílico al tubo de acero con cinta adhesiva de papel, y se dejó en hielo por 5 minutos (figura 5). Posteriormente se montó en un vibratomo (Compresstome™ VF-300, Precisionary Instruments Inc.) y se cortaron rebanadas de 150µm, las cuales caían en un recipiente con HBSS, en donde fueron separadas de la gelatina y puestas en placas pequeñas para cultivo con 2 ml de HBSS.

Las muestras fueron cambiadas a nuevas placas con 2 ml. de medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) bajo campana de flujo laminar y conservadas dentro de una incubadora (Incubador CO<sub>2</sub> Precision Scientific modelo 5410) a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5% durante un periodo de aproximadamente 12 horas para posterior análisis.



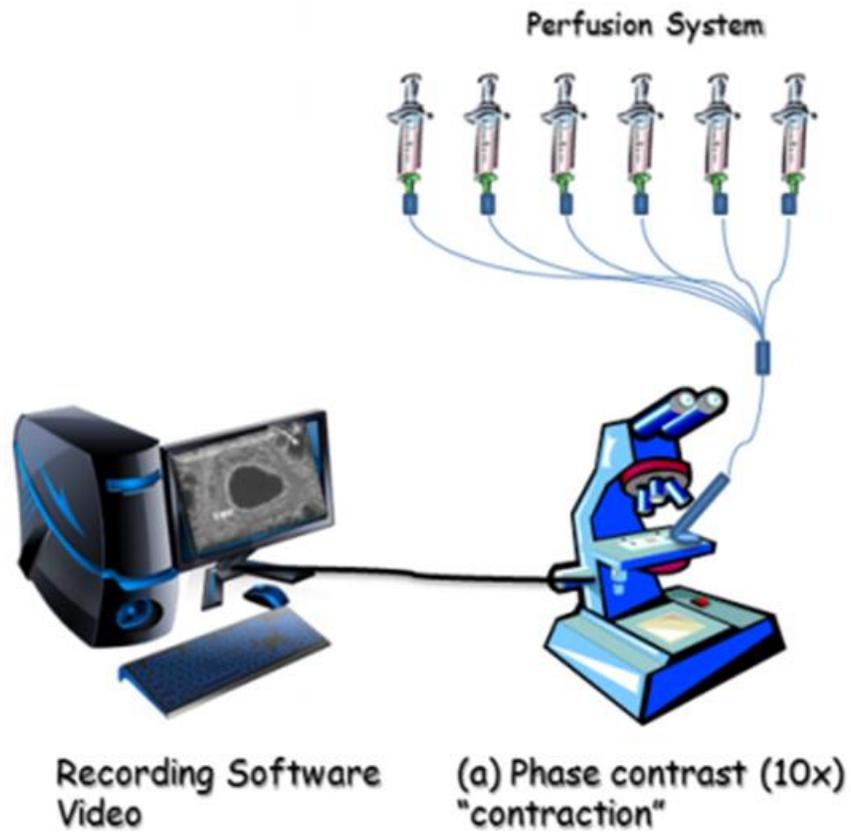
**Figura 5.** Montaje de la muestra de pulmón distal en gelatina. (A, B y C) Montaje de la muestra de pulmón en gelatina, (D) relleno la muestra con gelatina dentro del tubo de acero, (E) enfriamiento de la muestra con gelatina, (F) montaje del tubo de acero en el vibratomo.

### 7.7. Montaje de las rebanadas para perfusión

Las rebanas de pulmón fueron montadas en un portaobjetos y revisadas bajo microscopia óptica de contraste de fases. Se seleccionaron las rebanadas en las que se observaron bronquiolos de diámetro entre 100 y 200  $\mu\text{m}$ . Los bronquiolos fueron identificados por sus características histológicas y anatómicas correspondientes a un epitelio cilíndrico ciliado sin componente cartilaginoso ni glandular acompañado por arteriolas, éstas últimas con una capa muscular gruesa, además de esto en el lumen de los bronquiolos se debía identificar movimiento ciliar. Las rebanadas seleccionadas fueron fijadas con una malla de género a la cual se le realizó una perforación central, esta última fue flanqueada por dos líneas de silicona para formar un canal en donde quedó la rebanada de pulmón con el bronquiolo seleccionado y se tapó con un cubreobjetos para formar un canal de perfusión. Por un extremo del canal formado entre el portaobjetos y cubreobjetos se instaló un sistema de perfusión y por el otro extremo un sistema de aspiración.

Se configuró un programa de perfusión automatizado de 7 canales (Figura 6) de los cuales uno contenía HBSS (Hank's Balanced Salt Solution), los 6 restantes con agonistas broncoconstrictores en concentración ascendente desde 0,001  $\mu\text{M}$  aumentándola 10 veces por cada canal hasta llegar a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  para la estimulación con carbacol e histamina. Para la estimulación con salbutamol primero se realizó una pre-contracción con

CCh 50  $\mu\text{m}$  y posteriormente dosis ascendentes de salbutamol desde 0,01  $\mu\text{m}$  hasta 100  $\mu\text{m}$ . Cada canal se configuró con 3 minutos de tiempo de perfusión. Se realizaron registros de al menos 3 rebanadas de pulmón para cada configuración de perfusión.



**Figura 7.** Montaje de rebanadas de pulmón con sistema automatizado de perfusión, microscopía de contraste de fase y software para el registro de imágenes.

## 7.8. Registro y análisis de imágenes

Los portaobjetos con las rebanadas de pulmón fueron puestos bajo microscopio óptico de contraste de fases conectado a una cámara (Digital Camera Type Color CMOS SXY-M90) enlazada a un computador de escritorio (figura 6). Para la captura de las imágenes se utilizó el software S-VIEWER con el cual se registró imágenes con objetivo 25X cada dos segundos por el total del tiempo que durará el experimento, obteniendo un total de 930 fotografías por cada experimento.

El análisis de las imágenes se realizó con el software ImageJ con el cual se hizo un conteo del número de partículas (1 partícula= 1 pixel<sup>2</sup>) del lumen de los bronquiolos en cada una de las imágenes, los datos fueron exportados a una planilla Excel y posteriormente se normalizaron a porcentajes usando como valor de referencia las primeras fotografías, las que representaron el 100% del lumen antes de que las rebanadas de pulmón sean estimuladas con agonistas broncoconstrictores. Para la representación gráfica de los datos obtenidos se utilizó el software OriginPro 8.1.

Los cortes de las rebanadas de pulmón, preparación y análisis de las muestras fueron realizados en Laboratorio de Dinámicas Broncovasculares y Daño Pulmonar de la Universidad De Chile.

## **8. Análisis estadístico**

Se realizaron pruebas Mann-Whitney y ANOVA no paramétrica (Kruskal-Wallis) para determinar las diferencias entre los grupos, y para determinar las diferencias en un mismo grupo se utilizaron pruebas de Friedman, para todas las comparaciones múltiples se utilizó la prueba de Dunn's. Los valores están representados en medianas y rangos intercuartílicos. Para la comparación de curvas dosis respuesta y curva exponencial entre grupos se utilizó la prueba F- test.

## 9. Resultados

Se utilizaron 12 ratas macho, raza Sprague Dawley divididas en un grupo control y un grupo con injuria pulmonar aguda, las características basales de los grupos se resumen en la Tabla 1.

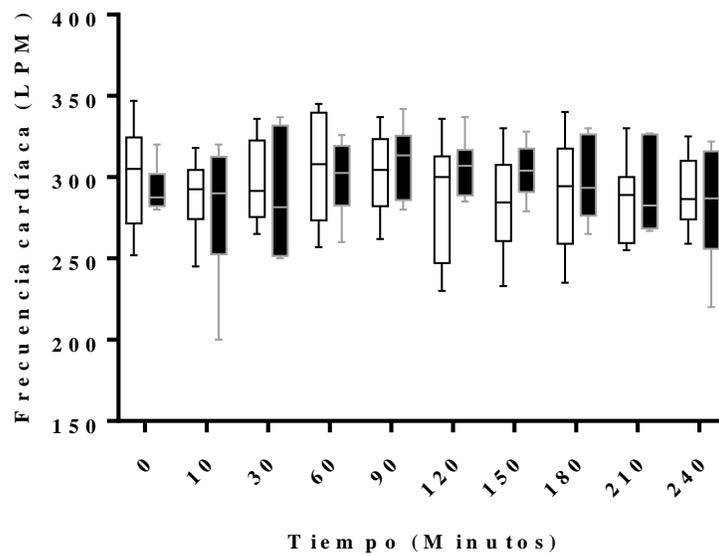
	<b>Grupo Control n= 6</b>	<b>Grupo IPA n= 6</b>	<b>Valor p</b>
<b>Peso (gramos)</b>	322,5 [307,5 - 335,0]	319,5 [297,50- 350,0]	0,900
<b>Frecuencia cardiaca (LPM)</b>	305,0 [271,5 - 324,5]	287,5 [282,30 - 302,3]	0,818
<b>Frecuencia respiratoria (RPM)</b>	95,0 [95,0 - 95,0]	95,0 [95,0 - 95,0]	0,999
<b>Presión arterial sistólica (mmHg)</b>	115,5 [108,8 – 121,3]	113,6 [103,3 – 116,3]	0,333
<b>Presión arterial diastólica (mmHg)</b>	80,5 [76,3 – 93,5]	75,0 [72,8 – 78,0]	0,084
<b>Presión arterial media (mmHg)</b>	96,0 [91,3 – 101,8]	85,5 [86,5 – 95,5]	0,191
<b>Presión máxima de vía aérea (cmH<sub>2</sub>O)</b>	10,8 [9,6 – 12,0]	9,8 [9,2 – 11,2]	0,405
<b>Saturación O<sub>2</sub> en sangre arterial (%)</b>	100,0 [100,0 – 100,0]	100,0 [100,0 – 100,0]	0,999
<b>Fracción inspirada de O<sub>2</sub></b>	1,0 [1,0 – 1,0]	1,0 [1,0 – 1,0]	0,999
<b>PaO<sub>2</sub> (mmHg)</b>	355,0 [318,0 – 395,0]	379,0 [350,3 – 396,3]	0,485
<b>PaCO<sub>2</sub> (mmHg)</b>	43,8 [41,6 – 45,5]	42,7 [38,4 – 46,0]	0,853
<b>pH</b>	7,4 [7,3 – 7,4]	7,3 [7,3 – 7,4]	0,099
<b>Bicarbonato real (mEq/L)</b>	24,9 [23,8 – 25,1]	23,8 [19,6 – 24,8]	0,223
<b>Exceso de bases (mEq/L)</b>	-1,0 [-2,0 – 0,3]	-2,0 [-6,0 – -0,8]	0,193
<b>Lactato (mmol/L)</b>	0,5 [0,4 – 0,6]	0,4 [0,3 – 0,5]	0,221
<b>Temperatura (°C)</b>	37,8 [37,4 – 37,9]	36,5 [35,0 – 37,6]	0,087

