

# Histopatología inducida por inhalación de pegantes tipo boxer en animales de experimentación

De Vivero Camacho Andres\*, Combariza Vallejo Juan Felipe\*\*, Ojeda León Paulina\*\*\*

## RESUMEN

El objetivo principal es identificar y describir los cambios histopatológicos en el pulmón, tras la inhalación de pegantes tipo Boxer.

**Materiales y métodos:** se utilizaron 100 ratones de experimentación, distribuidos en cuatro grupos así: Grupo A: 10 ratones usados como control, Grupo B: 30 ratones expuestos a humo de cigarrillo durante una hora al día, Grupo C: 30 animales expuestos a 10 cc de Boxer durante una hora diaria, Grupo D: 30 ratones expuestos a la inhalación de 10 cc de Boxer permanentemente; todos los animales se fueron sacrificando a lo largo de ocho meses. Se realizó estudio macro y microscópico de los pulmones de cada animal y adicionalmente lavado broncoalveolar.

**Análisis estadístico:** se determinó la asociación entre las variables mediante la prueba de chi cuadrado, con un nivel de significancia estadística del 5%.

**Resultados:** se encontró hiperplasia del epitelio de la pared bronquiolar en el 88% de los animales, bronquiolitis linfocítica en 71% e infiltrado linfocítico perivascular en el 36.1%. Todos estos datos fueron estadísticamente significativos. Se encontró relación entre la severidad de los cambios y el tiempo y dosis de exposición.

**Palabras clave:** boxer, bronquiolitis, hiperplasia, Lavado Broncoalveolar (BAL).

## SUMMARY

The principal objective is to identify and describe histopathological changes in the lung, after the inhalation of Boxer-type adhesive substances.

**Materials and methods:** One hundred experimental mice were used and distributed in four groups as follows: Group A: 10 mice used as control group. Group B: 30 mice exposed to cigarette smoke during one hour daily. Group C: 30 animals exposed to 10 cc of Boxer one hour daily, and Group D: 30 mice exposed to inhalation of 10 cc of Boxer permanently; all animals were periodically killed throughout the 8 months of exposition. Lungs macro and microscopic changes were studied; additionally, BAL was used.

**Statistical analysis:** Associations between variables were determined using chi-square method, with a 5% statistic significance level.

**Results:** Hyperplasia of the bronchiolar wall epithelium was found in 88% of the animals, lymphocytic bronchiolitis in 71% and perivascular lymphocytic inflammation in 36.1%. All were statistically significant. A relation between severity of changes, time and dose of exposition was found.

**Keywords:** boxer, bronchiolitis, Bronchoalveolar lavage (BAL), hyperplasia.

## INTRODUCCIÓN

El boxer es un pegante sintético hecho a base de caucho que utiliza como solvente el tolueno, un hidrocarburo aromático ampliamente utilizado en el sector industrial.

En Colombia miles de personas inhalan esta sustancia por sus efectos estimulantes y anorexiantes. Aunque sus efectos sistémicos se han estudiado, es poca la literatura que se encuentra acerca de los efectos pulmonares derivados de su uso crónico. Por este motivo nos interesamos en hacer un estudio experimental cuyo objetivo principal es identificar y describir los cambios histopatológicos en el pulmón y Lavado

Broncoalveolar (BAL) tras la inhalación de pegantes tipo Boxer, teniendo en cuenta la influencia del tiempo y la dosis de exposición en los mismos.

Se espera que las conclusiones obtenidas sirvan como punto de partida para estudiar, prevenir y/o manejar la patología respiratoria derivada del uso crónico de Boxer en seres humanos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio experimental utilizando animales de laboratorio, comparando los datos obtenidos de animales expuestos con aquellos obtenidos de un grupo control.

\* Internista. Residente 2 año de Neumología, Hospital Santa Clara-Universidad El Bosque. Bogotá.

\*\* Internista Clínica El Bosque. Bogotá.

\*\*\*Jefe Departamento de Patología del Hospital Santa Clara de Bogotá.

