

Reconstrucción digital tridimensional para el análisis de las malformaciones intratorácicas congénitas inducidas con nitrofen*

L. Martínez, S. González-Reyes, F. Hernández, V. Fernández-Dumont, W. Martínez-Calonge, E. Burgos, J.A. Tovar

Departamentos de Cirugía Pediátrica y Anatomía Patológica. Hospital Infantil La Paz, Madrid.

RESUMEN: Introducción. Los distintos modelos informáticos de reconstrucción tridimensional ofrecen múltiples ventajas a la hora de analizar y comparar diferentes procesos biológicos y estructuras anatómicas. El modelo experimental en roedores de hernia diafragmática congénita (HDC) inducida por nitrofen ocasiona múltiples anomalías en estructuras derivadas de la cresta neural. El objetivo de este trabajo es analizar mediante un método de reconstrucción tridimensional las posibles alteraciones de los nervios vago y recurrente laríngeo en esta malformación.

Material y métodos. Se usó el modelo experimental de HDC en ratas. Se estudiaron 9 fetos control y otros 9 con HDC. En cada uno se obtuvo un bloque torácico (desde laringe a la bifurcación traqueal) que fue seccionado seriadamente. Se tiñeron uno de cada 10 cortes y las imágenes resultantes (de 90 a 120 en cada feto) se digitalizaron usando un software biológico específico que permitió la reconstrucción tridimensional (TDR-3dbase®) de las estructuras señaladas (nervios vago y recurrente laríngeo, tráquea, esófago y grandes vasos).

Resultados. Se encontraron diferencias en la anatomía nerviosa de los fetos con HDC comparados con los controles: 1) Ausencia de uno de los nervios vagos (4/9). 2) Ausencia de uno de los recurrentes laríngeos (6/9). 3) Hipoplasia evidente de los nervios vagos (2/9). 4) Desviaciones anatómicas groseras del recorrido de los nervios.

Conclusiones. La reconstrucción tridimensional permitió un análisis detallado y proporcionó una aproximación real a la anatomía de las malformaciones. Los fetos con HDC presentaron anomalías de los nervios vago y recurrente laríngeo que apoyan la teoría de una alteración en la organogénesis mediada por la cresta neural en el origen de esta enfermedad.

PALABRAS CLAVE: Hernia diafragmática congénita; Nitrofen; Cresta neural; Reflujo gastroesofágico; Reconstrucción tridimensional; Nervio vago; Nervio recurrente laríngeo.

Correspondencia: Dr Leopoldo Martínez. Departamento de Cirugía Pediátrica. Hospital Infantil La Paz. Paseo de la Castellana 261. 28046 Madrid.

Email: lmartinezm.hulp@salud.madrid.org

*Trabajo financiado con las ayudas FIS 01/0532 y 02/1220. Trabajo presentado en el XLIII Congreso de la Sociedad Española de Cirugía Pediátrica. Toledo Mayo 2004.

Recibido: Febrero 2005

Aceptado: Marzo 2005

APPLICATION OF A 3D RECONSTRUCTION MODEL FOR THE ANALYSIS OF NITROFENINDUCED INTRATHORACIC MALFORMATIONS

ABSTRACT: Background. Three dimensional computer-assisted reconstruction offers some advantages for analysis and comparison of biological phenomena and anatomical structures. The CDH nitrofen-induced animal model associates multiple anomalies in neural-crest derived tissues. The goal of this study is to analyse by a 3-D reconstruction software the malformations in the extrinsic innervation of the esophagus in this model.

Methods. Nine control fetuses from 4 dams and 9 fetuses with CDH from 7 dams were studied. A thoracic block from the larynx to tracheal bifurcation was serially sectioned in the horizontal plane in every embryo. One in every 10 sections was stained with HE. The image was digitalized using biological software (TDR-3dbase®). Vagus and recurrent laryngeal nerves, trachea, esophagus and the great vessels were examined. In order to obtain the 3-D reconstructions, 90 to 120 consecutive images were used.

Results. In comparison with controls there were striking abnormalities of these nerves in fetuses with CDH: 1) Absence of the left (2/9) or right (2/9) vagus nerves. 2) Absence of the left (3/9) or right (3/9) recurrent laryngeal nerves. 3) Marked hypoplasia of the trunk of the vagus (2/9). 4) Deviations of their normal course and change of normal anatomical relationships into the mediastinum (2/9).

Conclusions. To fulfill our goals 3-D reconstructions allow a detailed analysis and provide a precise insight into the real anatomy. Rat fetuses with CDH have anomalies of the vagus and recurrent laryngeal nerves that support the concept of a neural crest involvement in the origin of this malformation. These observations may explain esophageal motility disorders in CDH.

KEY WORDS: Congenital diaphragmatic hernia; Nitrofen; Neural crest; Gastroesophageal Reflux; 3D reconstruction; Vagus nerve; Laryngeal recurrent nerve.

INTRODUCCIÓN

La aplicación de los modelos en tres dimensiones para la comprensión de estructuras corporales o de procesos del desarrollo embrionario ha sido una constante desde finales del siglo XIX⁽¹⁾. Aunque inicialmente estas reconstrucciones ana-



Figura 1. Radiografía de tórax de un recién nacido intervenido una semana antes por una HDC izquierda. Obsérvese la gran dilatación esofágica presente.

tómicas se realizaban de manera artesanal, los avances en la tecnología informática y en el tratamiento digital de las imágenes hacen hoy posible representar las estructuras y ofrecer esquemas 3D reales ya sea de embriones o de pacientes^(2,4).

La hernia diafrágica congénita (HDC) es una malformación humana que se suele encontrar asociada a múltiples anomalías^(5,6). Entre ellas, estos pacientes suelen padecer reflujo gastroesofágico (RGE), fenómeno habitualmente justificado por factores anatómicos⁽⁷⁾. Sin embargo, algunas anomalías estructurales o funcionales del esófago asociadas a la hernia diafrágica siguen sin tener una explicación clara (Fig. 1)⁽⁸⁻¹⁰⁾.

El modelo experimental de HDC inducido con el herbicida nitrofen reproduce en roedores no sólo la hernia sino también el cortejo de malformaciones asociadas encontradas también en el humano⁽¹¹⁻¹⁵⁾. Muchas de estas malformaciones ocurren en estructuras total o parcialmente derivadas de la cresta neural (CN) como el corazón y los grandes vasos, el timo o las paratiroides^(16,17). Los nervios vago (NV) y recurrente laríngeo (NRL) también son estructuras derivadas de la CN, aunque sus malformaciones no han sido estudiadas previamente en este modelo.

El objetivo de este trabajo es evaluar la aplicabilidad de un modelo de reconstrucción tridimensional de imagen a un problema del desarrollo embrionario concreto, como es la

anatomía intratorácica del embrión de rata con HDC inducida por nitrofen.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales de experimentación. Se emplearon 11 ratas Sprague-Dawley hembras vírgenes de 220-250 g de peso y machos de fertilidad probada. Los animales fueron alojados en las instalaciones del laboratorio experimental del hospital La Paz de Madrid y fueron alimentados con el granulado especial para rata y agua de bebida *ad libitum*. Su manipulación se ajustó a las exigencias de la Unión Europea vigentes (E.C. 86/L609) y a las recogidas en el R.D. 223/1988.

Tras 24 horas de contacto visual y olfativo, las hembras fueron enjauladas con macho (3 x1) para su fecundación durante una noche. El día 0 de la gestación fue contado a partir del momento en que en el frotis vaginal se demostró la presencia de espermatozoides. Las ratas fueron entonces divididas de forma aleatoria en 2 grupos: control (n=5) y nitrofen (n=6).

En el día 9,5 de gestación se administró a las madres del grupo nitrofen una dosis de 100 mg diluidos en 1 mL de aceite de oliva puro por vía intragástrica. Los animales del grupo control fueron tratados de idéntica forma con el mismo volumen de excipiente.

Los fetos fueron recuperados en el día 21 de gestación (el día término de la gestación en la rata es el 22). Tras ser sacrificados, fueron pesados y examinados bajo microscopio quirúrgico para evaluar la presencia de HDC y otras anomalías. Finalmente, los animales fueron conservados en formol al 10% durante al menos 7 días tras los cuales se obtuvo un bloque torácico de un grosor aproximado de 6 a 8 mm que comprendía desde el cuello a la bifurcación traqueal. Este bloque se cortó de forma seriada con microtomo a 7 μ , tiñendo con hematoxilina y eosina convencionales 1 de cada 10 secciones, que fueron numeradas correlativamente en el sentido craneocaudal.

Digitalización de las imágenes. Cada uno de los cortes teñidos fue estudiado de forma minuciosa bajo microscopio (Olympus CX40, Hamburgo, Alemania), centrándonos en las estructuras torácicas correspondientes a los nervios vago y recurrente laríngeo, el esófago, la tráquea y los bronquios y los grandes vasos. Al mismo tiempo, estas imágenes se digitalizaron usando una cámara digital adaptada al microscopio (CV-S3200, Jai Corporation, Yokohama, Japón) y conectada a un ordenador PC convencional.

Manipulación de las imágenes digitales. Cada imagen obtenida fue cuidadosamente alineada con la anterior y almacenada en el ordenador en formato bmp (del inglés *windows bitmap file format*), usando para ello un software de reconstrucción tridimensional desarrollado por biólogos del desarrollo (TDR-3dbase[®] versión 1.3, Hubrecht Laboratory, Utrecht, Holanda). Dentro de cada una de las imágenes se trazó con ayuda de un tablero de dibujo digital (Genius Tablet

Tabla I Resumen de los hallazgos en la inervación esofágica vagal en los 9 fetos del grupo experimental

Feto	Vago izq	Recurrente izq	Vago dch	Recurrente dch	Otros
1	-	-	+	+	
2	+	-	-	-	
3	+	+	+	-	Hipoplasia nervios Alteración localización
4	+	+	-	-	
5	-	-	+	+	
6	+	+	+	+	Hipoplasia nervios
7	+	+	+	+	Localización anormal
8	+	+	+	+	
9	+	+	+	+	

+: Presente. -: Ausente.

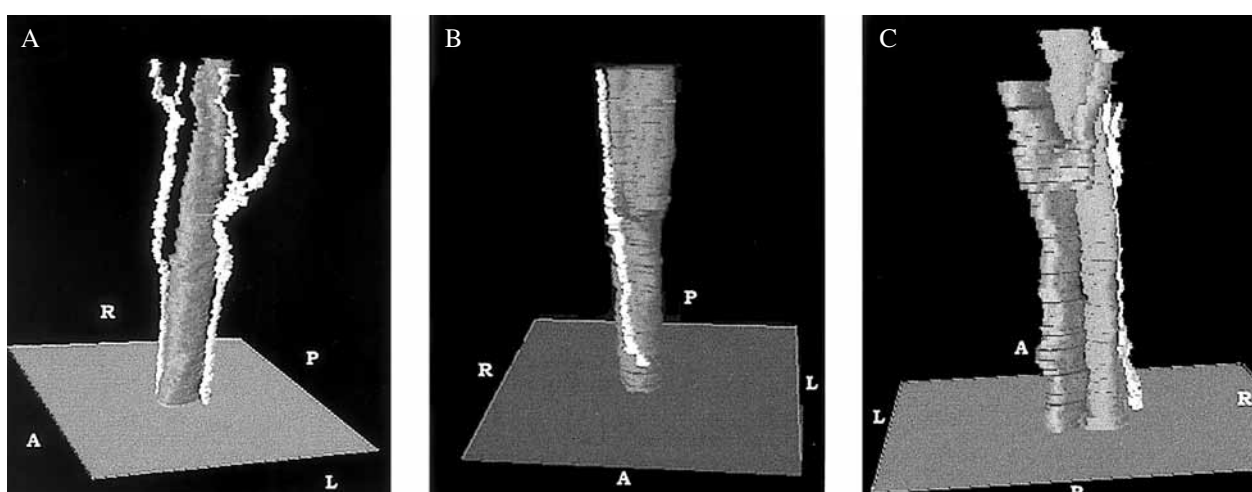


Figura 2. Representación monocromática de 3 ejemplos de reconstrucción tridimensional. A) Vista anterolateral izquierda de un feto control mostrando el esófago (gris), los nervios vagos y los recurrentes laríngeos (blanco). B) Vista anterior de un feto con HDC con tan solo un nervio vago derecho. C) Vista posterior de un feto con HDC, arteria subclavia aberrante derecha (gris oscuro) y agenesia de vago izquierdo. A: Anterior, P: Posterior, R: Derecha, L: Izquierda.

GeniTAB III, GeniusLife, Taiwan) el contorno de las estructuras anatómicas estudiadas (nervios, esófago, tráquea y grandes vasos), asignando un color diferente a cada una de ellas. Una vez finalizado el proceso se obtuvo una imagen tridimensional de dichas estructuras, permitiendo evaluar en el espacio sus malformaciones y sus relaciones anatómicas.

RESULTADOS

Ningún animal del grupo control presentó malformaciones del diafragma, mientras que 47 de los 65 fetos obtenidos de las ratas del grupo nitrofen (72%) presentaba HDC, que fue izquierda en el 95% de los casos, derecha en el 4% y bilateral en el 1%. Fueron seleccionados de forma aleatoria e

incluidos para estudio 9 fetos de 4 madres del grupo control y otros 9 con HDC de 7 madres del grupo nitrofen.

En total se obtuvieron de 90 a 120 imágenes de cada feto, generando archivos individualizados de la anatomía torácica que permitieron analizar y comparar las distintas malformaciones encontradas. Dichas malformaciones afectaron principalmente a los nervios vago y recurrente laríngeo que, con respecto a los controles, presentaban las alteraciones descritas en la tabla I. Tan sólo 2 de los fetos fueron anatómicamente normales, presentando los otros 7 una o más alteraciones resumidas en los 4 puntos siguientes (Fig. 2):

Ausencia de uno de los nervios vago. En 2 fetos existía una agenesia del NV derecho y en otros 2 del izquierdo. Estos 4 fetos provenían de 4 madres diferentes. En 3 de ellos además existía una arteria subclavia retroesofágica aberrante (Fig. 3).

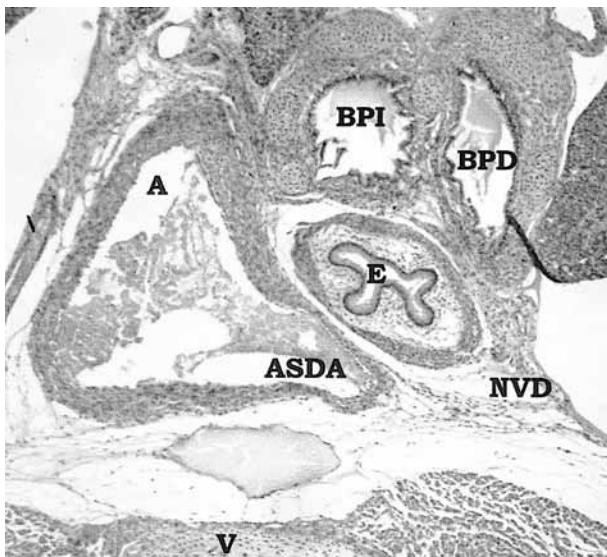


Figura 3. Corte transversal a nivel de la bifurcación traqueal en un feto con HDC. Nótese la ausencia de vago y recurrente izquierdos y la arteria subclavia derecha aberrante (ASDA). NVD (línea de puntos), vago derecho; BPI, Bronquio principal izquierdo; BPD, Bronquio principal derecho; A, Aorta; E, Esófago; V, Vértebra.

Ausencia de un nervio recurrente laríngeo. Como era de esperar, aquellos 4 fetos con agenesia del NV presentaban también agenesia del correspondiente NRL. Sin embargo, otros 2 fetos con vagos normales presentaban agenesia del NRL, uno a cada lado.

Hipoplasia evidente del NV. Dos fetos con HDC presentaron troncos vagales hipoplásicos comparados con los controles y con los restantes animales del grupo nitrofen. Ambos presentaban anatomías normales tanto de los NV como de los NRL.

Desviaciones del trayecto anatómico normal y cambios en las relaciones intramediastínicas. En 2 casos los nervios seguían trayectos anatómicos anormales: el primero un NRL derecho anterior a la tráquea y el segundo un NV inusualmente alejado del esófago cerca del hiato diafragmático.