**Tabla 1.** Características basales por grupo, los valores están representados en medianas [percentil 25 – 75]. LPM: Latidos por minuto; RPM: Respiraciones por minuto.

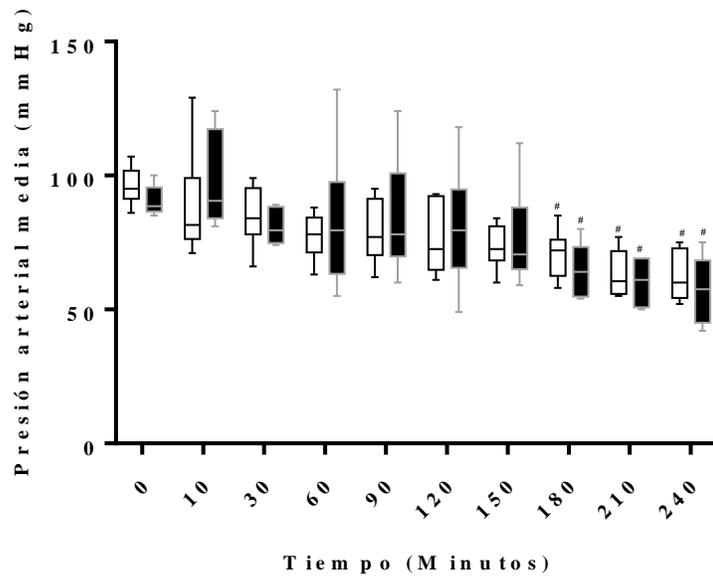
### 9.1. Signos vitales

La frecuencia cardíaca no presentó diferencias entre los grupos y tampoco se observaron variaciones significativas durante todo el periodo experimental (Figura 8).

Respecto a la presión arterial media, si bien esta no presentó diferencia entre los grupos, sí se observó una disminución significativa desde el tiempo 180 hasta el final del periodo experimental en ambos grupos al ser comparado con el tiempo 0 ( $p < 0,05$ ) (Figura 9).



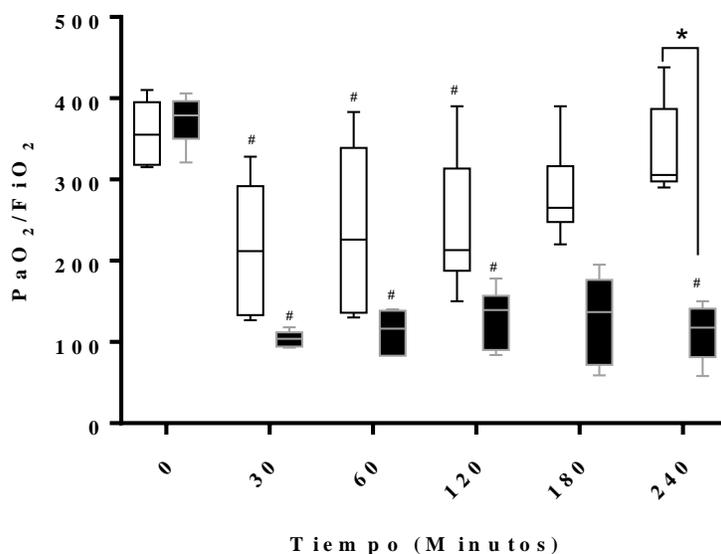
**Figura 8. Frecuencia cardíaca en latidos por minuto (LPM) en relación con el tiempo.** Los valores están representados en medianas y rango intercuartílico. Las cajas blancas representan el grupo control ( $n = 6$ ) y las negras representan el grupo IPA ( $n = 6$ ).



**Figura 9. Presión arterial media en mmHg en relación con el tiempo.** Los valores están representados en medianas y rango intercuartílico. Las cajas blancas representan el grupo control (n= 6) y las negras representan el grupo IPA (n= 6). # p< 0,05 comparado con el tiempo 0 de su respectivo grupo.

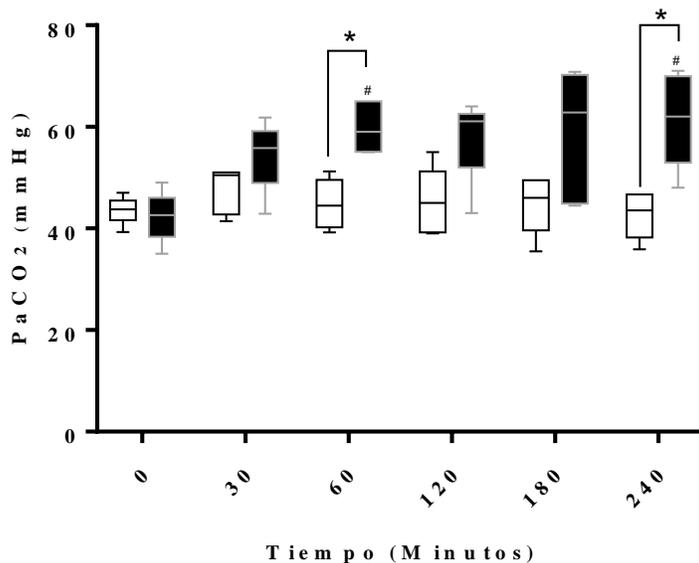
## 9.2. Intercambio gaseoso

Se observó una disminución significativa de la  $PaO_2/FiO_2$  posterior a la intervención en ambos grupos con una mediana de 212,0 (133,0-292,0) ( $p= 0,001$ ) y 104,0 (94,5-112,0) ( $p= 0,003$ ) en el grupo control e IPA respectivamente, disminución que fue transitoria en el grupo control ya que se mantuvo baja solo hasta el minuto 120, posteriormente y hasta el final del periodo experimental, no se observaron diferencias al ser comparado con su tiempo 0. Por otro lado, el grupo IPA mantuvo la  $PaO_2/FiO_2$  significativamente más baja respecto de su tiempo 0 hasta el tiempo 240 ( $p< 0,01$ ). En el tiempo 240 en el grupo IPA se observó una  $PaO_2/FiO_2$  significativamente menor, con una mediana de 117,5 (81,25-135,0), respecto al grupo control el que tuvo una mediana 305,8 (297,5-387,0) ( $p= 0,004$ ) (Figura 10).



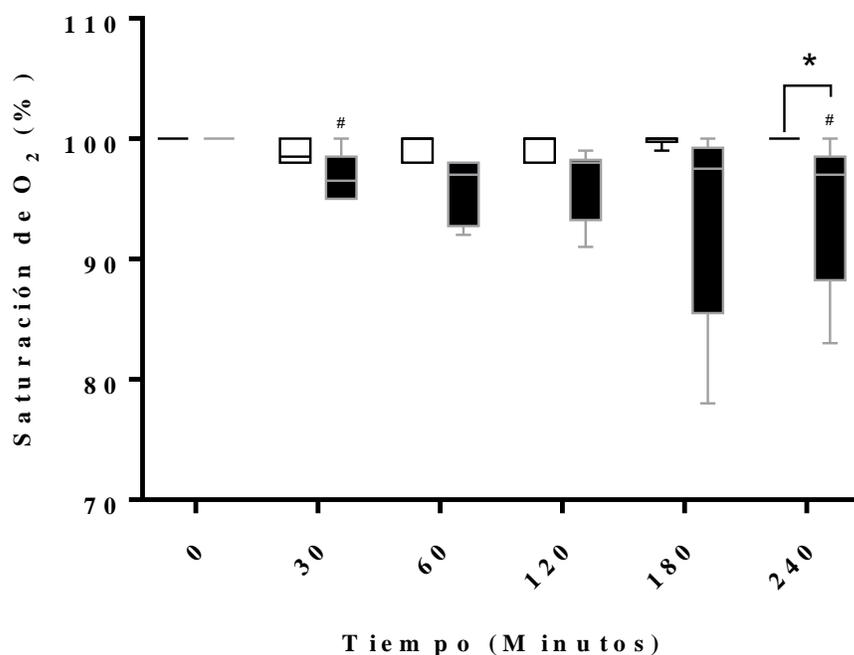
**Figura 10. Relación  $PaO_2/FiO_2$  en relación con el tiempo.** Los valores están representados en medianas y rango intercuartílico. Las cajas blancas representan el grupo control ( $n= 6$ ) y las negras representan el grupo IPA ( $n= 6$ ). #  $p< 0,05$  comparado con el tiempo 0 de su respectivo grupo; \*  $p< 0,05$  comparado con el grupo control.

