

# PAPEL DE LAS PLAQUETAS EN EL DAÑO PULMONAR INDUCIDO POR LA INSTILACION INTRATRAQUEAL DE ACIDO CLORHIDRICO EN LA RATA\*

G. Arenas<sup>1</sup>, E. Novoa<sup>1</sup>, M.E. Lathrop<sup>2</sup>, L. Ferrer<sup>1</sup> y M.J. Oyarzún<sup>2</sup>.

Departamentos Medicina Experimental Norte<sup>1</sup>  
y Ciencias Preclínicas de Oriente<sup>2</sup>.  
Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Santiago de Chile.

Las plaquetas han sido involucradas en la patogenia del daño pulmonar agudo en diferentes modelos experimentales. El objetivo de este estudio fue evaluar su papel en el daño pulmonar inducido por la instilación intratraqueal de HCl 0,1 N (2 ml/kg).

Se instiló HCl o bien NaCl 0,9 % en ratas con plaquetas normales o con dos niveles de plaquetopenia: a) menos de 100.000 plaquetas/mm<sup>3</sup> y b) entre 100.000 y 200.000 plaquetas/mm<sup>3</sup> en sangre periférica.

La trombocitopenia se indujo inyectando a las ratas intraperitonealmente con suero antiplaquetario previamente preparado en el conejo. A las 4 horas post instilación se efectuó estudio histológico pulmonar y se determinó proteínas y surfactante alveolar (fosfolípidos totales y fosfatidicolina disaturada) en el lavado broncoalveolar (LBA); pre y post instilación de HCl se practicó gasometría arterial.

La instilación de HCl produjo hipoxemia, hiperventilación, edema pulmonar, reacción inflamatoria y aumento de proteínas en el LBA en las ratas con y sin trombocitopenia. El surfactante aumentó significativamente en las ratas con mayor trombocitopenia instiladas con HCl.

De acuerdo a este resultado, las plaquetas no jugarían un papel relevante en el daño pulmonar inducido por HCl; sin embargo ellas o alguno de sus componentes podrían tener algún papel en el control del nivel de surfactante alveolar.

Role of platelets in the pulmonary damage induced by the intratracheal instillation of hydrochloric acid in rats

Platelets have been implicated in the pathogenesis of acute pulmonary damage in several experimental models. The aim of the present study was to assess their role in the pulmonary damage induced by the intratracheal instillation of HCl 0,1 N (2 ml/kg).

HCl or NaCl 0,9 % were instilled to rats with normal platelets or with two levels of thrombopenia: a) less than 100.000 platelets/mm<sup>3</sup>, and b) between 100.000 and 200.000 platelets/mm<sup>3</sup> in peripheral blood.

Thrombocytopenia was induced by the intraperitoneal injection of antiplatelet serum previously prepared in rabbits. Four hours after the instillation, histologic lung study was performed, and proteins and alveolar surfactant (total phospholipid and disaturated phosphatidylcholine) were measured in the bronchoalveolar lavage (BAL) fluid. Arterial blood gases were measured before and after HCl instillation.

HCl instillation resulted in hypoxemia, hyperventilation, pulmonary edema, inflammatory reaction and increased protein level in the BAL fluid in the rats with and without thrombocytopenia. Surfactant was significantly increased in rats with more severe thrombocytopenia and HCl instillation.

According to these results, platelets would not play a relevant role in the HCl induced pulmonary damage; however, platelets themselves or some of their components might play some part in the control of the level of alveolar surfactant.

*Arch Bronconeumol* 1989; 25:106-110

## Introducción

La instilación intratraqueal de ácido clorhídrico provoca en la rata al cabo de cuatro horas edema pulmonar por aumento de la permeabilidad vascular, reacción inflamatoria y fallo respiratorio agudo<sup>1</sup>.

Estos cambios son similares a aquellos encontrados en otros modelos animales de daño pulmonar agudo y en el síndrome de distrés respiratorio del adulto (SDRA) asociado a la aspiración de contenido gástrico observado en humanos<sup>2</sup>.

