

Peso húmedo del pulmón de conejos diabéticos sometidos a un desafío transtorácico con el lipopolisacárido de *Klebsiella pneumoniae**

Alicia Magdalena Nevárez Garza**
Rosa Elena Franco Lastra**
Claudia Elizabeth Cerda Armijo**
Luis Edgar Rodríguez Tovar**
Rodolfo Niño Fong**
Rafael Ramírez Romero**

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the lung inflammatory response through histopathology and lung wet weight determinations in diabetic rabbits subjected to a challenge with *Klebsiella pneumoniae* lipopolysaccharide (LPS). Two groups were included. Both groups received a transthoracic challenge with LPS directly into their right lungs. The left non-inoculated lungs were used as controls. Animals in Group 1 received the diabetogenic agent alloxan 110 days previously, whereas controls (Group 2) received saline solution. Five days after the challenge rabbits were euthanized. Histopathological examinations were similar in both groups however, lung wet weights showed that diabetic animals had a decreased lung inflammatory response compared to the control ones. These results agree with reports of deficiencies in the inflammatory response and repair mechanisms in diabetics.

Key words: DIABETES, *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* LIPOPOLYSACCHARIDE, LUNG WET WEIGHT, RABBITS.

Resumen

El propósito de este estudio fue evaluar la respuesta inflamatoria del pulmón mediante histopatología y la determinación del peso húmedo pulmonar en conejos diabéticos sujetos a un desafío con lipopolisacárido (LPS) de *Klebsiella pneumoniae*. Fueron incluidos dos grupos. Ambos recibieron un desafío transtorácico con LPS directamente en los pulmones derechos. Los pulmones del lado izquierdo no inoculados se usaron como testigos. Los animales del grupo 1 recibieron el agente diabetogénico aloxana 110 días antes de la inoculación, mientras que los testigos (grupo 2) recibieron solución salina fisiológica. Cinco días después del desafío los conejos fueron sacrificados. El estudio histopatológico fue similar en ambos grupos; sin embargo, los pesos húmedos de los pulmones mostraron que los animales diabéticos tuvieron una disminución en la respuesta inflamatoria comparada con los testigos. Estos resultados concuerdan con los informes de deficiencias en la respuesta inflamatoria y mecanismos de reparación en diabéticos.

Palabras claves: DIABETES, *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*, LIPOPOLISACÁRIDO, PESO HÚMEDO DEL PULMÓN, CONEJOS.

Recibido el 16 de octubre de 1996 y aceptado el 31 de enero de 1997.

* Proyecto parcialmente financiado con apoyo del Conacyt a través del Sistema de Investigación Alfonso Reyes (Sireyes).

**Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Nuevo León. Av. Lázaro Cárdenas 4600, Unidad Mederos, Monterrey, 64930, Nuevo León. México.

Se ha considerado a la *diabetes mellitus* (DM) como la enfermedad metabólica de mayor importancia en los seres humanos.⁹ Al respecto, se calcula que aproximadamente 5% de la población mundial la padece.¹¹ Las infecciones bacterianas de la piel, de las vías urinarias y del sistema respiratorio, se encuentran entre las complicaciones más frecuentes en personas con DM mal controlada.^{15,17,23} Se ha demostrado que esta elevada susceptibilidad a las infecciones se debe a deficiencias, tanto en la respuesta inmune como en los mecanismos de inflamación y reparación tisular.^{3,23}

Las bacterias gram-negativas, como *Klebsiella pneumoniae*, pueden provocar severas neumonías y complicaciones sistémicas a pesar de la actual disponibilidad de potentes compuestos antimicrobianos.¹⁴ Se ha confirmado que los lipopolisacáridos (LPS), componentes esenciales para la viabilidad de las bacterias gram-negativas,¹⁶ son los responsables de la patología pulmonar y de las severas manifestaciones clínicas derivadas. Lo anterior a través de la producción de citocinas, principalmente interleucina-1 y factor de necrosis tumoral, por parte de las células encargadas de instaurar la respuesta inflamatoria, luego que han sido activadas por los LPS.^{16,21}

Recientemente se ha descrito un modelo de daño pulmonar en el ratón empleando LPS de *K. pneumoniae*. En este modelo los animales reciben un desafío directo sobre el pulmón a través de una inoculación transtorácica y la respuesta inflamatoria es evaluada mediante el peso de los pulmones e histopatología; subsecuentemente, los valores de los pesos pulmonares son comparados mediante un simple procedimiento estadístico para reconocer diferencias significativas entre los grupos.¹² El objetivo en el presente experimento fue reproducir este modelo, ahora en conejos, incluyendo un grupo que por largo tiempo padeció DM tipo I no controlada. Se supuso que los animales diabéticos mostrarían una respuesta inflamatoria en sus pulmones más severa que los animales normales.