DISCUSIÓN

En investigación biomédica, las reconstrucciones tridimensionales se realizan con la finalidad de comprender y analizar fenómenos morfológicos y funcionales complejos. De esta manera, no sólo las estructuras anatómicas sino también procesos como la distinta expresión génica en el tiempo y el espacio o la proliferación celular, son mejor comprendidos si se logran visualizar en las 3 dimensiones del espacio⁽¹⁸⁻²²⁾.

Los avances en los medios informáticos y de proceso y manipulación de imágenes, hacen posible la reconstrucción de estructuras en 3D a partir de múltiples secciones

paralelas bidimensionales. Los ejemplos en clínica son múltiples, pues sus aplicaciones en el diagnóstico de imagen son hoy rutinarias. En investigación su uso crea representaciones en 3D que permiten una comparación detallada de las estructuras y un análisis real de distintos fenómenos funcionales⁽²⁾.

En nuestro caso, la representación de la anatomía intratorácica del embrión de rata supuso una oportunidad para poder visualizar los cambios intratorácicos inducidos con el nitrofen. En efecto, ya sabíamos que los grandes vasos y la vía aérea eran anormales en los fetos con HDC^(15, 17). Por otro lado, múltiples estructuras derivadas de la cresta neural (una dotación celular embrionaria efímera y multipotencial) se encuentran alteradas en el mismo modelo experimental⁽¹⁶⁾. Por tanto, la innervación esofágica extrínseca, representada por los nervios vago y recurrente laríngeo, podían ser anormales en los fetos tratados con nitrofen.

Además, en clínica humana la mayor parte de los pacientes con HDC sufren RGE. Este fenómeno se explica habitualmente por razones mecánicas (posición intratorácica del estómago durante la vida intrauterina, dificultad de vaciamiento esofágico o incompetencia cardial) o fisiológicas (gradientes de presión alterados entre el tórax y el abdomen que favorecen el reflujo)⁽⁷⁾. Sin embargo existen datos que hacen pensar que puede existir una alteración intrínseca del esófago en estos pacientes^(9, 10).

Nuestro trabajo es el primero en objetivar alteraciones en la innervación esofágica en los fetos con HDC inducida con nitrofen. Además de ofrecer nuevos argumentos a favor de la etiología neurocristal de esta malformación inducida, podría explicar algunos casos de RGE en el humano con HDC si, como ha ocurrido con otros hallazgos, esta malformación esofágica también se termina demostrando en el niño.

La representación en 3D con ayuda de un software específico ha permitido no sólo una correcta visualización de las estructuras y sus interrelaciones, sino también una adecuada comparación entre grupos y una inmejorable calidad en la comunicación de los resultados desde el punto de vista docente.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Fons J. Verbeek del Hubrecht Laboratory, Netherlands Institute for Developmental Biology, Utrecht, Holanda, por su inestimable ayuda tanto en la donación del software como en su aprendizaje inicial.

BIBLIOGRAFÍA

1. Verbeek FJ, Huijsmans DP, Baeten RJ, Schoutsen NJ, Lamers WH. Design and implementation of a database and program for 3D reconstruction from serial sections: a data-driven approach. *Microsc Res Tech* 1995;**30**:496-512.

