

FIBROSIS PULMONAR EXPERIMENTAL EN LA RATA (DESENCADENADA POR SUERO ANTI-MBG)

J. DE D. ESCOLAR CASTELLON, F. ESCOLAR CASTELLON,
L. LOPEZ BURBANO, M.P. A. ROCHE ROCHE, C. MIÑANA AMADA
y A.I. MAURAIN VILORIA

Departamento de Anatomía. Facultad de Medicina.
Universidad de Zaragoza.

Se administró suero anti-MBG con diferentes pautas, a cinco grupos de ratas, y se sacrificaron en distintos períodos de tiempo (4 horas, 2 días, 14 días, 2 meses y 3 meses). Los pulmones de estos animales se procesaron para microscopía de luz y electrónica.

Los pulmones de las ratas de primer grupo, presentaron macrófagos cargados de hemosiderina, a la par que fagocitaban las paredes alveolares próximas a los capilares. El segundo grupo se caracterizó por la presencia de leucocitos polimorfonucleares pegados a las paredes vasculares. En el tercer grupo había proliferación de las células intersticiales. El quinto grupo presentó aumento de las fibras de colágena. El cuarto grupo, fue un eslabón intermedio entre el tercer y quinto grupo. En los pulmones de todos los animales se demostró el suero anti-MBG administrado.

Todo esto se ha podido sistematizar como un proceso evolutivo de cuatro fases: 1.ª) alveolitis aguda, 2.ª) inflamación vascular, 3.ª) neumonitis, y 4.ª) fibrosis.

Arch Bronconeumol 1986; 22:106-110.

Introducción

Dentro de las múltiples causas de fibrosis pulmonar, los inmunocomplejos ocupan un lugar muy importante^{1,2}. En las enfermedades por inmunocomplejos, una variedad es la producida por anticuerpos antimembrana basal (anti-MB)³. Fue Lindeman en 1900 el primero en estudiar esta enfermedad, llamando al suero heterólogo antimembrana basal glomerular (MBG) empleado «veneno renal»; Masugi en 1934⁴ sistematizó esta enfermedad, estableciendo el término de «suero anti-riñón»; en 1957, Krakowe y Greenspon⁵ demostraron que este suero se dirigía principalmente contra la MBG, por lo que desde entonces se acepta la denominación de suero anti-MBG.

A = luz alveolar; C = colágena; E = endotelio; M = monocito, macrófago; MBA = membrana basal alveolar; P = polimorfonuclear; V = luz vascular; II = neumocito tipo II.

Recibido el 14-5-1985 y aceptado el 6-11-85.

Experimental pulmonary fibrosis in the rat

Five groups of rats were given different schedules of anti-MBG serum and sacrificed at varying intervals (4 hours, 2 days, 14 days, 3 months). The lungs were processed for light and electron microscopic examination.

The lungs from the first group presented hemosiderin loaded macrophages which phagocytized the alveolar walls near the capillaries. The second was characterized by the presence of polymorphonuclear leukocytes adhered to the vascular walls. Group three showed a proliferation of interstitial cells. In Group five the collagen fibres were increased. Group 4 was at a stage intermediate between groups 3 and 5. The administered anti-MBG serum was found in the lungs of all animals.

These findings were ordered as the four phases of a progressive disorder: 1.º acute course; 2.º vascular inflammation, 3.º pneumonitis and 4.º fibrosis.

Producir una afectación pulmonar con suero anti-MBG es muy difícil⁶, aunque hay autores que lo han descrito⁷. El objetivo de este estudio es producir en la rata una fibrosis pulmonar por inmunocomplejos, utilizando suero anti-MBG.

Material y métodos

Se han utilizado 38 ratas blancas tipo Wister. A 19 de ellas se les administró suero de conejo anti-MBG⁸, según las siguientes pautas:

- Grupo I, 4 ratas: una administración de 0,5 cc.
- Grupo II, 4 ratas: dos administraciones de 0,5 cc, con dos días de intervalo.
- Grupo III, 4 ratas: siete administraciones de 0,5 cc con dos días de intervalo entre cada dosis.
- Grupo IV, 3 ratas: ocho administraciones de 0,5 cc con siete días de intervalo entre cada dosis.
- Grupo V, 4 ratas: doce administraciones de 0,5 cc con siete días de intervalo entre cada dosis.

