



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Estudio de la función pulmonar con pletismografía
barométrica en un modelo de enfermedad pulmonar
obstructiva crónica en cobayo (*Cavia porcellus*)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

JUAN CARLOS VILLA LÓPEZ



**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. JOSÉ LUIS ARREOLA RAMÍREZ**

Ciudad Universitaria, Cd.Mx., 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Índice

RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	6
EPOC	10
COBAYOS COMO MODELO EN EPOC.....	12
VOLÚMENES PULMONARES Y PLESTISMOGRAFÍA	14
JUSTIFICACIÓN	16
OBJETIVOS	17
OBJETIVO GENERAL.....	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
HIPÓTESIS	17
MATERIAL Y MÉTODOS.....	18
DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO	18
PLETISMOGRAFÍA DE ANIMAL EN LIBRE MOVIMIENTO.....	18
EXPOSICIÓN A HUMO DE TABACO.....	19
HISTOLOGÍA PULMONAR.....	21
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	22
RESULTADOS	22
DISCUSIÓN	31
CONCLUSIONES	34
REFERENCIAS.....	35

DEDICATORIAS

Dedico el presente trabajo principalmente a mis padres Verónica López Orozco y Carlos Eduardo Villa Velasco, por haberme dado la vida y cuidarme, por formarme con buenos hábitos, sentimientos y valores, los cual siempre me han ayudado a salir en momentos difíciles. Sin ustedes no sería nada y es por ello que les dedico éste primer paso tan importante de mi formación profesional.

A mis abuelitos Lucía Velasco Naranjo, Imelda Orozco Cedillo, Carlos Villa Rivera y Juan de Dios López Aguilar, por ser los pilares más importantes de cada familia y por demostrarme siempre su cariño y amor incondicional.

A mi hermano Eduardo Villa López por ser un gran amigo para mí, que juntos hemos pasado adversidades pero hemos logrado salir siempre adelante.

A mi tutor, pero sobre todo lo considero un amigo, el doctor José Luis Arreola, por depositar esperanza y confianza en mí y por siempre motivarme a seguir adelante sin importar las adversidades de la vida.

A mi novia y mejor amiga por luchar siempre a mi lado y apoyarme en todo momento.

Por último le agradezco a mis amigos Gerardo, Ángel, Silva, Armando, Diego y Allan por confiar siempre en mí y grandes momentos que pasé con ustedes.

AGRADECIMIENTOS

Gracias mamá, eres la mujer más valiente, más decidida y fuerte que conozco y debido a esas y muchas más virtudes te agradezco por hacer de mi lo que soy. Gracias por prepararme para la vida y por convencerme de que todo lo que me proponga lo puedo lograr.

Le Agradezco a mi padre Carlos Eduardo por verlo luchar por mí, dar todo de él y hasta mucho más. Gracias por todo lo que me has dado y es por ello que te respeto mucho. Eres un gran ejemplo para mí.

A mis abuelitos Lucía Velasco Naranjo, Imelda Orozco Cedillo, Carlos Villa Rivera y Juan de Dios López Aguilar, que a través de su experiencia y consejos he aprendido mucho del mundo, y ahora me siento listo para encarar cualquier aprieto. Gracias por enseñarme a ver la vida con ojos positivos y por todo el amor que me han brindado.

Gracias Lalo por ser mi hermano y apoyarme en todo momento. A pesar de tener nuestras eventuales discusiones y de que tal vez seamos polos opuestos en ciertas cuestiones, has sido una de las principales personas por las cuales me motiva día a día a seguir adelante.

También quiero agradecer a mi novia la cual ha sido mi compañera, mi amiga, mi consejera y mi complemento. Te agradezco de la manera más sincera por tus ayudas en la elaboración de ésta tesis y por tus incontables apoyos para mi vida.

A mi tutor Arreola, el cual no puedo encontrar palabras para agradecerle por todo el apoyo que me ha dado, es sin duda un amigo de verdad, gracias por compartir tantas cosas juntos y por todo el conocimiento que me ha brindado

A todos ellos les agradezco por estar siempre en los momentos más importantes de mi vida, por ser el ejemplo para salir adelante y por los consejos que me ayudan día a día a ser mejor persona .Es por ello que les estoy inmensamente

agradecidos por confiar en mí y darme la oportunidad de culminar esta etapa de mi vida.

RESUMEN

La exposición a largo plazo de agentes nocivos, principalmente a humo de cigarro, genera padecimientos como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). La evaluación completa sobre los cambios que presenta en la función pulmonar, se pueden realizar con el sistema de pletismografía barométrica de cuerpo completo en libre movimiento. Se utilizaron cobayos hembras que fueron expuestos al humo de 20 cigarrillos sin filtro por día, 5 días a la semana, cubriendo un total de 10 semanas (grupo EPOC, $n = 8$), y se compararon con cobayos hembras no expuestas de la misma edad (grupo control, $n = 8$). Las pletismografías se realizaron en ambos grupos, posteriormente se realizó la histología pulmonar. Resultados: Al final del período de exposición, los cobayos en el grupo de EPOC tenían mayor frecuencia respiratoria (F), mientras que el ciclo de trabajo (T_i / T_{tot}) no se vio afectado. Disminuyeron los siguientes parámetros, el volumen minuto (MV) y el flujo espiratorio 50 ($EF50$); sin embargo, el grupo de EPOC siempre se mantuvo más alto que el grupo control. La Pausa Mejorada ($Penh$) fue menor en EPOC mientras que el tiempo de frenado (TB), y el radio del pico de flujo espiratorio (R_{pef}) fueron mayores en el grupo de EPOC. Todos los cobayos expuestos al humo de cigarro desarrollaron lesiones de enfisema en sus pulmones y en comparación con el grupo control, ganaron muy poco peso. Conclusiones: En este modelo de EPOC, la exposición al humo de cigarrillo producen cambios en la pletismografía barométrica en animal en libre movimiento, caracterizado por un patrón de respiración poco profunda con una disminución de $Penh$ y una tendencia hacia el aumento de $EF50$ (probablemente debido a la disminución de la retracción elástica), el aumento del TB (lo que sugiere estrechamiento

de laringe), y una tendencia de aumento de MV (probablemente debido a una mayor tasa metabólica). Muchos de estos cambios funcionales se parecen a los observados en los pacientes con EPOC y con esto corroboramos la idoneidad de este modelo animal para el estudio de la EPOC.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), es un proceso patológico tratable y prevenible, que se encuentra determinado por una limitación parcialmente reversible al flujo aéreo [ALAT, 2014] [Papandrinopoulou et al., 2012] [Vestbo et al. 2013]. Otra característica es que la designan como “progresiva”, es decir empeora con el transcurso del tiempo, teniendo así niveles de gravedad para su valoración [ALAT, 2014].

El EPOC se encuentra asociado a la destrucción del parénquima pulmonar (enfisema) debido a respuestas inflamatorias crónicas de las vías aéreas y pulmonares (bronquitis), causadas por la inhalación de gases o partículas nocivas (Figura 1). Siendo el humo de tabaco la principal causa a nivel mundial y el humo de leña en segundo lugar en países en vías de desarrollo como México [Hu et al., 2010][Montaña et al., 2009][Pérez et al.,1996] [Shapiro e Ingenito, 2005].



Figura 1. El EPOC es una enfermedad respiratoria producto de la bronquitis crónica y del enfisema pulmonar. Imagen modificada de:
<http://terapiaherbal.com/el-enfisema-f%E2%82%ACil-las-causas-y-los-s%E2%82%ACntomas-el-tratamiento-del-enfisema-f%E2%82%ACil> y
<http://pressionem.info/asma-epoc-enfermedad-pulmonar-obstructiva-crnica-2/>

Sin embargo, la exposición a largo plazo a otros irritantes de los pulmones como el aire contaminado, los vapores químicos o el polvo, también puede contribuir a la enfermedad ya que muchos pacientes con EPOC nunca han fumado [Pérez et al., 2012][Salvi y Barnes, 2009]. Los pacientes con EPOC pueden presentar síntomas tales como tos con producción de grandes cantidades de mucosidad, sibilancias (silbidos o chillidos al respirar), dificultad al respirar (disnea) y presión en el pecho, dependiendo en forma individual de cada paciente, a su vez puede coexistir con otras enfermedades como hipertensión, osteoporosis, depresión, cáncer pulmonar, infecciones respiratorias incluso diabetes [Vestbo et al., 2013].

El impacto causado por EPOC sobre la morbilidad-mortalidad, no se encontraba totalmente definido; esto se debe a que las definiciones sobre EPOC eran imprecisas y variables, pues muchas veces se confundía con otras enfermedades respiratorias, principalmente con asma [Doina et al., 2007]. No es sino hasta 1998,

cuando surge un grupo de investigadores con objetivos bien definidos para realizar guías diagnósticas y estandarizadas, como la Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease o mejor conocida como “GOLD” y así poder en la actualidad diferenciar y poder describir mejor la patología de la EPOC (Tabla 1).

Es por ello que se define a la EPOC como una enfermedad relativamente nueva debido a su complejidad y semejanza con otras enfermedades respiratorias.