Se utilizaron 100 ratones exocriados (no emparentados genéticamente) de raza ICR blancos de seis semanas de edad, 50 hembras y 50 machos. Las hembras con un peso entre 27 y 28 gr y los machos con un peso entre 28 y 29 gr, que fueron seleccionados aleatoriamente en cuatro grupos distribuidos de la siguiente manera:

Grupo A: control. Conformado por 10 ratones que no fueron expuestos a ningún tóxico.

Grupo B: exposición a cigarrillo. Conformado por 30 ratones que fueron expuestos a la inhalación de humo de cigarrillo durante una hora al día, todos los días, por un período de ocho meses.

Grupo C: exposición al pegante tipo Boxer 1. Conformado por 30 ratones que fueron expuestos a la inhalación de 10 cc de pegante tipo Boxer durante una hora diaria, todos los días por un período de ocho meses.

Grupo D: exposición al pegante tipo Boxer 2. Conformado por 30 ratones que fueron expuestos a la inhalación de 10 cc del pegante tipo Boxer durante 24 horas al día, todos los días por un período de ocho meses.

Los cuatro grupos de ratones fueron mantenidos en cámaras de vidrio de 60 cm de largo, 30 cm de ancho, y 40 cm de alto con tapa removible asegurando su hermetismo durante las exposiciones. El tipo de inhalante fue el pegante tipo Boxer comercial (para el grupo C y D) y para el grupo B cigarrillo comercial con filtro. Las jaulas se mantuvieron en un salón de aproximadamente 10 por 15 mts, a temperatura ambiente, aislados de contaminantes ambientales y ruido.

Fueron excluidos 17 ratones que murieron antes de haber sido expuestos a alguna de las sustancias descritas, o cuyo estudio *post-mortem* reveló algún tipo de patología diferente de aquella producida por las sustancias que se utilizaron en el estudio, tales como lo fue la hipoxia aguda severa y neumonía infecciosa.

Durante el estudio se fueron sacrificando los ratones paulatinamente, a los 7, a los 15 días y posteriormente cada 6 semanas hasta completar 7 sacrificios, los cuales se realizaban mediante la instilación intraperitoneal de 1 cc de lidocaína. Luego del sacrificio se realizó Lavado Broncoalveolar y extracción de

los pulmones de cada animal, para su procesamiento histológico. Los lavados fueron procesados y coloreados con tinción de Diff-Quick, y los cortes pulmonares con tinción de Hematoxilina-Eosina. Además se utilizó tinción para hierro en los animales del grupo B (cigarrillo).

Se realizó un análisis descriptivo de medidas repetidas a través de distribución porcentual y frecuencia de las principales variables referenciadas y evaluando la influencia del tiempo, sustancia y dosis en la información recolectada. Inicialmente se buscó la frecuencia simple de los hallazgos encontrados. Posteriormente se hizo un cruce de variable entre los principales hallazgos, el grupo de exposición y la fecha del sacrificio. Posteriormente, se determinó la asociación entre variables utilizando la prueba de chi cuadrado.

## RESULTADOS

De los 100 animales iniciales únicamente se incluyeron en el estudio 83 ratones, conformando 4 grupos. Ver Tabla 1.

**Tabla 1.** Número y porcentaje de ratones distribuidos por grupo.

GRUPO	Nº DE RATONES	PORCENTAJE	ACUMULADO
A	8	9.6%	9.6%
B	26	31.3%	41.0%
C	22	26.5%	67.5%
D	27	32.5%	100%
TOTAL	83	100.0%	100%

La distribución de ratones por grupos en cada sacrificio se expone en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Distribución de animales por grupo en cada sacrificio.

