



# Reclutamiento alveolar por insuflación transpulmonar a alta presión. Estudio morfométrico experimental

J.D. Escolar Castellón, C. Tejero Juste, M.A. Escolar Castellón y B. Gallego Carrión\*

Departamento de Ciencias Morfológicas. Universidad de Zaragoza. \*Servicio de Neumología. Hospital Miguel Servet. Zaragoza.

Se presenta un estudio experimental en el que se cuestionan, utilizando técnicas morfométricas, los conceptos tradicionales sobre el comportamiento del alveolo ante los cambios de presión.

El incremento de la presión de insuflación pulmonar produce reclutamiento alveolar (aumento en el número de los espacios aéreos distales) por desplegamiento de sus paredes.

Para demostrar la hipótesis se han perfundido pulmones de rata a 25 y 35 cm de presión de agua. Los perfundidos a mayor presión deberán presentar: disminución del tamaño de los alveolos, con adelgazamiento de sus paredes, aumento del perímetro alveolar interno, sin que varíe la cantidad de tejido. El estudio ha sido morfométrico, realizado en un sistema informático. Los resultados se han contrastado con tests estadísticos.

Se han utilizado 10 ratas Wistar. Sus pulmones se procesaron para microscopía de luz. Se cuantificaron las siguientes variables: índice de intersección lineal media (Lm), cuerda alveolar, grosor de pared, perímetro alveolar interno y porcentaje de tejido.

La disminución del Lm en los pulmones perfundidos a 35 cm de presión de agua, nos hace considerar que el número de alveolos aumentó; la disminución del Lm y de la cuerda alveolar indican reducción del tamaño de los alveolos; la pared alveolar disminuyó de grosor; el perímetro alveolar interno aumentó. Todas estas diferencias fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,001$ ), siendo el porcentaje de tejido la única variable que no sufrió variación significativa.

Todos estos resultados nos hacen considerar que el aumento de la presión de insuflación pulmonar produce reclutamiento alveolar por desplegamiento de sus paredes.

*Arch Bronconeumol 1994; 30:202-206*

Alveolar recruitment during inflation at high transpulmonary pressure: An experimental morphometric study

We describe an experimental study in which morphometric techniques are used to question traditional conceptions about the behavior of the alveolus under changes in pressure.

An increase in inflation pressure in the lung results in alveolar recruitment (an increase in distal air spaces) due to stretching of its walls.

To test this hypothesis, the lungs of rats were filled to 25 to 35 cm water pressure. Lungs filled to a higher pressure were expected to present a decrease in alveolar size along with thinning of its walls, and an increase of internal perimeter of the alveolus with no change in amount of tissue. Morphometric data were processed by computer and results were analyzed by statistical tests.

The lungs of 10 Wistar rats were examined under light microscope. The following variables were recorded: mean linear intersection (Lm), alveolar cord, wall thickness, internal alveolar perimeter and tissue percentage.

Lower Lm in lungs filled to 35 cm water pressure allows us to consider that the number of alveoli increased; lower Lm and alveolar cord indicate that alveolar size is smaller; alveolar wall thickness decreased; internal alveolar perimeter increased. All these differences were statistically significant ( $p < 0,001$ ), tissue percentage being the only variable that did not change significantly.

All results lead us to consider that an increase in lung inflation pressure leads to alveolar recruitment and stretching of its walls.

## Introducción

El pulmón es una víscera elástica que varía su forma continuamente con los movimientos respiratorios. Estas variaciones de la forma son producidas por

cambios de presión intratorácica. Se asume intuitivamente que en la inspiración y espiración los alveolos se comportan como un balón durante el inflado y desinflado. Lum et al<sup>1</sup> insuflaron por vía traqueal pulmones de gerbo a 30 cm de presión de agua durante 10 minutos, y se observaron que los alveolos eran más pequeños que los de los pulmones fijados a 25 cm de presión. Estos resultados aparentemente contradictorios con lo aceptado hasta ahora, concuerdan con los obtenidos 7 años antes por Smaldone et al<sup>2</sup> quienes, tras insuflar pulmones de perro con un aerosol

Correspondencia: Dr. J.D. Escolar Castellón.  
Departamento de Ciencias Morfológicas. Facultad de Medicina.  
Domingo Miral, s/n. 50008 Zaragoza.