La prevalencia de la EPOC en la población mundial se estima que es aproximadamente del 1%, pero en ciudades con habitantes de edad mayor (mayores de 40 años) se eleva bruscamente a más del 10% ,subiendo el porcentaje conforme aumenta la edad [Halbert et al., 2006]. Un ejemplo de ello es el estudio realizado por el Proyecto Latinoamericano de Investigación en Obstrucción Pulmonar [PLATINO, 2006] en el cual se observa la prevalencia de EPOC en países latinoamericanos, donde fue mayor en hombres fumadores mayores de 60 años [Menezes, 2007] [PLATINO, 2006] (Véase Fig. 2).

Algunas diferencias entre asma y EPOC

Indicadores	ASMA	EPOC
Edad más frecuente	Menores a 40 años	Mayores a 40 años
Sexo	Indistinto	Predominio en hombres
Antecedentes familiares	Historia de alergias y asma	No frecuente
Antecedentes personales	Historia de alergia y crisis de disnea con tos	tabaquismo
Enfermedades asociadas	Rinitis, dermatitis, conjuntivitis	hipertensión, osteoporosis, depresión, cáncer pulmonar, infecciones respiratorias incluso diabetes
Síntomas	Tos, disnea, escasa expectoración	Tos, disnea, expectoración

Tabla 1. Característica típicas de cada enfermedad, sin embargo, dichos rasgos dependen de cada individuo

Estudio Platino 2006, sobre la prevalencia de EPOC

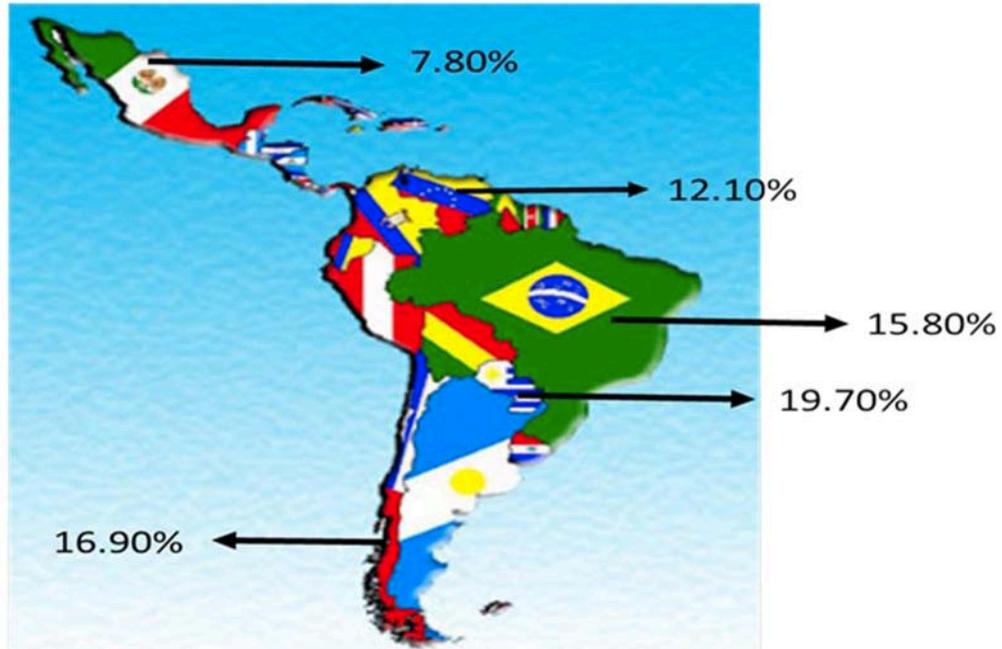


Figura 2. La prevalencia de EPOC en países latinoamericanos no ha cambiado desde el 2006, siendo para San Pablo de 15.8%, 7.8% para México, 19.7% para Montevideo, 16.9% para Santiago y 12.1% para Caracas. Imagen modificada de: <http://buenosairesyargentina.blogspot.mx/2014/09/hispanoamerica-iberoamerica-y.html>

Datos de la Organización Mundial de la Salud sugieren que para el año 2030 esta enfermedad pasará al tercer lugar como causa de mortalidad general [OMS, 2004].

Como se ha visto el EPOC es un gran problema para el sector salud, pero viendo cifras, también es un gran problema en el sector económico para el gobierno. Veamos porque:

El impacto económico que representa el consumo de tabaco al sistema de salud mexicano, solamente por costos de atención médica de las cuatro principales enfermedades (cáncer de pulmón, infarto agudo de miocardio, enfermedad

cerebro vascular y enfermedad pulmonar obstructiva crónica) se estimó en 43 000 millones de pesos anuales [Reynales et al., 2006].

No obstante, el sector salud destina solamente 20 000 millones de pesos anuales para atender el tabaquismo, de los cuales únicamente para el Instituto Mexicano del Seguro Social [IMSS, 2004], los costos directos de la atención a los pacientes con EPOC representaron la cantidad de 1469 millones de pesos [Durán et al., 2015].

Si bien históricamente se había examinado la mayor prevalencia de la enfermedad entre los varones debido al ámbito tabáquico, estudios muestran que los efectos adversos del tabaquismo sobre la función pulmonar pueden ser mayores en mujeres que en hombres y por ende las mujeres son más propensas a desarrollar EPOC [Prescott et al., 1997][Sorheim et al., 2010].

EPOC

El EPOC, es una enfermedad que se define como una inflamación a la respuesta del sistema inmune, presentando destrucción del parénquima pulmonar, pérdida de la elasticidad pulmonar y por ende un cierre de las vías aéreas pequeñas causando obstrucción respiratoria; todo este proceso es debido a una señal de daño por productos tóxicos del cigarro, humo de leña o cualquier agente nocivo.

Cuando el humo de cigarro entra al organismo, al ser un agente nocivo, nuestro sistema inmune actúa produciendo inflamación, donde se puede observar todos los tipos de células inflamatorias (macrófagos, linfocitos NK, neutrófilos, eosinófilos). Dichas células liberan mediadores inflamatorios y dañan a las estructuras del pulmón que a continuación se explicarán y que se resumen en la

fig.3 Los linfocitos NK y T secretan una citoquinas llamadas interferón gama (IFN- γ) en el alvéolo, las cuales son las responsables de la activación de macrófagos para la destrucción microbiana. Estos macrófagos al ser producidos por estímulos inflamatorios, liberan factores quimiotácticos, tales como leucotrieno B4 y la interleucina-8 para atraer neutrófilos. Estudios recientes se han basado principalmente en la elastasa de dichos neutrófilos, proteinasa 3 y en las catepsinas, ya que estas proteasas provocaron enfisema en los animales experimentados [Stockley, 1999]. No obstante también están ligadas en la producción de esputo en pacientes con EPOC [Barnes et al., 2003].

Otras proteasas que ayudan a la destrucción del parénquima pulmonar son las metaloproteinasas, tales como MMP-2, MMP-9 y MMP-12 [Barnes y Celli, 2009].

Existe una teoría del desequilibrio entre proteasas y antiproteasas [Barnes et al., 2003], donde se menciona que existen inhibidores de proteasas (1-antitripsina) en el parénquima pulmonar y al menos tres inhibidores de las metaloproteinasas de la matriz (TIMP-1, TIMP-2, y TIMP-3). Pero en los pacientes con EPOC la producción de antiproteasas es insuficiente para neutralizar a las proteasas y por ende su daño.

