

HIPOPLASIA PULMONAR EXPERIMENTAL

Juan A. Tovar

Profesor Titular de Pediatría
Jefe del Departamento de Cirugía
Hospital Infantil Universitario La Paz
Madrid

Trabajo realizado en parte con las Ayudas FIS 96/59-01 y 96/59-02

INTRODUCCIÓN

En este trabajo recordamos las etapas del desarrollo embriológico del árbol respiratorio así como los mecanismos reguladores del mismo. Más adelante revisamos los conocimientos actuales sobre la hipoplasia pulmonar asociada a la hernia diafragmática congénita (HDC) y sus posibilidades de reproducción experimental así como lo que se sabe de los mecanismos que conducen a la misma.

DESARROLLO BRONCOPULMONAR

El esbozo traqueobronquial emerge de la cara ventral del intestino primitivo anterior en el día 26 de la gestación y se bifurca en dos bronquios principales que lo hacen nuevamente hasta configurar progresivamente las ramificaciones del árbol traqueobronquial definitivo con sus bronquiolos, sus sacos terminales y sus alveolos. En este proceso se distinguen las fases pseudoglandular (entre las 10 y 16 semanas), canalicular (entre las 16 y las 28 semanas), sacular (entre las 28 y las 36 semanas) y alveolar que se completa en el periodo perinatal (1). Durante la fase pseudoglandular las cavidades respiratorias están recubiertas por células dispuestas alrededor de una luz puntiforme de modo que recuerdan más un parénquima glandular como el páncreas o la parótida que una estructura esponjosa como el pulmón. En la fase canalicular aparecen los bronquiolos respiratorios y en la sacular se producen expansiones de la vía aérea que van afinando el mesénquima circundante hasta configurar los alveolos definitivos en la fase alveolar. Solamente en ésta las células del epitelio respiratorio, que hasta entonces eran grandes y con vacuolas de glucógeno,

se diferencian en neumocitos tipo II que en su mayoría se aplanan y se transforman en neumocitos tipo I que recubren el alveolo quedando solamente algunos de tipo II que proporcionarán el surfactante. Paralelamente el tejido mesenquimatoso va dando lugar a vasos arteriales y venosos y a elementos de sostén que se diferencian por procesos de mutua inducción epitelio-mesenquimatosa que aún no conocemos bien. La diferenciación de los neumocitos tipo II a células de tipo I es la base de esta maduración morfológica que es acompañada por la de los vasos arteriales cuya muscularización acaba normalmente con la ramificación bronquiolar terminal.

El neumocito tipo II maduro ha perdido sus vacuolas de glucógeno y tiene en cambio una serie de estructuras globulares que al microscopio electrónico están compuestas por láminas densas dispuestas en capas que reciben el nombre de cuerpos lamelares. Estos son liberados en la luz alveolar aportando el surfactante, compuesto por los fosfolípidos fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol y esfingomielina así como por las las proteínas A, B y C.

Aunque ignoramos qué mensajes se envían mutuamente el epitelio y el mesénquima durante este proceso de desarrollo, sabemos que la presencia de una porción específica de cada uno de ellos da lugar a procesos morfogenéticos y madurativos en la otra. Experimentos de explante de pulmón embrionario permiten detener la ramificación bronquial extirpando el mesénquima circundante y, al contrario, la trasposición del mesénquima peribronquial a la tráquea representa un estímulo para una nueva división que ya no debería producirse. Estas interacciones que se median sin duda por mecanismos moleculares que tienen como efectores a factores de transcripción y citoquinas se van conociendo mejor a través de estudios inmuno-histoquímicos en embriones y en pulmones embrionarios explantados así como por experimentos de

delección de los genes correspondientes en ratones que permiten ver el efecto morfológico y funcional de su ausencia.

Junto a estas interacciones tienen un papel en el desarrollo pulmonar, sobre todo en esta última fase madurativa, las hormonas tiroideas y los corticosteroides lo que ha conducido a su uso directo e indirecto en clínica humana cuando se desea acelerar la maduración pulmonar transplacentariamente ante un parto prematuro inminente. Los mecanismos de acción de las hormonas sobre el pulmón embrionario y fetal no son bien conocidos pero mediarse en parte a través de acciones moleculares como las antes citadas.