Respecto a la PaCO<sub>2</sub>, se observó que el grupo control no presentó variaciones significativas durante el periodo experimental. Por otra parte, el grupo IPA presentó un aumento significativo de la PaCO<sub>2</sub> con respecto al tiempo 0, en el tiempo 60 y tiempo 240, en ambos tiempos también presentó diferencias significativas respecto al control haciéndose más evidente al tiempo 240 con una mediana de 43,6 mmHg (38,2-46,7) y 62,0 mmHg (52,9-69,9) para el grupo control e IPA, respectivamente (p= 0,007) (Figura 11).



**Figura 11. Presión parcial de CO<sub>2</sub> expresada en mmHg con relación al tiempo.** Los valores están representados en medianas y rango intercuartílico. Las cajas blancas representan el grupo control (n= 6) y las cajas negras representan el grupo IPA (n= 6). # p< 0,05 comparado con el tiempo 0 de su respectivo grupo; \*p< 0,05 comparado con el grupo control.

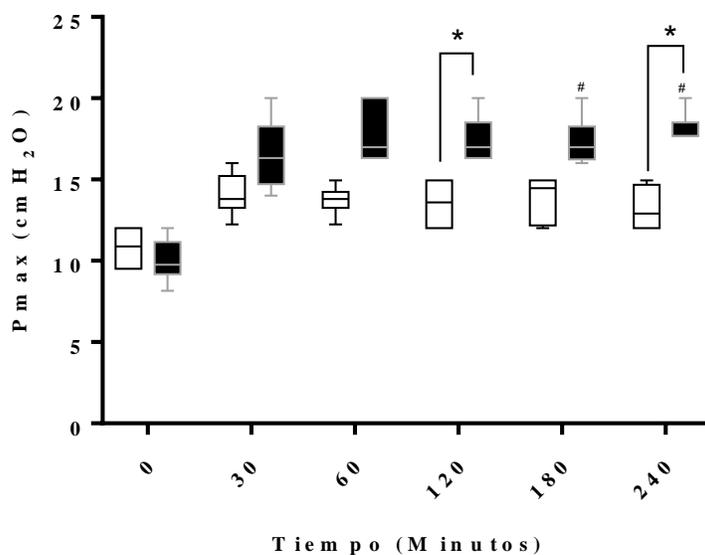
El porcentaje de saturación de oxígeno en sangre arterial se mantuvo sin variación significativa en el grupo control. Por otra parte, el grupo IPA presentó valores de saturación de oxígeno significativamente menores respecto al tiempo 0 en los tiempos 30 y 240, tiempos en donde también fue significativamente menor al grupo control siendo este último en donde se registró la mayor diferencia, con una mediana de 100,0% (100,0-100,0) y 97,0% (88,3-98,5) para el grupo control e IPA respectivamente ( $p= 0,009$ ) (Figura 12).



**Figura 12. Porcentaje de saturación de oxígeno en sangre arterial con relación al tiempo.** Los valores están representados en medianas y rango intercuartílico. Las cajas blancas representan el grupo control ( $n= 6$ ) y las cajas negras representan el grupo IPA ( $n= 6$ ). #  $p< 0,05$  comparado con el tiempo 0 de su respectivo grupo; \*  $p< 0,05$  comparado con el grupo control.

### 9.3. Presión máxima de vía aérea

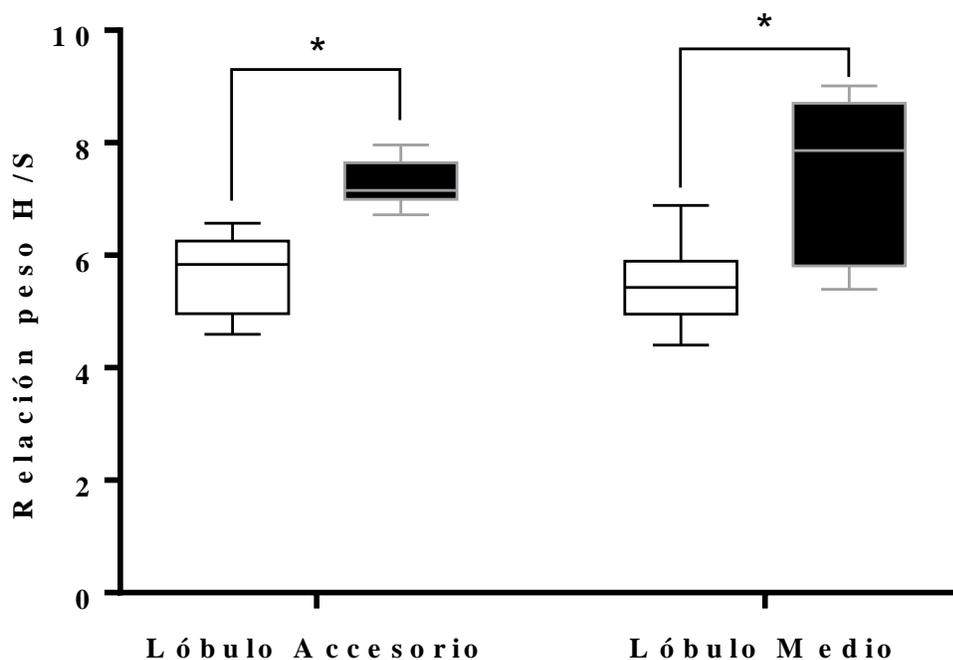
Se observó que el grupo control no cambió significativamente la presión máxima de vía aérea (Pmax). Por otra parte, el grupo IPA presentó un aumento significativo de la Pmax respecto al tiempo 0, en el tiempo 180 y 240, tiempos en donde también se observaron diferencias significativas entre los grupos, siendo el tiempo 240 en donde se observó la mayor diferencia con una mediana de 17,8 cmH<sub>2</sub>O (17,8-18,5) para el grupo IPA y 13,2 cmH<sub>2</sub>O (12,0-14,7) para el grupo control (p= 0,004) (Gráfico 13).



**Figura 13. Presión máxima de vía aérea (Pmax) en cmH<sub>2</sub>O con relación al tiempo.** Los valores están representados en medianas y rango intercuartílico. Las cajas blancas representan el grupo control (n= 6) y las cajas negras representan el grupo IPA (n= 6). # p< 0,05 comparado con el tiempo 0 de su respectivo grupo; \* p< 0,05 comparado con el grupo control.

#### 9.4. Edema pulmonar (relación peso húmedo/seco pulmonar)

El grupo IPA presentó mayor edema pulmonar, con una relación peso húmedo/seco (H/S) para el lóbulo accesorio significativamente mayor con medianas de 7,15 (6,99-7,64) y 5,84 (4,96-6,25) para el grupo IPA y control respectivamente ( $p= 0,002$ ). La relación peso H/S para el lóbulo medio también fue significativamente mayor en el grupo IPA, con una mediana de 7,87 (5,81-8,70), respecto al grupo control, en donde se observó una mediana de 5,43 (4,95-5,89) ( $p= 0,026$ ) (Figura 14).

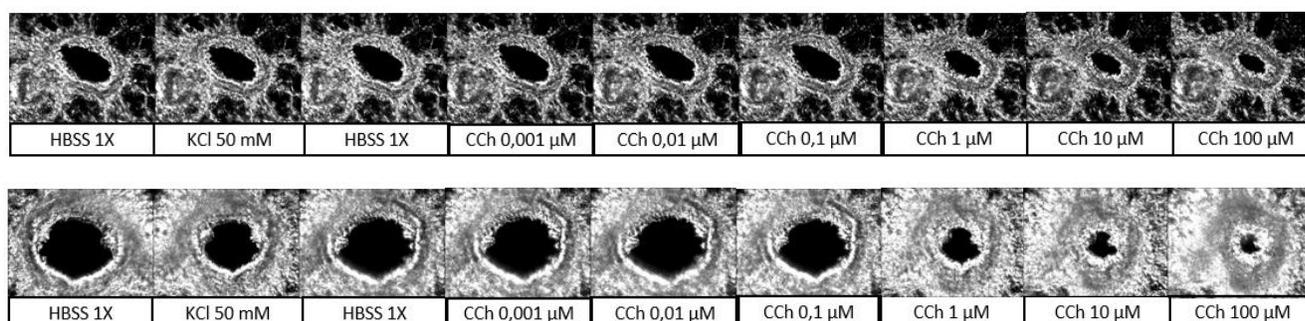


**Figura 14. Relación peso húmedo/seco para el lóbulo accesorio y lóbulo medio.** Los valores están representados en medianas y rango intercuartílico. Las cajas blancas representan el grupo control (n= 6) y las cajas negras representan el grupo IPA (n= 6). \*  $p < 0,05$  comparado con el grupo control.

