

VIII JORNADA DE DIFUSIÓN DE LA INVESTIGACIÓN Y EXTENSIÓN – FCV-UNL

RESUMEN EXTENDIDO

DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO DE CRISTALES DE HEMOGLOBINA EN PULMONES DE RATAS WISTAR/CMEDC.

Arnodo V¹, Sacco SC^{1,2}, Belotti EM^{1,2}, Chiaraviglio JA¹, Pereyra EAL¹,

Rebelindo E¹, Salvetti NR¹, Ortega HH¹.

¹Centro de Medicina Comparada (CMC), Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICiVet-Litoral), Universidad Nacional del Litoral (UNL) / Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

²Cátedra de Patología Veterinaria. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Litoral.

* Correspondencia: Sacco SC, E-mail: sofiasaccovet@gmail.com

Editado por: R. Sobrero. C. Baravalle y V. Matiller

RESUMEN

Los animales de laboratorio, como los ratones y las ratas, se han utilizado durante mucho tiempo como modelos para mejorar nuestra comprensión de varias enfermedades y tratamientos. El transcurso normal de la vida de los animales provoca cambios histológicos en muchos órganos y estos se denominan lesiones de fondo o "background". Se reconoce que muchos modelos animales tienen estas lesiones que pueden ser difícil de diferenciar de las lesiones inducidas por xenobióticos. Los cristales de hemoglobina son lesiones "background" que se observan ocasionalmente en ratas debido a que la hemoglobina de la rata cristaliza más fácilmente que la hemoglobina de otras especies. Reportamos aquí tres casos de cristales de hemoglobina encontrados en pulmones de ratas Wistar/Cmedc del Centro de Medicina Comparada (CMC) que no recibieron ningún tipo de tratamiento. El diagnóstico fue confirmado por histopatología. Los cristales de hemoglobina se encontraron típicamente en el espacio extracelular alveolar, fueron rectangulares y rojos, y generalmente estaban asociados espacialmente con eritrocitos extravasados. El objetivo del reconocimiento de las lesiones "background" en los animales de laboratorio es maximizar la confiabilidad y reproducibilidad de los resultados para la investigación traslacional en estudios preclínicos. Este informe proporciona información valiosa que presenta a los cristales de hemoglobina como lesiones "background" que se pueden encontrar en los pulmones de las ratas Wistar/Cmedc de CMC.

Palabras clave: Histopatología, Rata, Cristales de hemoglobina

HISTOPATHOLOGICAL DIAGNOSIS OF HEMOGLOBIN CRYSTALS IN WISTAR / CMEDC RATS LUNGS

SUMMARY

Laboratory animals, such as mice and rats, have long been used as models to improve our understanding of several diseases and the development of treatments. The normal wear and tear of animal life causes histologic changes in many organs and those are called background lesions. Many animal models are recognized to have background lesions for which distinction from xenobiotic-induced injury may be challenging. Hemoglobin crystals are background lesions occasionally seen in rats, because rat hemoglobin crystallizes more readily than does hemoglobin in other species. We report herein three cases of hemoglobin crystals found in lung from untreated Wistar/Cmedc rats from Center for Comparative Medicine (CMC). Diagnosis was confirmed by histopathology. Hemoglobin crystals were found typically in the alveolar extracellular space, they were rectangular and red, and usually spatially associated with extravasated erythrocytes. The aim of recognition of expected background lesions in strains of rats is maximize the reliability and reproducibility of results to translational research in preclinical studies. This report provides a valuable information and present the hemoglobin crystals like a background lesions found in lungs of Wistar/Cmedc rats from CMC.

Keywords: Histopathology, Rat, Hemoglobin crystals

El uso de animales de laboratorio ha permitido lograr innumerables avances en el campo de la ciencia y el desarrollo de nuevos tratamientos y técnicas biosanitarias que mejoren la salud. Dentro de los animales utilizados en investigación, los ratones y las ratas han sido las especies preferidas para los modelos de investigación biomédica debido a su tamaño y similitud anatómica, fisiológica y genética con los humanos. Una de las cepas de ratas más utilizadas en la investigación biomédica es la rata (*Rattus norvegicus*) de las que existen numerosas cepas, como por ejemplo la Wistar. Las lesiones de fondo (en inglés, *background*), incidentales o espontáneas son hallazgos patológicos que generalmente se consideran un cambio en la morfología del tejido fuera del rango de variación normal para una especie o cepa en particular. Estas lesiones ocurren por el desgaste normal de la vida que provoca cambios histológicos en muchos órganos. Estos hallazgos pueden ser confundidos durante los exámenes histopatológicos con lesiones producidas por sustancias evaluadas en ensayos de toxicidad y preclínicos. Muchas lesiones incidentales han sido descritas en pulmones de animales de laboratorio. Los cristales de hemoglobina son lesiones *background* que a menudo pueden hallarse en los pulmones de ratas Wistar. Se conoce que la hemoglobina en los seres humanos y en la mayoría de las especies cristaliza *in vivo* sólo si es estructuralmente anormal, sin embargo, hace algunas décadas que se sabe que la hemoglobina de rata cristaliza fácilmente *in vitro* (Squires y McFadzean, 1963) y se ha observado en relación a ciertas injurias pulmonares. En ratas, estos cristales se han interpretado como un estado intermedio de degradación de la hemoglobina, y pueden evidenciarse fácilmente mediante histopatología. Los cristales son estructuras típicamente rectangulares y se forman en el espacio extracelular, aunque los macrófagos alveolares pueden fagocitarlos. Por lo general, se parecen a los glóbulos rojos por su color y generalmente se asocian principalmente con eritrocitos extravasados. El objetivo de este trabajo fue reportar la presencia de cristales de hemoglobina en pulmones de 3 ratas Wistar/Cmedc del Centro de Medicina Comparada (CMC) del Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICiVet-Litoral). Se llevó adelante siguiendo guías internacionales de cuidado y uso de animales de laboratorio, y de acuerdo a procedimientos aprobados por el Comité de Ética y Seguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral (FCV-UNL). Se efectuó un estudio retrospectivo en los registros del laboratorio de histopatología del Área Analítica del CMC del ICiVet-Litoral. Se evaluaron los casos de ratas Wistar/Cmedc que provenían de monitoreos sanitarios y animales controles (no tratados) de diferentes ensayos. Se incluyeron casos de necropsias realizadas entre 2016 y 2020, en los cuales el pulmón fue remitido para histopatología. A estos animales se realizó la eutanasia y necropsia completa, se tomaron muestras de pulmón que fueron fijadas en formol bufferado al 10%. Las muestras se procesaron mediante la técnica de inclusión en parafina, se realizaron cortes seriados de 4 micras de espesor con micrótopo (Leica RM 2245),

coloración con Hematoxilina y Eosina (Biopur) y la posterior evaluación microscópica. En los archivos del CMC en el período evaluado (2016-2020) se encontraron 42 casos de ratas Wistar/Cmedc en los cuales se remitió pulmón para histopatología, 21 (50%) animales fueron machos y 21 (50%) hembras. Entre esos casos se detectaron 3 (7%) en los cuales se observó la presencia de cristales de hemoglobina en los pulmones de las ratas, 2 machos (de 21 y 120 días de edad) y una hembra (20 días). Macroscópicamente, en los animales que presentaron la lesión se observó una coloración rojiza multifocal en los lóbulos pulmonares de los 3 animales. Microscópicamente, en los 3 animales se evidenciaron zonas hemorrágicas focales, con numerosos eritrocitos extravasados, distribuidas al azar con numerosos cristales de hemoglobina, en la luz de los alvéolos, así como en los tabiques interalveolares y moderado edema alveolar. Los cristales descritos eran rectangulares, eosinófilos, y de bordes aguzados, extracelulares, a veces formando estructuras con forma de estrellas o asteriscos al confluir (Figura 1).

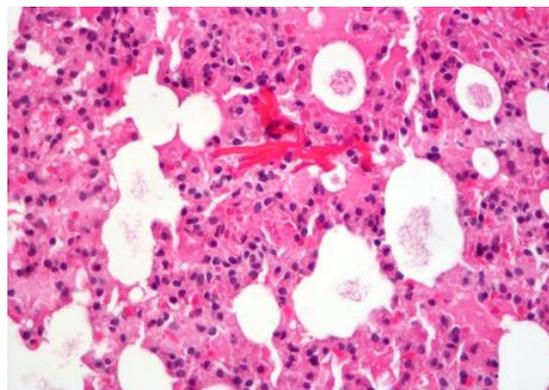


Figura 1. Pulmón. Cristales hemoglobina. H&E.40X.

Existen varios reportes de cristalización de hemoglobina posteriores a lesiones de diversas causas en el pulmón de rata (Ghio et al., 2000), coincidiendo con lo detectado en este estudio. Ocasionalmente, los cristales de hemoglobina pueden aparecer en áreas de hemorragia, a menudo asociados con inflamación, o a la presencia de edema cardiogénico. La cristalización de hemoglobina de rata *in vivo* se observó por primera vez de forma incidental después de una lesión pulmonar por una toxina (Harris y Chen, 1970), y se caracterizó de manera más completa después de una lesión (presión graduada) en la dentición (Rygh y Selvig, 1973). En los casos reportados en este trabajo la presencia de los cristales se observó asociados a zonas de hemorragia y edema pulmonar. Los animales no presentaron signos de enfermedad respiratoria ni lesiones macroscópicas compatibles con alguna patología evidente. Sin embargo, en esas ratas solo se realizó el estudio histopatológico de pulmón, y no se remitieron otros órganos para evaluación microscópica, por lo cual, la presencia otros procesos patológicos concomitantes no puede ser corroborada y causa de la lesión no puede ser determinada. Es importante destacar el diagnóstico y reconocimiento e interpretación de lesiones *background*

en pulmones de animales destinados a la investigación. El registro de la prevalencia de estas lesiones en animales no tratados (lesiones incidentales) es fundamental para las distintas cepas de cada bioterio, ya que estas lesiones pueden también ser inducidas por los compuestos analizados en los estudios preclínicos o toxicológicos. Por ello, la información aportada por este estudio es esencial para que los profesionales que trabajan en investigación biomédica con la cepa Wistar/Cmedc conozcan este hallazgo y puedan hacer una interpretación correcta del mismo ante su aparición en un ensayo biológico.

Bibliografía

Ghio AJ, Richards JH, Crissman KM, Carter JD. 2000. Iron disequilibrium in the rat lung after instilled blood. *Chest*, 118, 814–823.

Harris PN y Chen KK. 1970. Development of hepatic tumors in rats following ingestion of *Senecio longilobus*. *Cancer Res*, 30, 2881–2886.

Rygh P y Selvig KA. 1973. Erythrocyte crystallization in rat molar periodontium incident to tooth movement. *Scand. J. Dent. Res*, 81, 62–73.

Squires S y McFadzean JA. 1963. Behaviour of mammalian hemoglobin after freezing and thawing. *Nature*, 199, 783–784.