LA HIPOPLASIA PULMONAR DE LA HDC

Desde los años 60 se sabe que los pulmones de pacientes con HDC tienen hipoplasia en términos de peso, de volumen y de recuento alveolar radial, que es una medida indirecta de insuficiente ramificación broncoalveolar. Es más, casi desde entonces se sabe que en los alveolos de estos niños hay membranas hialinas como las que se ven en la inmadurez pulmonar del prematuro (2). Estas alteraciones se acompañan de un engrosamiento de la pared de las arteriolas terminales cuyas capas, al contrario que las de los pulmones normales, están muscularizadas (3). Más adelante se ha ido demostrando que esta hipoplasia morfológica se asocia a una inmadurez bioquímica por insuficiente cantidad o anormal calidad del surfactante. Todas estas causas explican la insuficiente hematosis, la hipertensión pulmonar y la progresiva derivación del flujo pulmonar al sistémico que caracteriza a la persistencia de la circulación fetal frecuente en este contexto clínico y que explica en parte la aún desesperante alta mortalidad de la HDC.

HIPOPLASIA PULMONAR EXPERIMENTAL

Al existir una compresión pulmonar por las vísceras herniadas en el lado ipsilateral y por el mediastino desplazado en el contralateral se ha considerado siempre que este factor mecánico era responsable de todas las lesiones lo que ha dado lugar a numerosas investigaciones destinadas entre otras cosas a abrir la vía para la corrección prenatal de este compromiso de espacio. Primero se demostró que la compresión progresiva del pulmón del cordero fetal por un globo de goma originaba una hipoplasia pulmonar igual a la de la HDC (4). Aún más, se demostró que esta situación se recuperaba en parte si el globo se deshinchaba algún tiempo antes del nacimiento (5). Más adelante se reprodujo mediante cirugía fetal en el mismo modelo y también en el feto de conejo una verdadera HDC, se verificó que las lesiones, tanto las broncoalveolares como las vasculares, eran idénticas a las humanas y también se demostró su reversibilidad con una segunda operación de descompresión prenatal (6). Las insuficiencias de la función de surfactante observadas en el humano (7) (aunque no siempre confirmadas (8)) han sido igualmente demostradas en estos modelos animales (9). Por último, tras observar que los pulmones de pacientes con agenesia traqueal están agrandados, se ha ensayado con éxito en corderos fetales con HDC la ligadura traqueal como método de revertir la hipoplasia pulmonar (10) aunque no parece que esta manipulación mejore la insuficiencia de surfactante (11).

Paralelamente a estos experimentos y teniendo en cuenta que la HDC humana se acompaña de muchas más malformaciones, cardíacas, neurológicas, esqueléticas y otras, se desarrolló un modelo teratogénico en feto de ratón o de rata que ha resultado precioso para investigar tanto la hipoplasia pulmonar como algunas de estas malformaciones. Cuando los embriones se exponen transplacentariamente en el día 9 o 10 de la gestación al herbicida 3,4 diclorofenil-paranitrofenol-eter (nitrofen), una

proporción considerable de ellos sufren HDC con hipoplasia pulmonar del lado ipsilateral y también del contralateral (12). Esta hipoplasia es muy semejante a la humana reuniendo todos los componentes broncoalveolares, vasculares y bioquímicos ya citados (13-16) y proporciona un modelo mucho más abordable para el estudio de esta condición que tiene dos ventajas muy importantes: por una parte produce hipoplasia pulmonar también en los animales sin HDC, lo que sugiere que la hipótesis mecanicista de la compresión puede no ser la única aceptable, y por otra reproduce numerosas malformaciones que se asemejan a las de los niños con HDC. En efecto, como los humanos, estos fetos de rata tienen defectos cardíacos troncoconales y de los arcos aórticos branquiales (17), hipoplasia cardíaca (18), malformaciones músculo-esqueléticas (19) y además, malformaciones laringo-traqueo-branquiales (20) que revelan sin duda que el origen de la hipoplasia precede a la compresión producida por las vísceras herniadas.

