



## Original

## Modelo de cámara inhaladora para los estudios controlados sobre la toxicidad del humo del tabaco en los roedores

José Roberto Jardim<sup>a,\*</sup>, Luciana Bizeto<sup>b</sup>, Anamaria Fleig Mayer<sup>c</sup>, Aquiles Camelier<sup>d</sup>, Fernanda Warken Rosa<sup>e</sup>, Daniele Oliveira<sup>f</sup>, Daiane Azevedo<sup>f</sup>, Paulo Hilário Saldiva<sup>e</sup>, Milton de Arruda Martins<sup>g,f</sup>, Jorge Bonassa<sup>h</sup> y Oliver A. Nascimento<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Respiratory Division and Pulmonary Rehabilitation Center, Universidade Federal de São Paulo (Unifesp)/Lar Escola São Francisco (Lesf), Brasil

<sup>b</sup> Experimental Laboratory of Physiopathology, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brasil

<sup>c</sup> Physiotherapy Department, Universidade do Estado de Santa Catarina, Brasil

<sup>d</sup> Respiratory Division, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil

<sup>e</sup> Faculdade de Tecnologia e Ciências, Universidade Católica do Salvador, Universidade Estadual da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil

<sup>f</sup> Department of Pathology, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brasil

<sup>g</sup> Department of Medicine, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brasil

<sup>h</sup> Intermed Equipamento Médico Hospitalar Ltda, Brasil

## INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

*Historia del artículo:*

Recibido el 27 de febrero de 2008

Aceptado el 8 de mayo de 2010

On-line el 10 de julio de 2010

*Palabras clave:*

Cámara inhaladora

Tabaco

Ratas

Gases tóxicos

Contaminantes ambientales

## RESUMEN

**Introducción:** El tabaquismo constituye un grave problema de salud pública en todo el mundo. Los modelos animales actúan como un paso intermedio entre los estudios de laboratorio y los estudios en seres humanos. Los modelos aplicados son difíciles de reproducir debido al uso de diferentes tipos de cámaras inhaladoras y principalmente por la falta de una monitorización constante de la concentración del humo del tabaco.

**Objetivo:** Desarrollar una cámara inhaladora para ratas (con la exposición exclusiva del hocico) en la que pueda mantenerse y monitorizarse constantemente la cantidad de monóxido de carbono (CO).

**Material y métodos:** Se expusieron ratas Wistar macho, de 250 g de peso, a 50 partes por millón de CO producido por el humo del tabaco de un cigarrillo sin filtro. Los animales se sometieron a una exposición de 2 h y, acto seguido, fueron sacrificados a las 0, a las 4, a las 24 y a las 48 h. El grupo de control se dejó libre dentro de pequeñas cámaras perpendiculares y solo recibió 5 l/min de aire comprimido.

**Resultados:** El modelo fue capaz de aumentar la concentración de carboxihemoglobina inmediatamente después del término de la exposición ( $p < 0,001$ ), observándose una disminución desde las 2 h en adelante comparado con la concentración del grupo de control. La concentración plasmática de cotinina aumentó inmediatamente después de la exposición y todavía se detectó a las 2 y a las 4 h ( $p < 0,05$ ).

**Conclusión:** Concluimos que este sistema de cámara inhaladora puede mantener una concentración controlada de CO en un modelo en el que se expone a pequeños animales a la inhalación de humo de cigarrillos, lo que permite estudios adecuadamente controlados, al igual que investigaciones sobre otros gases tóxicos y contaminantes ambientales.

© 2008 SEPAR. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

## An Inhalation Chamber Model for Controlled Studies of Tobacco Smoke Toxicity in Rodents

## ABSTRACT

**Introduction:** Smoking is a serious worldwide public health problem. Animal models act as a bridge between laboratory and human studies. The models applied are difficult to reproduce because of the use of different types of inhalation chambers and mainly because of the lack of continuous monitoring of smoke concentration.