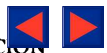
Los mecanismos patogénicos que participan en el daño pulmonar agudo no están claramente dilucidados. Últimamente se ha sugerido que diferentes células y substancias vasoactivas pueden participar como posibles mecanismos mediadores del daño pulmonar. Entre estos están las plaquetas y sus mediadores<sup>3</sup>.

En diferentes modelos de SDRA se ha encontrado una disminución del número de plaquetas circulantes y un secuestro de éstas en el parénquima pulmonar,

Trabajo presentado en XXX Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Chile y a la II Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Ciencias Fisiológicas, La Serena, Chile, Noviembre 1987.

\* Estudio financiado parcialmente por proyecto M-2709 - 8714 DIB, Universidad de Chile.

Recibido el 14-12-1988 y aceptado el 2-1-1989.



lo que ha hecho pensar a algunos investigadores que las plaquetas, o algunos de sus mediadores, pueden jugar algún papel en la patogénesis de la insuficiencia respiratoria provocada por el aumento de la permeabilidad vascular pulmonar<sup>4</sup>. Sin embargo hasta hoy, esta hipótesis permanece en controversia<sup>5</sup>.

El objetivo de este trabajo fue determinar si las plaquetas juegan algún papel patogénico en el daño pulmonar agudo inducido por la instilación intratraqueal de HCl en la rata.

## Material y métodos

Se utilizó ratas Wistar de un peso promedio de  $342,5 \pm 3,8$  DS. Una vez anestesiados los animales con pentobarbital sódico (40 mg/kg de peso corporal) administrado por vía intraperitoneal, se procedió a realizar una traqueostomía para colocar un tubo de polietileno y a canular la arteria carótida para extraer sangre arterial al comienzo y al final del experimento con el fin determinar PaO<sub>2</sub>, PaCO<sub>2</sub> y pH.

A través de la cánula traqueal se instiló 2 ml/kg de peso corporal de HCl (0,1 N) o bien solución salina 0,9 % en ratas con niveles normales de plaquetas circulantes o con dos niveles de plaquetopenia:

- a) menos de 100.000 plaquetas/mm<sup>3</sup> de sangre circulante
- b) entre 100.000 y 200.000 plaquetas/mm<sup>3</sup> de sangre circulante.

La disminución del número de plaquetas circulantes en la sangre de las ratas se logró mediante la inyección intraperitoneal de diferentes dosis de suero antiplaquetario previamente preparado en conejos mediante la técnica de Castellan y Steiner<sup>6</sup>.

Se formaron así las siguientes series experimentales:

1. Serie HCl: constituida por ocho animales que recibieron la instilación intratraqueal de 2 ml/kg de peso corporal de HCl 0,1 N y con un recuento de plaquetas circulantes normales [ $764.000 \pm 265.000$  (DS)/mm<sup>3</sup>].
2. Serie solución salina: constituida por nueve animales con número de plaquetas circulantes normales ( $618.570 \pm 158.970$ /mm<sup>3</sup>) que fueron instiladas con 2 ml/kg de solución salina.
3. Serie solución salina en ratas plaquetopénicas. Esta serie estuvo constituida por ocho animales con niveles de plaquetas circulantes de promedio  $78.500 \pm 23.707$ /mm<sup>3</sup> que recibieron la instilación de solución salina 0,9 % a través de la tráquea.
4. Serie HCl en ratas plaquetopénicas: < 100.000 plaquetas/mm<sup>3</sup> (SAP1). Esta serie estuvo constituida por nueve ratas plaquetopénicas ( $31.777 \pm 20.000$ /mm<sup>3</sup>) que recibieron la instilación intratraqueal de 2 ml/kg de HCl 0,1 N.
5. Serie HCl en ratas plaquetopénicas: entre 100.000 y 200.000 plaquetas/mm<sup>3</sup> (SAP2). Esta serie estuvo constituida por nueve ratas plaquetopénicas ( $142.888 \pm 42.120$ /mm<sup>3</sup>) que recibieron 2 ml/kg de HCl 0,1 N por vía intratraqueal.

Cuatro horas después de la instilación intratraqueal de HCl o solución salina se procedió a la extracción de sangre arterial para determinar PaO<sub>2</sub> y pH e inmediatamente después se sacrificaron los animales mediante exsanguinación.