En todos los casos, la vía de administración fue la sublingual. El sacrificio de estos animales se realizó a las cuatro horas de la última administración de suero.

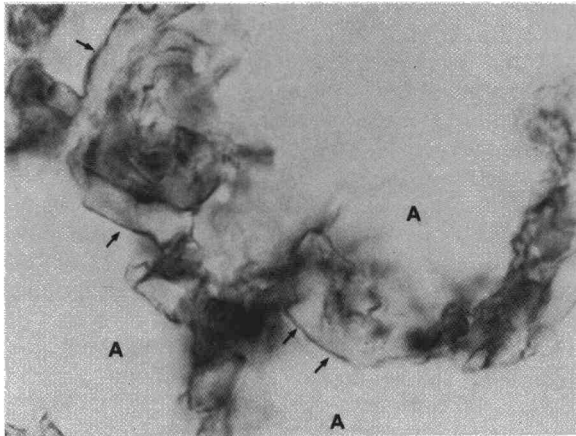


Fig. 1. Septum de pulmón de rata tratada con suero anti-MBG, contrastado con PAP. Se pueden advertir los contornos de los capilares contrastados (flechas) y los núcleos celulares en diferentes planos de enfoque ($\times 1.200$).

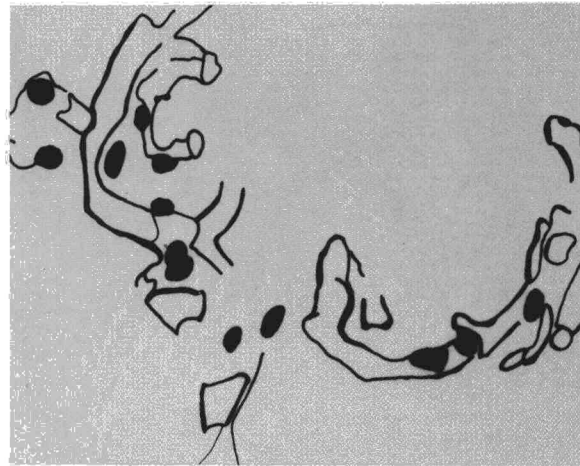


Fig. 2. Dibujo del septum de la figura 1, realizado en cámara clara. Se han perfilado exclusivamente la IgG de conejo contrastada con la PAP y los núcleos celulares.

Todos estos grupos tenían otro grupo control paralelo, que fue tratado con suero inespecífico de conejo.

Previa anestesia con éter, se realizó una esternotomía media, para acceder al interior del tórax y extraer el pulmón izquierdo, que fue fijado por inmersión en formalina al 10 % tamponada a pH 7,4. El pulmón derecho fue perfundido por ventrículo derecho con glutaraldehído al 1 % y paraformaldehído al 1 % en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4 para procesado de microscopía electrónica. El material fijado en formalina se procesó para microscopía de luz, realizándose las tinciones de tricómico de Martins, azul de Prusia (para la detección de hemosiderina).

Para la localización de los anticuerpos de conejo anti-MBG, se utilizó el método inmunohistoquímico de la peroxidasa-anti-peroxidasa (PAP) de Burns⁹, según el siguiente protocolo:

1. Bloqueo de la peroxidasa endógena con H_2O_2 al 0,3 % en tampón triss salino 0,04 M y pH 7,4.
2. Bloqueo de las inmunoglobulinas con suero de cabra (Operon[®]).
3. Suero de cabra anticonejo 1/100 (Operon[®]).
4. PAP de conejo 1/100 (Dako[®]).
5. Diaminobencidina al 0,05 % en triss salino con 0,5 % de H_2O_2 .
6. Tinción nuclear con hematoxilina.