Se emplearon veinte conejos Nueva Zelanda con un peso promedio de 2.2 kg al inicio del experimento. Los animales se mantuvieron en condiciones convencionales con agua y alimento comercial *ad libitum*. Se establecieron dos grupos, el grupo 1 diabético y el grupo 2 testigo.

Los animales en el grupo 1 recibieron el compuesto diabotogénico aloxana* por vía endovenosa en una sola dosis de 150 mg/kg.^{5,7,13} Los conejos en el grupo 2 recibieron solamente el vehículo, 1.0 ml de solución salina fisiológica. Una semana después se obtuvo una muestra de sangre de todos los animales para determinar los niveles de glucosa sanguínea, mediante la prueba de O-toluidina. Se demostró que los niveles de glucosa sanguínea en el grupo 1 fueron superiores (media: 666.56 mg/dl) cuando se compararon con los del grupo 2 (media: 70.70 mg/

Cuadro 1
DISEÑO EXPERIMENTAL

Días	Grupo 1 (Diabéticos)	Grupo 2 (No diabéticos)
0	Inoculación con aloxana ^a	Inoculación con solución salina fisiológica ^a
8	Determinación de glucosa sanguínea (O-toluidina)	Determinación de glucosa sanguínea (O-toluidina)
110	Desafío transtorácico (pulmón derecho) <i>K. pneumoniae</i> LPS ^b	Desafío transtorácico (pulmón derecho) <i>K. pneumoniae</i> LPS ^b
115	Eutanasia, determinación del peso pulmonar en ambos pulmones ^c	Eutanasia, determinación del peso pulmonar en ambos pulmones ^c

^a Se administró aloxana en una sola dosis de 150 mg/kg, contenida en 1.0 ml de solución salina fisiológica. El grupo no diabético recibió solamente 1.0 ml del vehículo. La inoculación fue endovenosa.

^b El LPS se administró a ambos grupos en dosis de 500 mg, contenida en 0.2 ml de solución salina fisiológica.

^c Después de las determinaciones de los pesos, los pulmones se procesaron para histopatología.

dl) ("t" de Student $P < 0.05$).¹⁹ Los rangos normales para glucosa sanguínea en el conejo Nueva Zelanda van de 50 a 140 mg/dl.⁴ Los animales de ambos grupos fueron desafiados 102 días después del examen de glucosa sanguínea. Es importante comentar que para entonces todos los animales del grupo 1 mostraron polidipsia, poliuria, polifagia y emaciación y algunos de ellos también lesiones oculares, las cuales posteriormente demostraron ser sinequias y cataratas.

Se usó para el desafío un LPS comercial** obtenido de *K. pneumoniae* por extracción con fenol. Todos los animales recibieron 500 µg del LPS disueltos en 0.2 ml de solución salina fisiológica. Para la inoculación transtorácica los animales fueron anestesiados con ketamina y maleato de acepromazina y posteriormente, luego de una preparación aséptica de la zona, fueron inoculados en el pulmón derecho. En el Cuadro 1 se presenta el diseño experimental.

Cinco días después del desafío los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico para luego proceder a su eutanasia por un desangramiento seccionando la aorta abdominal. Luego se abrió la cavidad torácica para remover los pulmones. Se registraron tanto los cambios macroscópicos como los pesos de los órganos. Este procedimiento se llevó a cabo tanto en los pulmones inoculados (derechos) como en los no inoculados (izquierdos).

Subsecuentemente, los pulmones se fijaron en formalina al 10% amortiguada para su posterior proceso histopatológico rutinario.²⁰ Es importante comentar que un animal en el grupo 1 (diabéticos) murió a las 4 horas posteriores

* 2, 4, 5, 6 - Tetraoxypyrimidine; 5, 6 - Dioxyuracil. Monohydrate Crystalline, Sigma Chemical Company. USA.