Los pulmones y el corazón fueron extraídos y pesados para obtener la relación peso pulmón/peso corporal, peso pulmón/peso corazón y para realizar un lavado broncoalveolar (LBA).

Las relaciones peso pulmón/peso corporal y peso pulmón/peso corazón se usaron como índice del contenido acuoso del pulmón. En el LBA se determinó: a) contenido de fosfolípidos totales (PLT) mediante el método de Bligh y Dyer<sup>7</sup>, seguido por el método de Bartlett<sup>8</sup>; b) fosfatidilcolina disaturada (PCDS) usando tetróxido de osmio<sup>9</sup> y c) contenido de proteínas usando el método de Lowry et al<sup>10</sup>.

En dos pulmones de cada serie experimental se realizó un estudio histológico para evaluar el daño inducido por HCl. Se fijaron los pulmones mediante la inyección de los bronquios con formalina al 5 % hasta la capacidad pulmonar total y luego se sumergieron en formalina al 20 %. Se usó la tinción de hematoxilina-eosina y se estudió la histología al microscopio óptico.

El análisis estadístico de los resultados se realizó usando test pareado de Student, análisis de varianza y test de Newman-Keuls<sup>11</sup>, según el caso. Un valor de p menor de 0,05 se consideró significativo.

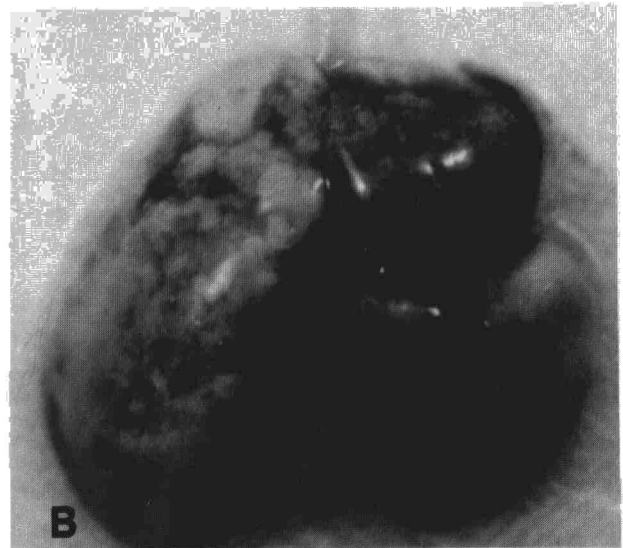
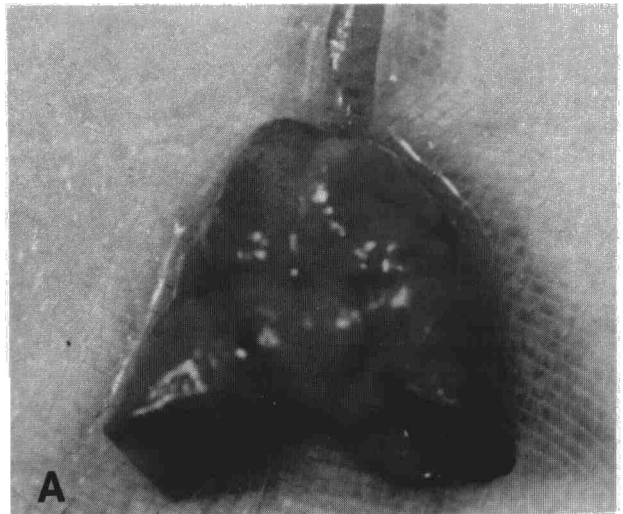


Fig. 1. Visión macroscópica del pulmón de una rata instilada con NaCl 0,9 % (2 ml/kg) y de otra instilada con HCl 0,1 N (2 ml/kg). El animal que recibió HCl (B) presenta congestión pulmonar, zonas hemorrágicas bilaterales difusas y petequias subpleurales. El pulmón de la rata instilada con NaCl 0,9 % presenta aspecto normal (A).