**Objective:** To develop an inhalation chamber for rats (with only the nose exposed) in which the amount of carbon monoxide (CO) can be maintained and monitored constantly.

**Material and methods:** Male Wistar rats weighing 250 g were exposed to 50 ppm CO produced by the smoke from a filter-free cigarette. The animals were submitted to a single 2-h exposure and then sacrificed

*Keywords:*

Inhalation chamber

Tobacco

Rats

Pollutants

Environmental exposure

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: josejardim@yahoo.com.br (J.R. Jardim).

at 0, 4, 24 and 48 h. The control group was left restrained inside the small perpendicular chambers, receiving only 5 L/min of compressed air.

**Results:** The model was able to increase HbCO levels immediately after the end of exposure ( $p < 0.001$ ), with a decrease being observed from 2 h onwards when compared to the levels of the control group. Plasma cotinine increased immediately after exposure, and showed still detectable levels at 2 and 4 h ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** We conclude that the presented inhalation chamber system is able to maintain a controlled CO concentration in a model in which small animals are exposed to the inhalation of cigarette smoke, permitting well-controlled studies, as well as investigations involving other toxic gases and air pollutants.

© 2008 SEPAR. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

## Introducción

El tabaquismo constituye un problema grave de salud pública en todo el mundo. En Brasil se estima que es la causa principal de mortalidad de unos 200.000 individuos al año. La enfermedad pulmonar obstructiva crónica es un proceso sistémico cuya fisiopatología no es bien conocida, siendo su principal desencadenante el tabaquismo<sup>1,2</sup>.

Los modelos animales actúan como un paso intermedio entre los estudios de laboratorio y los efectuados en seres humanos<sup>3</sup>. Los estudios publicados sobre los modelos animales de inflamación y enfisema pulmonar debidos a intoxicación por el humo de los cigarrillos siguen siendo limitados<sup>4</sup>. Los modelos aplicados son difíciles de reproducir porque se usan diferentes tipos de cámaras inhaladoras y principalmente debido a la falta de una monitorización constante de la concentración del humo de los cigarrillos. En el presente estudio desarrollamos una cámara inhaladora para ratas (con la exposición exclusiva del hocico), en la que pudo mantenerse y monitorizarse constantemente la cantidad de monóxido de carbono (CO).

Para validar la cámara se analizaron dos parámetros, la carboxihemoglobina (HbCO) y la cotinina. El CO se une en su mayor parte a la hemoglobina, produciendo HbCO, cuya afinidad por la hemoglobina es 220 veces mayor que la del oxígeno. La nicotina presente en el humo de los cigarrillos es metabolizada en el hígado, produciendo cotinina, que es detectable en el plasma utilizando diferentes técnicas<sup>5</sup>. La enzima responsable de su metabolismo es la isoenzima 2A6 del sistema del citocromo P450<sup>6</sup>.

El objetivo de la presente investigación fue desarrollar una cámara inhaladora para el estudio de las enfermedades relacionadas con el tabaquismo y la contaminación ambiental, en la que pudo mantenerse constante la concentración del humo de los cigarrillos según lo monitorizado en función de la concentración de CO y en la que las ratas pudieron exponerse de manera uniforme a cantidades conocidas y controladas de CO.