**Sigma Chemical Company, USA.

al desafío. Esta condición fue atribuida a un choque endotóxico, por lo que los datos concernientes a sus pulmones no fueron incluidos.

Con los datos obtenidos de los pesos de los pulmones se realizaron las siguientes comparaciones: pulmones inoculados (derechos) de animales diabéticos (grupo 1) contra pulmones inoculados de animales no diabéticos (grupo 2) y, pulmones no inoculados (izquierdos) en animales diabéticos contra pulmones no inoculados en animales no diabéticos. El procedimiento estadístico para estas comparaciones fue una prueba "t" de Student.¹⁹

Los pulmones derechos, tanto en el grupo 1 como en el grupo 2, se mostraron turgentes, congestionados y con zonas de consolidación rojo-grisáceas asociadas con el sitio del inóculo. La mayoría de los pulmones izquierdos no presentaron cambios apreciables en ambos grupos; sólo en algunos se reconoció congestión generalizada. Microscópicamente, en los pulmones derechos se apreció: áreas con severa hemorragia y necrosis y en zonas adyacentes abundante exudado serofibrinoso. Las células infiltrantes en la lesión fueron mayormente polimorfonucleares (heterófilos) (PMN) y macrófagos. También se reconoció pleuritis fibrinosa en la zona correspondiente al sitio de inoculación, la cual siempre presentó las lesiones más severas. Histológicamente no se reconocieron diferencias en la gravedad de las lesiones entre los grupos 1 y 2.

Por otra parte, no se reconocieron cambios significativos en los pulmones izquierdos (no inoculados) en ambos grupos.

Los valores de los pesos de los pulmones derechos (inoculados) demostraron ser diferentes entre los grupos, siendo los del grupo 2 (testigo) significativamente mayores que los del grupo 1 (diabético) ($P < 0.05$). En cambio, los valores de los pesos de los pulmones izquierdos no resultaron diferentes entre los grupos ($P > 0.05$). En los cuadros 2 y 3 se resumen estos datos.

Se ha referido en anteriores trabajos que el peso húmedo de los pulmones es influido por la infiltración celular, el edema y la hemorragia durante un proceso inflamatorio, y que, por lo tanto, resulta un buen indicador de la intensidad de la respuesta inflamatoria.^{6,12} Con este fundamento, el valor de los pesos pulmonares fue utilizado como un estimador directo de la intensidad de la respuesta inflamatoria; además, los valores obtenidos permitieron reconocer una diferencia significativa mediante un sencillo procedimiento estadístico, como se ha señalado anteriormente.¹² Esta diferencia no pudo ser detectada durante la interpretación histopatológica de la severidad de las lesiones.

Los resultados aquí obtenidos demostraron que los valores de los pesos de los pulmones que recibieron el inóculo del LPS fueron diferentes y que esa diferencia correspondió a un peso menor de los pulmones de los animales diabéticos. Puesto que el peso de los pulmones no inoculados resultó similar en ambos grupos, los valores de los pulmones inoculados debe ser el resultado de una auténtica diferencia en la capacidad de respuesta inflamatoria

Cuadro 2
COMPARACION DE LAS MEDIAS DE LOS PESOS
DE LOS PULMONES NO INOCULADOS EN AMBOS
GRUPOS

	Media	Desviación estándar
Grupo 1 (diabéticos)	3.54 ^a g +/-	0.43
Grupo 2 (no diabéticos)	3.89 ^a g +/-	0.42

^{aa} Literales semejantes representan diferencias no significativas ($P > 0.05$) entre los grupos, empleando una prueba "t" de Student.

hacia el LPS. Esta diferencia pudo corresponder a una respuesta inflamatoria más intensa en el grupo testigo o bien a una deficiencia en la capacidad flogística del grupo diabético; los datos apoyan más esto último.