Este trabajo se ha realizado con la ayuda del Fondo de Investigaciones sanitarias del Ministerio de Sanidad y Consumo Español n.º 92/0564.

Recibido: 26-4-93; aceptado para su publicación: 31-8-93.

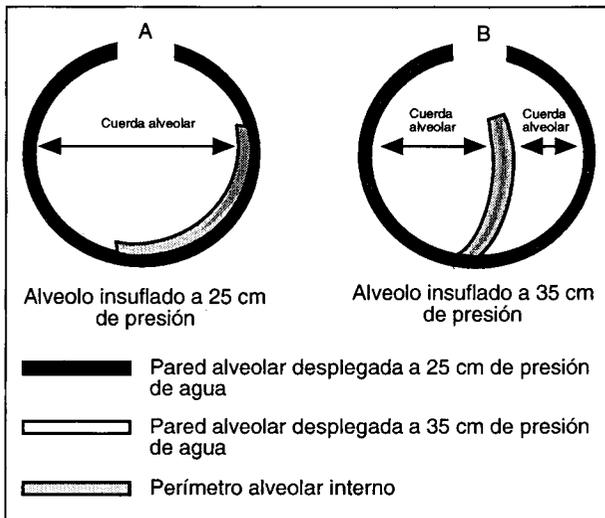
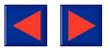


Fig. 1. Representación esquemática de la hipótesis de trabajo. Se muestra un modelo de cavidad aérea distal en dos momentos diferentes: A) con insuflación a 25 cm de presión de agua, en el que una pared central está plegada sobre otra lateral. B) Con insuflación a 35 cm de presión, en el que la pared central se despliega, disminuyendo entonces el tamaño de la cuerda alveolar y del grosor de pared y aumentando el perímetro alveolar interno, sin que la cantidad de tejido experimente modificación.

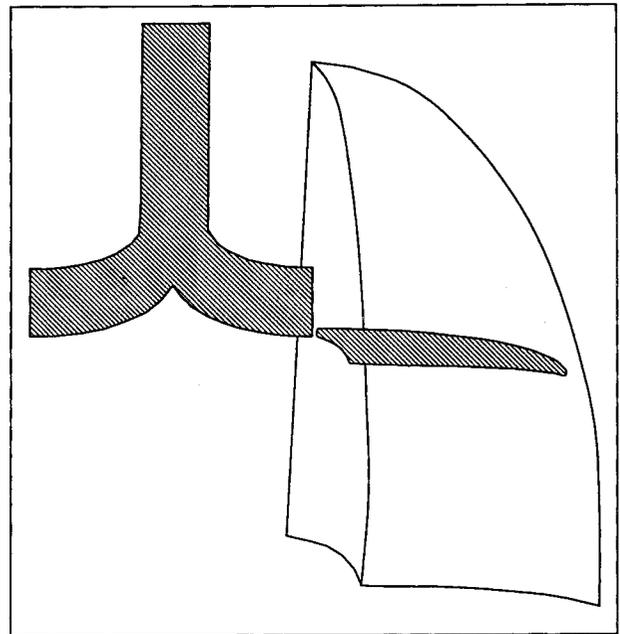


Fig. 2. Representación esquemática de la zona de elección del corte histológico estudiado.

monodisperso, concluyeron que el aumento de la presión de insuflación incrementa el número de alveolos, esto es, se produce un reclutamiento alveolar. Lum et al<sup>1</sup> proponen que el reclutamiento alveolar producido por el aumento de presión de insuflación es consecuencia de un desplegamiento de paredes que con menores presiones permanecerían cerradas.

La propuesta de Lum et al<sup>1</sup> considera que un pulmón insuflado con presión superior de 25 cm de agua deberá presentar: reclutamiento alveolar y menor tamaño de los espacios aéreos distales, como consecuencia del desplegamiento de paredes. Para demostrar esta hipótesis nosotros proponemos que el desplegamiento de paredes condicionará un menor grosor de las mismas, con aumento del perímetro alveolar interno; todas estas modificaciones se producirán sin que varíe la cantidad de tejido alveolointerstitial del pulmón (fig. 1). El presente estudio tiene como objetivos: 1) confirmar los hallazgos de Lum et al<sup>1</sup> y Smaldone et al<sup>2</sup>, y 2) demostrar morfométricamente la hipótesis de Lum, el reclutamiento alveolar se produce por desplegamiento de paredes alveolares.