Sacrificio	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D	Grupo E
1	1	3	3	2	9
2	1	2	3	2	8
3	1	3	3	3	10
4	1	3	2	4	10
5	1	3	3	5	15
7	2	7	4	6	19
Total	8	26	22	27	83

Se encontró hiperplasia del epitelio de la pared bronquiolar en 73 ratones (88%) de los cuales 51 ratones (69.8%) presentaron hiperplasia leve y otros 22 (30.2%) hiperplasia moderada (Foto 1). Los 10 ratones restantes (12%) no presentaron hiperplasia de la pared bronquiolar. De los 51 con hiperplasia leve, el 33.3% pertenecían al grupo B, el 29.4% al grupo C, y el 37.3% al grupo D. De los 22 con hiperplasia moderada, el 40.9% pertenecían al grupo B, el 22.7% al grupo C y el 36.4% al D.

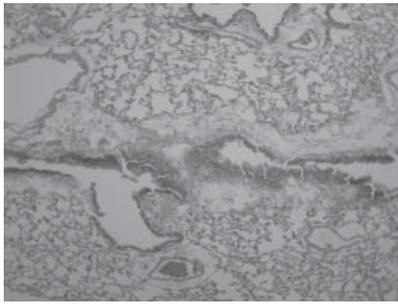
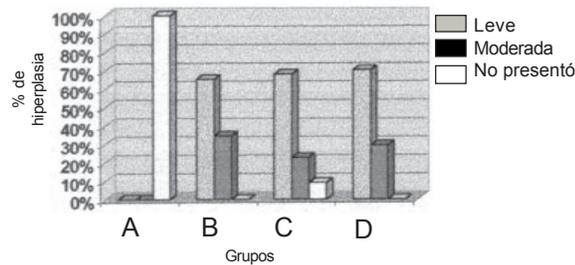


Foto 1. Bronquiolos con hiperplasia del Epitelio. H-E. 10x.

Todos los animales que conformaron el grupo B presentaron hiperplasia epitelial, de los cuales el 65.4% fue leve, y el restante 34.6% moderada. Del grupo C, el 91 % presentó algún grado de hiperplasia, el 68.2% presentó hiperplasia leve, y el 22.7% moderada.

Todos los animales del grupo D presentaron algún grado de hiperplasia. Estos hallazgos son estadísticamente significativos, con un valor de  $p < 0,01$  (Ver Gráfica 1).



Gráfica 1. Distribución del hallazgo hiperplasia en los grupos de exposición.

po B, el 36.4 al grupo C, y el 54.5% al grupo D (Foto 2). El único ratón que presentó bronquiolitis severa pertenecía al grupo D (boxer 24/horas). Estos datos son estadísticamente significativos, con un valor de  $p < 0,01$ . Se evidenció infiltrado linfocítico perivascular en 30 ratones (36.1%), en todos de manera leve. Ninguno perteneció al grupo A. Del grupo B, el 30.8% lo presentó, del grupo C el 31.8% y del grupo D 55.6%. (Foto 3).

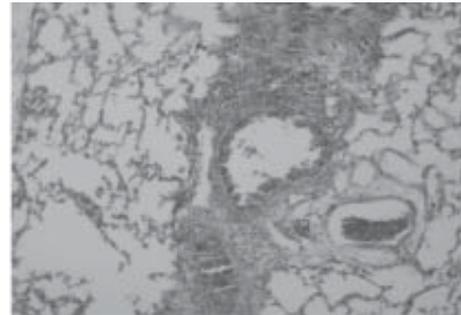


Foto 2. Bronquiolos con infiltrado linfocitario en la pared.

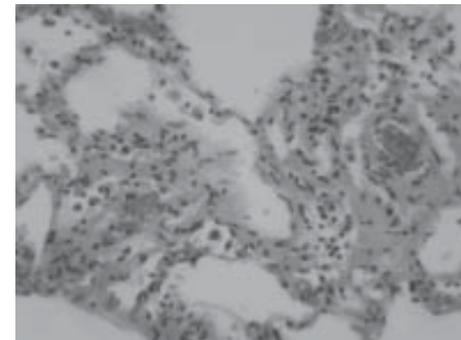


Foto 3. Capillaritis. H-E 40x.

Se encontró bronquiolitis linfocítica en 59 de los 83 animales (71%). 47 animales (79,6%) lo presentaron de forma leve, otros 11 (18.6%) de forma moderada, y uno (1.8%) de manera severa.