## 9.5. Reactividad Bronquiolar

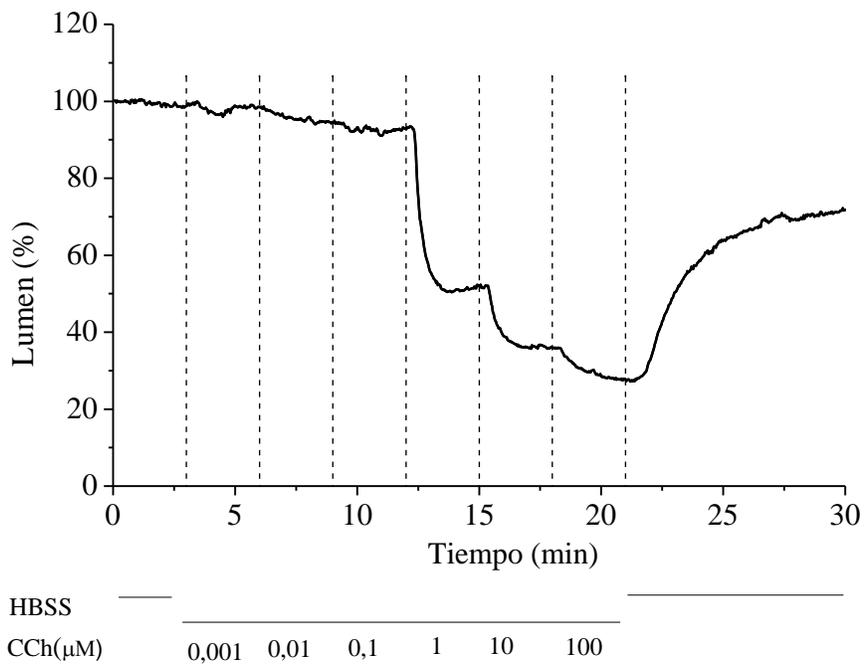
### 9.5.1. Reactividad bronquiolar a Carbacol

Se utilizaron 37 y 36 rebanadas de pulmón para el grupo control e IPA respectivamente, provenientes de 6 ratas de cada grupo, para el análisis *ex vivo* de la reactividad a carbacol (CCh) (Figura 15). Se consideró el lumen inicial como el promedio de las primeras 90 imágenes de cada experimento, no se observaron diferencias entre los lúmenes iniciales de los bronquiolos con una mediana de  $18676,14 \mu\text{m}^2$  (14901,62-26750,42) y  $20424,75 \mu\text{m}^2$  (12463,36-26392,53) para el grupo control e IPA respectivamente ( $p= 0,77$ ).

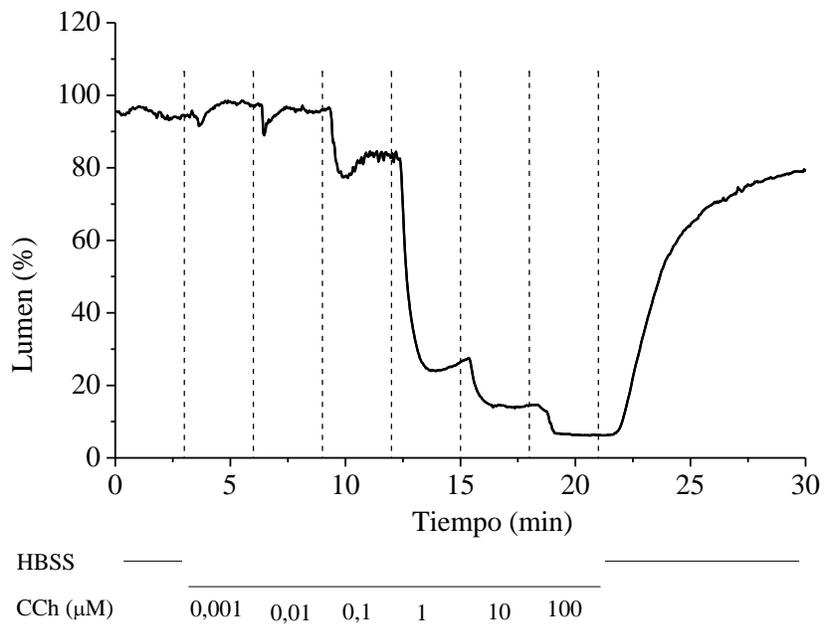


**Figura 15. Imágenes representativas de microscopía de contraste de fases de bronquiolos estimulados con carbacol en dosis ascendente.** Arriba bronquiolo representativo del grupo control, abajo bronquiolo representativo del grupo IPA.

Para la representación gráfica de las variaciones del lumen de los bronquiolos estimulados con carbacol se utilizó el software OriginPro 8.1, los valores de partículas por imagen fueron normalizados a porcentajes tomando en cuenta el 100% del lumen como las primeras imágenes para cada uno de los experimentos (Figura 16 y 17).

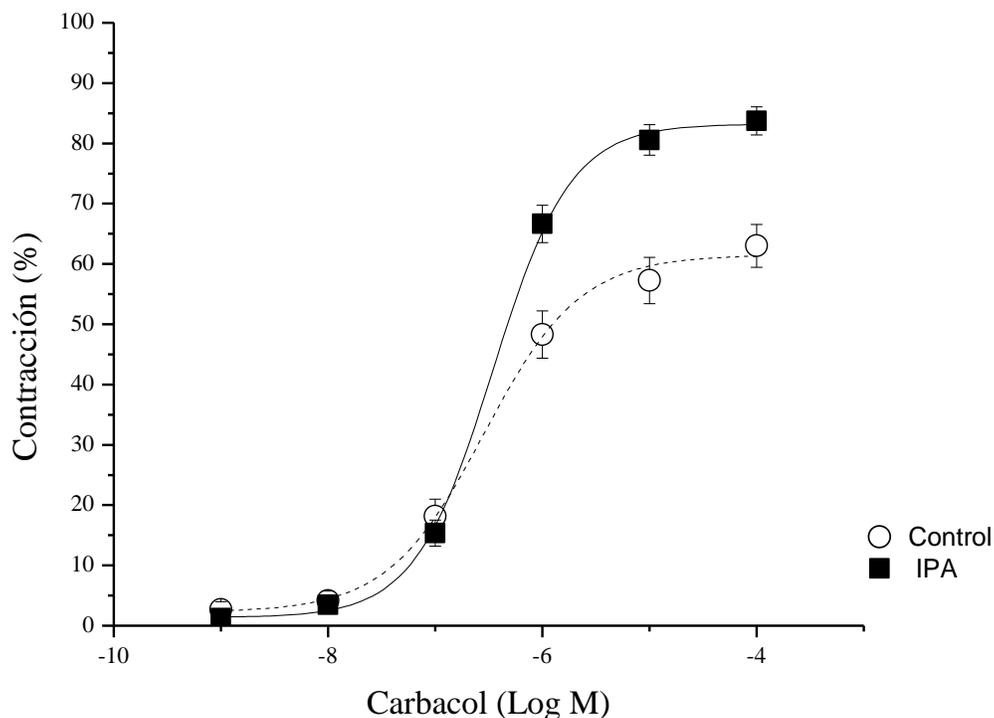


**Figura 16.** Contracción de un bronquiolo representativo de rata control estimulado con carbacol en dosis ascendente.



**Figura 17.** Contracción de un bronquiolo representativo de rata con injuria pulmonar aguda estimulado con carbacol en dosis ascendente.

Para representar cada punto de la curva dosis respuesta se utilizó la diferencia entre el porcentaje del lumen sin estimulación y el porcentaje de lumen obtenido para cada concentración de carbacol y se transformaron las concentraciones de CCh a logaritmo de la concentración molar. Al ajuste de las curvas dosis respuesta se le aplicó un test estadístico (F-test) para comparar el grupo control con el IPA, concluyendo ambos son estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) (Figura 18). Los valores EC50 fueron 285,86 nM y 344,15 nM para el grupo control e IPA respectivamente en donde no existieron diferencias significativas.



**Figura 18. Curva dosis respuesta a carbacol de bronquiolos control versus injuria pulmonar aguda (IPA).** Los círculos blancos representan al grupo control y los cuadrados negros al grupo IPA.

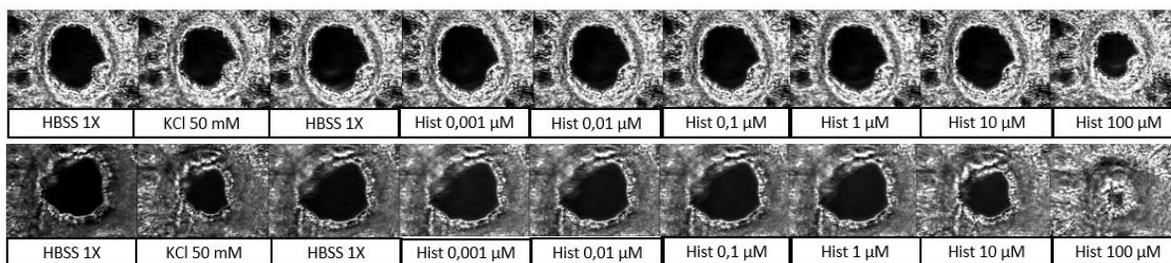
Por otra parte, al analizar las diferencias entre ambos grupos para cada concentración de CCh, con un test estadístico no paramétrico, los bronquiolos del grupo IPA tuvieron mayor contracción con concentraciones de 1µM, 10µM y 100µM respecto al grupo control (Tabla 2).