Desarrollo de la Enfermedad pulmonar obstructiva crónica

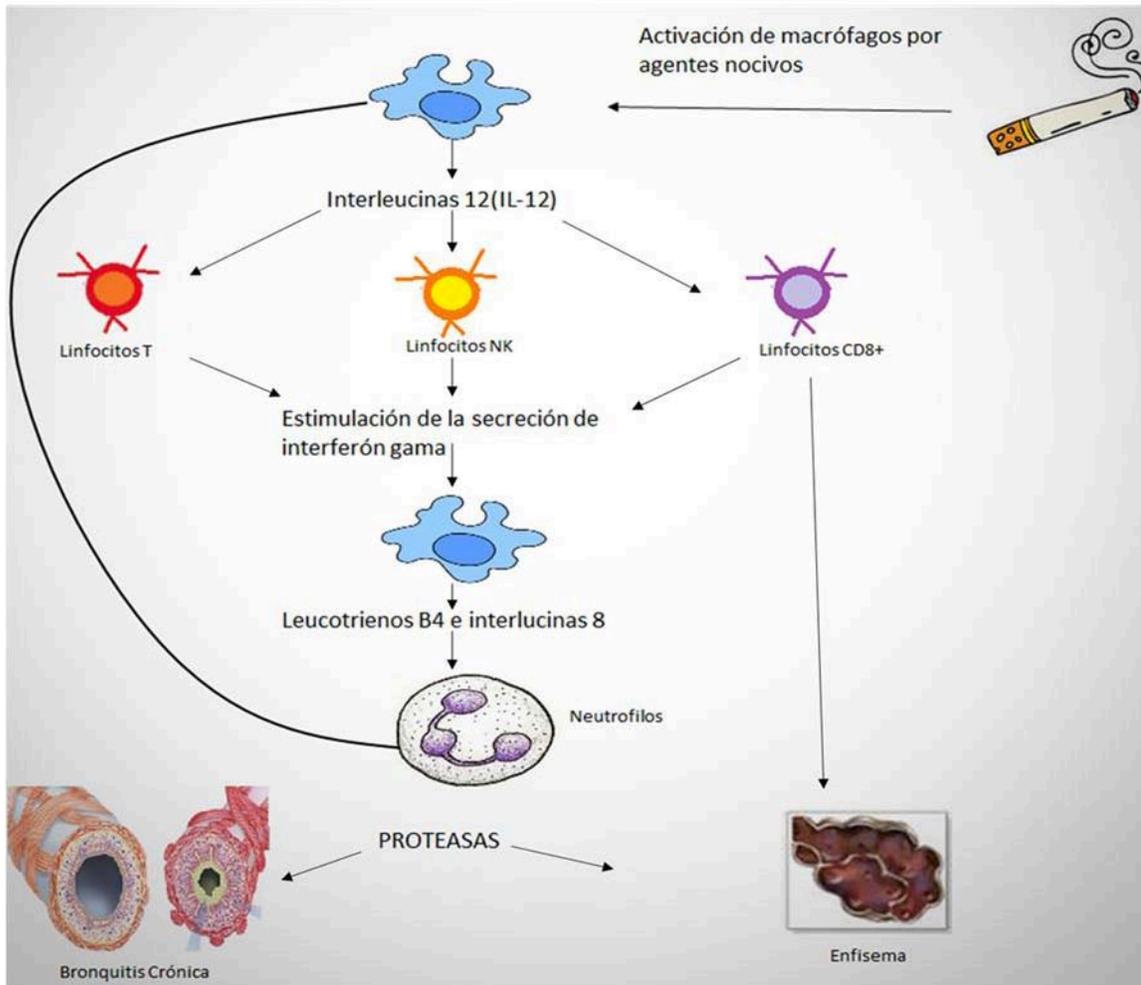


Figura 3. Cascada de reacciones causadas por el humo de cigarro que provocan enfisema pulmonar y bronquitis crónica

COBAYOS COMO MODELO EN EPOC

Se ha reportado en la literatura el uso de diferentes especies para desarrollar la enfermedad. Sin embargo, el cobayo es el mejor modelo para el estudio del EPOC por la similitud con los humanos en los procesos fisiológicos de las vías respiratorias [Muccitelli et al., 1987][Ressmeyer et al., 2006].

Comparando con los otros roedores con mayor uso de experimentación tales como la rata y el ratón, ambos no tienen verdaderos alvéolos en el nacimiento, se desarrollan a partir entre los días 4 y 14, mientras que los cobayos si presentan alveolos en el nacimiento. Esto es importante ya que el espacio aéreo aumenta progresivamente y puede ser interpretado con un falso enfisema [Wright et al. 2008].

Estudios relevan que la patología por la exposición de humo de cigarrillo es similar en cobayos y humanos incluyendo neutrofilia aguda, desarrollo lento de reclutamiento de monocitos, destrucción alveolar, secreción de moco, incremento de la permeabilidad epitelial, reflejos alterados e hipertensión pulmonar. Además se menciona que la anatomía y fisiología de la vía aérea en general es parecida a la del humano, en el músculo liso, las líneas de epitelio pseudo estratificado de la tráquea, células caliciformes , glándulas mucosas, bronquio principal, nervios vagales aferentes, incluyendo las fibras C y mecanorreceptores, que inervan el pulmón [Canning y Chou, 2008].

En el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” se desarrolló un modelo de Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica inducido con exposición a humo de tabaco en cobayos donde se obtuvo un incremento de los niveles plasmáticos de Malondialdehido, así como aumento en la actividad de la enzima antioxidante superoxido dismutasa en los macrófagos del lavado bronquialveolar, se encontraron alteraciones histológicas en las vías aéreas, parénquima pulmonar y sistema vascular pulmonar, consistentes en la presencia de enfisema, hipertensión arterial pulmonar e hiperplasia del músculo liso; en paralelo, el análisis de la expresión génica y actividad enzimática, mostraron

incremento en las metaloproteinasas MMP-1, MMP-2, y MMP-9 concomitante con la presencia de muerte celular por apoptosis. Comprobando así las características morfológicas y bioquímicas que ocurren en la EPOC observada en humanos, así como en otros modelos experimentales inducidos con humo de cigarro y otros agentes [Montaño et al., 2009]. No obstante no se han registrado en la literatura los parámetros fisiológicos respiratorios de la enfermedad en modelos animales mediante pletismografía barométrica de libre movimiento.

VOLÚMENES PULMONARES Y PLETISMOGRAFÍA

Se le da el nombre de volumen corriente a la ventilación normal, el volumen exhalado al máximo se le denomina capacidad vital, pero aun así algo de aire se queda en el pulmón (volumen residual). La capacidad pulmonar total es la suma de la capacidad vital más el volumen residual.

Dichos volúmenes pulmonares se pueden estudiar en humanos mediante espirometría. Sin embargo, el estudio en animales de laboratorio es diferente ya que en ellos no puedes controlar su respiración es decir, no se le puede pedir al animal que inhale al máximo o exhale, por lo que se utiliza otra técnica como la pletismografía.

La pletismografía es una prueba de función respiratoria (PFR) bien estandarizada que además de medir volúmenes pulmonares, también mide las capacidades pulmonares y resistencias de las vías aéreas [Vargas et al., 2010]. Esta prueba implica que el volumen no cambia y las mediciones se llevan a cabo por cambios de presión tomando en cuenta la Ley de Boyle en donde $P_1 V_1 = P_2 V_2$.

Por lo tanto, en dicha técnica como el volumen es constante, el cambio en la presión de la cámara representa la diferencia entre la expansión/contracción del tórax y el volumen corriente, así simula la inspiración/espriación que realiza el animal dentro de la cámara. Los cambios de presión en la cámara son diferenciados para generar una señal de “pseudoflujo” que es posteriormente analizada por el programa computacional, para obtener los siguientes parámetros:

Tabla 2. Parámetros pulmonares de la pletismografía de cuerpo completo			
Parámetros	Abreviación	Unidades	Definición
Frecuencia respiratoria	f	rpm	Número de ciclos de respiración completos por minuto
Volumen minuto	MV	mL/ min	Ventilación total en un minuto
Volumen corriente	VC	mL	Volumen de aire desplazado durante un ciclo de respiración
Tiempo de espiración	Te	s	Tiempo necesario para exhalar el volumen corriente (VC)
Tiempo de inspiración	Ti	s	Tiempo necesario para inhalar el volumen corriente (VC)
Ciclo de trabajo	Ti/Ttot	Sin unidad	Es un determinante importante del grado de estrés al que están sometidos los grupos de músculos respiratorios .Se mide con el tiempo de inspiración (Ti) con relación a la duración total de un ciclo de respiración (Ttot)
Flujo espiratorio máximo	PEF	mL/s	El valor más alto medido durante la fase espiratoria
Flujo inspiratorio máximo	PIF	mL/s	El valor más alto medido durante la fase inspiratoria
Tiempo de frenado	TB	%	Elongación del período desde el final de la inspiración hasta el inicio de la espiración
Tiempo de pausa	TP	%	Elongación del período desde el final de la espiración hasta el inicio de una nueva inspiración

Tiempo de relajación	Tr	s	Tiempo necesario para lograr el 64% de cambio de presión en la cámara pletismográfica durante la fase espiratoria
Pausa	PAU	s	Tiempo que tarda en espirar el 36% restante de la presión espiratoria total en comparación con la cantidad inicial de tiempo que tarda en espirar el primer 64% de la presión espiratoria total $PAU = (T_e - Tr) / Tr$
Flujo espiratorio al 50%	EF50	mL/s	Flujo espiratorio a la mitad del volumen corriente
Pausa mejorada	Penh	Sin unidad	Índice que combina las señales de presión de la caja tanto de inspiración (PIF) como de espiración (PEF), con la comparación de tiempo de vencimiento temprano y tardío (PAU). $Penh = (PAU)(PEF / PIF)$
rpm=respiraciones por minuto			

JUSTIFICACIÓN

La evaluación de las mediciones fisiológicas pulmonares en animales de laboratorio es una herramienta esencial en muchas áreas de investigación. Recientemente la pletismografía ha ganado amplio uso, sin embargo no se tienen datos bibliográficos en mediciones con EPOC en modelo de cobayo (*Cavia porcellus*), ya que la mayoría de los trabajos son datos morfológicos y moleculares. Por otra parte, la EPOC es un problema de salud pública y la mayor causa de morbilidad crónica en el mundo. Muchas personas sufren de esta enfermedad durante años y mueren prematuramente por ella o por sus complicaciones. También es un gran problema económico ya que sólo el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS, 2004) gasta 1469 millones de pesos para atender a pacientes con EPOC. Por dichos motivos es importante desarrollar un

modelo en animales para poder interpretar los parámetros respiratorios que se asemejan con pacientes que padecen de EPOC para investigaciones futuras.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Efectuar pletismografías de cuerpo completo de libre movimiento en un modelo de cobayo para el estudio de los parámetros fisiológicos en EPOC por inducción con humo de cigarro.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desarrollar en cobayos (*Cavia porcellus*) una metodología específica para la inducción de EPOC con humo de cigarro.
- Realizar y contrastar la pletismografía de animal en libre movimiento, así como entre animales con EPOC y Controles.