Ningún animal del grupo control mostró bronquiolitis linfocítica. La distribución de dicho hallazgo en los otros grupos se aprecia en la Tabla 3.

Del total de los animales con bronquiolitis leve, el 42.6% correspondió al grupo B, el 23.4% al grupo C y el 34% al grupo D. De los que presentaron bronquiolitis moderada el 9.1% correspondió al gru-

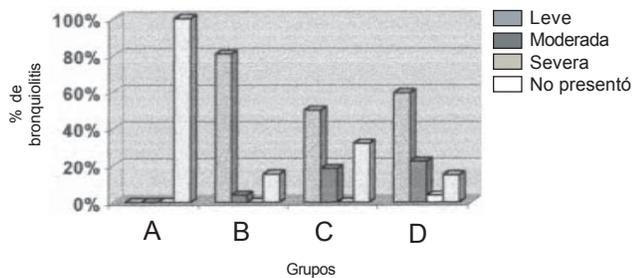
Tabla 3. Distribución del hallazgo de infiltrado linfocítico de la pared bronquiolar según los diferentes grupos de exposición.

GRUPO	INFILTRADO LEVE	INFILTRADO MODERADO	INFILTRADO SEVERO	NO PRESENTÓ	TOTAL
A	0 * 0% ** 0%	0 * 0% ** 0%	0 * 0% ** 0%	8 * 100% ** 33.3%	8 *** 9.6%
B	21 80.7% 42.6%	1 3.8% 9.1%	0 0% 0%	4 15.3% 20.8%	26 31.3%
C	11 50% 23.4%	4 18.2% 36.4%	0 0% 0%	1 31.8% 29.2%	22 26.5%
D	16 59.3% 34%	6 22.2% 54.5%	1 3.7% 100%	4 14.8% 16.1%	27 32.5%

\* Porcentaje sobre el total del grupo.

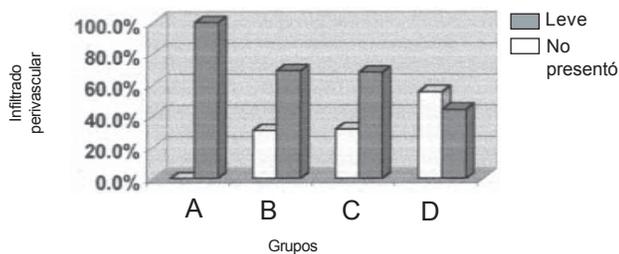
\*\* Porcentaje del total del hallazgo.

\*\*\*Porcentaje sobre el total de los animales.



**Gráfica 2.** Porcentaje de bronquiolitis en los diferentes grupos de exposición.

De otra forma, del total de los animales con este hallazgo positivo el 26.7% correspondió al grupo B, el 23.3% al grupo C y el 50% al grupo D. ( $p = 0.02$ ). **Las diferencias entre los grupos se aprecian en la Gráfica 3.**



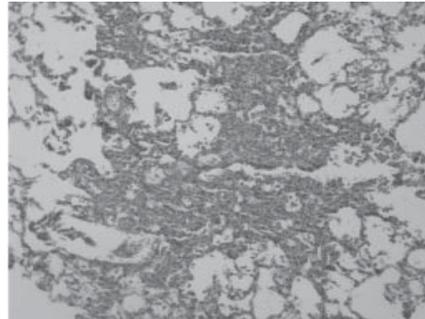
**Gráfica 3.** Porcentaje de infiltrado perivascular según los grupos de exposición.

Se evidenció infiltrado intersticial de tipo linfocítico en 8 (9,6%) de los ratones (Foto 4). De ellos en 6 (75%) fue leve y en los otros 2 (25%) moderado. Macrófagos pardos en la luz alveolar, fueron encontrados en 18 animales, todos ellos pertenecientes al grupo B para un total de 69.2% del mismo (Foto 5). El 88.9% presentó conteo entre 50 y 100 por 10 campos grandes, por lo que fueron clasificados como moderados. Los restantes presentaron un conteo menor de 50 células por 10 campos grandes (leve). Estos datos son estadísticamente significativos ( $p < 0,01$ ). Se evidenció, aunque en menor proporción, presencia leve de macrófagos con pigmento antracótico en la luz alveolar en 7 de los animales expuestos (8.4%); hemorragia alveolar en 3 (3.6%)(Foto 6), una leve y las otras dos moderadas; y edema alveolar (Fotos 7 y 8) en un espécimen.