	CCh 0,001 µM	CCh 0,01 µM	CCh 0,1 µM	CCh 1 µM	CCh 10 µM	CCh 100 µM
<b>Control</b>	0	0	14,59	46,85	57,14	64,65
<b>Contracción (%)</b>	[0,00-1,24]	[0,00-3,74]	[3,70-25,24]	[31,01-67,84]	[41,25-79,07]	[45,45-82,51]
<b>IPA</b>	0	1,76	11,39	66,72*	81,48*	88,20*
<b>Contracción (%)</b>	[0,00-1,59]	[0,00-5,79]	[4,78-20,56]	[53,15-77,16]	[69,48-91,23]	[74,28-93,46]

**Tabla 2. Porcentajes de contracción para cada concentración de CCh.** Los valores están representados en medianas [percentil 25-75]. \*  $p < 0,05$  respecto al grupo control con la misma concentración de CCh.

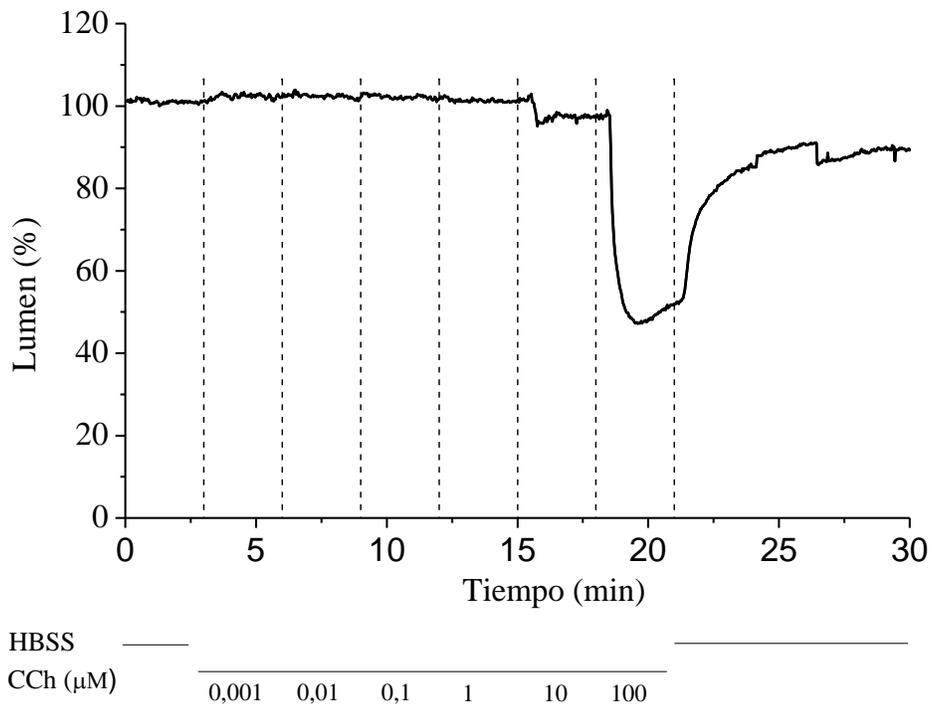
### 9.5.2. Reactividad bronquiolar a histamina

Se utilizaron 30 y 28 rebanadas de pulmón para el grupo control e IPA respectivamente provenientes de 6 ratas de cada grupo para el análisis *ex-vivo* de la reactividad a histamina (Figura 19). Se consideró el lumen inicial como el promedio de las primeras 90 imágenes de cada experimento, no se observaron diferencias entre los lúmenes iniciales de los bronquiolos con una mediana de 25366,11 µm<sup>2</sup> (16844,88-31518,71) y 25139,39 µm<sup>2</sup> (18323,39-28235,94) para el grupo control e IPA respectivamente ( $p= 0,85$ ).

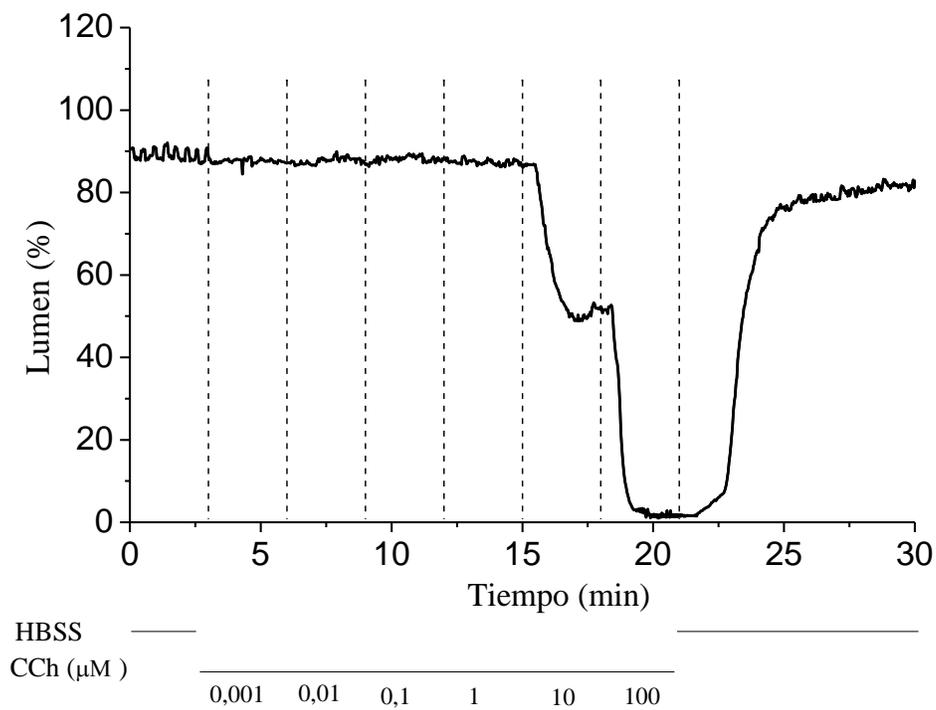


**Figura 19. Imágenes de microscopía de contraste de fases de un bronquiolo representativo de rata con injuria pulmonar aguda estimulado con histamina (Hist) en dosis ascendente.** Arriba bronquiolo representativo del grupo control, abajo bronquiolo representativo del grupo IPA.

Para la representación gráfica de las variaciones del lumen de los bronquiolos estimulados con histamina, los valores de partículas por imagen fueron normalizados a porcentajes tomando en cuenta el 100% del lumen como las primeras imágenes para cada uno de los experimentos (Figura 20 y 21).

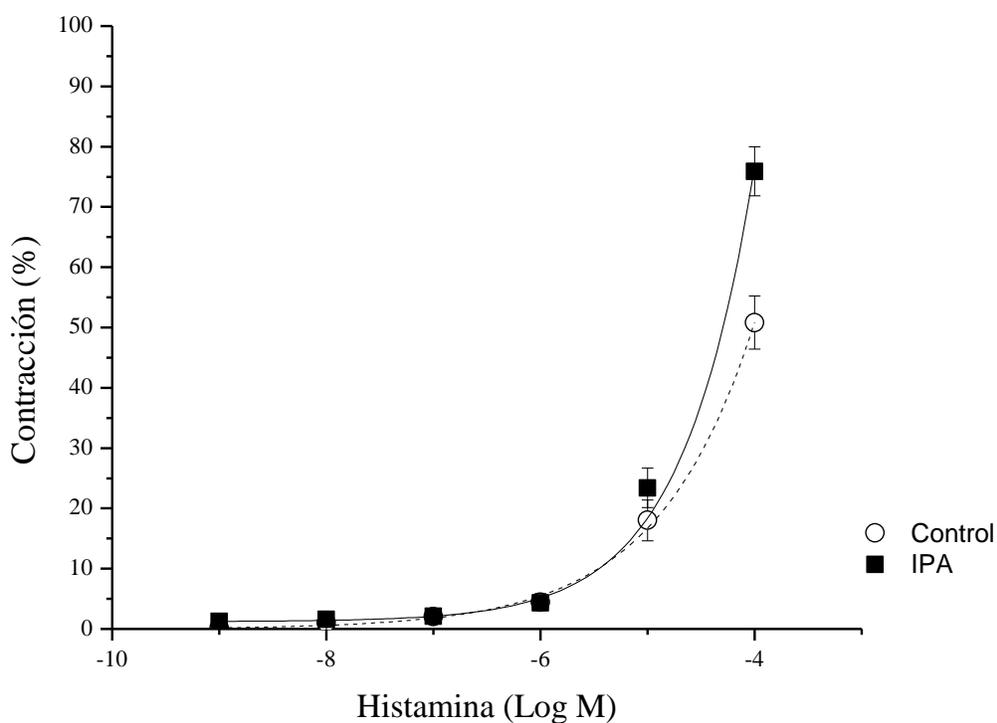


**Figura 20.** Contracción un bronquiolo representativo de rata control estimulado con histamina en dosis ascendente.



**Figura 21.** Contracción de un bronquiolo de rata con injuria pulmonar aguda estimulado con histamina en dosis ascendente.

Para la construcción de la curva con ajuste exponencial en respuesta a histamina se representó cada punto como la diferencia entre el porcentaje del lumen del bronquiolo, previo a la estimulación, y el porcentaje del lumen obtenido para cada concentración de histamina y se transformaron las concentraciones de histamina a logaritmo de la concentración molar, los ajustes de las curvas son estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) (Figura 22).



**Figura 22. Curva de respuesta a histamina de bronquiolos control versus injuria pulmonar aguda (IPA).** Los círculos blancos representan al grupo control y los cuadrados negros al grupo IPA.