## Resultados

Los pulmones de las ratas que recibieron la instilación intratraqueal de 2 ml/kg de HCl 0,1 N presentaron macroscópicamente al cabo de 4 horas edema y zonas de hemorragia pulmonar (fig. 1). La histología de estos pulmones mostró edema intraalveolar, intersticial, perivascular y peribronquial así como la presencia de células inflamatorias en estas mismas regiones pulmonares (fig. 2). La inducción de plaquetopenia por suero antiplaquetario no modificó las alteraciones pulmonares provocadas por HCl.

Los índices peso pulmón/peso corporal y peso pulmón/peso corazón de las ratas que recibieron la instilación intratraqueal de HCl fueron significativamente más altas que los controles. Lo mismo ocurrió con el contenido de proteínas en el lavado broncoalveolar

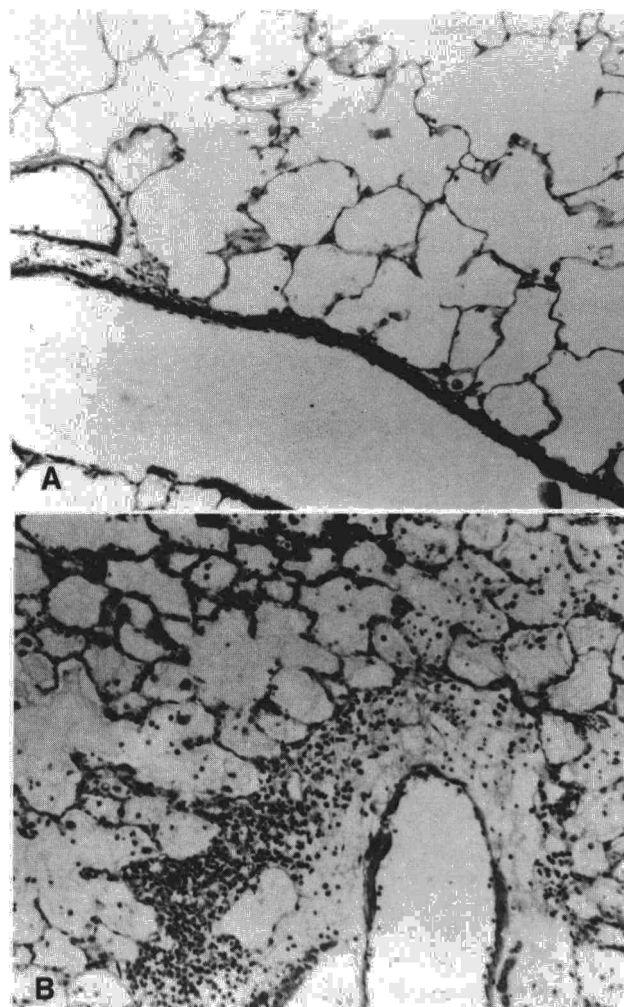


Fig. 2. Histología pulmonar de una rata instilada con NaCl 0,9 % (2 ml/kg) (A) y de otra instilada con 2 ml HCl 0,1 N/kg (B). Se observa edema intraalveolar y perivascular en el animal que recibió HCl. En la rata instilada con NaCl 0,9 % hay discreto edema perivascular (HE  $\times$  40).

de las ratas que recibieron HCL, puesto que presentaron un aumento significativo de éstas en comparación con el grupo control (fig. 3). Los cambios descritos se observaron en todas las series de ratas que recibieron HCl, ya sea que tuvieran recuentos de plaquetas en sangre periférica normal o los dos niveles de plaquetopenia ya señalados (fig. 3).

En relación al comportamiento de los gases en sangre arterial se observó que la instilación intratraqueal de HCl provocó una caída significativa de la PaO<sub>2</sub> sin modificar el pH. Esta hipoxemia e hiperventilación inducida por el HCl se detectó tanto en los animales con plaquetas circulantes normales como en aquellos a los cuales previamente se les indujo una plaquetopenia mediante la inyección intraperitoneal de suero antiplaquetario (tabla I).