HIPÓTESIS

Si la pletismografía barométrica de cuerpo entero en libre movimiento, en animales de laboratorio, se basa en los cambios de presiones dentro de la cámara pletismográfica, midiendo parámetros respiratorios, entonces, dicha técnica podrá ser utilizada para estudios futuros, en modelos animales con patologías pulmonares diversas, como sería en este caso, encontrando variaciones entre el grupo sano y el grupo con EPOC. Con esto se podrá contribuir con 14 parámetros respiratorios, para poder comparar entre lo fisiológico y la enfermedad.

MATERIAL Y MÉTODOS

DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se utilizaron cobayos (*Cavia porcellus*) hembra de dos meses de edad (peso 350-400g), mantenidos en condiciones de bioterio de acuerdo a la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Se utilizaron 16 animales y se dividieron en dos grupos:

GRUPO CONTROL: Cobayos normales (n =8)

GRUPO EPOC: Cobayos inducidos a la enfermedad con humo de cigarro (n=8).

Ambos grupos fueron marcados con colorantes de plumones de distintos colores para así llevar un registro. Se utilizó dicha técnica por su aplicación rápida y por ser indoloro para el animal.

Posteriormente a la técnica del marcaje, se pesó a cada animal para llevar un control y así proceder colocándolos en cámaras pletismográficas para medir los parámetros fisiológicos pulmonares.

El estudio fue aprobado por nuestro comité institucional de Ciencia y bioética.

PLETISMOGRAFÍA DE ANIMAL EN LIBRE MOVIMIENTO

La cámara pletismográfica para animales en libre movimiento (Buxco Electronics Inc, EUA), es una cámara de acrílico la cual consta de dos orificios para la entrada de un flujo de aire constante (aprox.10ml s⁻¹) que no interfiere con las señales respiratorias del animal. La cámara fue conectada a una bomba de aire y por ende

hay una succión de aire con el fin de medir el cambio de presión ejercida por el animal al respirar.

La presión dentro del pletismógrafo fue medida por un transductor de presión diferencial (SCXL004DN SenSym, CA, EUA) conectado a un amplificador y continuamente analizada a través de un programa computacional específico. (véase figura 4).

Ya colocados los ejemplares en las cámaras pletismográficas, se procedió con el registro, el cual el programa considera 5 minutos para aclimatar al animal, luego de este punto, los parámetros respiratorios se registraron cada 2 segundos, teniendo datos durante 90 minutos.

EXPOSICIÓN A HUMO DE TABACO.

Existen 2 formas de administrar el humo de tabaco. El denominado “nose only” es donde la combustión de los cigarros es directamente a la nariz del animal y el utilizado en éste proyecto, el llamado “whole body”, donde el grupo experimental se les indujo la enfermedad en una cámara de exposición de acrílico con las siguientes medidas: 100cm largo x 60cm de ancho X 80cm alto. Dicha cámara se encontraba conectada a una bomba la cual hace la función de crear un vacío de aire y así producir la combustión de los cigarros. La inducción consto de 20 cigarros sin filtro al día, de los cuales se dividieron en 4 etapas, es decir se colocaron 5 cigarros, después de su combustión se dejó al animal respirar el humo por 20 minutos apagando la bomba, posteriormente se prendió la bomba por 15 minutos con el fin de la recuperación del animal. Una vez concluido el tiempo se prosiguió con los siguientes 5 cigarros hasta completar los 20 por día en un

periodo de 5 días a la semana, por 10 semanas para inducir la enfermedad (Figura 5).

Este modelo experimental se encuentra ya estandarizado en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.[Vargas et al., 2010]

Sistema de pletismografía para cobayos en libre movimiento

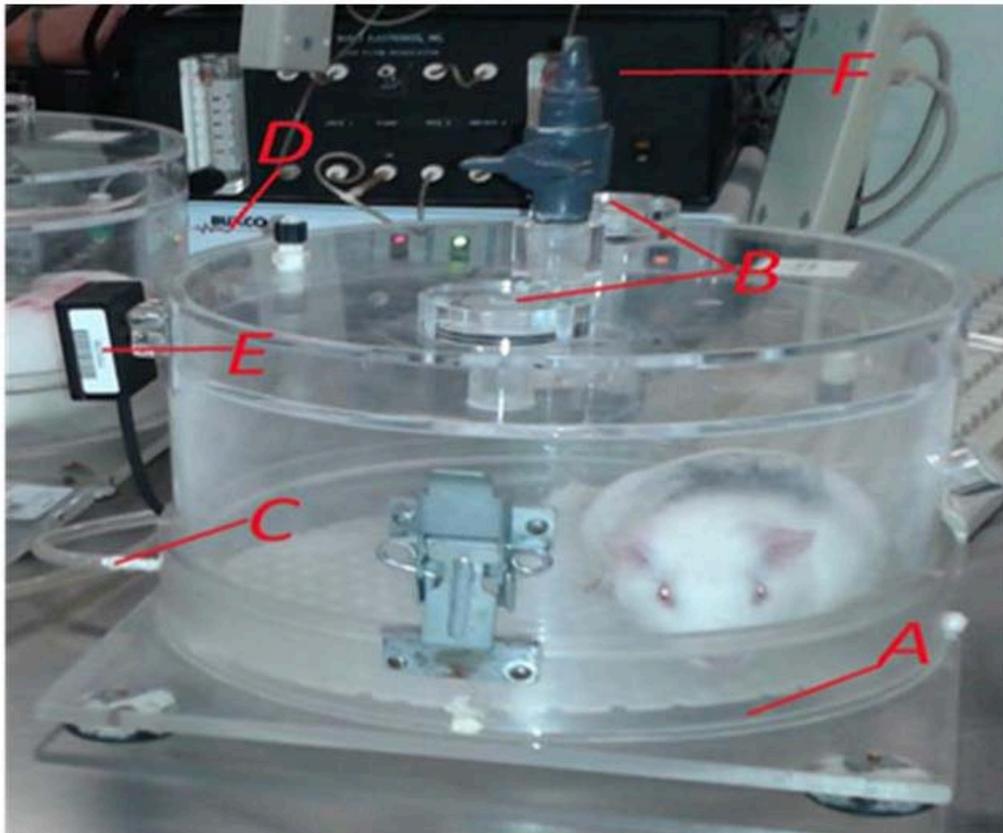


Figura 4. La pletismografía para animales en libre movimiento es una cámara de acrílico(A), la cual contiene entradas para aire continuo(B), mangueras para succión del aire(C) conectadas a una bomba de aire (D) y un transductor de presión diferencial muy sensible (E) conectado a un amplificador (F) continuamente analizado a través de un programa computacional específico.

Modelo de inducción a EPOC



Figura 5. El modelo de inducción por humo de cigarro consta de colocar a los cobayos en una caja de acrílico, la cual tiene dos tubos de metal, en donde son colocados los cigarros sin filtro. Con la ayuda de una bomba (succiona aire) se produce la combustión de los cigarros y así los cobayos respiran el humo.

Concluido el periodo de 10 semanas de inducción, el grupo experimental fue colocado de la misma forma que el grupo control en las cámaras pletismográficas para así poder comparar y evaluar los parámetros respiratorios.

HISTOLOGÍA PULMONAR

Todos los animales fueron sacrificados colocándoles pentobarbital (2,5 ml) intraperitonealmente. Se obtuvo los pulmones derechos y se fijaron con solución de formalina a una presión constante de 25 cm H₂O. Posteriormente, el tejido se procesó mediante métodos convencionales y técnicas histológicas para tinción con hematoxilina y eosina para análisis de microscopía óptica.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

La pletismografía barométrica de libre movimiento nos proporcionó datos cada dos segundos (por cada uno de los parámetros fisiológicos). Es decir se obtuvieron un aproximado de 878,400 datos totales. Debido a ésta gran variabilidad, se calculó la mediana en periodos de 5 minutos.

El uso de las medianas, nos permitió descartar la influencia de valores extremos, ya que dichos valores se deben al estrés que generan los cobayos entre los primeros 30-60min [Bazan et al. 2004]. Pasando los 60 min. El animal se aclimata y es por ello que a partir de dicho periodo, todas las medianas de cada parámetro fisiológico y de cada animal, se promediaron para obtener el valor representativo de cada grupo experimental (EPOC y Control).

Para corroborar que nuestras $n=8$ control y $n=8$ EPOC, contaban con una distribución normal, se realizó la prueba de Kolmogorov- Smirnov. Posteriormente se evaluaron las diferencias entre ambos grupos a través de la prueba estadística t de Student para muestras independientes.

RESULTADOS

En cuanto al peso de los animales experimentados, en el grupo de EPOC ($n = 8$) y el grupo control ($n = 8$) fueron similares al inicio del estudio ($410,1 \pm 12,4$ vs $411,8 \pm 8,5$ g, media \pm Error estándar, respectivamente), pero ya en la décima semana, el aumento de peso fue menor en los cobayos expuestos al humo de cigarrillo que en el grupo control ($763,9 \pm 23,4$ vs $673,5 \pm 22,4$ g, respectivamente) con una significancia de $\approx p < 0,02$

Pesos de los grupos estudiados

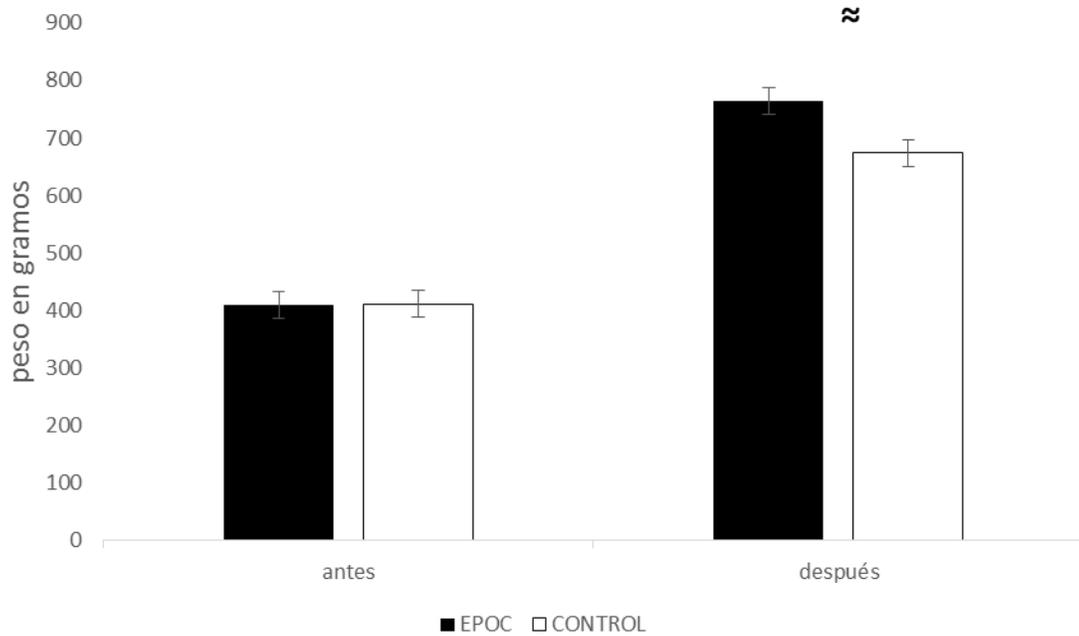


Figura 6. Gráficas comparativas del antes y después de los pesos respectivos a cada grupo estudiado

A todos los cobayos se les realizaron y analizaron las pletismografías barométricas en libre movimiento, seguido por la histología pulmonar. El examen histológico de pulmón mostró lesiones de enfisema en los cobayos expuestos a humo de cigarrillos, mientras que sólo un animal del grupo control presentó agrandamiento de los espacios de aire en sólo uno de los campos evaluados por microscopía, lo que fue considerado un hallazgo insignificante. Imágenes representativas de la histología pulmonar se pueden observar en la Figura 7. Estos cambios morfológicos fueron compatibles con los que ya se informa en este modelo de EPOC para cobayos [Selman et al., 1996]

Histología pulmonar

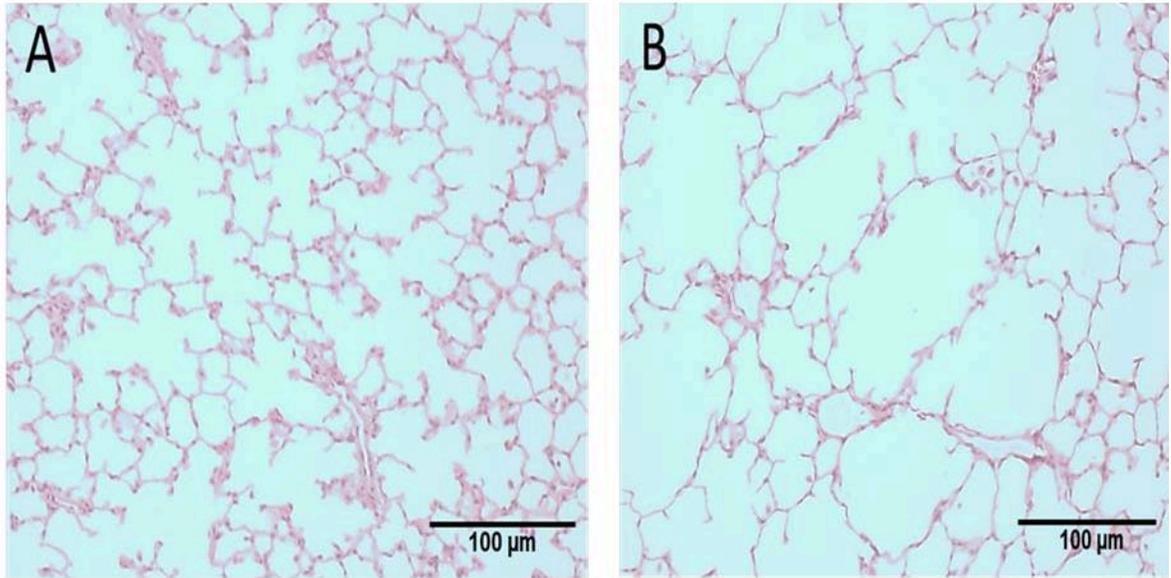
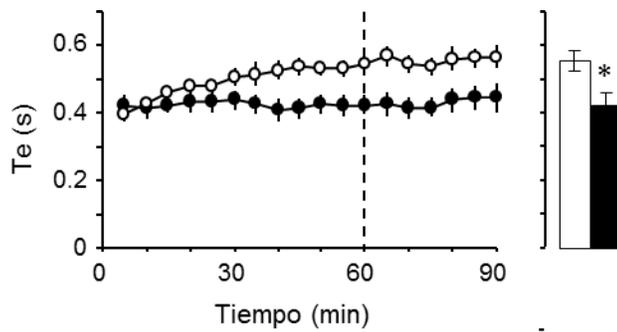
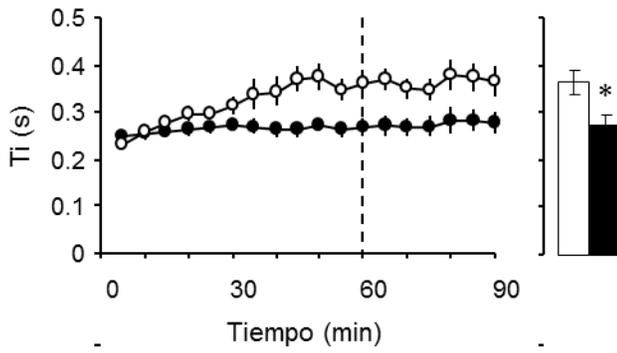
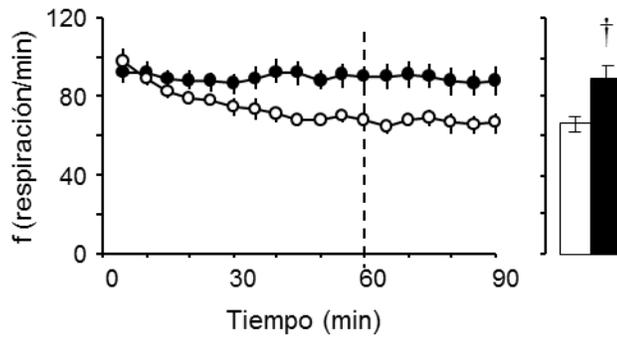


Figura 7. Imágenes de cortes histológicos de pulmones de cobayos sanos(A), Mientras que en el grupo B se observan cortes de pulmones de cobayos expuestos a humo de cigarro, mostrando enfisema.

En la pletismografía los valores medios para los grupos de control y EPOC se ilustran en las figuras 8-10. En el modelo de EPOC, la exposición crónica a humo de cigarrillo produce un aumento estadísticamente significativo en la frecuencia de respiración ($\dagger p < 0.01$). Con una disminución correspondiente en T_i , T_e , y T_r ($* p < 0.05$ para todos), mientras que el ciclo de trabajo (T_i / T_{tot}) no cambió con respecto al grupo control. Los volúmenes y flujos respiratorios no difirieron entre los grupos de EPOC y de control, aunque hubo una tendencia en MV, PIF, PEF, y EF50 a ser mayor en el primer grupo. Por último, el Pen_h y TP ($\dagger p < 0.01$ para ambos) fueron más bajos, mientras que la TB y R_{pef} ($* p < 0.05$ para ambos) fueron mayores en el grupo con EPOC en comparación con los animales control.