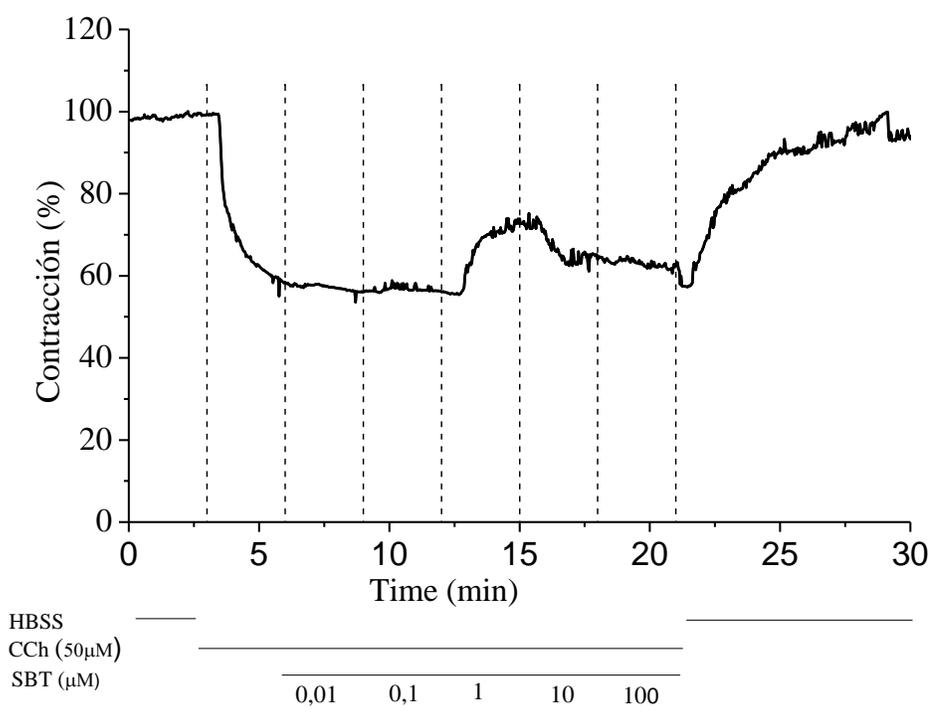
Por otra parte, al analizar las diferencias entre ambos grupos para cada concentración de histamina, con un test estadístico no paramétrico, los bronquiolos del grupo IPA tuvieron mayor contracción que los controles solo a concentración 100 $\mu$ M (Tabla 3).

	Hista 0,001 $\mu$ M	Hista 0,01 $\mu$ M	Hista 0,1 $\mu$ M	Hista 1 $\mu$ M	Hista 10 $\mu$ M	Hista 100 $\mu$ M
<b>Control</b>	0	0	0	0,58	10,74	51,89
<b>Contracción (%)</b>	[0,00-0,00]	[0,00-0,00]	[0,00-2,68]	[0,00-7,32]	[5,29-23,35]	[28,74-66,28]
<b>IPA</b>	0	0	0	3,52	19,29	75,18
<b>Contracción (%)</b>	[0,00-1,33]	[0,00-2,83]	[0,00-3,73]	[0,00-7,17]	[9,67-34,03]	[61,22-93,30]

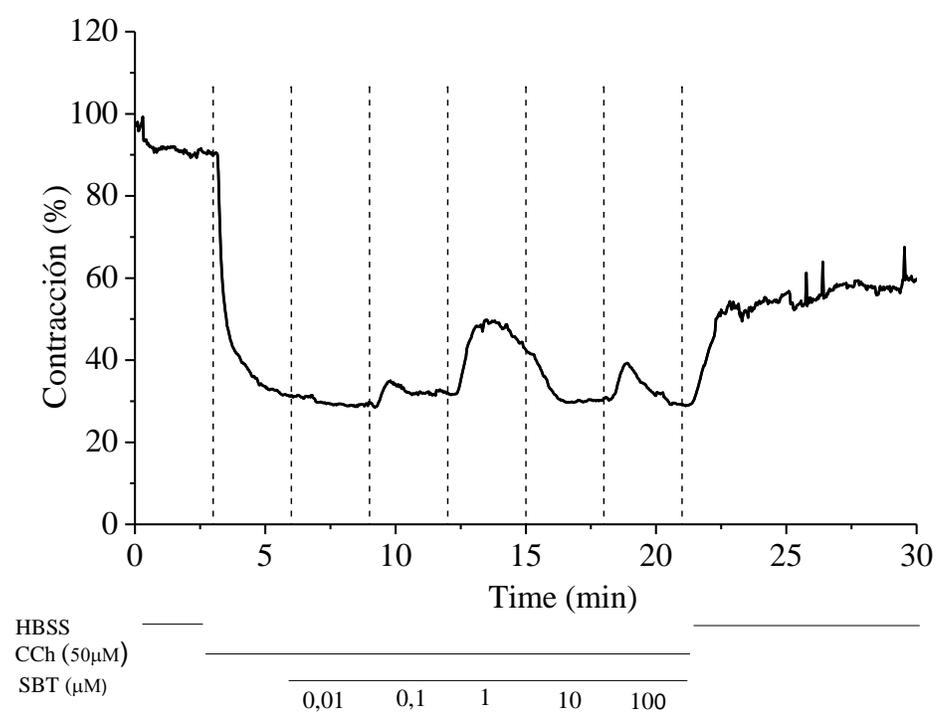
**Tabla 3. Porcentajes de contracción para cada concentración de histamina (Hista).** Los valores están representados en medianas [percentil 25-75]. \*  $p < 0,05$  respecto al grupo control con la misma concentración de Hista.

### 9.5.3. Reactividad bronquiolar a carbacol más salbutamol

Se utilizaron 25 y 23 rebanadas de pulmón para el grupo control e IPA respectivamente provenientes de 6 ratas de cada grupo para el análisis *ex-vivo*. Salbutamol en ninguna de sus concentraciones (0,01 $\mu$ M-100 $\mu$ M) fue capaz de revertir completamente la broncoconstricción producida por CCh 50  $\mu$ M en ambos grupos, además generó una respuesta inconsistente debido a que no se logró estabilización del lumen para cada concentración y solo se observaron picos de relajación en ambos grupos los cuales fueron efectos transitorios (Figura 23 y 24).

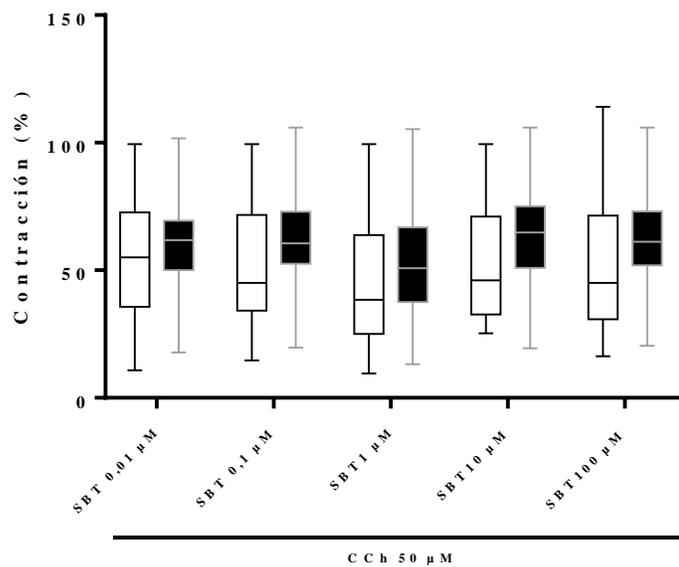


**Figura 23.** Contracción de un bronquiolo de rata control con una contracción por carbacol (CCh) 50µM estimulado con salbutamol (SBT) en dosis ascendente.



**Figura 24.** Contracción de un bronquiolo de rata control con una contracción por carbacol (CCh) 50 $\mu$ M estimulado con salbutamol (SBT) en dosis ascendente.

No se observaron diferencias de los lúmenes entre ambos grupos en respuesta a salbutamol en ninguna de las concentraciones evaluadas (0,01 – 100  $\mu$ M), posterior a la pre-contracción por CCh 50  $\mu$ M (Figura 25).



**Figura 25.** Contracción de bronquiolos en respuesta a dosis ascendentes de salbutamol (SBT) con dosis fija de carbacol (CCh). Los valores están representados en medianas y rango intercuartílico. Las cajas blancas representan el grupo control y las cajas negras representan el grupo IPA.

## 10. Discusión

Se logró establecer un modelo de injuria pulmonar aguda por instilación de HCl en ratas, asistido con ventilación mecánica y monitoreo hemodinámico invasivo, caracterizado por hipoxemia severa y edema pulmonar, dos de las principales características fisiopatológicas del SDRA [5]. El estudio de reactividad bronquiolar *ex-vivo* reveló que el modelo de injuria pulmonar aguda por instilación de HCl presenta aumento de la respuesta broncoconstrictora a carbacol e histamina, particularmente a dosis altas.

La tercera causa de SDRA en humanos es la aspiración de contenido gástrico. El modelo de HCl busca simular esta condición de manera controlada y reproducible. Existe variabilidad respecto al volumen y concentración de HCl utilizado para generar la injuria pulmonar, en donde el volumen varía desde los 0,5 ml/kg [32] hasta 2 ml/kg [33], y la concentración entre 0,1 N [34] y 0,5 N [26]. En nuestro trabajo la inducción de la injuria pulmonar aguda se realizó con volumen de 2 ml/kg y concentración 0,1 N, valores descritos previamente [35, 36]. Se descartó la utilización de dosis más altas de HCl ya que en experimentos piloto se observó rápida letalidad (datos no presentados).