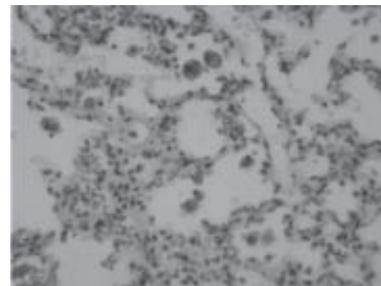
### Lavado broncoalveolar

Se incluyeron en el estudio 70 lavados broncoalveolares debido a que algunas muestras tomadas no pudieron ser procesadas por diversas razones. Entre ellas se encuentran: contaminación de la muestra y muestra insuficiente. Se realizó conteo

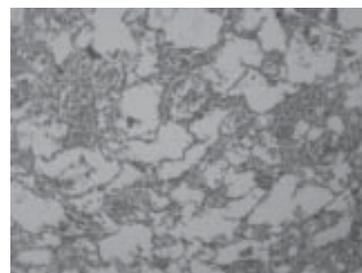
microscópico de 100 células anotando la distribución porcentual de macrófagos, linfocitos y neutrófilos, aceptando como valores normales: macrófagos entre 85 y 95%, linfocitos entre 5 y 15% y neutrófilos del 0 al 1%. La distribución de los BAL incluidos en el estudio según los grupos de exposición se muestran en la Tabla 4.



**Foto 4.** Infiltrado intersticial x células mononucleares. H-E 10x.



**Foto 5.** Presencia de MFG pardos con pigmento antracótico en la luz alveolar. H-E 10x.



**Foto 6.** Pulmón con llenamiento alveolar. H-E 10x.



**Foto 7.** Pulmones de aspecto edematoso y congestivo.

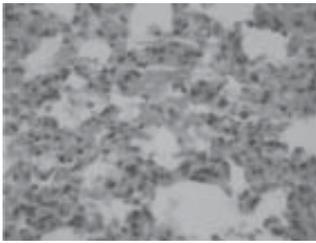


Foto 8. Edema intraalveolar e intersticial. H-E 10x.

Tabla 4. Distribución de lavados broncoalveolares según el grupo.

GRUPO	ANIMALES	PORCENTAJE	% ACUMULADO
A	8	11.4%	11.4%
B	24	34.3%	45.1%
C	19	27.1%	72.8%
D	19	27.1%	100%

Se encontró un conteo de células anormal en el 47.1% de los animales.

La distribución encontrada de lavados anormales según los grupos de exposición fue la siguiente: Todos los lavados del grupo control se encontraban dentro de límites normales, del grupo B un 54.2% de los lavados eran anormales, así mismo fueron anormales el 52.6% de los grupos C y D. Por otro lado de los lavados anormales el 39.4% pertenecían al grupo B, mientras que el 30.3% pertenecía tanto al grupo C, como al grupo D; siendo estos hallazgos estadísticamente significativos con un valor de  $p = 0.04$ .

El número de animales y la distribución porcentual se aprecian más claramente en la Tabla 5.

De los lavados anormales se encontró que un 82.6% tenía un conteo de macrófagos entre 75 y 84%, mientras que el restante 17.4% lo tuvo menor de 75%. El 67.1% de los lavados tuvo un conteo de macrófagos normal.

En cuanto al conteo de linfocitos, se encontró que fue normal en el 64.3% de los lavados. De los anormales, el 72% tuvo conteo linfocítico entre 15 y 20% y el restante 28% tuvo conteos con linfocitos mayores del 20% (Foto 9).