Estudios previos de otros investigadores^{5,7,13} y también trabajos realizados en este laboratorio,²⁸ han demostrado que la aloxana es un efectivo agente diabetogénico y que la DM inducida es permanente. En este trabajo, después de una semana de la administración endovenosa de la aloxana o, en su caso, de solución salina fisiológica en el grupo testigo, se demostró que los niveles de glucosa sanguínea fueron significativamente mayores en los animales que recibieron el compuesto químico; además, en estos animales se reconocieron signos clínicos compatibles con el estado de hiperglicemia.¹⁰ Sin embargo, el estado diabético inducido por la aloxana no influyó en el peso de los pulmones puesto que no se reconocieron diferencias significativas en el peso de los pulmones no inoculados.

Inicialmente se supuso que los animales diabéticos tendrían una respuesta inflamatoria más severa porque, como ha sido señalado, las personas con DM mal controlada tienen una mayor susceptibilidad a las infecciones y las lesiones asociadas resultan más graves en comparación con los no diabéticos o con los diabéticos sujetos a un control estricto.¹⁷ Inclusive, se ha reconocido que el estado de hiperglicemia en la DM es un factor que agrava las

Cuadro 3
COMPARACION DE LAS MEDIAS DE LOS PESOS DE LOS
PULMONES INOCULADOS EN AMBOS GRUPOS

	Media	Desviación estándar
Grupo 1 (diabéticos)	5.28 ^a g +/-	0.80
Grupo 2 (no diabéticos)	6.15 ^b g +/-	0.74

^{ab} Literales diferentes representan diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los grupos, empleando una prueba "t" de Student.

lesiones y prolonga el curso de los padecimientos neumónicos.¹ Sin embargo, nuestros resultados apuntan hacia una deficiencia en la respuesta inflamatoria de los animales diabéticos.

Se ha confirmado que los problemas metabólicos derivados de un estado diabético provocan alteraciones en los mecanismos de defensa; por ejemplo, en los PMN se ha reconocido una disminución en su capacidad fagocítica y bactericida; asimismo, una reducida respuesta quimiotáctica y una débil adherencia endotelial. Por otra parte, también se ha observado una reducida acción opsonizante del suero y una respuesta inmune celular menos eficiente en las personas diabéticas.^{15,23} Estas alteraciones corresponden con una respuesta inflamatoria subnormal y, por lo tanto, son compatibles con los resultados en el presente trabajo. Inclusive, en modelos animales de hipersensibilidad pulmonar se ha reconocido que la respuesta inflamatoria ante el antígeno, es menor en animales diabéticos en comparación con los testigos.^{8,22} Esta deficiencia en la respuesta inflamatoria pulmonar de animales hipersensibilizados no está relacionada con una producción menor de anticuerpos.

Es probable que la presentación de lesiones más severas en las personas diabéticas no provenga de una respuesta inflamatoria más intensa, sino de un proceso de reparación tisular ineficiente.² De hecho, la respuesta inflamatoria y la reparación son parte de un mismo proceso¹⁸ y, por ende, la evolución de uno de ellos está relacionada con el desarrollo del otro. Entonces, si la parte inflamatoria del proceso es defectuosa, también se presentarán deficiencias en la parte restauradora. Como se sabe, la cicatrización de las heridas es también un grave problema en los diabéticos;³ al respecto, se ha confirmado una resolución tardía de lesiones cutáneas inducidas mediante la reacción local de Shwartzman, en conejos diabéticos.²

Se concluye que ante la exposición transtorácica con el LPS de *K. pneumoniae*, la respuesta inflamatoria del pulmón de conejos diabéticos se encuentra disminuida en comparación con la registrada en animales normales.