## Material y métodos

Se han utilizado 10 ratas blancas, de 4 meses de edad, pertenecientes todas a la misma camada, hembras y machos indistintamente, libres de enfermedad.

### Sacrificio

Los animales fueron anestesiados con pentotal sódico por vía intraperitoneal (0,01 mg/100 g peso). Mediante dos incisiones de toracotomía medioclaviculares, se retiró el peto costal. Al quedar al descubierto el contenido de la caja torácica, se pudo realizar el lavado de sangre de los pulmones profundiendo por el ventrículo derecho suero fisiológico.

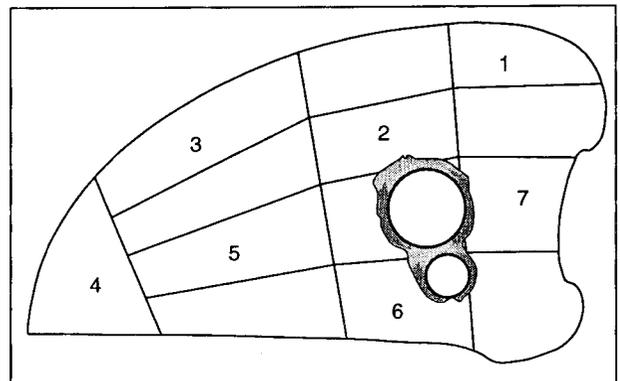


Fig. 3. Representación esquemática de las 13 zonas en las que se dividió el corte; se estudiaron las siete numeradas.

### Procesado histológico

Los pulmones fueron extraídos de la cavidad torácica y se fijaron con formalina al 10% durante 48 horas; la posfijación se realizó en el mismo fijador durante 20 días. El protocolo de fijación dividió a los animales en 2 grupos:

1. Grupo de referencia, 5 animales cuyos pulmones se fijaron a 25 cm de presión de agua.
2. Cinco animales cuyos pulmones se fijaron a una presión de 35 cm de agua.

Se calculó el volumen pulmonar mediante desplazamiento de volumen de agua.

El bloque de tejido elegido para el estudio era perpendicular al eje mayor del pulmón izquierdo, inmediatamente inferior al bronquio principal cuando se hace intraparenquimatoso (fig. 2). Los bloques, deshidratados por pases sucesivos en alcoholes de grado creciente, se incluyeron en parafina y se pudieron realizar cortes de 5  $\mu$ m de grosor, que se contrastaron con azul de metileno.

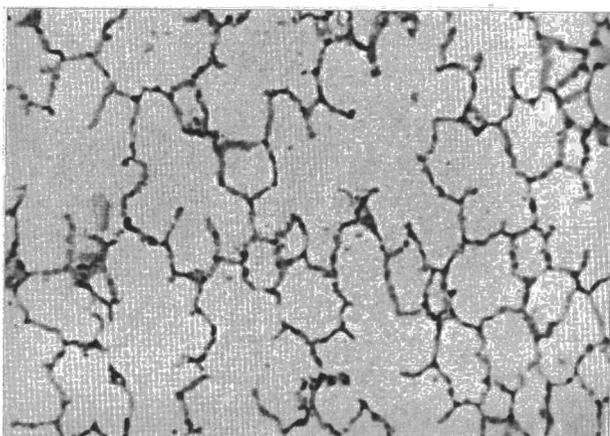


Fig. 4. Imagen histológica teñida con azul de metileno y capturada en 16 tonos de grises.

#### Estudio morfométrico

Consta de tres fases, captura, tratamiento y cuantificación.

**Captura.** Según metodología ya descrita<sup>3</sup>, los cortes se dividieron en 13 zonas de las que se eligieron siempre siete, sobre cada una de las cuales se tomó un campo al azar

(fig. 3), que no tuviera vaso ni vía aérea importante. Mediante una cámara de vídeo (Hitachi KP-110<sup>®</sup>) adaptada a un microscopio (Nikon<sup>®</sup>), la imagen histológica ( $\times 100$ ) fue capturada (Digi-View<sup>®</sup>) por un ordenador (Amiga 500<sup>®</sup>) con 2 megas de memoria RAM y un disco duro de 40 megas), en 16 tonos de grises (fig. 4).

**Tratamiento.** Se utilizó un programa desarrollado por nuestro grupo de investigación, y el mismo ordenador que en la fase de captura. Mediante la opción "umbral", la imagen capturada fue transformada en otra de dos colores<sup>4</sup> (fig. 5, blanco-aire, negro-tejido). El filtro de la "mediana" suprimía el ruido de fondo<sup>4</sup> (fig. 5). Las células aisladas en la luz alveolar, así como los posibles defectos del tejido eran eliminados con un filtro de "manchas", que suprimía las imágenes menores de 200  $\mu\text{m}$  rodeadas completamente por el color opuesto<sup>4</sup> (fig. 5).

**Cuantificación.** En la imagen resultante se cuantificaron las siguientes variables:

1. Porcentaje de tejido: porcentaje de color negro respecto al total de la imagen (fig. 5).
2. Perímetro alveolar interno: longitud en  $\mu\text{m}$  de la interfase color negro color blanco (figs. 1 y 5).
3. Cuerda alveolar (Ca): longitud en  $\mu\text{m}$  de la distancia, existente entre 2 paredes de un mismo alveolo (fig. 1).
4. Grosor de la pared en  $\mu\text{m}$  (Gp).

Para la determinación de estas dos últimas variables el ordenador trazaba aleatoriamente 30 rectas paralelas equi-

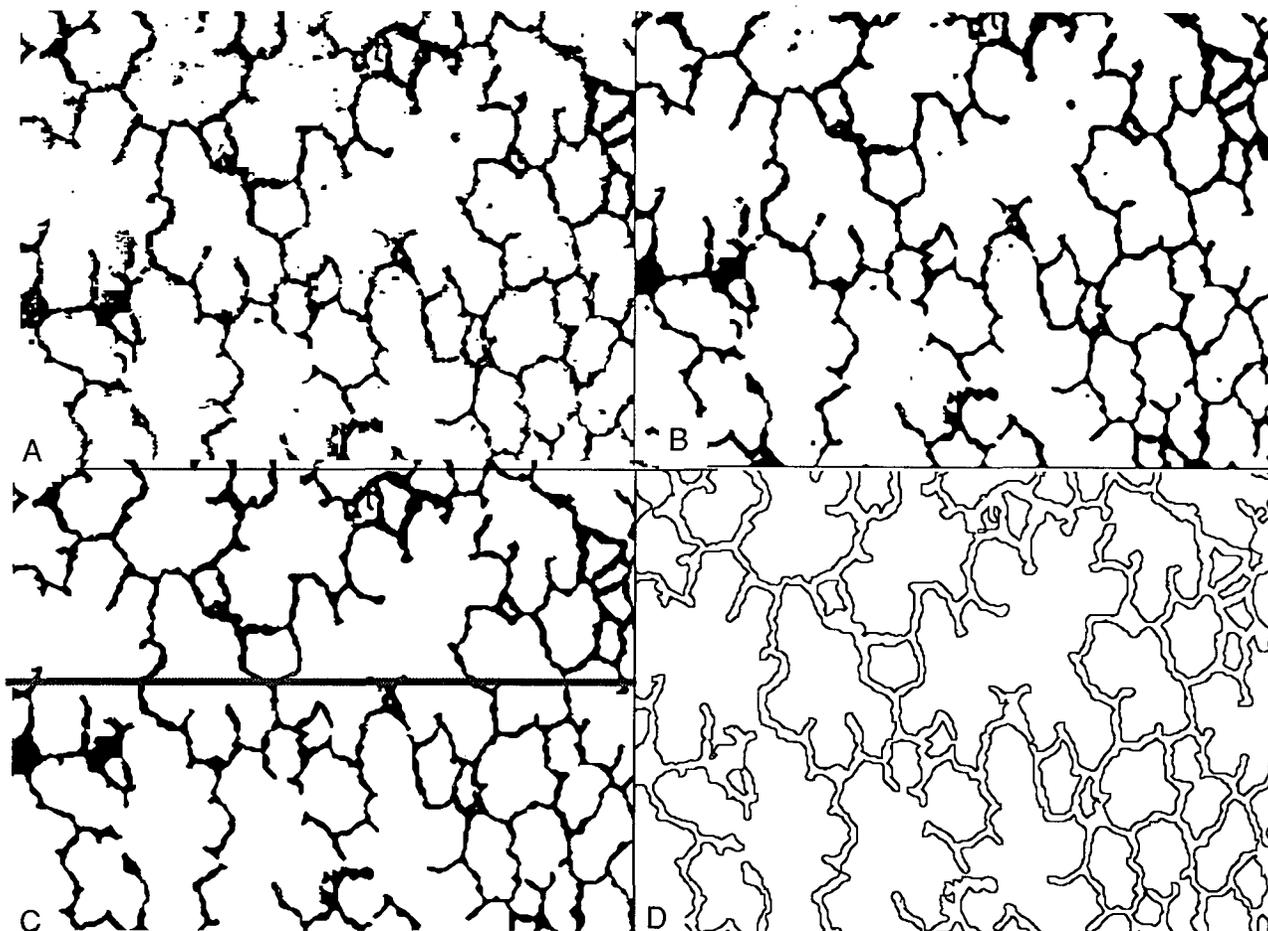
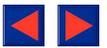