Al estudiar el contenido de surfactante alveolar en el lavado broncoalveolar mediante el análisis de los PLT y la PCDS encontramos que la instilación intratraqueal de HCl en animales con recuentos plaquetarios normales en sangre circulante no produjo cam-

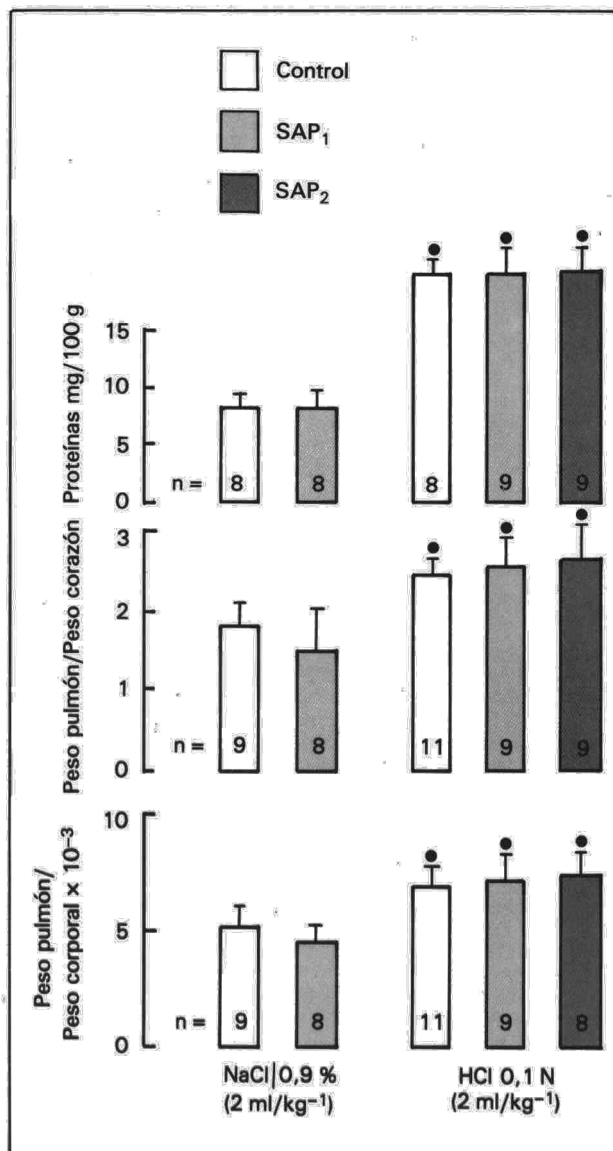


Fig. 3. Contenido de proteínas en el lavado broncoalveolar e índices peso pulmón/peso corazón, peso pulmón/peso corporal en ratas instiladas con HCl 0,1 N o NaCl 0,9 % y con diferentes niveles de plaquetas en sangre circulante. SAP 1: < 100.000 plaquetas/mm<sup>3</sup>. SAP 2 = entre 100.000 y 200.000 plaquetas/mm<sup>3</sup>. p calculada por análisis de varianza y test de Newman-Keuls, \*p < 0,05 cuando son comparadas con los grupos con solución salina. La línea vertical sobre cada columna representa el error estándar.

bios significativos de estos índices al cabo de 4 horas en comparación con los controles que recibieron solución salina. En cambio hubo aumento significativo de los PLT y la PCDS en el lavado broncoalveolar de las ratas plaquetopénicas sea que hubieran recibido solución salina o HCl.

Los animales con menos de 100.000 plaquetas/mm<sup>3</sup> en sangre periférica que recibieron la solución salina a través de la cánula traqueal presentaron un aumento de un 41 % en los PLT y de un 50 % en la PCDS, con respecto a los animales que recibieron solución salina y tenían recuentos plaquetarios normales. Las otras series experimentales de ratas plaquetopénicas (con menos de 200.000 plaquetas/mm<sup>3</sup> de



sangre circulante) y que recibieron la instilación intratraqueal de HCl presentaron al cabo de 4 horas un aumento significativo tanto de los PLT como de la PCDS en comparación a las ratas que recibieron HCl o solución salina pero que tenían recuentos plaquetarios normales (fig. 4).

### Discusión

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que las plaquetas no jugarían un papel iniciador o amplificador del daño pulmonar inducido por la instilación intratraqueal de HCl en la rata. La serie de animales con recuentos plaquetarios normales antes de la instilación de 2 ml/kg de HCl 0,1 N presentó al cabo de cuatro horas una caída de las plaquetas del 30 % además de hipoxemia, hiperventilación, edema e inflamación pulmonar. Esta caída de las plaquetas observada en nuestro modelo experimental no fue significativa, como tampoco lo fue en otro trabajo realizado en nuestro laboratorio<sup>12</sup> mediante la infusión iv de ácido oléico (10 mg × kg<sup>-1</sup> × min<sup>-1</sup>).

Estos resultados son diferentes a los de otros investigadores, en los cuales se encuentra caída significativa de las plaquetas circulantes con secuestro de ellas en la circulación pulmonar. Spragg por su parte<sup>4</sup>, encontró en conejos que recibieron una infusión de ácido oléico una caída significativa de las plaquetas marcadas con Indio-134 en el plasma, en tanto que la marca aumentó a nivel pulmonar, por lo que sugirió que las plaquetas o algunos de sus marcadores podrían participar en el daño vascular por aumento de la permeabilidad pulmonar. En nuestro trabajo observamos que en los animales que presentaban un recuento plaquetario menor de 100.000/mm<sup>3</sup> en la sangre circulante (promedio 40.000 para la serie SAP 1) previo a la instilación de HCl también existía daño pulmonar semejante a la serie que recibió HCl y tenía recuentos plaquetarios normales. Por la posibilidad de que muy bajos recuentos plaquetarios en vez de proteger al pulmón de la instilación de HCl fueran facilitadores del daño especialmente de hemorragias, es por lo que trabajamos con un segundo grupo de ratas plaquetopénicas (SAP 2) que tenían un recuento en-

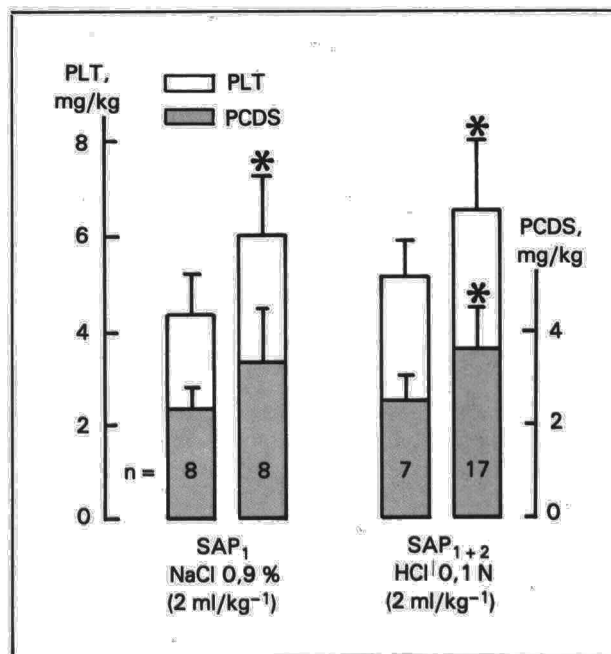


Fig. 4. Contenido de fosfolípidos totales (PLT) y dipalmitoil fosfatidilcolina (PCDS) en el lavado broncoalveolar en ratas instiladas con HCl 0,1 N o NaCl 0,9 % y con diferentes niveles de plaquetas circulantes; SAP 1: < 100.000 plaquetas/mm<sup>3</sup>; SAP 1 + 2: < 200.000 plaquetas × mm<sup>3</sup>. p calculada por análisis de varianza y test de Newman Keuls; \* = p < 0,05 cuando los grupos con suero antiplaquetario (SAP) son comparados con los sin SAP. La línea vertical sobre cada columna representa el error estándar de la media.

tre 100.000 y 200.000 plaquetas/mm<sup>3</sup> en sangre periférica. En este grupo tampoco observamos protección pulmonar, por lo que suponemos que probablemente la caída de las plaquetas circulantes con el secuestro a nivel pulmonar encontrado en muchas series experimentales de SDR, como también se ha observado en humanos, corresponda a un epifenómeno secundario al daño pulmonar y no sea un evento iniciador. Posiblemente las plaquetas pueden intervenir en la génesis de la hipertensión pulmonar como se ha señalado en distintas investigaciones<sup>13</sup>. Nuestro diseño experimental no contemplaba la medición de presiones del circuito pulmonar, ni del débito cardíaco, de modo que desconocemos la partici-

TABLA I  
Gases en sangre arterial y pHa de ratas tratadas con HCl y con distintos niveles de plaquetas en sangre periférica

|                               | PaO <sub>2</sub> mmHg |                                 | PaCO <sub>2</sub> mmHg |                                | pHa             |                  |
|-------------------------------|-----------------------|---------------------------------|------------------------|--------------------------------|-----------------|------------------|
|                               | Basal                 | Post instilación                | Basal                  | Post instilación               | Basal           | Post instilación |
| NaCl 0,9 %<br>(n = 7)         | 67<br>(8,9)           | 67,4<br>(13,5)                  | 4,0<br>(4,5)           | 33,5 <sup>&amp;</sup><br>(5)   | 7,36<br>(0,01)  | 7,41<br>(0,02)   |
| NaCl 0,9 % + SAP 1<br>(n = 7) | 70<br>(9,5)           | 67,6<br>(8,8)                   | 41,4<br>(4,2)          | 34,6 <sup>&amp;</sup><br>(4,6) | 7,34<br>(0,025) | 7,41<br>(0,03)   |
| HCl 0,1 N<br>(n = 6)          | 82,8<br>(10)          | 55,8 <sup>&amp;</sup><br>(3,5)  | 38<br>(4,7)            | 34 <sup>&amp;</sup><br>(3,6)   | 7,41<br>(0,02)  | 7,41<br>(0,02)   |
| HCl 0,1 N + SAP 1<br>(n = 9)  | 68,5<br>(7,8)         | 45,9 <sup>&amp;</sup><br>(10)   | 39,4<br>(3,7)          | 34,5<br>(8,8)                  | 7,35<br>(0,024) | 7,34<br>(0,14)   |
| HCl 0,1 N + SAP 2<br>(n = 9)  | 62<br>(8,2)           | 44,5 <sup>&amp;</sup><br>(13,7) | 39,1<br>(2,6)          | 37,9<br>(10)                   | 7,36<br>(0,024) | 7,35<br>(0,11)   |

Cada valor representa la media, entre paréntesis su desviación estándar; n: número de ratas. SAP 1 = 100.000 plaquetas/mm<sup>3</sup>. SAP 2 = entre 100.000 y 200.000 plaquetas/mm<sup>3</sup>. & = p < 0,05 (test pareado de Student).



pación de alteraciones hemodinámicas en la génesis de las alteraciones estudiadas.

