

Efecto de la pulverización con un aerosol de solución salina hipertónica sobre la depuración mucociliar, en un modelo animal

Dres. Juan M. Figueroa*, María L. Cassará** y Enrique J. Mansilla***

Resumen

Introducción. La depuración mucociliar es la primera barrera protectora del epitelio respiratorio y su enlentecimiento se asocia con numerosas patologías.

Recientemente se ha descripto que lavajes y nebulizaciones con solución salina hipertónica aceleran la depuración mucociliar en pacientes con diferentes enfermedades (sinusitis, asma, fibrosis quística). En el presente trabajo evaluamos el efecto de un aerosol de solución salina hipertónica (ClNa 3%) sobre la depuración mucociliar en un modelo animal *in vitro*.

Material y métodos. Se utilizaron explantes de mucosa palatina de sapo, desarrollando sobre ellos una nueva forma de análisis de la depuración mucociliar. Se evaluó el efecto de un aerosol de solución salina hipertónica comparándolo con solución fisiológica.

Resultados. La aplicación de un aerosol de solución salina hipertónica produjo un significativo aumento de la depuración mucociliar en la mucosa palatina del sapo.

Conclusión. La aplicación de un aerosol de solución salina hipertónica produjo, en un modelo animal *in vitro*, un efecto acelerador de la depuración mucociliar similar al observado con lavajes o nebulizaciones de solución salina hipertónica en patología humana.

Palabras clave: aerosol, solución salina hipertónica, depuración mucociliar.

Summary

Introduction. The mucociliary clearance is the first protective barrier of the respiratory epithelium and its slowness is associated with several diseases.

Recently it has been described that washes and nebulizations with hypertonic saline solution accelerate the mucociliary clearance in different diseases (sinusitis, asthma, cystic fibrosis). We evaluated the effect of a spray of hypertonic saline solution (ClNa 3%) on the mucociliary clearance in an animal model *in vitro*.

Material & methods. We used explants of the palatine mucosa of the toad, developing on them a new test for the evaluation of the mucociliary clearance. We compared the effect of a spray of hypertonic saline solution versus physiological saline solution.

Results. On the toad palatine mucosa, the application of an hypertonic saline solution spray leads to a significant acceleration of the mucociliary clearance.

Conclusion. The application of a spray of hypertonic saline solution in an *in vitro* animal model

accelerates the mucociliary clearance, a similar effect to what has been observed with hypertonic saline washes or nebulizations in different human diseases.

Key words: spray, hypertonic saline solution, mucociliary clearance.

INTRODUCCIÓN

El funcionamiento normal de la barrera mucociliar es el primer elemento protector de todo el epitelio respiratorio, desde la nariz hasta la pequeña vía aérea.

El moco que recubre el epitelio respiratorio está constituido por una capa externa (gel) y otra interna (sol), entre las cuales se encuentra una película más delgada de surfactante. Las cilias están inmersas dentro de la capa interna y los pequeños ganchos que poseen en su extremo superior se adhieren al gel, de manera que al ondular en dirección a la faringe, arrastran esta "alfombra". Inmediatamente después del movimiento, las cilias se desenganchan del gel y se repliegan dentro del sol para volver a extenderse y enganchar la siguiente zona del gel. De esta manera, el moco normalmente secretado por las células del epitelio respiratorio es transportado por las cilias en dirección a la faringe, donde se produce su deglución. La eficiencia y velocidad de este transporte o lavado (depuración) dependen tanto de las propiedades fisicoquímicas del moco como de las características de la motilidad ciliar. El enlentecimiento de la depuración mucociliar deteriora las posibilidades defensivas del epitelio y participa en el desarrollo de numerosas patologías respiratorias altas y bajas.¹⁻³

En ensayos terapéuticos en humanos se ha descripto recientemente que la utilización de lavajes o nebulizaciones

* Secciones
Otorrinolaringología
y Neumonología
Infantil. Hospital de
Clínicas (UBA).

Instituto de
Neurobiología.