Los cortes teñidos con PAP fueron dibujados en una cámara clara, con el fin de facilitar el estudio de la morfología y distribución de los depósitos de IgG de conejo. El tejido fijado con glutaraldehído y paraformaldehído se incluyó en araldita. Los cortes semifinos de control, se desaralditizaron y se tiñeron con tricómico de Martins, y los ultrafinos se contrastaron con acetato de uranilo y plomo.

Resultados

En primer lugar, se quiere destacar que en todos los casos tratados con suero anti-MBG, la PAP ha sido positiva en el pulmón. Esto se expresa como una línea más o menos continua de color marrón, que perfila los vasos (figs. 1 y 2, flechas), sobre todo cuando coincide con el alveolo. En los casos más prolongados, la morfología es predominantemente grumosa.

Grupo I: destaca la presencia de abundantes macrófagos cargados de hemosiderina (contrastada con azul de Prusia), adheridos a los septum

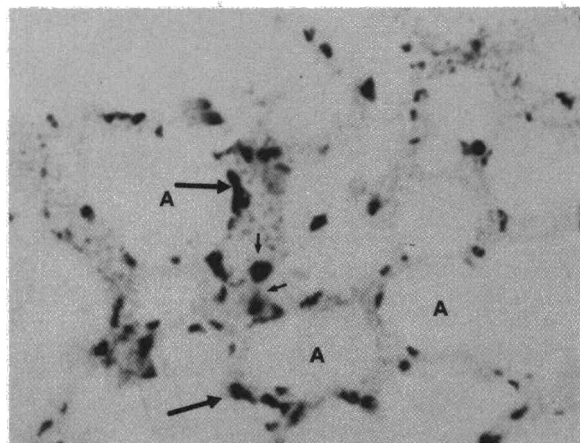


Fig. 3. Pulmón de rata del grupo I. Tinción: azul de Prusia. Macrófagos alveolares pegados a las paredes (flechas grandes) e intersticiales en el interior (flechas pequeñas). Hay algún macrófago alveolar desprendido en la luz del alveolo ($\times 400$).

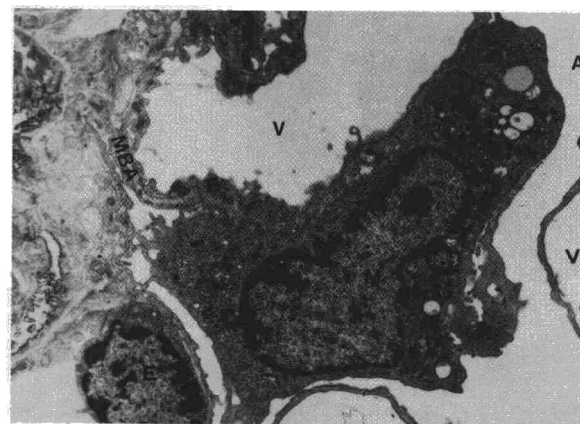


Fig. 4. Rata del grupo I. Macrófago alveolar (M), contactando con el endotelio capilar (E). Ha desaparecido el epitelio alveolar y la MBA entre ambos ($\times 4.500$).

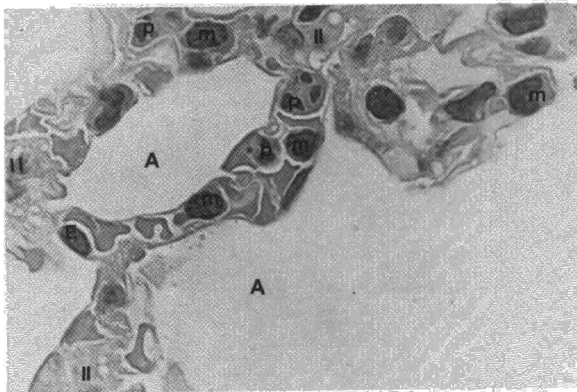
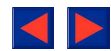


Fig. 5. Pulmón de rata del grupo II, con abundantes leucocitos (PM) dentro del capilar (corte semifino) ($\times 1,200$).

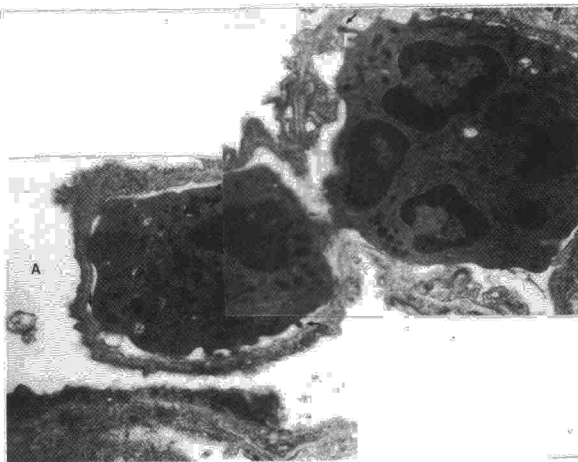


Fig. 6. Capilar pulmonar de rata del grupo II, que contiene dos polimorfonucleares emitiendo prolongaciones hacia la célula endotelial ($\times 15,000$).

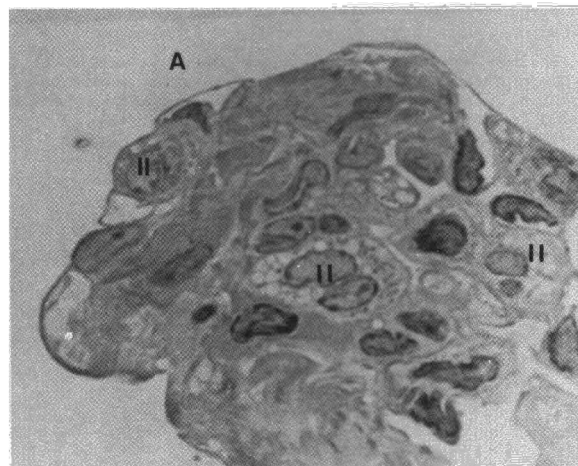


Fig. 7. Pulmón de rata del grupo III. Engrosamiento de las paredes alveolares a expensas de células septales (corte semifino) ($\times 1,100$).

(fig. 3, flechas). En la microscopía electrónica, se puede apreciar como algunos macrófagos están pegados a las «paredes capilares», pues ha desaparecido la célula epitelial y la membrana basal alveolar

(MBA) subyacente, por lo que contactan directamente con el epitelio vascular (fig. 4).

Grupo II: en la microscopía de luz, se observan leucocitos polimorfonucleares y monocitos dentro de los capilares, así como los núcleos tuberosos de las células endoteliales (fig. 5). Hay una proliferación de los neumocitos tipo II. Con la microscopía electrónica, se han podido confirmar estas observaciones, ya que ha demostrado abundantes leucocitos polimorfonucleares dentro de los capilares alveolares, emitiendo prolongaciones hacia las células epiteliales y rellenando toda la luz (fig. 6).

Grupo III: los pulmones de estas ratas muestran engrosados sus septum alveolares, a expensas de un aumento en el número de sus células (fig. 7). Dentro de sus capilares se han advertido abundantes leucocitos.

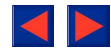
Grupo IV: los hallazgos en este grupo, son superponibles a los de los grupos III y V.

Grupo V: hay una desestructuración del pulmón, habiendo perdido éste su característica arquitectura (fig. 8). Los septa, unas veces están engrosados a expensas sobre todo de material acelular, y otras excesivamente delgados. Con el microscopio electrónico (fig. 9), se pueden apreciar fibras de colágena muy mal contrastadas, junto con un aumento de los pericitos entre el endotelio capilar y el epitelio alveolar.

Discusión

Con la PAP se han detectado, de forma neta, los anticuerpos de conejo anti-MBG, en el tejido pulmonar. La inmunofluorescencia, aunque es un buen método, sobradamente experimentado, para su realización requiere ciertas servidumbres, como tejido fresco, criotomo para obtener cortes por congelación, microscopio de fluorescencia, realizar el estudio de las preparaciones en un corto espacio de tiempo, etc. Sin embargo, la PAP, que ya ha sido utilizada en el pulmón¹⁰, ofrece muchas ventajas. El tejido a utilizar se puede incluir en parafina y cortar a siete micras; el procesado en parafina es muy interesante para los trabajos experimentales, ya que los cortes no son perecederos, y se pueden guardar para contrastarlos todos juntos, con lo que se consigue un mejor control de los falsos positivos y negativos. En este método, se pueden teñir los núcleos celulares, por lo que hay una mejor relación con el tejido. Todas estas razones, junto a la gran sensibilidad del método (la inmunofluorescencia sólo opone una molécula de fluorocromo al antígeno frente a las tres de cromógeno que presenta la PAP), hacen que se esté extendiendo su uso a todos los laboratorios de anatomía patológica y de investigación.

Los detractores de la PAP, le achacan que la presencia de peroxidasa endógena pueda dar falsos positivos, hecho que se ha solucionado, introduciendo los cortes, en un primer paso, en una solución que contenga H_2O_2 , y realizando los controles que corresponden a una técnica tan sofisticada.



La sistematización de los hallazgos descritos (tabla I), puede servir para plantear los pasos de un proceso evolutivo de cuatro fases:

1.^a fase: (corresponde al grupo I), hay una proliferación de neumocitos tipo II, lo que indica una respuesta inespecífica del alveolo¹¹; hay también una alteración de la permeabilidad de la barrera alveolo-capilar, que se manifiesta por la presencia de macrófagos cargados de hemosiderina, procedente ésta, de la hemoglobina que ha tenido que pasar el filtro «endotelio-alveolar». Estos macrófagos, contrastados tan selectivamente, están pegados a los septa y en su intersticio, por lo que se pueden catalogar de macrófagos alveolares e intersticiales. Los macrófagos alveolares se encuentran adosados a las paredes alveolares, hasta que cumplen su función, entonces o se desprenden a la luz alveolar para ser expulsados al exterior o, bien, se introducen en el intersticio¹².

La causa de este aumento de la permeabilidad, está en los depósitos de IgG de conejo en torno a los vasos¹³, demostrados con la PAP, y de los macrófagos alveolares apoyados en la pared del vaso, que han digerido el epitelio y provocado una solución de continuidad en la MBA. Dentro de la clasificación que hicieron Crystal et al^{14,15} sobre la respuesta inmunitaria del pulmón, se podría incluir también en la primera fase, ya que en ella describen una activación de macrófagos para reconocimiento del antígeno. Se ha producido una alveolitis.

2.^a fase: (corresponde al grupo II), se caracteriza por una inflamación de los vasos, aunque no se ha comprobado necrosis perivascular. Sobre la presencia de leucocitos dentro de los capilares pulmonares, se ha de precisar que el material procesado para cortes semifinos (fig. 5) y microscopía electrónica, fue perfundido, con lo que la sangre, junto con la mayoría de sus elementos formes, fue empujada de la circulación pulmonar, pudiendo quedar sólo algún hematíe en los capilares; los leucocitos están adheridos a la pared de los vasos, como muy bien ha demostrado la microscopía electrónica. En síntesis, el aumento de tamaño de los núcleos de las células endoteliales, la presencia de leucocitos en el interior de los vasos, adheridos a sus paredes, y la demostración de IgG de conejo en el capilar alveolar, es indicio de un proceso vasculítico, que caería dentro de la enfer-

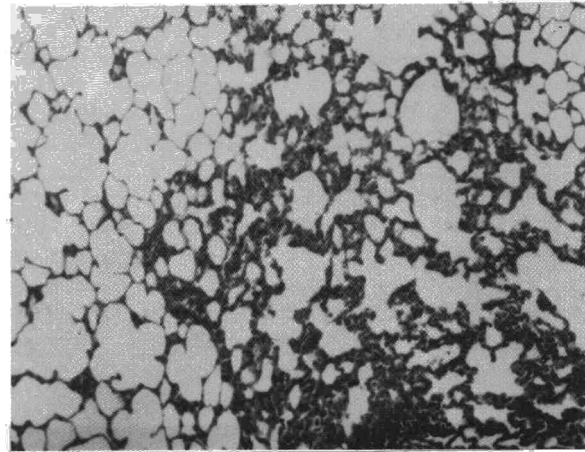


Fig. 8. Pulmón de rata del grupo V. Zona de enfisema junto con zona de engrosamiento septal (× 100).

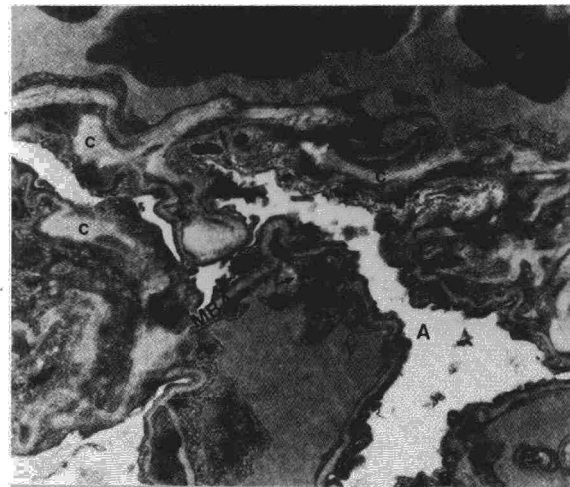


Fig. 9. Detalle de la pared alveolar de rata del grupo V. Hay un aumento de la colágena (C) entre el endotelio capilar y el epitelio alveolar, junto con proliferación de pericitos (flechas) (× 4,500).

medad del suero¹³. Crystal et al^{14,15} no pudieron describir esta fase porque sus estudios fueron realizados fundamentalmente en cultivos celulares.

3.^a fase: (corresponde al grupo III), hay proliferación celular. Eskenasy et al¹⁶⁻¹⁸, estudiaron la reactivi-

TABLA I
Sistematización de los hallazgos

	PAP	hemosiderina en macrófagos alveolares	leucocitos en los capilares	células septales	fibrosis
GRUPO I	+	+	-	-	-
GRUPO II	+	-	+	-	-
GRUPO III	+	-	+	+	-
GRUPO IV	+	-	+	+	-
GRUPO V	+	-	+	-	+



vidad del mesénquima pulmonar, tras la administración de un antígeno potenciado con adyuvante completo, y demostraron como los animales previamente sensibilizados, presentaban un aumento de células pironinófilas (ricas en ácidos nucleicos), que tienen gran poder mitótico y secretor. Crystal et al^{14,15} identifican en ellas macrófagos y fibroblastos.

4.^a fase: correspondería a la 3.^a fase descrita por Crystal et al^{14,15}. El tejido pulmonar fagocitado por los macrófagos, es reemplazado por tejido fibroso, perdiendo su arquitectura y elasticidad características. Esta fase corresponde principalmente a los animales del último grupo, en los que junto a zonas de engrosamiento de las paredes alveolares, aparecen otras enfisematosas. Para algunos autores¹⁹, el aumento del componente fibrilar del pulmón es suficiente para catalogarlo de fibrosis; sin embargo, los más exigentes consideran que es el aumento de la colágena tipo III (difícil de contrastar al microscopio electrónico) sobre la tipo I, lo que define a la fibrosis pulmonar¹⁰. En nuestros casos, la colágena demostrada en los septa, se ha contrastado peor que la peribronquial, lo que puede inducir a pensar que sea de tipo III, ya que la única manera de demostrar los diferentes tipos de colágena en el tejido, es la inmunohistoquímica específica para estas fibras, que no se ha realizado.

AGRADECIMIENTOS:

Los autores agradecen a M.^a Carmen Francisco Tomás su valiosa colaboración para la elaboración del material fotográfico, y a los laboratorios Operón, el suero anti-MBG proporcionado.