Lo sorprendente de este trabajo fue que encontramos un aumento del surfactante alveolar medido a través de los PLT y de la PCDS en el lavado broncoalveolar en las series experimentales de ratas plaquetopénicas, ya hubieran recibido HCl, o solución salina a través de la cánula traqueal. A las 4 horas de la instilación de HCl no encontramos una modificación significativa de los índices de surfactante, como ya lo habíamos comunicado en un trabajo previo<sup>1</sup>. Sin embargo, este aumento ocurrió a las 48 horas post-instilación. El grupo de ratas plaquetopénicas y que recibió HCl, presentó a las 4 horas un aumento significativo de ambos índices de surfactante, en tanto que las ratas plaquetopénicas que recibieron solución salina presentaron aumento significativo de los PLT y del 50 % de la PCDS, que no alcanzó a ser significativo posiblemente por la dispersión de los datos. Estos resultados sugieren que las plaquetas o algunos de sus mediadores posiblemente jueguen algún papel en el control del surfactante alveolar en el daño pulmonar agudo. King et al, comunicaron que el factor activador de plaquetas (PAF) que es sintetizado y secretado por las propias plaquetas además de otras células, es capaz de inducir la síntesis y secreción de surfactante por neumocitos tipo II cultivados *in vitro*<sup>14</sup>. Este mismo investigador encontró que la instilación intratraqueal o la inyección por vía intravenosa de PAF en ratas vivas también aumentaba el surfactante en el lavado broncoalveolar<sup>15</sup>. Es posible que en nuestro modelo experimental, el PAF sea el factor que media este aumento del surfactante alveolar encontrado en las ratas plaquetopénicas. Esto podría ocurrir por efecto del suero antiplaquetario que, como lo pudimos comprobar en nuestro laboratorio, produce lisis de las plaquetas con liberación de su contenido al medio sanguíneo. Algunas de las sustancias liberadas por las plaquetas, entre ellas el PAF o el tromboxano A<sub>2</sub>, podrían haber sido inductores de una mayor secreción de surfactante. En un trabajo previo, Oyarzún et al sugieren que el aumento de surfactante observado en el daño pulmonar agudo inducido por la infusión e.v. de ácido oleico en el conejo sería mediado por tromboxano A<sub>2</sub><sup>16</sup>. De modo que las plaquetas que poseen la capacidad de sintetizar, almacenar y liberar estos poderosos mediadores podrían participar en el control de surfactante en el daño pulmonar a través de PAF y/o Tx A<sub>2</sub>.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a la Dra. A. Díaz, a la Sra. Y. Derpich y al señor P. Poloni por su valiosa colaboración profesional y a la Sra. Vargas por transcribir el manuscrito.

## BIBLIOGRAFIA

1. Mendoza R, Merino JA, Lathrop ME, Hernández P, Arenas G, Oyarzún MJ. Instilación endotraqueal de HCl en la rata: efectos pulmonares inmediatos y tardíos. Arch Biol y Med Exper 1986; 19:398.
2. Wynne JW. Aspiration pneumonitis. Clinics in Chest Medicine 1982; 3:25-34.
3. Schneider RC. Platelet consumption in severe acute respiratory failure. Am Rev Respir Dis 1980; 122:445-455.
4. Spragg EG. Pulmonary injury. Am Rev Respir Dis 1982; 126:553-557.
5. Heffner JE, Sahn SA, Repine JE. The role of platelet in the adult respiratory distress syndrome. Am Rev Respir Dis 1987; 135:482-492.
6. Castellán RM, Steiner M. Effect of platelet age on adhesiveness to collagen and platelet surface changes. Thromb Haemostas (Stuttgart) 1976; 36:392-400.
7. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem 1959; 37:911-917.
8. Bartlett GR. Phosphorus assay in column chromatography. J Biol Chem 1959; 234:466-468.
9. Mason RJ, Nellenbogen J, Clements JA. Isolation of disaturated phosphatidylcholine with osmium tetroxide. J Lipid Res 1976; 17:281-284.
10. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall EJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193:226-275.
11. Snedecor GW, Cochran WG. Statistical methods. Iowa State Univ Press Ames Iowa, USA 1976.
12. Arenas G. Respuesta pulmonar tardía a la infusión de ácidos grasos libres: Efectos de la prostaciclina e imidazol. Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Médicas, mención Fisiopatología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, 1987.
13. Bredenberg CE, Taylor GA, Webb WR. The effect of thrombocytopenia on the pulmonary and systemic hemodynamics canine endotoxin shock. Surgery 1980; 87:59-68.
14. King RJ, Kumar R, Martin HM, Hanahan DJ. Platelet activating factor (PAF) stimulates the secretion of surfactant by rat type II cells with the same increment and time course as tetradecanil phorbol acetate (TPA). Fed Proc 1986; 45:1530 (abstract 284).
15. King RI, Martin H, Humar R, Hanahan DJ. Platelet activating factor (PAF) simulates the metabolism of intracellular and alveolar pool of disaturated phosphatidylcholine (DSPC) in rat lung when tested in vivo. Am Rev Respir Dis 1987; 135:376.
16. Oyarzún MJ, Donoso P, Arias M, Quijada D. Thromboxane mediates the increase in alveolar surfactant pool induced by free fatty acid infusion in the rabbit. Respiration 1984; 46:231-240.