A)

○ □ Control
● ■ EPOC



B)

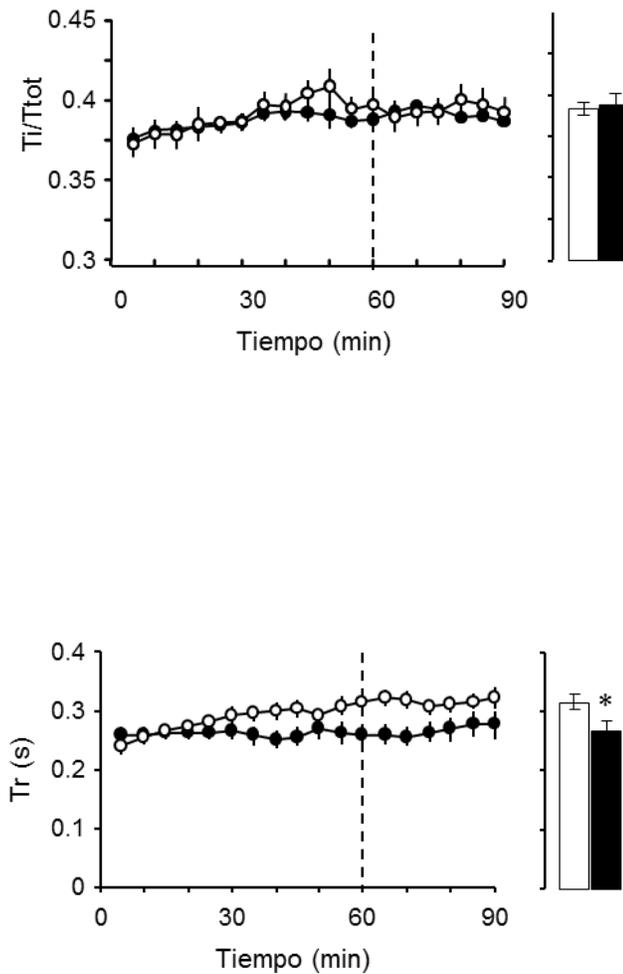
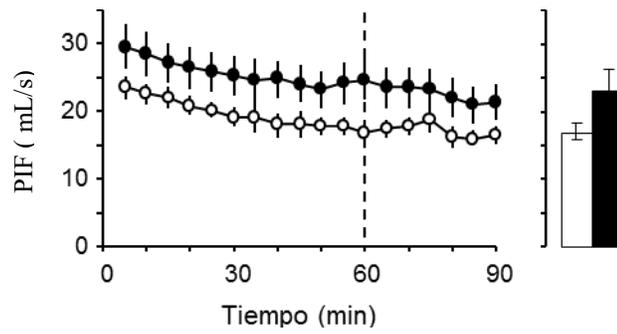
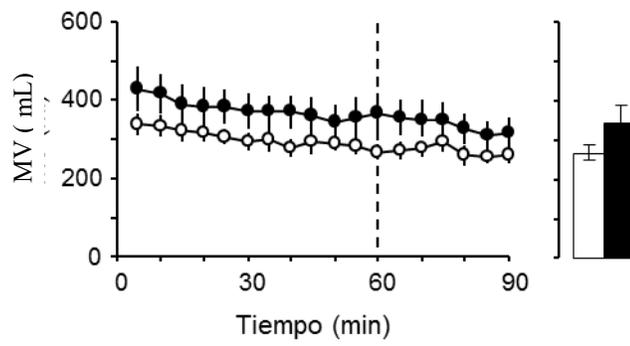
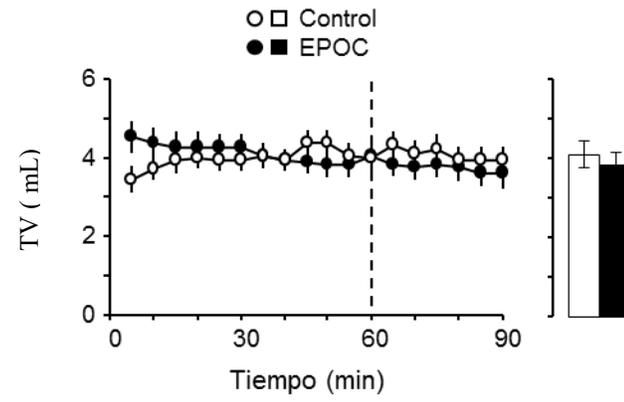
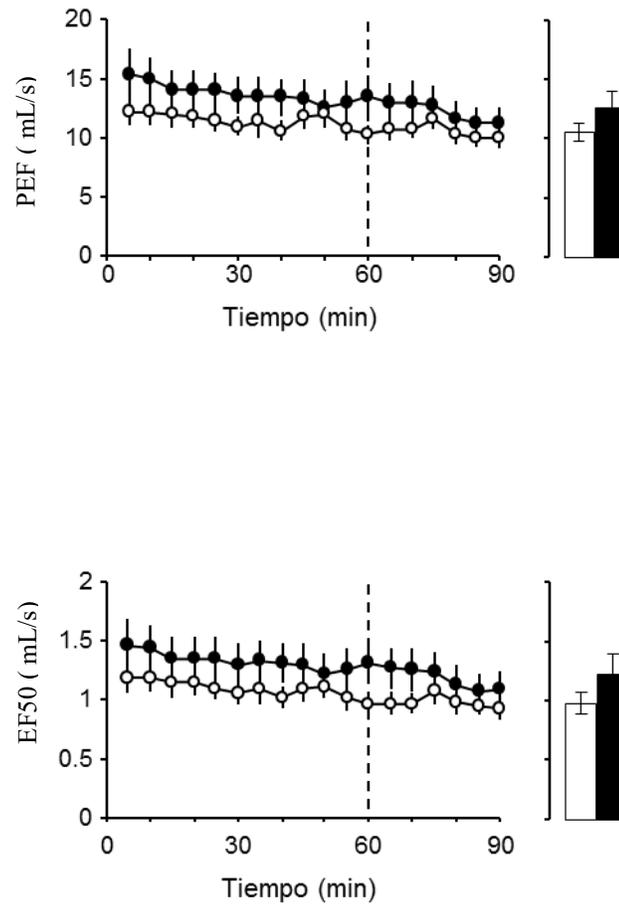


Figura 8. Valores de los periodos respiratorios de la pletismografía barométrica de libre movimiento durante 90 minutos .A partir de los 60 min. el animal se aclimata, por lo que después de dicho tiempo, se toman los datos para la comparación del grupo control y el grupo con EPOC. * $p < 0.05$, † $p < 0.01$. A) F = frecuencia, T_e = tiempo espiratorio y T_i =tiempo inspiratorio. B) T_i/T_{tot} = ciclo de trabajo, y T_r = tiempo de relajación

A)

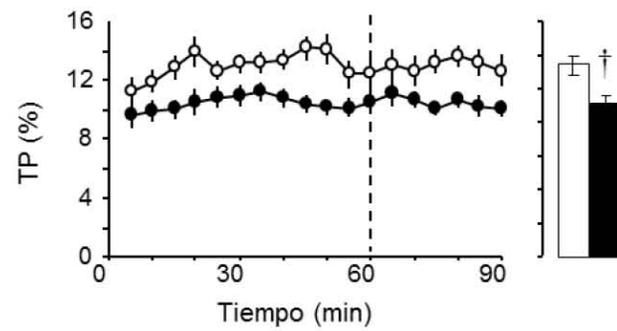
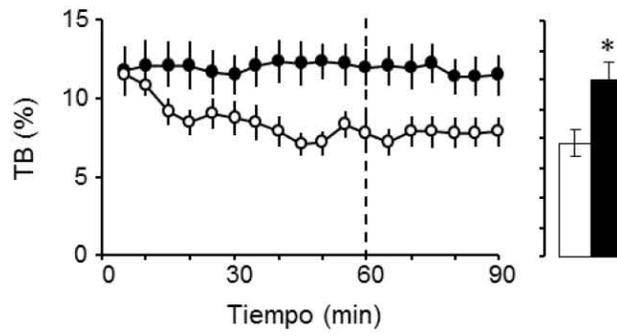
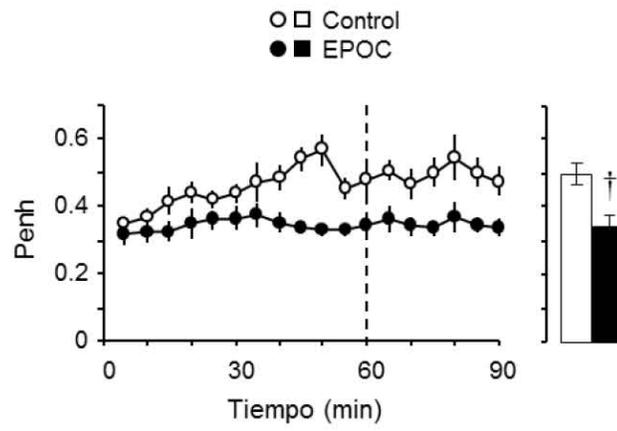


B)



*Figura 9. Volúmenes respiratorios y flujos dados por la pletismografía barométrica de libre movimiento durante 90 minutos. A partir de los 60 min. el animal se aclimata, por lo que después de dicho tiempo, se toman los datos para la comparación del grupo control y el grupo con EPOC. * $p < 0.05$, † $p < 0.01$. A) TV= volumen tidal o corriente, PIF=pico de flujo inspiratorio y MV= volumen minuto. B), PEF= pico de flujo espiratorio y EF50= flujo espiratorio al 50%*

A)



B)

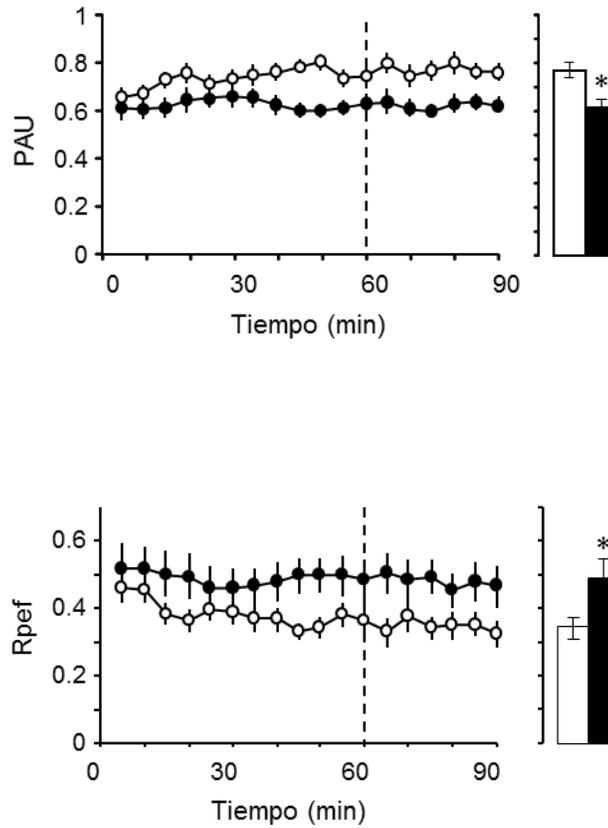


Figura.10 Índices respiratorios dados por la pletismografía barométrica de libre movimiento durante 90 minutos. A partir de los 60 min. el animal se aclimata, por lo que después de dicho tiempo, se toman los datos para la comparación del grupo control y el grupo con EPOC. * $p < 0.05$, † $p < 0.01$. A) Penh= pausa mejorada, TP= tiempo de pausa y TB= tiempo mejorado. B) PAU=pausa, y Rpef=radio del pico del flujo espiratorio

DISCUSIÓN

La pletismografía de libre movimiento, es un procedimiento que analiza la función respiratoria en animales despiertos. Esta técnica ha demostrado ser útil para evaluar patrones anormales específicos en los diferentes niveles del tracto respiratorio. La literatura describe la función pulmonar en algunos animales de laboratorio y refiere tres tipos de patrones respiratorios anormales [Vijayaraghavav et al., 1993] [Vijayaraghavav et al., 1994]. 1) **patrón del tracto respiratorio superior**, en el que un cierre de la glotis y aumento de la resistencia laríngea produce el fenómeno conocido como "freno" (cuantificada por la TB); Este se produce en la fase espiratoria temprana y causa un aumento en la duración de la Te, que da lugar a una disminución de f. 2) **patrón conductor de la vía aérea pulmonar**, es clásicamente descrito como una prolongación de Te debido a una disminución del flujo aéreo espiratorio secundaria a la obstrucción de las vías respiratorias, que causa una caída en f. Con el desarrollo de la pletismografía de cámara única, el Penh se presentó como un sustituto para la resistencia del pulmón (RL) y su incremento es un indicador de broncoconstricción [Chong et al., 1998] [Hamelmann et al. 2006] [Vargas et al. 2010]. EF50 también se ha propuesto como una medida de resistencia de las vías aéreas y tiene buena correlación con medidas invasivas, como la resistencia de vía aérea específica [Hoymann, 2012] [Vijayaraghavan et al., 1993]. 3) **el patrón a nivel alveolar** se caracteriza por acortamiento de Ti y Te, f mayor y disminución de VC, representa el patrón de respiración como ventilación rápida y superficial; un alto nivel de anormalidad puede incrementar PAU (cuantificado por TP).

Para hacer el análisis más fácil, hemos estratificado los parámetros pletismográficos en los siguientes tres grupos diferentes, períodos respiratorios: f , T_i , T_e , T_i/T_{tot} y T_r (figura 8); volúmenes respiratorios y flujos: VC , MV , PIF , PEF y $EF50$ (figura 9) e índices respiratorios: $Penh$, TB , TP , PAU y R_{pef} (figura 10). También, como se indicó anteriormente, se omiten los primeros 60 minutos de la pletismografía de registro con el fin de reducir el sesgo inducido por el estrés del animal. En este contexto, los parámetros presentaban cambios espontáneos durante los primeros 60 min, con una tendencia hacia la estabilización durante los últimos 30 min. En cambio, en el grupo de EPOC casi no había cambios en períodos respiratorios y en los índices durante el registro de 90 minutos, que, a primera vista, podría sugerir que estos cobayos mantienen la tensión durante todo el estudio. Sin embargo, la tendencia descendente del MV durante el estudio, que fue paralela a la tendencia observada en el grupo control, puede indicar que estos animales tenían niveles progresivamente más bajos de estrés [Masaoka y Homma, 1997]. Para períodos respiratorios, después de los primeros 60 min de la aclimatación del animal a la cámara pletismográfica, observamos en el grupo de EPOC, que la frecuencia respiratoria fue aumentada, mientras que T_i , T_e y T_r se disminuyeron, en comparación con el grupo control. Estas características respiratorias asemejan el patrón alveolar descrito por Vijayaraghavan et al., que puede corresponder a la activación de C-fibras vagales en el parénquima pulmonar por el proceso patológico (inflamatorio) que conduce a enfisema [Barnes, 2016]. Sin embargo, otras causas de la respiración rápida y superficial pueden también participar, como la fatiga de músculos inspiratorios [Gallagher et al. 1985]. Sea cual sea el mecanismo, este patrón respiratorio en nuestro modelo

de EPOC es totalmente parecido con el patrón de respiración superficial a menudo observado en pacientes con EPOC [Dellweg et al. 2008][Loveridge et al. 1984]. Por otra parte, nuestros resultados mostraron que el ciclo de trabajo (T_i/T_{tot}) no fue afectado por la exposición al humo del tabaco, un hallazgo que también se ha descrito en pacientes con EPOC [Loveridge et al. 1984].

Con respecto a los volúmenes de aire, el TV no mostró diferencias entre los grupos de estudio, MV se incrementó ligeramente entre cobayos expuestos al humo de cigarro, que es consistente con las observaciones de otros autores y refleja probablemente la respuesta a una mayor tasa metabólica en estos animales [Gastinger et al., 2014]. Asimismo, los valores de flujo de aire (PIF, PEF y EF50) aumentaron en el grupo de EPOC. Aunque las presiones de aire alcanzado en PIF y PEF pueden ser secundarias a la frecuencia de la respiración creciente, los valores más altos de EF50 merecen más explicaciones. EF50 se ha correlacionado inversamente con la obstrucción de las vías respiratorias [Vijayaraghavav et al.,1993] [Vijayaraghavav et al.,1994]. y así el aumento no significativo de este parámetro en el grupo de EPOC está en consonancia con los valores más bajos de P_{enh} , el índice clásico para evaluar la obstrucción de vía aérea en el contexto del asma y otras enfermedades pulmonares [Chong et al. 1998][Hamelmann et al., 1997][Vargas et al., 2010]. Estos resultados fueron sorprendentes ya que, junto con el enfisema, esperaba algún grado de obstrucción de vía aérea que ocurre en nuestro modelo de EPOC. Recientemente, encontraron que valores de P_{enh} crecientes eran evidentes después de 5 semanas de exposición al humo del cigarrillo en un modelo de cobayo [Domínguez et al., 2014]. No hay ninguna explicación clara para estos resultados discordantes,

pero las diferencias en intensidad (5 cigarrillos por día) o duración (6 meses) en su método de exposición al humo de cigarro puedan haber producido obstrucción de las vías respiratorias más que en nuestro modelo. Además, mientras que se utilizaron cobayos hembras, estos autores emplearon los animales machos, y es sabido que en modelos animales y en humanos, el tipo y grado de las lesiones de EPOC varía según el sexo [Hardin et al., 2016][Tam et al., 2016]. Períodos respiratorios anormales (TB y TP) reflejan elongaciones (es decir, el flujo de aire es casi cero) en el principio (TB) o al final (TP) de la fase espiratoria, respectivamente [Vijayaraghavan et al., 1993]. En comparación con el grupo control, TP era más corto y TB fue mayor en el grupo de EPOC. El acortamiento de TP simplemente podría estar relacionado con la frecuencia respiratoria mayor alcanzada por el grupo de EPOC. En cambio, la mejora notable de la TB observados después del periodo de exposición al humo de cigarro sugiere que el cierre de la glotis (frenado) comprende una parte clave de nuestro modelo de EPOC en cobayos.

CONCLUSIONES

En este estudio, durante 10 semanas de exposición al humo de cigarro, se generaron lesiones enfisematosas en los pulmones de cobayos y produjeron cambios funcionales en la pletismografía barométrica en libre movimiento, caracterizado por los siguientes parámetros: 1) un patrón de respiración superficial con mayor f , disminución T_i , T_e , T_r , TP y PAU . 2) disminución de $Penh$ y una tendencia hacia el aumento de $EF50$, probablemente como consecuencia de la disminución de la distensibilidad. 3) mayor TB , sugiriendo estrechamiento laríngeo.

4) una tendencia hacia el aumento de MV, que podría constituir la respuesta fisiológica a una mayor tasa metabólica. Muchos de estos cambios funcionales se asemejan a los observados en pacientes con EPOC, corroborando así la idoneidad de este modelo de cobayo para el estudio de esta enfermedad.

REFERENCIAS

1. Asociación Latinoamericana de Tórax (ALAT). Guía latinoamericana ALAT para el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. 2014 <https://www.alatorax.org/epoc/guia-epoc-alat>.
2. Barnes P.J. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol*, 2016;138:16-27.
3. Barnes P.J. y Celli B. Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *European Respiratory Journal*, 2009; 33: 1165-1185.
4. Barnes P.J., Shapiro S.D. y Pauwels R.A. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *European Respiratory Journal*, 2003; 22:672-688.
5. Bazan-Perkins B., Vargas M.H., Sánchez G.E., Chavez J. y Montaña L.M. Spontaneous changes in guinea pig respiratory pattern during barometric plethysmography: role of catecholamines and nitric oxide. *Exp Physiol*.2004;89:623-628.
6. Canning B. y Chou Y. Using guinea pigs in studies relevant to asthma and COPD. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 2008; 21:702-720.
7. Chong B.T., Agrawal D.K., Romero F.A. y Townley R.G. Measurement of bronchoconstriction using whole-body plethysmograph: comparison of freely moving versus restrained guinea pigs. *J Pharmacol Toxicol Methods*,1998;39:163-168.
8. Dellweg D., Haidl P., Siemon K., Appelhans P. y Kohler D. Impact of breathing pattern on work of breathing in healthy subjects and patients with COPD. *Respir Physiol Neurobiol*, 2008;161:197-200.

9. Doina M. E., Mitrofan E. y Mihailovici M. Chronic Obstructive Pulmonary Disease in a new concept. Romanian Journal of Morphology and Embryology, 2007; 48: 207–214.
10. Dominguez F. D., Ferrer E., Puig P. R., Carreno C., Prats N., Aparici M., Musri M.M., Gavalda A., Peinado V.I., Miralpeix M. y Barberá J.A. Effects of acridinium bromide in a cigarette smoke-exposed guinea pig model of chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Cell Mol Biol, 2014;50:337-346.
11. Durán L.A., Cisneros F.J. y Gutiérrez E.A. Calidad de vida en enfermedad pulmonar obstructiva crónica: experiencia de un hospital del occidente, México. 2015, de Instituto Mexicano del Seguro Social Sitio web: <http://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2015/im153u.pdf>.
12. Gallagher C.G., Hof V.I. y Younes M. Effect of inspiratory muscle fatigue on breathing pattern. J Appl Physiol ,1985;59:1152-1158.
13. Gastinger S., Donnelly A., Dumond R. y Prioux J. A review of the evidence for the use of ventilation as a surrogate measure of energy expenditure. J Parenter Enteral Nutr, 2014;38:926-938.
14. Halbert R., Natoli J., Gano A., Badamgarav E., Buist A. y Mannino D. Global burden of COPD: systematic review and meta-analysis. European Respiratory Journal, 2006; 28: 523-532.
15. Hamelmann E., Schwarze J., Takeda K., Oshiba A., Larsen G.L., Irvin C.G. y Gelfand E.W. Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. Am J Respir Crit Care Med, 1997;156:766-775.
16. Hardin M., Foreman M., Dransfield M.T., Hansel N., Han M.K., Cho M.H., Bhatt S.P., Ramsdell J., Lynch D., Curtis J.L., Silverman E.K., Washko G. y DeMeo D. Sex-specific features of emphysema among current and former smokers with COPD. European Respiratory Journal, 2016;47:104-112.
17. Hoymann H.G. Lung function measurements in rodents in safety pharmacology studies. Front Pharmacol 2012;3:156.

18. Hu G., Zhou Y., Tian J., Yao W., Li J., Li B. y Ran P. Risk of COPD from Exposure to Biomass Smoke. *Chest*, 2010; 138: 20-31.
19. IMSS. Estado de resultados y balance general. México: Instituto Mexicano del Seguro Social, 2004. <http://www.imss.gob.mx/sites/all/statics/pdf/informes/20142015/21-InformeCompleto.pdf>.
20. Loveridge B., West P., Anthonisen N.R. y Kryger M.H. Breathing patterns in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis*, 1984;130:730-733.
21. Masaoka Y. y Homma I. Anxiety and respiratory patterns: their relationship during mental stress and physical load. *Int J Psychophysiol* ,1997;27:153-159.
22. Menezes, A. PLATINO. Montevideo: Asociación Latinoamericana del Tórax-ALAT.2007.
23. Montaña R. M., Cisneros L. J., Pedraza C.J. y Ramos A. C. Presencia de estrés oxidativo en un modelo de enfermedad pulmonar obstructiva crónica inducido con exposición a humo de leña en cobayos. *Revista Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 2009; 22:272-279.
24. Muccitelli R.M., Tucker S. S., Hay D. W., Torphy T.J. y Wasserman M.A. Is the guinea pig trachea a good in vitro model of human large and central airways? Comparison on leukotriene-, methacholine-, histamine- and antigen-induced contractions. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1987; 243: 467–473.
25. OMS Chronic respiratory diseases. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD). 2004 Disponible en: www.who.int/respiratory/copd/en.
26. Papandrinopoulou D., Tzouda V. y Tsoukalas G. Lung Compliance and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Pulmonary Medicine*, 2012:1-6.
27. Pérez P.R., Fernández R., López V. M., Montes de Oca M., Muiño A., Tálamo C., Brito J. J., Valdivia G. y Baptista M. A. Airflow Obstruction in Never Smokers in Five Latin American Cities: The PLATINO Study. *Archives of Medical Research*, 2012; 43: 159-165.

28. Pérez P.R., Regalado J., Vedal S., Paré P., Chapela R., Sansores R. y Selman M. Exposure to biomass smoke and chronic airway disease in Mexican women. A case-control study. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 1996; 154: 701-706.
29. Prescott E., Bjerg A.M., Andersen P.K., Lange P. y Vestbo J.G. Difference in smoking effects on lung function and risk of hospitalization for COPD: results from a Danish longitudinal population study. *European Respiratory Journal*, 1997; 10:822-7.
30. Proyecto Latino-Americano de Investigación en Obstrucción Pulmonar (PLATINO), 2006, <http://www.platino-alat.org/publicaciones.html>
31. Ressmeyer A., Larsson A., Vollmer E., Dahlen S., Uhlig S. y Martin C. Characterisation of guinea pig precision-cut lung slices: comparison with human tissues. *European Respiratory Journal*, 2006; 28: 603-611.
32. Reynales S.L.M., Rodríguez B.R.Á., Jiménez J.A., Juárez M.S.A., Castro R.A. y Hernández A.M. Costos de la atención médica atribuibles al consumo de tabaco en el Instituto Mexicano del Seguro Social. *Salud Pública de México*, 2006 http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342006000700007&lng=es&tlng=es.
33. Salvi S. y Barnes P. Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers. *The Lancet*, 2009; 374:733-743.
34. Selman M., Montano M., Ramos C., Vanda B., Becerril C., Delgado J., Sansores R., Barrios R. y Pardo A. Tobacco smoke-induced lung emphysema in guinea pigs is associated with increased interstitial collagenase. *Am J Physiol*, 1996; 271:734-743
35. Shapiro S. e Ingenito E. The Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2005; 32: 367-372.
36. Sorheim I., Johannessen A., Gulsvik A., Bakke P., Silverman E. y DeMeo, D. Gender differences in COPD: are women more susceptible to smoking effects than men? *Thorax*, 2010; 65:480-485.

37. Stockley R. Neutrophils and Protease/Antiprotease Imbalance. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 1999; 160: S49-S52.
38. Tam A., Churg A., Wright J.L., Zhou S., Kirby M., Coxson H.O., Lam S., Man S.F., y Sin D.D. Sex Differences in Airway Remodeling in a Mouse Model of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Am J Respir Crit Care Med, 2016;193:825-834.
39. Vargas M.H., Sommer B., Bazan P.B. y Montaña L.M. Airway responsiveness measured by barometric plethysmography in guinea pigs. Vet Res Commun ,2010;34:589-596.
40. Vestbo J., Hurd S.S., Agustí A.G., Jones P.W, Vogelmeier C., Anzueto A., Barnes P., Fabbri L., Martinez F., Nishimura M., Stockley R., Sin D. y Rodriguez R.R. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: GOLD executive summary. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2013; 187:347-365.
41. Vijayaraghavan R., Schaper M., Thompson R., Stock M.F., Boylstein L.A., Luo J.E. y Alarie Y. Computer assisted recognition and quantitation of the effects of airborne chemicals acting at different areas of the respiratory tract in mice. Arch Toxicol, 1994;68:490-499.
42. Vijayaraghavan R., Schaper M., Thompson R., Stock M.F. y Alarie Y. Characteristic modifications of the breathing pattern of mice to evaluate the effects of airborne chemicals on the respiratory tract. Arch Toxicol, 1993;67:478-490.
43. Wright J., Cosio M. y Churg A. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology, 2008; 295: L1-L15.