BIBLIOGRAFIA

1. Naguya H, Filmore M, Ford CD. Idiopathic interstitial pulmonary fibrosis. An immune-complex disease? *Am Rev Respir Dis* 1973; 107:826-830.
2. Holgate ST, Haslam P, Turner-Warwick M. The significance of antinuclear and DNA antibodies in criptogenetic fibrosing alveolitis. *Thorax* 1983; 38:67-80.
3. Haslam P. Terapéutica en las neumopatías intersticiales. *Symposium Internacional de Neumología, patología intersticial y pulmonar*. Sevilla 1983; Libro del congreso: 167-187.

4. Masugi M. Uber die experimentelle Glomerulonephritis durch das spezifisch Antinierenserum. Ein Beitrag zur Pathogenese der diffusen Glomerulonephritis. *Beitr Pathol* 1934; 92:429.
5. Krakowe CA, Greenspon SA. Localisation of the nephrotoxic antigen within the isolated renal glomerulus. *Arch Pathol* 1951; 51:629-644.
6. Bill A. Plasmaprotein dynamic: albumin and IgG capillary permeability extravascular movement and regional blood flow in immunoestabilised rabbits. *Acta Physiol Scand* 1977; 101:28-42.
7. López Burbano LF. Transformaciones experimentales de sustratos filtrantes tras acción inmunológica. (Estudio comparativo del comportamiento de la barrera alveolo-capilar y el filtro glomerular.) Tesis Doctoral, Zaragoza 1984.
8. Escolar Castellón JD, Canales V, López Burbano LF. Transformaciones ultraestructurales por acción antigénica. *An Anat* 1983; 32:239-248.
9. Burns J. Background staining and sensitivity of the unlabeled antibody-enzyme (PAP) method. Comparison with the peroxidase labeled antibody sandwich method using formalin fixed paraffin embedded material. *Histochemistry* 1975; 43:291-294.
10. Fox B, Shouha S, James KR, Mille GC. Immunohistological study of human lungs by immunoperoxidase technique. *J Clin Pathol* 1980; 35:144-150.
11. Williams MC, Mason RJ. Development of the type II cell in the fetal rat lung. *Am Rev Respir Dis* 1977; 115:37-47.
12. Green GM. Alveolobronchiolar transport mechanisms. *Arch Intern Med* 1973; 131:109-114.
13. Cupps TR, Fauci AS. Fisiopatología de las vasculitis. En: *Las vasculitides*. Ed Intermédica, 1983; 5-18.
14. Crystal RG, Bitterman PB, Rennard SI, Hance AJ, Keogh BA. Interstitial lung diseases of unknown cause: disorders characterized by chronic inflammation of the lower respiratory tract. *N Engl J Med* 1984; 310:154-166.
15. Crystal RG, Bitterman PB, Rennard SI, Hance AJ, Keogh A. Interstitial lung diseases of unknown cause. Disorders characterized by chronic inflammation of the lower respiratory tract (second of two parts). *N Engl J Med* 1984; 310:235-244.
16. Eskenasy A. L'immuno-morphologie du phenomene d'Arthus experimental du poumon. *Rev Imm* 1971; 35:85-101.
17. Eskenasy A, Galbenu P. Contributions a la immunomorphologie de la sensibilisation. (Les reactions du mesenchyme pulmonaire a la serum globuline bovines). *Arch Rium Path Exp Microbiol* 1969; 28:471-483.
18. Eskenasy A, Ionesco J, Nitzulesco G. Contribution a la immunomorphologie de la sensibilisation. (XI note; la reaction pulmonaire d'hypersensibilité provoquée par les aérosols de tuberculoproteine.) *Rev Imm* 1970; 43:343-355.
19. Winterbarner RH, Hammar SP, Hallman KO, Hays JE, Pardes WE, Morgan EH et al. Neumonía intersticial difusa. Correlación clínico-patológica en 20 pacientes tratados con prednisona/azatioprina. *Am J Med (ed esp)* 1978; 8:308-318.
20. Weinberger SE, Crystal RG. Reacciones del espacio intersticial frente a la agresión. *Tratado de Neumología*. AP Fishman. Ed Doyma 1983; 610-616.