Otra variable que requirió modificaciones al protocolo original fue la presencia de grandes esfuerzos respiratorios en los animales injuriados, a pesar de establecer un plano de anestesia profundo. Estos esfuerzos generaban inestabilidad hemodinámica e incluso la rápida

aparición de edema pulmonar que determinó la inundación de la vía aérea en dos experimentos piloto. Por esta razón fue necesario el uso de bloqueo neuromuscular como complemento a la anestesia general.

El modelo experimental cumple varias características que le dan relevancia clínica al estudio. Desde el punto de vista fisiopatológico destaca la severa alteración del intercambio gaseoso, la cual persiste hasta el final del modelo a pesar del uso de VM, así como el marcado edema pulmonar, evidenciado por el aumento de la relación peso H/S [37]. Datos similares han sido reportados en conejos sometidos a instilación de HCl [38], efecto que podría estar determinado por el efecto del bajo pH del HCl en las vías respiratorias, seguido por una respuesta inflamatoria neutrofílica aguda. Estos mecanismos patogénicos conducirían a la pérdida de la integridad microvascular pulmonar con extravasación de líquido y proteínas en las vías respiratorias y alvéolos[39], mecanismos que podrían explicar los fenómenos antes mencionados en las ratas con IPA. Otra fortaleza del modelo es la inclusión de VM, monitoreo de la presión arterial, presión de vía aérea, gases en sangre arterial, anestesia general y bloqueo neuromuscular, todas condiciones que normalmente están presentes en el manejo de los pacientes con SDRA.

La técnica de rebanadas de pulmón *ex-vivo* y video microscopía de contraste de fase ha sido empleada para estudiar la fisiología y fisiopatología pulmonar en diversas estructuras dentro de las que destacan bronquiolos, vénulas y arteriolas. Además es ampliamente utilizada en modelos de asma [40-42], enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) [43-45], e hipertensión pulmonar [46, 47]. Una de las mayores fortalezas de esta técnica es que mantiene la integridad estructural del tejido pulmonar, lo que permite una evaluación más completa de

las respuestas locales al estar presentes todos los tipos de células relevantes para la inducción de la respuesta inmune tales como células dendríticas, macrófagos o mastocitos. Además, las células permanecen en su relación arquitectónica normal e interactúan entre sí y con otras células residentes relevantes para la broncoconstricción, como células musculares lisas o nervios. Una desventaja en comparación con los métodos *in vivo* es que, al cesar la circulación sanguínea, se pierde la migración de células desde el pulmón a la sangre y viceversa [48], pero que en nuestro contexto no tiene efectos adversos respecto a los objetivos de este estudio.

La respuesta broncoconstrictora a CCh fue significativamente mayor en el grupo de injuria pulmonar aguda, encontrándose diferencias a concentraciones de 1, 10 y 100 $\mu$ M (tabla 2). Respecto a la reactividad en respuesta a histamina, el grupo injuria pulmonar aguda también demostró aumento en la respuesta broncoconstrictora, encontrándose diferencia solo con histamina 100 $\mu$ M (tabla 3). Estos hallazgos demuestran que efectivamente existe hiperreactividad de las vías aéreas pequeñas en este modelo.

Se ha reportado que existe gran variabilidad inter-especies en respuesta a histamina, por ejemplo, en un modelo de rebanadas de pulmón de ovejas sanas, al ser estimuladas con histamina, este tejido no responde ni siquiera a histamina 100  $\mu$ M. Contrariamente, en rebanadas de pulmón de conejillos de india (Dunkin-Hartley) sanos, estimuladas con histamina, la respuesta comienza desde concentraciones más bajas (0,1 $\mu$ M) y un colapso casi completo con 10  $\mu$ M de histamina [49]. En rebanadas de pulmón de humanos sin patologías crónicas, estimuladas con histamina, se induce constricción de vías aéreas pequeñas a partir de dosis de 1 $\mu$ M, siendo máxima la respuesta a 100  $\mu$ M, logrando una contracción entre 50% y 60% del lumen [49]. Estos datos evidencian que la respuesta contráctil a histamina es muy

variable entre distintas especies, siendo la respuesta de humanos la que más se asemeja en términos de contracción máxima a nuestras ratas control.

Respecto a la estimulación con CCh, se observó una mayor respuesta broncoconstrictora en el grupo con injuria pulmonar aguda, la cual fue evidente a partir de dosis de  $1\mu\text{M}$  de carbacol. Este dato es consistente con el estudio de H. Held y S. Uhlig, quienes demostraron hiperreactividad del sistema respiratorio en respuesta a MCh en ratones vivos con injuria pulmonar aguda por LPS [23] a través de medición de resistencia de vía aérea, la cual es una evaluación del comportamiento global del sistema respiratorio. En nuestro estudio se logró aislar el comportamiento de las vías respiratorias pequeñas y demostrar aumento de la reactividad en respuesta a agonistas broncoconstrictores como histamina y CCh. Este hallazgo es potencialmente relevante, ya que las vías respiratorias pequeñas carecen de cartílagos y por lo tanto son más propensas al colapso [50]. Además de esto, la suma del área de sección transversal es mayor que el de las vías respiratorias centrales [16], lo que hace que la resistencia en condiciones normales sea baja, por lo tanto cualquier influencia en estas podría llegar a ser crítico e influir en la distribución de la ventilación. Por otra parte, la reducción de la ventilación produce disminución de la distensibilidad pulmonar. Esto puede deberse a la presencia de atelectasias, consolidación, así como también al cierre de las vías respiratorias pequeñas, lo cual podría promover alteraciones más o menos severas en el intercambio de gases. Estas alteraciones tienen como resultado una menor relación V/Q [51], ya que existirían áreas de mayor resistencia al paso del aire, además de zonas sobredistendidas, fenómeno que es amplificador del daño pulmonar en este síndrome [7]. Sin embargo, no podemos determinar si el aumento de reactividad observada en este modelo *ex vivo* existe o no en humanos con SDRA, y tampoco podemos afirmar si es que el aumento de

reactividad tiene una traducción en términos de resistencia de las vías aéreas en la condición *in vivo*.

A pesar de que salbutamol es un broncodilatador ampliamente usado, en nuestro modelo su utilización no fue capaz de revertir la contracción producida por CCh 50  $\mu$ M. Esto podría deberse a que la concentración de CCh utilizada fue excesivamente alta causando saturación de los receptores muscarínicos, ya que cuando se ha utilizado metacolina, la cual actúa sobre los mismos receptores, las concentraciones utilizadas son considerablemente más bajas, 316 nM en conejillos de india sanos [49], y 100 nM en un modelo de asma en ratones [52], en ambos casos salbutamol sí tuvo efecto broncodilatador consistente.

En estudios futuros proyectamos poder realizar una evaluación de la mecánica respiratoria más detallada que nos permita evaluar resistencia, distensibilidad y PEEPi. Adicionalmente, valorar la reactividad a agonistas broncoconstrictores *in vivo* en diferentes fases del periodo experimental. También esperamos evaluar otras dosis de histamina en las rebanadas de pulmón *ex vivo* y determinar cuál es la meseta de la respuesta broncoconstrictora. Y, por último, realizar instilación con una solución que se asemeje más al contenido gástrico y que contenga no sólo HCl sino también bacterias, material particulado y citoquinas.

## 11. Conclusiones

Se estableció un modelo de injuria pulmonar aguda con características fisiopatológicas similares al SDRA, como alteraciones de intercambio gaseoso, aumentos de presión de vía aérea y edema pulmonar.

La técnica de rebanadas de pulmón *ex-vivo* y video microscopía de contraste de fase, por primera vez es utilizada para un modelo experimental de SDRA, por lo tanto, es un precedente y da alternativas de investigación relacionadas con dichas estructuras que involucran al parénquima pulmonar, las que están íntimamente relacionadas y su comportamiento podría tener impacto en los fenómenos relacionados a este síndrome.

Si bien el Salbutamol no tuvo impacto en revertir la broncoconstricción producida por CCh 50  $\mu$ M, nuestro modelo de IPA sí se asocia a aumento de reactividad de la vía aérea pequeña en respuesta a agonistas broncoconstrictores como histamina y CCh, lo cual es interesante ya que podría tener impacto en la distribución de la ventilación y alteraciones del intercambio gaseoso, aunque es difícil poder extrapolar esto a la clínica ya que no sabemos si es una característica del modelo de instilación de HCl o del daño pulmonar agudo, por lo tanto se requieren más estudios con diferentes modelos de injuria pulmonar aguda para poder aclarar este punto.