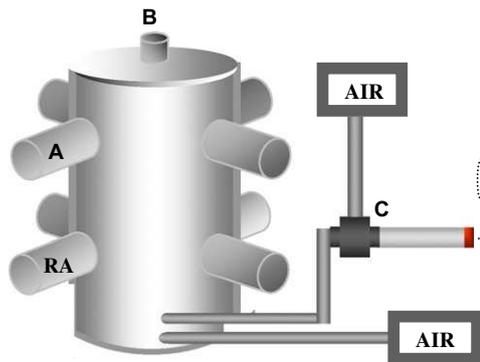
## Material y métodos

El estudio fue aprobado por el comité de investigación de la Universidad de São Paulo. Cámara inhaladora: se diseñó una cámara de material acrílico, cilíndrica, de 30 cm de diámetro y 50 cm de altura (fig. 1), cuya capacidad total era de 35,31, para la exposición de los roedores a los gases tóxicos. Se insertaron ocho cámaras perpendiculares pequeñas en el cuerpo de la cámara que contenía las ratas (6 × 25 cm), conteniendo cada cámara un émbolo interno para confinar a los animales. Se introdujo un orificio de 1 cm de diámetro entre el cuerpo de la cámara y cada cámara individual, de modo que solo se expuso el hocico del animal a la cámara principal. Dicho sistema estaba equipado con una válvula Venturi tridireccional (Intermed, Brasil). En la porción aferente de la válvula (parte generadora de flujo) se conectó aire comprimido con un caudalímetro de alta sensibilidad de hasta 1 l/min, con una tasa de flujo que varió desde 50–100 ml/min; en la porción lateral se introdujo un cigarrillo encendido sin filtro (aspiración de aire) y con la parte eferente se conectó una extensión que alcanzaba el orificio

de la parte lateral e inferior de la cámara principal (porción propulsiva). Este sistema permite la aspiración del humo de los cigarrillos y su conducción hasta la cámara principal. Se inyectó una cantidad adicional de aire comprimido en la cámara a través de otro caudalímetro de baja sensibilidad de hasta 15 l/min, con una tasa de flujo de 5 l/min, para mantener la concentración deseada de CO. Dentro de la cámara se introdujo un mezclador de aire para la homogeneización del aire comprimido y el humo del cigarrillo con el objetivo de mantener una concentración homogénea del humo dentro de la cámara. La concentración de CO, documentada como partes por millón (ppm), se monitorizó con un cooxímetro (Toxi-Biosystems™, Estados Unidos) que se introdujo en la cámara principal. El humo se produjo constantemente y se expelió a través del borde superior de la cámara principal en el medio.

«Exposición de los animales al humo de los cigarrillos». Se expuso a ratas Wistar macho, cuyo peso era de 250 g, al humo del cigarrillo o al aire comprimido. En el grupo expuesto al humo del cigarrillo la concentración objetivo de CO era de 50 ppm. Para estandarizar la exposición de los animales, todas se efectuaron con la misma marca de cigarrillo. Cada cigarrillo usado contiene 0,8 mg de nicotina, 10 mg de alquitrán y 10 mg de CO. Los animales se sometieron a una exposición de 2 h y, acto seguido, fueron sacrificados a las 0, a las 4, a las 24 y a las 48 h. El grupo de control se dejó libre en el interior de pequeñas cámaras perpendiculares y solo recibió 5 l/min de aire comprimido.

«Sacrificio de los animales y obtención de las muestras sanguíneas». Después de completar la exposición en los tiempos predeterminados se sacrificó a los animales mediante técnicas estándar de acuerdo con la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Academy Press, 1996, Washington, D.C.). Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital (30 mg/kg) por vía intraperitoneal de modo que se indujo una anestesia profunda sin depresión respiratoria. Los animales se colocaron en decúbito dorsal horizontal con las patas extendidas mediante fijación con hilo hasta su sacrificio por hemorragia mediante punción de la aorta abdominal para la obtención de sangre a través de una laparotomía. Las muestras de sangre se almacenaron en dos tipos de tubos, uno con anticoagulante y el otro sin



**Figura 1.** Cámara. A) Cilindros individuales para la colocación de los animales. B) Salida del humo del cigarrillo. C) Válvula de Venturi.

anticoagulante. Las muestras usadas para la determinación de cotinina se almacenaron congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

«Determinación de HbCO». La concentración de HbCO se determinó por espectrometría diferencial en la región variable según lo descrito por Beutler y por West<sup>7</sup>. Las muestras sanguíneas heparinizadas se almacenaron en un frigorífico hasta el análisis.