Así mismo se encontró un conteo normal de neutrófilos en el 78.6% de los lavados, del restante 22.4% de lavados anormales, el 86.6% tuvo conteos entre 2 y 4% de neutrófilos, mientras que el 14.4% tuvo un conteo mayor o igual al 15%.



Foto 9. Bal con linfocitosis. Dic Quick. 40x.

Tabla 5. Normalidad de los lavados según los diferentes grupos de exposición.

GRUPO	NORMAL	ANORMAL	TOTAL
A	8 *100% ** 21.6	0 0% 0%	8 ***11.4%
B	11 45.8% 29.7%	13 54.2% 39.4%	24 34.3%
C	9 47.4% 24.3%	10 52.6% 30.3%	19 27.1%
D	9 47.4% 24.3%	10 152.6% 30.3%	19 27.1%
TOTAL	37 52.9%	33 47.1%	70 100%

\* Porcentaje del total del grupo.

\*\* Porcentaje del total del hallazgo.

\*\*\*Porcentaje del total de los animales.

No se apreciaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a las anomalías del lavado y el tiempo de exposición.

Se encontraron cambios en el comportamiento de los animales sometidos a inhalación del pegante tipo Boxer. Aproximadamente a los 15 minutos de iniciada la exposición los animales presentaban agitación motora progresiva y algunos, al final de la exposición presentaban temblor, incoordinación y alteraciones en la marcha. Este hallazgo fue similar en los grupos C y D. Por el contrario los animales sometidos a inhalación de humo de cigarrillo, presentaban sedación y somnolencia, que se iniciaba aproximadamente a los 10 minutos y se mantenía durante toda la exposición.

Estos cambios comportamentales revertían rápidamente luego de suspender la exposición.

## DISCUSIÓN

La inhalación de pegantes tipo Boxer, puede relacionarse con cambios histopatológicos a nivel pulmonar; estos cambios pueden ser tanto inflamatorios como irritativos y parecen estar relacionados con la cantidad de exposición.

La severidad de los cambios varió de acuerdo con el tiempo de exposición, de tal manera se evidencia que el 77.3% de los animales que presentaron hiperplasia moderada fueron sacrificados luego de seis meses de exposición a las diferentes sustancias. Todos los animales que presentaron bronquiolitis linfocítica moderada la presentaron después del quinto mes de exposición. El 56.7% de los animales que presentó infiltrado linfocítico perivascular, lo presentó luego de seis meses de exposición. Los hallazgos presentes en los animales que en este estudio pertenecen a los diferentes grupos de exposición contrastan de manera importante con el hecho de que ningún animal perteneciente al grupo no expuesto, usado como control, presentó algún cambio. Comparando los diferentes grupos de exposición, puede observarse como la inhalación de humo de cigarrillo induce la aparición más temprana aunque menos severa, de cambios inflamatorios que la inhalación de Boxer, ya que aquellos animales del grupo B, presentaron bronquiolitis a partir del primer sacrificio, mientras que los de los grupos C y D lo presentaron desde el tercero. Así mismo se evidencia un ligero aumento en la incidencia y severidad de hiperplasia del epitelio bronquial y bronquiolar, en el grupo D con respecto al grupo C. En el D hubo un 29.6% de hiperplasia moderada, mientras que en el C fue 22.7%. En cuanto a la bronquiolitis, en el grupo D fue donde se encontró mayor severidad, de acuerdo con los siguientes resultados: el 22.2% de los animales de este grupo presentó bronquiolitis moderada, mientras que en el grupo C el 18.2% la presentó y en el grupo B tan solo un 3.8%. Además el único animal con bronquiolitis severa perteneció al grupo D.

El 47.1% de los lavados broncoalveolares fueron anormales; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en cuanto a las alteraciones en los lavados broncoalveolares entre los diferentes grupos de exposición.

El tipo de cambios encontrados, no difiere según la sustancia inhalada, a excepción de la presencia de

macrófagos pardos, los cuales aparecieron únicamente en el grupo expuesto a humo de cigarrillo. Dichos cambios son similares también a los descritos por Ojeda y cols. en su trabajo en ratones sobre inhalación de Bazuco (1).

## CONCLUSIÓN

Los pegantes tipo Boxer, inducen cambios irritativos e inflamatorios tanto de la vía aérea como del parénquima pulmonar; estos cambios no son específicos ya que se observa que otras sustancias pueden inducir cambios similares. Es esencial hacer estudios más largos, que permitan dilucidar si una exposición más prolongada induce algún cambio diferente a nivel pulmonar.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ojeda y Cols. Lesiones pulmonares y BAI en ratones expuestos a la inhalación de base de cocaína (bazuco). Tesis grado Hospital Santa Clara.
- Wright. Intravenous eugenol causes hemorrhagic lung edema in rats: Proposed oxidants mechanisms. *J-lab-clin-med* 1995; 125 (2).
- Eccles. Menthol and related cooling compounds. *J. Farmacol.* 1994; 46 (8).
- Bronchial responsiveness antiinflammation in guinea pigs exposed to toluene diisocyanate: Study in single and repeated exposure. *Toxicology* 1996; 112 N. 2.
- Human performance during exposure to Toluene. *Aviat space environment medicine.* 1996; 67 N. 7.
- Toluene diisocyanate induced *in vitro* tracheal hiperreactivity in the mouse. *Am. J. Resp. critical care medicine.* 1996; Vol 154 N.4.
- Rosenberg NI y cols. Toluene abuse causes diffuse central nervous system white matter changes. *Ann Neurol* 1988; 23:611-614.
- Hormes JT y cols. Neurologic sequelae of chronic solvent vapor abuse. *Neurology* 1986; 36: 698-702.
- Streicher HZ y cols. Syndroms of toluene sniffing in adults. *Ann Inter-Med* 1981; 94:758-762.
- Goldfrank. *Toxicology 2- Ed.* 1992: 759-767.
- Hersh JH y cols. Toluene embryopathy. *J-Pediatr* 1985; 106:922-927.

12. Blum A . Nicotine chewing gum and the medicalization of smoking. *Ann Intern Med* 1984; 101 :121-123.
13. Smolinske S, Spiller SK, Spoerke DG, et al. Pediatric nicotine overdose. *Vet Hum Toxicol* 1985; 28 :308.
14. Valle RL, Koelle GB. Ganglionic stimulating and blocking agents in Goodman LS, Gilman A: *The Pharmacological Basis of therapeutics*, 5th de. New York, Macmillan,1975: 585-600.
15. Fielding JE. Smoking: Health effects and control. *N Engl J Med* 1985; 313 :491-498.
16. Shiffman SM, Jarvik ME. Smoking withdrawal symptoms in two weeks of abstinence. *Psychopharmacology* 1993; 50:35-39.
17. Elgerot A. Psychological and psychological changes during tobacco abstinence in habitual smokers. *J Clin Psychol* 1994; 34 :759.
18. Greaves A. Observations on the pathogenesis of chronic airflow obstruction in smokers: implications for detection of eary lung disease. *Thorax* 1986; 4:81-87.
19. Mitchel G. Alveolar fenestrae in smokers. *Arch pathol Lab* 1985; 1109.
20. Ojeda P. Lavado Broncoalveolar. S.I. Actualizaciones en neumología, 1991; 47-53.
21. Reynolds, H. Broncoalveolar lavage.S.I. *Am Rev Respir Dis*, 1987; 135: 250-63.
22. Castella, J. S.I. Lavado broncoalveolar en la clínica neumológica, 1986; 22: 48-59.
23. Golden, J. Bronchoalveolar lavage as diagnostic modality. S.I. *Chest*, 1986: 90: 18-22.
24. Saltini, C. Accurate cuantification of cells recoveries by bronchoalveolar lavage. S.I. *Am.Rev.Respir.dis*, 1984; 130: 650-658.
25. Lareo L. Apuntes sobre el uso de animales de experimentación y humanos como sujetos de experimentación. Colombia, 1989; 6: 4-13.