## 12. Bibliografia

1. Bellani, G., et al., *Epidemiology, Patterns of Care, and Mortality for Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome in Intensive Care Units in 50 Countries*. *Jama*, 2016. **315**(8): p. 788-800.
2. Rubenfeld, G.D. and M.S. Herridge, *Epidemiology and outcomes of acute lung injury*. *Chest*, 2007. **131**(2): p. 554-62.
3. Koulouras, V., et al., *Efficacy of prone position in acute respiratory distress syndrome patients: A pathophysiology-based review*. *World J Crit Care Med*, 2016. **5**(2): p. 121-36.
4. Ranieri, V.M., et al., *Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition*. *Jama*, 2012. **307**(23): p. 2526-33.
5. Radermacher, P., S.M. Maggiore, and A. Mercat, *Fifty Years of Research in ARDS. Gas Exchange in Acute Respiratory Distress Syndrome*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2017.
6. Slutsky, A.S. and V.M. Ranieri, *Ventilator-induced lung injury*. *N Engl J Med*, 2013. **369**(22): p. 2126-36.
7. Slutsky, A.S., *History of Mechanical Ventilation. From Vesalius to Ventilator-induced Lung Injury*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2015. **191**(10): p. 1106-15.
8. *Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network*. *N Engl J Med*, 2000. **342**(18): p. 1301-8.
9. Koutsoukou, A., et al., *Expiratory flow limitation and intrinsic positive end-expiratory pressure at zero positive end-expiratory pressure in patients with adult respiratory distress syndrome*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000. **161**(5): p. 1590-6.
10. Kondili, E., et al., *Lung emptying in patients with acute respiratory distress syndrome: effects of positive end-expiratory pressure*. *Eur Respir J*, 2002. **19**(5): p. 811-9.
11. Vieillard-Baron, A., et al., *Pressure-volume curves in acute respiratory distress syndrome: clinical demonstration of the influence of expiratory flow limitation on the initial slope*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002. **165**(8): p. 1107-12.
12. Koutsoukou, A., et al., *Effects of positive end-expiratory pressure on gas exchange and expiratory flow limitation in adult respiratory distress syndrome*. *Crit Care Med*, 2002. **30**(9): p. 1941-9.
13. Vieillard-Baron, A. and F. Jardin, *The issue of dynamic hyperinflation in acute respiratory distress syndrome patients*. *Eur Respir J Suppl*, 2003. **42**: p. 43s-47s.
14. Vieillard-Baron, A., et al., *Increasing respiratory rate to improve CO<sub>2</sub> clearance during mechanical ventilation is not a panacea in acute respiratory failure*. *Crit Care Med*, 2002. **30**(7): p. 1407-12.

15. de Durante, G., et al., *ARDSNet lower tidal volume ventilatory strategy may generate intrinsic positive end-expiratory pressure in patients with acute respiratory distress syndrome*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002. **165**(9): p. 1271-4.
16. Jain, M. and J.I. Sznajder, *Bench-to-bedside review: distal airways in acute respiratory distress syndrome*. *Crit Care*, 2007. **11**(1): p. 206.
17. Morales, M.M., et al., *Small airway remodeling in acute respiratory distress syndrome: a study in autopsy lung tissue*. *Crit Care*, 2011. **15**(1): p. R4.
18. Black, J.L., J.K. Burgess, and P.R. Johnson, *Airway smooth muscle--its relationship to the extracellular matrix*. *Respir Physiol Neurobiol*, 2003. **137**(2-3): p. 339-46.
19. Burgess, J.K., et al., *Tissue and matrix influences on airway smooth muscle function*. *Pulm Pharmacol Ther*, 2009. **22**(5): p. 379-87.
20. Gonzalez-Lopez, A., et al., *Inflammation and matrix remodeling during repair of ventilator-induced lung injury*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2011. **301**(4): p. L500-9.
21. Pelaia, G., et al., *Molecular mechanisms underlying airway smooth muscle contraction and proliferation: implications for asthma*. *Respir Med*, 2008. **102**(8): p. 1173-81.
22. Simpson, D.L., et al., *Long-term follow-up and bronchial reactivity testing in survivors of the adult respiratory distress syndrome*. *Am Rev Respir Dis*, 1978. **117**(3): p. 449-54.
23. Held, H.D. and S. Uhlig, *Mechanisms of endotoxin-induced airway and pulmonary vascular hyperreactivity in mice*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000. **162**(4 Pt 1): p. 1547-52.
24. Morina, P., et al., *Effects of nebulized salbutamol on respiratory mechanics in adult respiratory distress syndrome*. *Intensive Care Med*, 1997. **23**(1): p. 58-64.
25. Cosio, B.G. and J. Rodriguez Rosado, *[Importance of the distal airway in COPD]*. *Arch Bronconeumol*, 2011. **47 Suppl 2**: p. 32-7.
26. Matute-Bello, G., C.W. Frevert, and T.R. Martin, *Animal models of acute lung injury*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008. **295**(3): p. L379-99.
27. Kuiper, J.W., et al., *High tidal volume mechanical ventilation-induced lung injury in rats is greater after acid instillation than after sepsis-induced acute lung injury, but does not increase systemic inflammation: an experimental study*. *BMC Anesthesiol*, 2011. **11**: p. 26.
28. Oliveira, W.R., et al., *Effects of prone and supine position on oxygenation and inflammatory mediator in a hydrochloric acid-induced lung dysfunction in rats*. *Acta Cir Bras*, 2008. **23**(5): p. 451-5.
29. Pawlik, M.T., et al., *Hydrochloric acid aspiration increases right ventricular systolic pressure in rats*. *Eur J Anaesthesiol*, 2009. **26**(4): p. 285-92.
30. Amigoni, M., et al., *Lung injury and recovery in a murine model of unilateral acid aspiration: functional, biochemical, and morphologic characterization*. *Anesthesiology*, 2008. **108**(6): p. 1037-46.
31. Felton, J.M., et al., *Thorax*.
32. Zhou, G.J., et al., *Evaluation of the inflammatory response in a two-hit acute lung injury model using [(18)F]FDG microPET*. *Exp Ther Med*, 2013. **6**(4): p. 894-898.
33. Aoki-Nagase, T., et al., *Calcitonin gene-related peptide mediates acid-induced lung injury in mice*. *Respirology*, 2007. **12**(6): p. 807-13.

34. Zambelli, V., et al., *Angiotensin-(1-7) improves oxygenation, while reducing cellular infiltrate and fibrosis in experimental Acute Respiratory Distress Syndrome*. Intensive Care Med Exp, 2015. **3**(1): p. 44.
35. Hashimoto, S., et al., *Expression of neutral endopeptidase activity during clinical and experimental acute lung injury*. Respir Res, 2010. **11**: p. 164.
36. Safdar, Z., et al., *Inhibition of acid-induced lung injury by hyperosmolar sucrose in rats*. Am J Respir Crit Care Med, 2005. **172**(8): p. 1002-7.
37. Ware, L.B. and M.A. Matthay, *The acute respiratory distress syndrome*. N Engl J Med, 2000. **342**(18): p. 1334-49.
38. Folkesson, H.G., et al., *Acid aspiration-induced lung injury in rabbits is mediated by interleukin-8-dependent mechanisms*. J Clin Invest, 1995. **96**(1): p. 107-16.
39. Raghavendran, K., et al., *Aspiration-Induced lung injury*. Critical care medicine, 2011. **39**(4): p. 818-826.
40. Cooper, P.R., *20-HETE Mediates Ozone-Induced, Neutrophil-Independent Airway Hyper-Responsiveness in Mice*. 2010. **5**(4).
41. Yang, Z., et al.,  *$\beta$ -Agonist-associated Reduction in RGS5 Expression Promotes Airway Smooth Muscle Hyper-responsiveness*. J Biol Chem, 2011. **286**(13): p. 11444-55.
42. Kim, H.J., et al., *Airway Smooth Muscle Sensitivity to Methacholine in Precision-Cut Lung Slices (PCLS) from Ovalbumin-induced Asthmatic Mice*. Korean J Physiol Pharmacol, 2015. **19**(1): p. 65-71.
43. Van Dijk, E.M., et al., *Elastase-Induced Parenchymal Disruption and Airway Hyper Responsiveness in Mouse Precision Cut Lung Slices: Toward an Ex vivo COPD Model*. Front Physiol, 2016. **7**: p. 657.
44. Singanayagam, A. and S.L. Johnston, *Smoke and viruses-a hindrance to relaxing the airways?* Clin Sci (Lond), 2016. **130**(10): p. 839-41.
45. Switalla, S., et al., *Natural innate cytokine response to immunomodulators and adjuvants in human precision-cut lung slices*. Toxicol Appl Pharmacol, 2010. **246**(3): p. 107-15.
46. Maihofer, N.A., et al., *Imatinib relaxes the pulmonary venous bed of guinea pigs*. Respir Res, 2017. **18**(1): p. 32.
47. Paranjpe, M., et al., *In vitro and ex vivo toxicological testing of sildenafil-loaded solid lipid nanoparticles*. Inhal Toxicol, 2013. **25**(9): p. 536-43.
48. Henjakovic, M., et al., *Ex vivo lung function measurements in precision-cut lung slices (PCLS) from chemical allergen-sensitized mice represent a suitable alternative to in vivo studies*. Toxicol Sci, 2008. **106**(2): p. 444-53.
49. Ressmeyer, A.R., et al., *Characterisation of guinea pig precision-cut lung slices: comparison with human tissues*. Eur Respir J, 2006. **28**(3): p. 603-11.
50. Pelosi, P. and P.R. Rocco, *Airway closure: the silent killer of peripheral airways*. Crit Care, 2007. **11**(1): p. 114.
51. Pelosi, P., P.R.M. Rocco, and M. Gama de Abreu, *Close down the lungs and keep them resting to minimize ventilator-induced lung injury*. Crit Care, 2018. **22**(1): p. 72.
52. Donovan, C., et al., *Rosiglitazone elicits in vitro relaxation in airways and precision cut lung slices from a mouse model of chronic allergic airways disease*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2015. **309**(10): p. L1219-28.