** Instituto de
Investigación
Biomédica-Fundación
P. Cassará.

*** Sección
Otorrinolaringología.
Hospital de Clínicas
(UBA).

Correspondencia:
Dr. Juan M. Figueroa.
Instituto de
Neurobiología.
Serrano 669.
(1414) Ciudad
de Buenos Aires.
Correo electrónico:
figuejuan@unilerta.com.ar

con solución salina hipertónica acelera la depuración mucociliar en individuos sanos y en pacientes con diferentes patologías. Talbot y col. describieron una aceleración de la depuración mucociliar nasal luego de la realización de lavajes con solución salina hipertónica,⁴ y Shoseyov y col. observaron mejoría clínica y radiológica en niños con sinusitis crónica tratados con lavajes nasales con solución salina hipertónica.⁵ Daviskas y col. y Eng y col. describieron un efecto acelerador de la depuración mucociliar bronquial con la utilización de nebulizaciones de solución salina hipertónica en pacientes asmáticos y fibroquísticos, respectivamente.^{6,7} Si se considera la capacidad osmoceptora de las células y nervios de la mucosa respiratoria,^{8,9} nos planteamos la posibilidad de que el beneficio de estas prácticas, más que de un efecto mecánico, podría depender del desencadenamiento de una mayor movilización mucociliar en respuesta al estímulo hiperosmótico. De ser así, mínimas cantidades de solución salina hipertónica podrían ser suficientes para obtener el efecto terapéutico obviando la realización de lavajes o nebulizaciones prolongadas, de dificultosa realización en la población pediátrica.

A partir de este razonamiento, decidimos inicialmente evaluar el efecto de la pulverización con un aerosol de solución salina hipertónica amortiguada (100 ml/disparo) sobre la depuración mucociliar en un modelo animal in vitro (mucosa faríngea de sapo).

MATERIAL Y MÉTODOS

La mucosa faríngea de los batracios está cubierta por un epitelio ciliado de características semejantes al epitelio respiratorio de los mamíferos, por lo que ha sido frecuentemente utilizada como modelo experimental para estudiar la depuración mucociliar. La estimación cuantitativa en este tipo de modelos se realiza mediante diferentes técnicas: observación del transporte de partículas, análisis digital del movimiento ciliar, etc.¹⁰⁻¹² Cuando se realizan estudios in vitro sobre secciones de epitelio, éste permanece vital y activo por más de 24 horas luego de su escisión. Los estudios publicados muestran que las cilias se mantienen activas en tanto estén recubiertas de

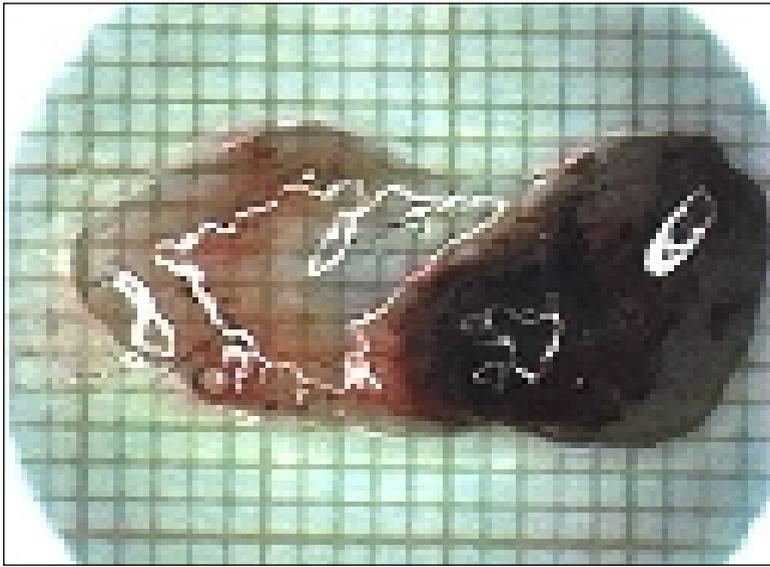
moco y exista una mínima presión que actúe como estímulo sobre ellas. A partir de estas observaciones, desarrollamos una nueva y sencilla técnica para cuantificar la depuración mucociliar.

Se tomaron 21 sapos (*Bufo arenarum Hensen*) mantenidos en cautiverio en un estanque cercado, con ciclo luz/oscuridad natural y alimentados con insectos vivos. Antes de comenzar la experiencia, cada sapo fue acondicionado en una sala a una temperatura de 20° C durante 30 minutos. Se desmeduló el animal mediante punción con aguja a nivel de la articulación occipitovertebral y se lo colocó en decúbito dorsal con la boca abierta mediante separadores, exponiendo el paladar, faringe, y laringe. Tomando como referencia el promontorio central que corresponde al fondo de la silla turca, se reseco un rectángulo de mucosa de 1 cm de ancho por 0,5 cm de largo. Una vez retirado el mismo, se lo dividió en dos cuadrados iguales de 0,5 x 0,5 cm, cada uno correspondientes a las mitades derecha e izquierda de la faringe. Se colocó cada mitad en una cápsula de vidrio. Una de ellas fue pulverizada con un disparo (100 ml) de solución salina hipertónica amortiguada (CINa 3 M, pH= 7), contenida en un frasco de vidrio con atomizador, desde una distancia de 10 cm. La otra mitad fue pulverizada de manera similar con solución fisiológica. Se aguardaron 15 minutos y luego se colocaron ambas mitades de mucosa en una caja transparente de 15 cm de ancho x 8 cm de longitud x 8 cm de alto, cuyo fondo estaba cubierto con una placa de vidrio. Los cortes de mucosa, con el moco que los cubría, se colocaron sobre el vidrio del fondo con las cilias hacia abajo. En contados minutos pudo observarse a simple vista que los cuadrados de mucosa comenzaron a avanzar dejando atrás una estela de moco. Al cabo de una hora se retiró la placa de vidrio y se midió la distancia que había recorrido cada porción de epitelio (*Fotografía 1*).

RESULTADOS

Al comparar el recorrido de las dos secciones de la faringe de un mismo animal, en 57% de las muestras se observó una mayor distancia en la sección tratada con solución hipertónica, en 20% no hubo dife-

FOTOGRAFÍA 1



Sección de faringe de sapo. Obsérvese la estela de moco reflejando la distancia recorrida por la mucosa.

rencias y en 23% hubo un mayor recorrido en las secciones pulverizadas con solución fisiológica. La distancia media recorrida por las secciones de mucosa tratadas con solución salina hipertónica fue de $7,7 \pm 1,8$ mm, en tanto la distancia media recorrida por las secciones pulverizadas con solución fisiológica fue de $4,9 \pm 1,2$ mm (prueba de Student $p < 0,01$).

DISCUSIÓN

El transporte de sustancias atrapadas en el moco respiratorio hacia el aparato digestivo fue descrito en la rana por Claude Bernard en 1866. Él mismo diseñó un aparato para cuantificar la depuración mucociliar mediante un sistema de engranajes.¹³ El avance posterior del conocimiento confirmó la existencia de estos mecanismos de "lavado" del epitelio respiratorio en los mamíferos. En 1977, Aiello y col. retomaron la observación de la mucosa faríngea de los batracios como modelo para el estudio de la depuración mucociliar. A partir de entonces se realizaron numerosas experiencias validando esta metodología y la aplicabilidad de sus resultados a la fisiología y farmacología humanas.

El modelo desarrollado por nosotros se basa en la inversión de la mucosa, convirtiendo lo que normalmente es un mecanis-

mo de cinta de transporte de partículas extrañas, en un mecanismo de oruga de autotransporte. De esta manera, la presión ejercida por el propio peso del tejido se mantiene como un estímulo de magnitud constante para el movimiento ciliar. La comparación de hemisecciones de un mismo animal nos permite evitar la influencia de diferencias basales dependientes de variables no controladas como la edad, el estado de hidratación o algún grado de inflamación subclínica. En este modelo observamos un claro aumento de la transportabilidad de las secciones de mucosa que recibieron una pulverización con solución salina hipertónica. Este incremento de la autotransportabilidad de la mucosa sobre sus cilias puede asimilarse a un aumento de la depuración mucociliar, en el que las cilias transportan la capa continua de moco que se halla depositada sobre ellas.

Este efecto coincide con el que han descrito diferentes autores con la utilización de lavajes y nebulizaciones de solución salina hipertónica en humanos sanos y con distintas patologías. En estudios *in vitro* algunos autores han descrito un efecto ciliostático de las soluciones hipertónicas, pero ellos utilizaron concentraciones de CINa cercanas al doble de las utilizadas por nosotros y por quienes han obtenido efectos terapéuticos positivos.¹⁴ El escaso volumen de solución pulverizada y las características controladas-comparativas de nuestro ensayo alejan la posibilidad de una acción mecánica y jerarquizan potenciales mecanismos de acción dependientes de las propiedades fisicoquímicas de la solución hipertónica. Trabajos *in vitro* e *in vivo* han mostrado la capacidad de las células y nervios de la mucosa respiratoria de modificar su actividad ante las variaciones de la tonicidad en la superficie de la misma. Si bien nuestro modelo no nos permite discernir en qué medida el efecto corresponde a un aumento de la motilidad ciliar inducido por acción directa sobre las células ciliadas o por modificación en las características del moco segregado, descarta, en cambio, cualquier influencia del sistema nervioso central o de factores séricos, lo que resalta el valor de la regulación local en la depuración mucociliar.

Más allá de estas incógnitas funcionales, los resultados resultan atractivos al coincidir con las observaciones de los trabajos clínicos sobre los efectos de las soluciones salinas hipertónicas, pero utilizando una forma farmacéutica de uso potencialmente más sencillo.

CONCLUSIÓN

La pulverización con un aerosol de solución salina hipertónica (CINa 3%, pH 7) aumenta la depuración mucociliar en secciones de mucosa faríngea de sapo *in vitro*. ■

BIBLIOGRAFÍA

1. Sleigh MA, Blake JR, Liron N. The propulsion of mucus by cilia. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137:724-6.
2. Corbo GM, Foresi A, Bofitto P, Mugnano A, Agabiti N, Cole PJ. Measurement of nasal mucociliary clearance. *Arch Dis Child* 1989; 64:545-50.
3. Sakakura Y, Majima Y, Harada T, Hattori M, Ukai K. Nasal mucociliary transport of chronic sinusitis in children. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1992; 118:1234-7.
4. Talbot et al. Mucociliary clearance and buffered saline hypertonic solution. *Laryngoscope* 1997; 197:500-3.
5. Shoseyov D, Bibi H, Shai P, Shoseyou N, Shazberg G, Hurvitz H. Treatment with hypertonic saline versus normal saline wash of pediatric chronic sinusitis. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101:602-5.
6. Daviskas E, Anderson SD, Gonda I, Eberl S, Meikle S, Bautovich G. Inhalation of hypertonic saline aerosol enhances mucociliary clearance in asthmatic and healthy subjects. *Eur Respir J*. 1996; 9:725-32.
7. Eng PA, Morton J, Douglass JA, Riedler J, Wilson J, Robertson Cf. Short-term efficacy of ultrasonically nebulized hypertonic saline in cystic fibrosis. *Pediatric Pulmonol* 1996; 21:77-83.
8. Willumsen et al. Selective response of human airway epithelia to luminal but not serosal solution hypertonicity. Possible role for proximal airway epithelia as an osmolality transducer. *J Clin Invest* 1994; 94:779-87.
9. Sanico AM, Philip G, Lai GK, Toghias A. Hyperosmolar saline induces reflex nasal secretions, evincing neural hyperresponsiveness in allergic rhinitis. *J Appl Physiol*. 1999; 86:1202-10.
10. Aiello E, Sleigh M. Ciliary function of the frog oropharyngeal epithelium. *Cell Tissue Res* 1977; 178:267-73.
11. Rubin BK, Ramírez O, King M. Mucus-depleted frog palate as a model for the study of mucociliary clearance. *J Appl Physiol* 1990; 69:424-9.
12. King M. Experimental models for studying mucociliary clearance. *Eur Respir J* 1998; 11:222-8.
13. Bernard MC. Intensité des mouvements ciliaires. En: *Leçons sur les propriétés des tissus vivants*. Paris: Germer Baillere ed., 1866:136-43.
14. Boek WM, Keles N, Graamans K, Huizing EH. Physiologic and hypertonic saline solutions impair ciliary activity *in vitro*. *Laryngoscope* 1999; 109:396-9.