Fig. 5. Secuencia de transformación de la figura 4. A) Transformación en dos colores, opción umbral. B) Supresión del ruido de fondo, opción filtro de mediana. C) Supresión de células en la luz alveolar y otros defectos, por la opción filtro de manchas; la línea recta de la figura representa la forma en la que se cuantificaron la cuerda alveolar y el grosor de pared. D) Medición del perímetro alveolar interno.



distantes, realizando las medidas según el criterio de Lum et al<sup>1</sup>.

Índice de intersección lineal media (Lm) se obtuvo desarrollando la fórmula inicial<sup>5</sup> según el siguiente razonamiento:

$Lm = \Sigma L/n$ ;  $Lm = (\Sigma Ca + \Sigma Gp)/n$ ;  $Lm = XCa + XGp$ ; donde  $\Sigma L$  es la longitud total de las líneas medidas y  $n$ , el número de mediciones.

El programa utilizado para la cuantificación fue diseñado por nosotros.

#### Estudio estadístico

Se presentan las medias  $\pm$  una desviación normal. Se realizó estudio de morfología de la curva de dispersión, índices de Kurtosis y Skewness. Cuando los valores obtenidos se acercaban a la distribución normal se compararon con el test de la *t* de Student y si no, se compararon con el test de la *U* de Mann-Whitney. Se consideraron diferencias significativas un valor de  $p < 0,05$ . El estudio estadístico se realizó en un ordenador Macintosh II cx<sup>®</sup> con un programa StatView<sup>®</sup>.

#### Resultados

No se apreciaron diferencias significativas entre los tamaños de los pulmones de los 2 grupos utilizados.

La cuantificación de los resultados de las variables morfométricas (tabla I) mostró, con excepción del porcentaje de tejido, diferencias significativas al comparar los 2 grupos de animales utilizados. En el grupo de animales cuyos pulmones fueron perfundidos a 35 cm de presión, el Lm, la cuerda alveolar y el grosor de pared disminuyeron (Lm:  $46,46 \pm 6,32$ ; Ca:  $36,95 \pm 6,94$ ; Gp:  $9,50 \pm 1,79$ ) en relación con el grupo de referencia (Lm:  $55,86 \pm 11,78$ ; Ca:  $44,11 \pm 11,94$ ; Gp:  $11,76 \pm 3,09$ ). El perímetro alveolar aumentó en los pulmones fijados a 35 cm ( $25.021 \pm 5.594$ ) al compararlo con los fijados a menor presión ( $22.580 \pm 4.140$ ).

#### Discusión

Se acepta que el Lm es una variable que está en relación con el tamaño del alveolo<sup>5</sup>, lo que nos permite considerar que los alveolos fijados a 35 cm de presión de agua presentan los alveolos más pequeños. Por otro lado, partiendo de la fórmula inicial ( $Lm = \Sigma L/n$ ) se puede deducir que el Lm es inversamente proporcional al número de mediciones ( $\Sigma L$  es igual en todos los casos, 18 mm por campo). Al ser  $\Sigma L$  constante, los pulmones perfundidos con mayor presión presentan mayor número de mediciones ( $n$ : número de mediciones) ya que su Lm es menor. Esto nos hace proponer que muy probablemente estos animales tengan aumentado el número de alveolos. De este razonamiento se deduce que nuestros resultados están a favor de los trabajos de Lum et al<sup>1</sup> y de Smaldone et al<sup>2</sup>, en los que tras aumentar la presión de insuflación se describe un reclutamiento alveolar.

Lum et al<sup>1</sup> proponen como causa del reclutamiento alveolar el desplegamiento de paredes alveolares. Para comprobar esa hipótesis hay que demostrar alveolos pequeños con paredes más delgadas. La disminución

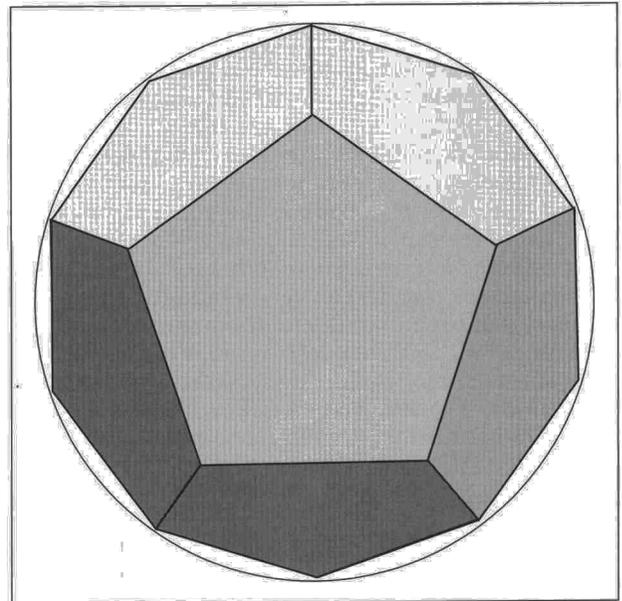


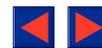
Fig. 6. Modelo teórico de alveolo, basado en un dodecaedro regular, en el que una hiperinsuflación transformaría el poliedro en una esfera.

TABLA I  
Resultados de las variables morfométricas

Variable/grupo	Grupo 25 cm	Grupo 35 cm
Porcentaje de tejido	$21,678 \pm 8,962$	$20,212 \pm 6,098$
Cuerda alveolar*	$44,107 \pm 11,944$	$36,953 \pm 6,944$
Grosor de pared*	$11,757 \pm 3,091$	$9,505 \pm 1,792$
Perímetro alveolar interno*	$22.579,809 \pm 4.139,727$	$25.021,423 \pm 5.593,988$
Lm*	$55.863 \pm 11.779$	$46.458 \pm 06,32$

Resultados obtenidos de las variables morfométricas. Se expresa en su media  $\pm$  una desviación normal. \* $p < 0,001$  al comparar los dos grupos de animales.

de la longitud de la cuerda alveolar y del Lm en los animales perfundidos a 35 cm de presión de agua nos hace considerar que el tamaño de los alveolos en estos animales es menor<sup>1, 3, 6</sup>. Podría haber ocurrido que el espacio aéreo distal de los pulmones perfundidos a 35 cm de presión hubiera disminuido por haber aumentado el grosor de las paredes alveolares. Creemos que esto no ha sido así, ya que el grosor de la pared alveolar ha disminuido en los pulmones perfundidos con mayor presión, y el porcentaje de tejido no ha variado; luego las modificaciones registradas se han producido sobre la misma cantidad de tejido, por lo que la única explicación posible de la disminución del grosor de las paredes alveolares es el desplegamiento de las mismas. La última variable cuantificada ha sido el perímetro alveolar interno, que nosotros asimilamos a la superficie alveolar interna<sup>7</sup>. En nuestro caso



el perímetro alveolar interno ha aumentado, lo que también relacionamos con el desplegamiento de paredes.

El conjunto de todas las variables estudiadas en este trabajo puede parecer redundante para demostrar la hipótesis de Lum et al<sup>1</sup>; sin embargo, hemos creído conveniente realizar todas estas mediciones para descartar posibles interferencias externas, ya que la hipótesis enunciada puede parecer paradójica. Efectivamente, se han propuesto diferentes modelos geométricos para definir la forma del alveolo. Por su sencillez destacamos el modelo de dodecaedro regular; este poliedro se convertiría en una esfera tras la hiperinsuflación<sup>8</sup>. Sin embargo, la práctica se aleja un poco de ese modelo teórico; reconstrucciones tridimensionales de alveolos insuflados a diferentes presiones dan como resultado que con presiones máximas de 25 cm de presión de agua, el alveolo adopta una forma esférica compatible con el dodecaedro, pero se hace caliciforme si la presión aumenta<sup>9</sup>. La distribución anular de las fibras de elastina en la boca del alveolo, podría ser la responsable de estas modificaciones estructurales<sup>9</sup>. En este sentido se ha de tener en cuenta que el alveolo tiene una arquitectura definida por su forma y por los elementos que la constituyen y todo ello, en nuestra consideración, ha de estar dirigido hacia un mejor funcionamiento. Oldmixon et al<sup>10</sup>, en un modelo de comportamiento alveolar, proponen que las paredes alveolares pueden plegarse y desplegarse durante los cambios de presión que se producen con la respiración; estos autores consideran<sup>10</sup> que la mayor proporción de paredes alveolares desplegadas se corresponde con un rango de presión determinado que se aproxima al concepto de presiones críticas de apertura y de cierre. Nosotros proponemos que una hiperinsuflación pulmonar, en el caso del modelo alveolar de dodecaedro regular, obligaría a éste a adoptar una forma esférica; por tanto, la relación "superficie alveolar interna/volumen de aire" disminuiría. Como se ha demostrado en nuestro estudio, la presión de insuflación puede aumentar considerablemente este cociente (aproximadamente 1,9 veces) en vez de disminuirlo, lo que muy posiblemente favorecerá el intercambio gaseoso.

Concluyendo, la hipótesis de trabajo ha sido demostrada, y nuestros resultados nos hacen proponer: en los modelos en los que el aumento de volumen aéreo alveolar está en relación directa con la presión de insuflación, únicamente se favorece la entrada de aire; sin embargo, el reclutamiento alveolar por aumento de presión de insuflación, además de introducir aire, facilita el intercambio gaseoso al incrementar la superficie alveolar interna. Esta última hipótesis se ha deducido de observaciones morfológicas realizadas a partir de imágenes bidimensionales. Somos conscientes de las limitaciones que existen al extrapolar una imagen plana a otra espacial<sup>11</sup>. Este estudio ha de ser completado con otros tridimensionales, que permitan precisar qué paredes alveolares podrán desplegarse y los posibles mecanismos que influyen en ello.

#### BIBLIOGRAFÍA

1. Lum H, Huang I, Mitzner W. Morphological evidence for alveolar recruitment during inflation at high transpulmonary pressure. *J Appl Physiol* 1990; 68:2.280-2.286.
2. Smaldone GC, Mitzner W, Itoh H. Role of alveolar recruitment in lung inflation: influence on pressure-volume hysteresis. *H Appl Physiol* 1983; 55:1.321-1.332.
3. Escolar Castellón JD, Roche Roche PA, Escolar Castellón A, Miñana Amada C. Experimental, semiquantitative and morphometric study, of the modifications produced in allergic alveolitis and in Goodpasture's syndrome due to exposure to cigarette smoke. *Histol Histopath* 1991; 6:535-547.
4. Wells WA, Rainer RO, Memoli VA. Basic principles of image processing. *AJCP* November 1992; 98:493-501.
5. Dunnill MS Quantitative methods in the study of pulmonary pathology. *Thorax* 1962; 17:320-328.
6. McCartney A, Fox B, Partridge T, Macrae K, Tetley T, Phillips G, Guz A. Emphysema in the Blotchy Mouse: A Morphometric Study. *J Pathol* 1988; 156:77-81.
7. Weibel E. Morphometric estimation of pulmonary diffusion capacity. *Resp Physiol* 1970; 11:54-75.
8. Linhartova A, Caldwell W, Anderson AE. A proposed alveolar model for adult human lungs: The Regular Dodecahedron. *Anat Record* 1986; 214:266-272.
9. Mercer RR, Crapo JD. Three-dimensional reconstruction of the rat acinus. *J Appl Physiol* 1987; 63:785-794.
10. Oldmixon EH, Hoppin FG. Alveolar septal folding and lung inflation history. *J Appl Physiol* 1991; 71:2.369-2.379.
11. Hansen JE, Ampaya EP. Branching pattern of airways and air spaces of a single human terminal bronchiole *J Appl Physiol* 1975; 38:983-989.