Esto nos lleva a tratar de interpretar, por una parte, cómo actúa la compresión sobre el pulmón en desarrollo para conducir a una malformación tan profunda y, por otra, a buscar mecanismos patogénicos moleculares de acción muy precoz en el proceso de desarrollo capaces de alterarlo tan profundamente. La compresión altera la expresión de los reguladores tisulares del desarrollo, factores de crecimiento, citoquinas, etc, que se encargan de efectuar el contenido de los mensajes genéticos que a su vez rigen la estructuración corporal y la organogénesis y que están contenidos en grupos de genes de la familia de los homeobox (21). Estos genes son muy constantes filogenéticamente y determinan tanto la segmentación corporal como la migración celular cristo-neural o determinadas interacciones epitelio-mesenquimatosas. Deleciones selectivas de estos genes en ratones conducen a malformaciones que tienen mucho en común con algunas de las que nos ocupan. Por ejemplo, un ratón knock-out para el factor de transcripción tiroideo-1 (TTF-1) da lugar a

la ausencia de pulmones y de tiroides (22), y mutantes carentes de proteína receptora del factor de crecimiento fibroblástico (FGF) origina una ausencia completa de ramificación bronquial. Knock-outs para Hoxa-3, Hoxb-3 (23, 24) y Hoxa-5 (25) tienen estenosis y malformaciones laringo-traqueales letales que son idénticas a las halladas en el modelo teratogénico de rata tratada con nitrofen y, al mismo tiempo tienen defectos de identidad vertebral semejantes a los producidos por el nitrofen y que se ven ocasionalmente en niños con HDC. Losada y cols. demostraron en nuestro laboratorio recientemente que el factor de transcripción TTF-1 está infrarregulado en el feto de rata con hipoplasia pulmonar inducida por nitrofen y también en cultivos de neumocitos aislados lo que sugiere una acción directa del teratógeno sobre las células (26). Esto explicaría la escasa participación de las hormonas tiroideas, químicamente semejantes al nitrofen que supuestamente competiría con ellas (27) en la hipoplasia pulmonar del modelo murino de HDC (28). Más recientemente hemos demostrado que el tratamiento prenatal con dexametasona restablece la expresión de TTF-1 en el pulmón hipoplásico y que incluso la estimula (no publicado).

BIBLIOGRAFÍA

1. Larsen WJ: Human embryology. (2nd ed.) New York: Churchill Livingstone, 1997
2. Butler N y Claireaux A: Congenital diaphragmatic hernia as a cause of perinatal mortality. *Lancet*, 1962, 31: 659-663.
3. Shochat SJ: Pulmonary vascular abnormalities in congenital diaphragmatic hernia, in: Puri P, ed. Congenital Diaphragmatic hernia. Basel: Karger, 1989: 54-61.
4. Harrison MR, Bressack MA y Churg AM: Correction of congenital diaphragmatic hernia in utero. II. Simulated correction permits fetal lung growth with survival at birth. *Surgery*, 1980, 88: 260-268.
5. Harrison MR, Jester JA y Ross NA: Correction of congenital diaphragmatic hernia in utero. I. The model: intrathoracic balloon produces fatal pulmonary hypoplasia. *Surgery*, 1980, 88: 174-182.
6. Harrison MR, Ross NA y DeLorimier AA: Correction of congenital diaphragmatic hernia in utero. III. Development of a successful surgical technique using abdominoplasty to avoid compromise of umbilical blood flow. *J Pediatr Surg*, 1981, 16: 934-942.
7. Glick PL, Leach CL, Besner GE, Egan EA, Morin FC, Malanowskakantoch A, Robinson LK, Brody A, Lele AS, McDonnell M, Holm B, Rodgers BT, Msall ME, Courey NG, Karp MP, Allen JE, Jewett TC y Cooney DR: Pathophysiology of Congenital Diaphragmatic Hernia-III - Exogenous Surfactant Therapy for the High-Risk Neonate with CDH. *J Pediatr Surg*, 1992, 27: 866-869.
8. Sullivan KM, Hagwood S, Flake AW, Harrison MR y Adzick NS: Amniotic fluid phospholipid analysis in the fetus with congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg*, 1994, 29: 1020-1024.
9. Glick PL, Stannard VA, Leach CL, Rossman J, Hosada Y, Morin FC, Cooney DR, Allen JE y Holm B: Pathophysiology of congenital diaphragmatic hernia II: The fetal lamb CDH model is surfactant deficient. *J Pediatr Surg*, 1992, 27: 382-388.
10. Hedrick MH, Estes JM, Sullivan KM, Bealer JF, Kitterman JA, Flake AW, Adzick NS y Harrison MR: Plug the lung until it grows (PLUG): A new

method to treat congenital diaphragmatic hernia in utero. *J Pediatr Surg* , 1994, 29: 612-617.