«Determinación de la cotinina». La cotinina plasmática se determinó por duplicado mediante radioinmunoanálisis usando un anticuerpo de acuerdo con el método de Langone<sup>8</sup>. La reactividad cruzada del anticuerpo anticotinina con otros metabolitos de la nicotina fue inferior al 5%. La variación detectable en la curva de nicotina fue de 0,2–20 ng/ml con un coeficiente de variación del 6–10%. Las muestras sanguíneas se mantuvieron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta el análisis.

«Análisis estadístico». Los resultados se documentan como media  $\pm$  error estándar de la media. Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron mediante el análisis de la varianza (ANCOVA) y se efectuó un análisis *posthoc* utilizando la prueba de Dunnet de comparaciones múltiples frente al grupo de control. Se consideró significativo un valor de  $p < 0,05$ .

## Resultados

Los animales permanecieron alojados y relajados en las cámaras individuales durante todo el experimento, no mostrando signos de estrés.

El presente modelo de exposición se probó en 20 ratas y los resultados se compararon con cuatro ratas de control. El modelo aumentó la concentración de HbCO inmediatamente después del término de la exposición ( $p < 0,001$ ), observándose una disminución desde las 2 h en adelante, en comparación con la concentración en el grupo de control. La cotinina plasmática aumentó inmediatamente después de la exposición, demostrándose concentraciones detectables a las 2 y a las 4 h ( $p < 0,05$ ) y disminuyendo a partir de ese momento (tabla 1). Durante el tiempo de exposición se usaron 4–6 cigarrillos para mantener estable la concentración de CO.

## Discusión

En los estudios publicados se han descrito diferentes sistemas de cámaras inhaladoras como modelos de exposición al humo de los cigarrillos, como cámaras cilíndricas<sup>9</sup> o cuadradas<sup>10</sup>, pero no todos los estudios describen la forma de la cámara utilizada. Algunos investigadores hacen referencia a la exposición como un método de exposición exclusiva del hocico, pero no describen detalles adicionales<sup>11,12</sup>.

**Tabla 1**

Determinaciones de la concentración plasmática de carboxihemoglobina y de cotinina en diferentes momentos en las ratas expuestas al humo de cigarrillos durante 2 h ( $n=4$  en cada grupo)

	HbCO (%)	Cotinina (ng/ml)
Control	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
0 h	3 $\pm$ 0*	17 $\pm$ 1,9**
2 h	0 $\pm$ 0	12 $\pm$ 4,5**
4 h	0,25 $\pm$ 0,25	12,7 $\pm$ 2,7**
24 h	0 $\pm$ 0	0,25 $\pm$ 0,25
48 h	0,25 $\pm$ 0,25	0,75 $\pm$ 0,47

HbCO: carboxihemoglobina.

Los valores se expresan como media  $\pm$  error estándar.

\*  $p < 0,05$ .

\*\*  $p < 0,001$ , grupo de control frente al grupo expuesto.

La cámara que describimos tiene una forma cilíndrica de modo que los animales pudieron exponerse al humo de la forma más homogénea posible, con cámaras transparentes individuales para las ratas de modo que pudieron visualizarse durante toda la exposición. Los diferentes estudios han descrito cámaras de forma rectangular, alojando a los animales en el interior de la cámara como grupo durante la exposición. Normalmente, estos animales tienen tendencia a formar grupos y pueden permanecer unos sobre los otros, por lo que no reciben la misma cantidad de humo. Además, otro problema de este tipo de exposición es el depósito de productos derivados del tabaco en la piel del animal. Cuando se lamen los animales ingieren los componentes de los cigarrillos y modifican la exposición. En un estudio previo nuestro grupo de investigación utilizó un modelo en el que todas las ratas permanecieron en la misma cámara y se observaron muchos inconvenientes de dicho modelo<sup>10</sup>. En la presente investigación los animales se alojaron fuera del cuerpo de la cámara principal en una acomodación individual, de tal modo que solo el hocico se expuso al humo del cigarrillo. Dentro de la cámara se adaptó un ventilador para permitir que la mezcla humo-aire fuera lo más homogénea posible.

Con respecto a la generación del humo, los diversos estudios publicados usaron un número fijo de cigarrillos por exposición<sup>10,11,13,14</sup>, otros determinaron el volumen (ml) del flujo del humo expelido en la cámara y su duración en segundos<sup>9,11,13,15–17</sup> o la cantidad (mg) y diámetro ( $\mu\text{m}$ ) de las partículas generadas<sup>11,12,15,16</sup> y, por último, algunos investigadores determinaron la cantidad de CO liberado en determinados tiempos, pero no de modo continuo<sup>12,16</sup>.

Consideramos que un modelo que genere una concentración constante de CO es el método más eficiente para exponer a los animales al humo de los cigarrillos, puesto que permite el mantenimiento de la misma concentración durante toda la exposición. Durante el período de exposición usamos 8–12 cigarrillos para mantener una concentración de CO de 50 ppm. Esta variación se debió a la introducción del humo del cigarrillo en la cámara. Por lo tanto, para estandarizar la exposición al humo monitorizamos la concentración de CO durante toda la exposición. En un estudio preliminar observamos que, durante su combustión, un cigarrillo produce diferentes concentraciones de CO: es más baja al principio de la combustión del cigarrillo y aumenta bruscamente hacia el final (datos no mostrados). Para mantener la misma concentración de CO durante todo el experimento examinamos diversos tipos de bombas, aunque sin resultado práctico. Por último, se desarrolló una válvula de Venturi que, conectada con un tanque de aire sintético y controlada por un caudalímetro de alta sensibilidad, pudo mantener un flujo constante del humo del cigarrillo. Se consiguió el mantenimiento de una aeración adecuada y de la concentración de CO dentro de la cámara principal con un flujo variable de aire sintético a través de un caudalímetro de 15 l/min. Para homogeneizar el humo se usó un ventilador dentro de la cámara. Dentro de la cámara se introdujo un cooxímetro, lo que permitió la determinación constante de CO.

En general, la cámara no conserva el olor del humo pero, en el caso de esta eventualidad, el material acrílico que la compone puede limpiarse con facilidad con detergente y agua. No obstante, los técnicos han de tener en cuenta que el uso de productos que contienen éter, acetona o sustancias abrasivas puede afectar a este material acrílico.

El aumento de la concentración de HbCO observada en los animales sacrificados 2 h después de la exposición y su disminución posterior nos permite concluir que las ratas inhalaban el humo del cigarrillo. El objetivo del experimento fue producir un modelo que mimetizara la concentración de HbCO durante la vida diaria de un fumador sin alcanzar valores tóxicos. La concentración

elevada de HbCO puede causar la muerte en las ratas debido a la hipoxemia. Además, este modelo de doble flujo permite establecer cualquier concentración de CO en la cámara de exposición tan solo variando la tasa de flujo del caudalímetro de alta sensibilidad y ajustándola a la del caudalímetro de baja sensibilidad. El uso de otro marcador, la concentración plasmática de cotinina, respalda claramente la información de que las ratas habían inhalado el humo del cigarrillo.

La investigación básica con modelos animales puede determinar los mecanismos de las enfermedades, en particular la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, y, en este caso, el humo de los cigarrillos puede contribuir a una mayor comprensión de su fisiopatología. El presente modelo de cámara inhaladora nos permite emprender estudios de dosis-respuesta que podrán dar lugar a conocimientos más precisos de estos fenómenos inflamatorios. Examinamos la estabilidad de concentraciones de CO de hasta 500 ppm durante el mismo período de tiempo (2 h) (datos no mostrados). Para alcanzar estas concentraciones elevadas solo tuvimos que incrementar el flujo de aire a través de la válvula Venturi.

Concluimos que el presente sistema de cámara inhaladora puede mantener una concentración controlada de CO en un modelo en el que se expone a pequeños animales a la inhalación del humo de cigarrillos, lo que permite efectuar estudios adecuadamente controlados, al igual que investigaciones sobre otros gases tóxicos y contaminantes ambientales.

#### Conflicto de intereses

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX).

#### Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento a Mauricio Levi-Orozco (Hospital del Mar, Barcelona, España), a Carlos Colonell (Hospital del Mar, Barcelona, España) y a Simona Pichini (Laboratorio Di Biochimica Clinica, Istituto Superiore Di Sanità, Roma, Italia) por su ayuda experta y sus contribuciones al estudio.

#### Bibliografía

1. Barbera JA, Peces-Barba G, Agustí AG, Izquierdo JL, Monsó E, Montemayor T, et al. Clinical guidelines for the diagnosis and treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Arch Bronconeumol.* 2001;37:297-316.
2. Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA, Calverley P, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;176:532-55.
3. Reid LM. Needs for animal models of human diseases of the respiratory system. *Am J Pathol.* 1980;101:S89-101.
4. Mahadeva R, Shapiro SD. Chronic obstructive pulmonary disease\* 3: Experimental animal models of pulmonary emphysema. *Thorax.* 2002;57:908-14.
5. Nakajima M, Yamamoto T, Kuroiwa Y, Yokoi T. Improved highly sensitive method for determination of nicotine and cotinine in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2000;742:211-5.
6. Nakajima M, Yamamoto T, Nunoya K, Yokoi T, Nagashima K, Inoue K, et al. Role of human cytochrome P4502A6 in C-oxidation of nicotine. *Drug Metab Dispos.* 1996;24:1212-7.
7. Beutler E, West C. Simplified determination of carboxyhemoglobin. *Clin Chem.* 1984;30:871-4.
8. Langone JJ. Applications of immobilized protein A in immunochemical techniques. *J Immunol Methods.* 1982;55:277-96.
9. Clark GC. Comparison of the inhalation toxicity of kretek (clove cigarette) smoke with that of American cigarette smoke. II. Fourteen days, exposure. *Arch Toxicol.* 1990;64:515-21.
10. Cendon SP, Battlehner C, Lorenzi Filho G, Dohnnikoff M, Pereira PM, Conceição GM, et al. Pulmonary emphysema induced by passive smoking: An experimental study in rats. *Braz J Med Biol Res.* 1997;30:1241-7.
11. Bilimoria MH, Ecobichon DJ. The induction of rat lung aryl hydrocarbon hydroxylase by diluted smoke from commercial cigarettes. *Toxicology.* 1981;22:205-10.
12. Coggins CR, Ayres PH, Mosberg AT, Ogden MW, Sagartz JW, Hayes AW. Fourteen-day inhalation study in rats, using aged and diluted sidestream smoke from a reference cigarette. I. Inhalation toxicology and histopathology. *Fundam Appl Toxicol.* 1992;19:133-40.
13. Bilimoria MH, Ecobichon DJ. Responses of rodent hepatic, renal and pulmonary aryl hydrocarbon hydroxylase following exposure to cigarette smoke. *Toxicology.* 1980;15:83-9.
14. Ofulue AF, Ko M, Abboud RT. Time course of neutrophil and macrophage elastolytic activities in cigarette smoke-induced emphysema. *Am J Physiol.* 1998;275:L1134-44.
15. Diamond L, Kimmel EC, Lai YL, Winsett DW. Augmentation of elastase-induced emphysema by cigarette smoke. Effects of reduced nicotine content. *Am Rev Respir Dis.* 1988;138:1201-6.
16. Haussmann HJ, Anskeit E, Becker D, Kuhl P, Stinn W, Teredesai A, et al. Comparison of fresh and room-aged cigarette sidestream smoke in a subchronic inhalation study on rats. *Toxicol Sci.* 1998;41:100-16.
17. Xu LJ, Dandurand RJ, Lei M, Eidelman DH. Airway hyperresponsiveness in cigarette smoke-exposed rats. *Lung.* 1993;171:95-107.