

Modulación por PCI de la respuesta inflamatoria postreperusión en un modelo experimental de autotrasplante pulmonar

Cristina Ginés Gallego

Plaza Ramón y Cajal, 28040-Madrid. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid.
cgines@estumail.ucm.es

Elena Vara. Carlos Simón.

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid
evaraami@med.ucm.es carlomsa@telefonica.net

Resumen: Diversas situaciones clínicas obligan a someter al tejido pulmonar a períodos de isquemia más o menos prolongados, con el consiguiente riesgo de daño pulmonar agudo tras la reperusión. Estudios recientes han demostrado un efecto protector del preconditionamiento isquémico (PCI) en el daño inducido por isquemia-reperusión en corazón. **Objetivo:** En este estudio hemos investigado el efecto del PCI sobre la expresión de mediadores inflamatorios en pulmón. **Métodos:** El modelo experimental consistió en la realización de un autotrasplante pulmonar izquierdo, practicando secuencialmente una neumonectomía izquierda, una lobectomía superior ex-situ y la reimplantación del lóbulo caudal mediante anastomosis bronquial, arterial y venosa. Los experimentos se realizaron en cerdos de raza "large-white" (30-50 kg) divididos en dos grupos, control y PCI. Se tomaron muestras de pulmón a diferentes tiempos: pre-neumonectomía, pre-implantación, y 10 minutos post-reperusión. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta la determinación de mieloperoxidasa (colorimetría), MCP-1 (Kit Elisa), lipoperoxidos de lípidos (colorimetría) y expresión de citoquinas (Western). **Resultados:** La neumonectomía indujo un aumento de la actividad mieloperoxidasa, los niveles de MCP-1 y la expresión de TNF- α e IL-1 ($p < 0.05$). Este incremento fue significativamente mayor tras la reperusión ($p < 0.01$). Dichos efectos fueron parcialmente bloqueados por PCI.

Palabras clave: Preconditionamiento isquémico. Isquemia-reperusión. Mediadores inflamatorios. Modelo experimental.

INTRODUCCIÓN

El daño de la isquemia-reperusión sigue siendo una de las principales causas de daño pulmonar, repercutiendo significativamente en la morbimortalidad temprana del trasplante pulmonar, el cual se caracteriza por un daño alveolar inespecífico, edema pulmonar e hipoxemia. Se considera la primera causa de fallo primario del injerto

pulmonar, provocando un aumento del riesgo de rechazo agudo y, a largo plazo, de rechazo crónico. Las lesiones producidas durante la fase de isquemia se relacionan, sobre todo, con la privación de oxígeno. La reperfusión supone, no sólo el paso al torrente sanguíneo de productos tóxicos desde el tejido isquémico, sino también la multiplicación de mediadores inflamatorios al reaccionar el oxígeno con los metabolitos resultantes de la isquemia. Todo ello genera una respuesta inflamatoria que no sólo daña el órgano sometido a isquemia (respuesta local), sino también órganos distantes (respuesta sistémica).

La mayoría de los estudios para preservar el tejido pulmonar de los efectos de la isquemia-reperfusión (I/R) se realizan en modelos experimentales o clínicos de trasplante pulmonar con isquemia fría ⁽¹⁾. Sin embargo, existen situaciones clínicas en las que no es posible el enfriamiento progresivo del pulmón, ni perfundirlo con una solución de preservación antes de interrumpir la circulación sanguínea. Entre estas situaciones, destacan las resecciones pulmonares con angioplastia de la arteria pulmonar ^(2, 3) y los trasplantes de lóbulo pulmonar de donante vivo. En estos casos, parte del tejido pulmonar sufre un período más o menos prolongado de isquemia caliente (normotérmica) y son frecuentes el edema de reperfusión y la necesidad de ventilación prolongada en el postoperatorio ⁽⁴⁾.

El preconditionamiento isquémico (PCI) constituye un fenómeno ya descrito en 1986 en el corazón, consistente en la aplicación de episodios de isquemia-reperfusión breves y repetitivos antes de la isquemia-reperfusión prolongada. En este estudio, hemos investigado el efecto del PCI sobre la expresión de mediadores inflamatorios en pulmón.

OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es investigar el papel del preconditionamiento quirúrgico sobre la expresión de citoquinas en un modelo de isquemia-reperfusión como supone el autotrasplante pulmonar.

Objetivos concretos

Determinar la secuencia de liberación de mediadores proinflamatorios tras diferentes períodos de tiempo de isquemia caliente, y post-reperfusión.

Determinar si el preconditionamiento isquémico modifica la liberación de mediadores proinflamatorios.

MÉTODOS

El modelo experimental consistió en la realización de un autotrasplante pulmonar izquierdo, practicando secuencialmente una neumonectomía izquierda, una lobectomía superior ex-situ y la reimplantación del lóbulo caudal mediante anastomosis bronquial, arterial y venosa. Los experimentos se realizaron en cerdos de raza "large-white" (30-50 kg).

Se realizaron 28 experimentos divididos en un grupo control (grupo C; n=17) y en un grupo de acondicionamiento isquémico (grupo PI; n=11) en el que la única modificación consistió en la oclusión, previa a la neumonectomía, de la arteria pulmonar izquierda durante dos períodos de cinco minutos, intercalando cinco minutos de perfusión normal. Se tomaron muestras de pulmón a diferentes tiempos: pre-neumonectomía, pre-implantación, y 10 minutos post-reperfusión. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta la determinación de mieloperoxidasa (colorimetría), MCP-1 (Kit Elisa), lipoperóxidos de lípidos (colorimetría) y expresión de citoquinas (Western).

RESULTADOS

La neumonectomía indujo un aumento de la actividad mieloperoxidasa ($p<0.05$), y este incremento fue significativamente mayor tras la perfusión ($p<0.01$), indicando un aumento de la infiltración tisular por neutrófilos. El PCI bloqueó este efecto post-reperfusión.

La neumonectomía también indujo un aumento de los niveles de MCP-1 ($p<0.05$) y, de nuevo, este incremento fue mayor post-reperfusión. Como en el caso de la MPO, estos efectos fueron bloqueados por PCI. Un efecto similar se observó cuando se determinaron los niveles de LPO.

Cuando estudiamos la expresión de TNF- α , se observó un aumento de la expresión de esta citoquina ($p<0.05$) tanto post-neumonectomía como post-reperfusión, y un efecto similar fue observado en el caso de la IL-1. El PCI disminuyó significativamente la expresión de ambas citoquinas, tanto pre-implantación como post-reperfusión.

DISCUSIÓN

Numerosos estudios señalan la producción de radicales libres de oxígeno (RLO), la activación de leucocitos polimorfonucleares y la producción de citoquinas

proinflamatorias como importantes mediadores de la respuesta inflamatoria.

La I/R se asocia generalmente con la infiltración de neutrófilos y, durante la reperfusión, su número se incrementa. La MPO es un enzima que forma parte de los gránulos azurofílicos de los neutrófilos de los mamíferos. Cataliza la formación del altamente tóxico ácido hipocloroso (HOCl), un componente importante del daño oxidativo inducido por los neutrófilos. En este trabajo, hemos elegido la determinación de la actividad mieloperoxidasa como método para cuantificar la respuesta leucocitaria a la isquemia-reperfusión, ya que constituye uno de los primeros estadios en la respuesta inflamatoria.

El reclutamiento de neutrófilos en el lugar de la inflamación depende de la producción y/o liberación local de factores quimiotácticos. La proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1) parece jugar un papel importante reclutando y activando células proinflamatorias en los tejidos lesionados. En este trabajo, hemos determinado los niveles de MCP-1 que, como vemos, son semejantes a los de la MPO, lo que apoya la hipótesis de un aumento de la infiltración por neutrófilos tras la isquemia. Durante la I/R, se generan RLO que provocan lisis celular por lipoperoxidación de los ácidos grasos libres de las membranas ⁽⁵⁾. El grado de lipoperoxidación e, indirectamente, la existencia de RLO, pueden medirse por la presencia de lipoperóxidos (LPO) y de MDA. De acuerdo con esto, en este trabajo hemos observado un aumento de los niveles de LPO, lo que indica claramente un aumento del estrés oxidativo tisular como consecuencia de la I/R. Resultados similares tras isquemia normotérmica se han observado en pulmón aislado de rata y mediante oclusión in-situ de la arteria pulmonar en perros ⁽⁶⁾.

Existe una estrecha relación entre estrés oxidativo e inflamación, ya que un aumento de la producción de radicales libres es capaz de activar los procesos inflamatorios y, por su parte, los radicales libres son también efectores de la inflamación. Como consecuencia del estrés oxidativo, se desencadenarán cascadas de transducción de señales, que pueden estimular la producción de citoquinas proinflamatorias. Se ha descrito que los RLO estimulan la síntesis y liberación de diferentes citoquinas y quimioquinas por parte de los macrófagos tisulares. Esta activación de los macrófagos se ha relacionado con la fase precoz de la respuesta inflamatoria a la I/R ^(5, 7). La IL-1 y el TNF- α son citoquinas proinflamatorias cuya implicación en las primeras etapas de la respuesta inflamatoria a la I/R es bien conocida, pero recientemente se ha atribuido un papel crucial en este proceso a la MCP-1, una quimioquina que regula la migración y activación de monocitos ^(7, 8). En nuestro trabajo, estas tres moléculas se elevan significativamente en el tejido pulmonar durante la isquemia, manteniéndose niveles elevados tras 10 minutos de reperfusión.

CONCLUSIONES

Nuestros resultados muestran que la I/R pulmonar va asociada a la activación y acumulación de neutrófilos en los tejidos, así como a un aumento de la expresión de mediadores proinflamatorios. Por otro lado, el incremento observado de los niveles de MCP-1 sugiere que esta quimioquina podría jugar un papel mediador en estos efectos, apoyando la hipótesis de que el MCP-1 participa en el daño tisular secundario a la I/R.

El PCI redujo el estrés oxidativo y la producción de mediadores proinflamatorios en tejido pulmonar, sugiriendo un posible papel modulador sobre el síndrome de isquemia-reperfusión en el pulmón.

BIBLIOGRAFÍA

1. Christie JD, Bavaria JE, Palevsky HI, Litzky L, Blumenthal NP, Kaiser LR, et al. *Primary graft failure following lung transplantation*. Chest. 1998;114:51–60
2. Christie JD, Edwards LB, Aurora P, Dobbels F, Kirk R, Rahmel AO, et al. *The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Twenty-sixth Official Adult Lung and Heart-Lung Transplantation Report–2009*. J heart lung transplant. 2009 28:1031–49
3. Lausberg HF, Graeter TP, Wendler O, Demertzis S, Ukena D, Schafers HJ. *Bronchial and bronchovascular sleeve resection for treatment of central lung tumors*. Ann Thorac Surg. 2000;70:367–71
4. Van der Kaaij NP, Kluin J, Haitsma JJ, den Bakker MA, Lambrecht BN, Lachmann B, et al. *Ischemia of the lung causes extensive long-term pulmonary injury: an experimental study*. Resp Res. 2008;9:28
5. De Perrot M, Liu M, Waddell T. *Ischemia-reperfusion-induced lung injury*. Am Resp J Crit Care Med. 2003;167:490–511
6. Akao T, Takeyoshi I, Totsuka O, Arakawa K, Muraoka M, Kobayashi K, et al. *Effect of the free radical scavenger MCI-186 on pulmonary ischemia-reperfusion injury in dogs*. J Heart Lung Transplant. 2006;25:965–71
7. Zhao M, Fernandez LG, Doctor A, Sharma AK, Zarbock A, Tribble CG, et al. *Alveolar macrophage activation is a key initiation signal for acute lung ischemia-reperfusion injury*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2006;291:L1018–26

8. Morimoto H, Hirose M, Takahashi M, Kawaguchi M, Ise H, Kolattukudy PE, et al. *MCP-1 induces cardioprotection against ischaemia/reperfusion injury: role of reactive oxygen species*. Cardiovasc Res. 2008;78:554–62

Recibido: 16 marzo 2012.

Aceptado: 16 diciembre 2013.