2. Baldock RA, Verbeek FJ, Vonesch JL. 3-D Reconstructions for graphical databases of gene expression. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 1997;**8**:499-507.
3. Verbeek FJ, de Groot MM, Huijsmans DP, Lamers WH, Young IT. 3D base: a geometrical data base system for the analysis and visualisation of 3D-shapes obtained from parallel serial sections including three different geometrical representations. *Comput Med Imaging Graph* 1993;**17**:151-163.
4. Verbeek FJ, Lawson KA, Bard JB. Developmental bioinformatics: linking genetic data to virtual embryos. *Int J Dev Biol* 1999;**43**:761-771.
5. Lund DP, Mitchell J, Kharasch V, Quigley S, Kuehn M, Wilson JM. Congenital diaphragmatic hernia: the hidden morbidity. *J Pediatr Surg* 1994;**29**:258-264.
6. Martínez-Frias ML, Prieto L, Urioste M, Bermejo E. Clinical/epidemiological analysis of congenital anomalies associated with diaphragmatic hernia [errata aparecida en Am J Med Genet 1996 May 17;63(2):416]. *Am J Med Genet* 1996;**62**:71-76.
7. Koot VC, Bergmeijer JH, Bos AP, Molenaar JC. Incidence and management of gastroesophageal reflux after repair of congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 1993;**28**:48-52.
8. Stolar CJ, Berdon WE, Dillon PW, Reyes C, Abramson SJ, Amodio JB. Esophageal dilatation and reflux in neonates supported by ECMO after diaphragmatic hernia repair. *AJR Am J Roentgenol* 1988; **151**:135-137.
9. Stolar CJ, Levy JP, Dillon PW, Reyes C, Belamarich P, Berdon WE. Anatomic and functional abnormalities of the esophagus in infants surviving congenital diaphragmatic hernia. *Am J Surg* 1990; **159**:204-207.
10. Jolley SG, Lorenz ML, Hendrickson M, Kurlinski JP. Esophageal pH monitoring abnormalities and gastroesophageal reflux disease in infants with intestinal malrotation. *Arch Surg* 1999;**134**:747-752.
11. Alfonso LF, Sasieta M, Ingunza N, Lopez de Torre B, Aldazabal P, Alvarez FJ, Vilanova J, Valls i Soler A, Tovar JA. El surfactante pulmonar en la hernia diafragmática congénita experimental. *Cir Pediatr* 1992;**5**:197-202.
12. Alfonso LF, Vilanova J, Aldazabal P, Lopez de Torre B, Tovar JA. Lung growth and maturation in the rat model of experimentally induced congenital diaphragmatic hernia. *Eur J Pediatr Surg* 1993; **3**:6-11.
13. Karamanoukian HL, Peay T, Love JE, Abdel-Rahman E, Dandonna P, Azizkhan RG, Glick PL. Decreased pulmonary nitric oxide synthase activity in the rat model of congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 1996;**31**:1016-1019.
14. Migliazza L, Xia H, Alvarez JI, Arnaiz A, Diez-Pardo JA, Alfonso LF, Tovar JA. Heart hypoplasia in experimental congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 1999; **34**:706-710.
15. Xia H, Migliazza L, Diez-Pardo JA, Tovar JA. The tracheobronchial tree is abnormal in experimental congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Surg Int* 1999;**15**:184-187.
16. Yu J, Gonzalez S, Rodriguez JI, Diez-Pardo JA, Tovar JA. Neural crest-derived defects in experimental congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Surg Int* 2001;**17**:294-298.
17. Migliazza L, Otten C, Xia H, Rodriguez JI, Diez-Pardo JA, Tovar JA. Cardiovascular malformations in congenital diaphragmatic hernia: human and experimental studies. *J Pediatr Surg* 1999;**34**:1352-1358.
18. Allen SP, Bogardi JP, Barlow AJ, Mir SA, Qayyum SR, Verbeek FJ, Anderson RH, Francis-West PH, Brown NA, Richardson MK. Misexpression of noggin leads to septal defects in the outflow tract of the chick heart. *Dev Biol* 2001;**235**:98-109.
19. Griffini P, Smorenburg SM, Verbeek FJ, van Noorden CJ. Three-dimensional reconstruction of colon carcinoma metastases in liver. *J Microsc* 1997;**187**(Pt 1):12-21.
20. van Raaij EJ, ten Berge D, Hage W, Brouwer A, Meijlink F, Maintz JB, Verbeek FJ. Automated topographical cell proliferation analysis. *Cytometry* 2001;**45**:13-18.
21. Wagenaar GT, Moorman AF, Chamuleau RA, Deutz NE, De Gier C, De Boer PA, Verbeek FJ, Lamers WH. Vascular branching pattern and zonation of gene expression in the mammalian liver. A comparative study in rat, mouse, cynomolgus monkey, and pig. *Anat Rec* 1994;**239**:441-452.
22. Watanabe Y, Ando H, Seo T, Kaneko K, Katsuno S, Shinohara T, Mori K, Toriwaki J. Three-dimensional image reconstruction of an anorectal malformation with multidetector-row helical computed tomography technology. *Pediatr Surg Int* 2003;**19**:167-171.