Literatura citada

- Cassiere, H., Rodrigues, J.C. and Fein, A.M.: Delayed resolution of pneumonia. *Postg. Med.*, 99:151-158 (1996).
- Cerda-Armijo, C.E.: Evolución de la reacción local de Shwartzman en conejos diabéticos. Tesis de licenciatura. *Fac. de Med. Vet. y Zoot.* Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N.L., México, 1994.
- Goodson, W.H., Radolf, J. and Hunt, T.K.: Cicatrización de las heridas en la diabetes. En: Cicatrización e Infección de las Heridas. Editado por: Hunt, T.K., 107-128. *El Manual Moderno*, México, D.F., 1983.
- Kozama, C., Macklin, W., Cummins, L.M. and Mauer, R.: Anatomy, physiology and biochemistry of the rabbit. In: *The Biology of the Laboratory Rabbit*. Edited by: Weisbroth, S.H., Flatt, R.E., Kraus, A.L., 50-72. *Academic Press*, New York, 1974.
- Malaise, W.J., Malaise-Lagae, F., Sener, A. and Pipeleers, D.G.: Determinants of the selective toxicity of alloxan to the pancreatic B cell. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79:927-930 (1982).
- Martinez-Burnes, J., Lopez, A., Merino-Moncada, M., Ochoa-Galvan, P. and Mondragon, I.: Pulmonary recruitment of neutrophils and bacterial clearance in mice inoculated with aerosols of *Pasteurella haemolytica* or *Staphylococcus aureus*. *Can. J. comp. Med.*, 49:327-332 (1985).
- Mordes, J.P. and Rossini, A.A.: Animal models of diabetes. *Am. J. Med.*, 70:353-360 (1981).
- Nevárez-Garza, A.M.: Evaluación de la respuesta inflamatoria provocada por la reacción de Arthus en el pulmón del conejo. Tesis de licenciatura. *Fac. de Med. Vet. y Zoot.* Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N.L., México, 1991.
- Notkins, A.L.: The cause of diabetes. In: *Cell Communication in Health and Disease*. Edited by: Rasmussen, H., 130-148. *W.H. Freeman and Co.*, New York, 1991.
- Ofulue, A.F., Khadempour, M.H. and Thurlbeck, W.M.: Diminished levels of insulin-like growth factor-I in lungs in streptozotocin-induced diabetes: Relation to nutritional status and growth. *Exp. Lung Res.*, 20:27-40 (1994).
- Porte Jr., D. and Schwartz, M.W.: Diabetes complications: Why is glucose potentially toxic? *Science*, 272:699-700 (1996).
- Ramírez-Romero, R., Barrera-Zamora, C. y Hernández-Páez, S.J.J.: Tolerancia temprana versus reacción de Shwartzman en un modelo de daño pulmonar en el ratón empleando lipopolisacárido de *Klebsiella pneumoniae*. *Vet. Méx.*, 25:137-140 (1994).
- Ramos-Rodríguez, H.G. y Méndez, J.D.: Diabetes mellitus experimental. *Cienc. Vet.*, 6:347-362 (1994).
- Rani, M., Gupta, R.K. and Chhibber, S.: Protection against *Klebsiella pneumoniae* induced lobar pneumonia in rats with lipopolysaccharide and related antigens. *Can. J. Microbiol.*, 36:885-890 (1990).
- Rayfield, E.J., Ault, M.J., Keusch, G.T., Brothers, M.J., Nechemias, C. and Smith, H.: Infection and diabetes: The case for glucose control. *Am. J. Med.*, 72:439-450 (1982).
- Rietschel, E.T. and Brade, H.: Bacterial endotoxins. *Sci. Am.*, 267:54-61 (1992).
- Suárez-Regalado, A., Higuera-Ramírez, F., García-Romero, J. e Hidalgo-Loperena, H.: Diabetes mellitus e infección. *Rev. Méd. Hosp. Gen. Méx.*, 52:7-14 (1989).
- Slauson, D.O. and Cooper, B.J.: Mechanisms of Disease. *Williams & Wilkins*, Baltimore, Maryland, 1990.
- Steel, R.G.D. and Torrie, J.H.: Principles and Procedures of Statistics. *McGraw-Hill*, Singapore, 1981.
- Thompson, S.W.: Selected Histochemical and Histopathological Methods. *Charles C. Thomas*, Springfield, Illinois, 1966.
- Ulich, T.R., Watson, L.R., Yin, S., Guo, K., Wang, P., Thang, H. and Castillo del, J.: The intratracheal administration of endotoxin and cytokines I. Characterization of LPS-induced IL-1 and TNF mRNA expression and the LPS-, IL-1 and TNF-induced inflammatory infiltrate. *Am. J. Pathol.*, 138:1485-1496 (1991).
- Vianna, E.O. and Garcia-Lame, J.: Allergen-induced airway inflammation in rats. Role of insulin. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 151:809-814 (1995).
- Walling, D.M. and Kaelin, W.G.: Pyomyositis in patients with Diabetes mellitus. *Rev. Infect. Dis.*, 13:797-802 (1991).