11. O'Toole SJ, Sharma A, Karamanoukian HL, Holm B, Azizkhan RG y Glick PL: Tracheal ligation does not correct the surfactant deficiency associated with congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* , 1996, 31: 546-50.

12. Iritani I: Experimental study on embryogenesis of congenital diaphragmatic hernia. *Anat Embryol* , 1984, 169: 133-139.

13. Tenbrinck R, Tibboel D, Gaillard JLJ, Kluth D, Bos AP, Lachmann B y Molenaar JC: Experimentally induced congenital diaphragmatic hernia in rats. *J Pediatr Surg* , 1990, 25: 426-429.

14. Tenbrinck R, Gaillard JLJ, Tibboel D, Kluth D, Lachmann B y Molenaar JC: Pulmonary Vascular Abnormalities in Experimentally Induced Congenital Diaphragmatic Hernia in Rats. *J Pediatr Surg* , 1992, 27: 862-865.

15. Alfonso LF, Vilanova J, Aldazábal P, López de Torre B y Tovar JA: Lung Growth and Maturation in the Rat Model of Experimentally Induced Congenital Diaphragmatic Hernia. *Eur J Pediatr Surg* , 1993, 3: 6-11.

16. Alfonso LF, Arnaiz A, Alvarez FJ, Qi B, Diez-Pardo JA, Valls-i-Soler A y Tovar JA: Lung hypoplasia and surfactant immaturity induced in the fetal rat by prenatal exposure to nitrofen. *Biol Neonate* , 1996, 69: 94-100.

17. Migliazza L, C. O, Xia H, Fantidis P, Rodriguez JI, Diez-Pardo JA y Tovar JA: Heart hypoplasia in experimental congenital diaphragmatic hernia in rats. *J Pediatr Surg* , 1999, 34: 706-711

18. Migliazza L, C. O, Xia H, Fantidis P, Rodriguez JI, Diez-Pardo JA y Tovar JA: Cardiovascular malformations in experimental diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* , 1999, (in press):

19. Migliazza L, Xia H, Diez-Pardo JA y Tovar JA: Skeletal malformations associated with congenital diaphragmatic hernia: experimental and human studies. *J Pediatr Surg* , (submitted),

20. Xia H, Otten C, Migliazza L, Diez-Pardo JA y Tovar JA: Tracheobronchial malformations in experimental congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* , submitted,

21. Mark M, Rijli FM y Chambon P: Homeobox genes in embryogenesis and pathogenesis. *Pediatric Research* , 1997, 42: 421-429.
22. Kimura S, Hara Y, Pineau T, Fernandez-Salguero P, Fox CH, Ward JM y Gonzalez FJ: The T/ebp null mouse: thyroid-specific enhancer-binding protein is essential for the organogenesis of the thyroid, lung, ventral forebrain and pituitary. *Genes & Development* , 1996, 10: 60-69.
23. Condie BG y Capecchi MR: Mice with targeted disruptions in the paralogous genes *hoxa-3* and *hoxd-3* reveal synergistic interactions [published erratum appears in *Nature* 1994 Oct 6;371(6497):537]. *Nature* , 1994, 370: 304-7.
24. Manley NR y Capecchi MR: Hox group 3 paralogous genes act synergistically in the formation of somitic and neural crest-derived structures. *Dev Biol* , 1997, 192: 274-88.
25. Aubin J, Lemieux M, Tremblay M, Berard J y Jeannotte L: Early postnatal lethality in *Hoxa-5* mutant mice is attributable to respiratory tract defects. *Dev Biol* , 1997, 192: 432-45.
26. Losada A, Xia H, Migliazza L, Diez-Pardo JA, Santisteban P y Tovar JA: Lung hypoplasia caused by nitrofen is mediated by down-regulation of the transcription factor TTF-1. *Pediatr Surg Int* , 1999, (in press):
27. Manson JM: Mechanism of nitrofen teratogenesis. *Environ Health Perspect* , 1986, 70: 137-47.
28. Tovar JA, Qi B, Diez-Pardo JA, Alfonso LF, Arnaiz A, Alvarez FJ, Valls-i-Soler A y Morreale de Escobar G: Thyroid hormones in the pathogenesis of lung hypoplasia and immaturity induced by prenatal exposure to nitrofen. *J Pediatr Surg* , 1997, 32: