



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN

**Papel de la liberación de acetilcolina y
sustancia P en el deterioro de la función
pulmonar en un modelo experimental de
preservación pulmonar en conejo**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Presenta

MC José Luis Arreola Ramírez

Tutor

Dr. Mario H. Vargas Becerra

Marzo 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis hijos José Luis y María Fernanda por su amor y cariño...

A mi esposa Adriana López Palacios por su apoyo y comprensión...

A mis padres (Q.E.P.D.) Antonio Arreola y Esperanza Ramírez...

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Medicina...

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología...

Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias...

Al Dr. Mario H. Vargas, director de esta Tesis...

A la Dra. Patricia Segura, gracias por sus consejos, sin cuya ayuda no habría podido realizarse este proyecto...

A todos los integrantes del Laboratorio de Investigación en Hiperreactividad Bronquial, quienes me brindaron su apoyo cuando más lo necesité..

A todos los que han sido mis profesores a lo largo de mi formación...

INDICE

INDICE.....	3
RESUMEN.....	5
ANTECEDENTES.....	7
EL TRASPLANTE PULMONAR.....	7
Indicaciones y contraindicaciones.....	7
Tipos de trasplante pulmonar.....	8
Evaluación del donador.....	10
Evaluación del receptor.....	11
Morbilidad y mortalidad postrasplante.....	11
LA PRESERVACION PULMONAR.....	13
LA FALLA PRIMARIA DEL INJERTO.....	13
MECANISMOS DE PRODUCCIÓN DE LA FALLA PRIMARIA DEL INJERTO.....	15
Lesión por isquemia.....	15
Lesión por reperfusión.....	17
Efecto del enfriamiento.....	20
Disfunción endotelial y vascular.....	22
Alteración del surfactante pulmonar.....	23
POSIBLE PAPEL DE ACETILCOLINA Y SUSTANCIA P EN LA FALLA PRIMARIA DEL INJERTO.....	23
La inervación pulmonar.....	25
Acetilcolina.....	29
Sustancia P.....	30

PULMÓN AISLADO Y PERFUNDIDO EN ESTUDIOS DE ISQUEMIA REPERFUSION.....	34
Variaciones técnicas del modelo de PAP.....	35
RELEVANCIA DEL ESTUDIO.....	36
HIPÓTESIS.....	37
OBJETIVOS.....	37
MATERIAL Y MÉTODOS.....	37
Animales.....	37
Obtención y preparación del bloque cardiopulmonar.....	38
Lavado y preservación pulmonar.....	38
Pretratamiento con capsaicina.....	39
Medición del mKf,c.....	39
Determinación de mediadores bioquímicos.....	42
Determinación de la actividad enzimática.....	45
Reactivos empleados.....	46
Análisis estadístico.....	47
RESULTADOS.....	47
Producción de acetilcolina y sustancia P durante la preservación pulmonar.....	47
Actividad de la NEP, AChE y ACE durante la preservación pulmonar.....	49
Efecto de la preservación pulmonar sobre la permeabilidad capilar.....	49
Efecto de la capsaicina, la atropina, el fragmento SP 4-11 y el L-732,138	51
DISCUSIÓN	54
La sustancia P participa en el deterioro de la permeabilidad vascular	54
La reperfusión con sangre anula el efecto protector del antagonista NK1	56
La capsaicina no previno el deterioro de la permeabilidad vascular	58
CONCLUSIONES	59
REFERENCIAS.....	61

RESUMEN

Antecedentes: El trasplante pulmonar es un recurso cada vez más empleado para el manejo de enfermedades pulmonares terminales como la fibrosis y el enfisema. Sin embargo, entre el 13 y 35% de los pacientes trasplantados desarrollan edema pulmonar en las primeras horas posteriores al trasplante, a lo que se le conoce como falla primaria del injerto. Los mecanismos que originan esta complicación no están completamente dilucidados, siendo los principales factores involucrados la hipoxia/anoxia durante la isquemia y la generación de radicales libres durante la reperfusión. En el presente estudio nosotros postulamos que inmediatamente después de la procuración pulmonar se presenta liberación de neurotransmisores que son capaces de incrementar la permeabilidad vascular. Entre estos neurotransmisores destacan la sustancia P y la acetilcolina por su gran capacidad para inducir aumento de la permeabilidad vascular. Hipótesis: La liberación de acetilcolina y sustancia P durante la preservación pulmonar producen aumento de la permeabilidad capilar en un modelo de lesión por isquemia-reperfusión en pulmón aislado y perfundido de conejo. **Material y métodos:** Se emplearon conejos machos Nueva Zelanda de 2.5 a 3.0 Kg a los que bajo anestesia profunda se les extrajo el bloque cardiopulmonar, y después de exsanguinarlo con solución salina se preservó por 24 h en solución salina a 4°C. Para medir la tasa de producción de sustancia P y acetilcolina, se hizo recambios del líquido intravascular a los 15 min y a las 6, 12 y 24 h, midiendo la concentración de estos mediadores en el líquido. Con el fin de estudiar la actividad de la endopeptida neutra (NEP), enzima convertidora de angiotensina (ACE) y acetilcolinesterasa (AChE) se tomaron muestras de lóbulos pulmonares a estos mismos intervalos de tiempo. El efecto de la preservación pulmonar sobre la función vascular se determinó a las 0, 6, 12 y 24 h evaluando el coeficiente de filtración capilar pulmonar (mKf,c) con la técnica de pulmón aislado y perfundido. En pulmones preservados por 24 h se midió por separado el efecto de un antagonista inespecífico de la sustancia P (fragmento 4-11 SP), un antagonista específico de los receptores NK1 (L-732,138) y de la atropina, añadidos al líquido intravascular durante la preservación. Se evaluaron también los cambios en la permeabilidad en pulmones preservados por 24 h y reperfundidos con sangre autóloga heparinizada, en vez de solución de Krebs. La posible influencia de la heparina en estos experimentos se evaluó añadiendo heparina a la solución de Krebs usada en la reperfusión. **Resultados:** La sustancia P y la acetilcolina se liberan durante la preservación pulmonar, con tasas máximas de liberación en los primeros minutos y disminución exponencial durante las 24 h de estudio. Las actividades enzimáticas de la NEP, la ACE y la acetilcolinesterasa en el tejido pulmonar no varían de forma significativa durante el período de preservación de 24 h. La preservación pulmonar produjo un aumento progresivo del mKf,c (medido usando reperfusión con Krebs) que alcanzó significancia estadística a las 12 h ($p < 0.05$) y 24 h ($p < 0.01$). La elevación del mKf,c se evitó completamente con la administración del fragmento 4-11 SP en el líquido intravascular de preservación ($p < 0.01$), y el mismo efecto tuvo el L-732,138

($p < 0.01$). La atropina no evitó el deterioro de la permeabilidad capilar después de la preservación pulmonar. El pretratamiento de los conejos con capsaicina antes de su sacrificio no modificó el deterioro de la permeabilidad vascular ocurrido durante la preservación pulmonar. La reperfusión con sangre autóloga heparinizada protegió a los pulmones preservados por 24 h del incremento de la permeabilidad vascular. Al evaluar el papel de la heparina en estos últimos se encontró que la heparina sola, adicionada al Krebs usado para la reperfusión, pudo evitar el deterioro de la permeabilidad de la misma forma que lo hizo la sangre heparinizada. **Conclusiones:** Nuestros resultados sugieren que la sustancia P interviene de forma importante en el aumento de la permeabilidad vascular pulmonar que se observa después de 24 h de preservación. Este efecto nocivo de la sustancia P se mostró claramente cuando los pulmones fueron reperfundidos con Krebs, pero no pudo ser evidenciado cuando la reperfusión fue realizada con sangre autóloga heparinizada, probablemente debido al efecto antagónico de la heparina sobre la actividad de la sustancia P.

ANTECEDENTES

EL TRASPLANTE PULMONAR

Los procedimientos quirúrgicos actualmente disponibles frente a la enfermedad pulmonar avanzada, irreversible y terminal son la cirugía de reducción de volumen pulmonar y el trasplante de pulmón. La cirugía de reducción de volumen pulmonar es un procedimiento que sólo está indicado en el tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, con predominio del enfisema. Por el contrario, el abanico de indicaciones para el trasplante de pulmón es mucho más amplio, ya que el trasplante puede plantearse, al menos potencialmente, para el tratamiento de la enfermedad pulmonar avanzada e irreversible de cualquier etiología.

A partir de que en 1967 se hizo el primer trasplante pulmonar [2-4] en animales de experimentación, y luego en humanos en 1983, las técnicas quirúrgicas para realizar este procedimiento se han ido perfeccionando progresivamente a través de los años. Así, el trasplante de pulmón ha evolucionado hasta convertirse en la actualidad en el tratamiento de elección de la enfermedad pulmonar terminal, médicamente irreversible [5-7]. Lamentablemente, sólo un número limitado de pacientes con enfermedad pulmonar terminal podrán beneficiarse de un trasplante de pulmón. Los problemas que limitan la utilidad del trasplante como procedimiento clínico generalizado son la escasez de donadores, la falla primaria del injerto y el rechazo inmunológico crónico, que en forma de bronquiolitis obliterante conduce a la insuficiencia respiratoria [8-11]. La expectativa de solucionar los problemas citados constituye el motor de la investigación en trasplante de pulmón.

Indicaciones y contraindicaciones

Las principales indicaciones y contraindicaciones del trasplante pulmonar se resumen en el **Cuadro 1**. En general, la mayoría de los pacientes en quienes se han realizado trasplantes pulmonares han sido aquellos pacientes con insuficiencia respiratoria en fase avanzada debida a fibrosis quística, bronquiectasias, enfisema pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática e hipertensión pulmonar primaria. Sin embargo, otras causas de insuficiencia respiratoria pueden ser consideradas indicaciones de trasplante pulmonar y, además, se considera indicación de retrasplante el desarrollo de bronquiolitis obliterante

Cuadro 1. Indicaciones y contraindicaciones del trasplante pulmonar

Indicaciones	Contraindicaciones
Enfermedad pulmonar terminal (parenquimatosa o vascular) no tratable	Expectativa de vida < 2 años
Nivel NYHA* funcional clase III o IV	Uso de tabaco, alcohol y drogas
Limitación sustancial de actividades diarias	Infección por HIV
Riesgo alto de muerte antes del trasplante	Cirrosis hepática, hepatitis B y C

*NYHA New York Heart Association. Tomado de Pasupathy [155]

secundaria a rechazo crónico con insuficiencia respiratoria, que sea nuevamente irreversible y terminal [12]. El trasplante pulmonar está contraindicado cuando existe enfermedad tumoral, enfermedad del sistema nervioso central, hepática o renal avanzada y no recuperable, enfermedad infecciosa pulmonar activa y/o cuadro séptico, tabaquismo y drogadicción. Además de las indicaciones y contraindicaciones que deben cumplir cualquier receptor potencial, y que están señaladas en el cuadro 1, se han sugerido criterios específicos para algunas enfermedades [13] señalados en el **Cuadro 2**.

Tipos de trasplante pulmonar

El trasplante pulmonar puede realizarse en *cuatro modalidades*, ya sea que se trasplante uno o los dos pulmones, con o sin inclusión del corazón, o que solo se trasplante uno o dos lóbulos pulmonares.

Trasplante unipulmonar o unilateral. Hasta mediados de los años 1990 éste era el tipo más frecuente de trasplante pulmonar, pero fue igualado en frecuencia, y luego superado en los últimos años, por el trasplante bilateral [14]. Las indicaciones del trasplante unilateral abarcan todas las enfermedades pulmonares terminales e irreversibles no supurativas (enfisema, hipertensión pulmonar, enfermedad pulmonar intersticial) y aquellas enfermedades pulmonares que se acompañan de enfermedad cardíaca que puede ser corregida quirúrgicamente, corrección que se efectúa en el mismo tiempo quirúrgico que el trasplante [15]. El trasplante unilateral está también indicado para las enfermedades pulmonares restrictivas debido a que la disminución del funcionamiento y el incremento de la resistencia del pulmón remanente del receptor tiene como resultado

Cuadro 2. Criterios de selección para candidatos para recibir trasplante de pulmón

Enfermedad pulmonar obstructiva crónica

Deterioro funcional clase III de la NYHA
FEV₁ < 500 ml
FEV₁ < 20% del predicho
Deterioro rápido del FEV₁
Hipoxia, hipercapnia
Pérdida de peso

Fibrosis pulmonar

Deterioro funcional clase III de la NYHA
Hipoxia al ejercicio
Capacidad de difusión para CO < 30% del predicho

Hipertensión vascular pulmonar

Deterioro funcional clase III de la NYHA
Presión media en arteria pulmonar > 55 mmHg
Presión media en aurícula derecha > 10 mmHg
Índice cardíaco < 4 L/min/m²
Falta de respuesta al tratamiento médico

Bronquiectasias, Fibrosis quística

Deterioro funcional clase III de la NYHA
FEV₁ < 500 ml
FEV₁ < 20% del predicho
Deterioro rápido del FEV₁
Hipoxia e hipercapnia
Pérdida de peso
Infecciones de repetición
Hemoptisis
Neumotórax

NYHA=New York Heart Association. Tomado de Pasupathy [155]

la ventilación y la perfusión preferenciales del pulmón trasplantado [16]. Las ventajas del trasplante unilateral es la relativa simplicidad de la intervención quirúrgica, en comparación con el trasplante bilateral, el mayor margen de compatibilidad de tamaño entre el donador y el receptor, y el aprovechamiento óptimo de los órganos donados, ya que el corazón y el pulmón contralateral pueden ser trasplantados a otros receptores. Entre sus desventajas se incluyen la posibilidad de desequilibrio de la ventilación/perfusión entre el pulmón nativo y el trasplantado y la difícil cicatrización de la anastomosis bronquial [8,9]. Debido a que la técnica quirúrgica del trasplante unilateral es menos compleja que la del bilateral, la primera puede estar indicada en pacientes con edad avanzada, toracotomía previa en uno de los hemitórax u otras condiciones que puedan aumentar la morbilidad.

Trasplante bilateral secuencial. El trasplante pulmonar bilateral ofrece la ventaja de extirpar todo el tejido pulmonar enfermo. Por este motivo, está especialmente indicado en aquellas patologías pulmonares supurativas como las bronquiectasias o la fibrosis quística, ya que si se trasplantara un solo pulmón se corre el riesgo de que éste se infecte por el pulmón nativo remanente [17].

Trasplante cardiopulmonar. Este tipo de trasplante está indicado cuando la enfermedad pulmonar se acompaña de enfermedad cardiaca terminal, si esta última no puede ser corregida quirúrgicamente [8].

Trasplante lobar único o lobar bilateral. Los trasplantes lobares se realizan con donador vivo consanguíneo y están justificados para aquellos candidatos a trasplante con riesgo inminente de muerte y para los que no se dispone de un pulmón procedente de donador cadavérico [11,18].

Evaluación del donador

Además de estar con muerte cerebral, que es la condición básica que debe tener el donador de pulmón, la evaluación clínica y funcional de los pulmones debe corroborar que están libres de gérmenes patógenos y que, presumiblemente, son capaces de soportar la agresión que supone el trasplante [19,20]. Lo anterior permite garantizar la hematosis una vez trasplantados los pulmones en el receptor. En la actualidad se considera que el donador debe cumplir las siguientes condiciones [19,20]:

- 1 Edad menor a 55 años.
- 2 Ausencia de historia de neoplasia previa.
- 3 Compatibilidad del sistema ABO.

- 4 Radiografía de tórax normal.
- 5 Presión parcial de oxígeno en sangre arterial (PaO₂) superior a 300 mmHg, con fracción inspirada de O₂ (FiO₂) de 1 y presión en vía aérea al final de la espiración (PEEP, por sus siglas en inglés: *positive end expiratory pressure*) de +5 cmH₂O.
- 6 No fumador o fumador de menos de 20 paquetes-año.
- 7 Ausencia de historia de traumatismo torácico.
- 8 Ausencia de historia de cirugía torácica previa.
- 9 Ausencia de episodio de aspiración broncopulmonar de material del tubo digestivo.
- 10 No estado de sepsis.
- 11 No estado de coagulación intravascular diseminada.
- 12 Ausencia de secreciones purulentas en la broncoscopia.
- 13 Tinción de Gram del esputo con ausencia de bacterias, hongos y/o leucocitos en cantidad significativa.

Puesto que la escasez de órganos es actualmente el factor más importante que limita la difusión del trasplante de pulmón, algunos autores, con el objetivo de aumentar el número de procedimientos, han ampliado los criterios anteriores de selección de donadores, habiendo publicado resultados aceptables con donadores “límitrofes” o “marginales”. Se han trasplantado incluso pulmones procedentes de donadores vivos [18].

Evaluación del receptor

La evaluación clínica del receptor pretende obtener información relativa a tres aspectos fundamentales que van a determinar la indicación y el momento de efectuar el trasplante [21]. Los dos primeros son el estado evolutivo de su enfermedad respiratoria y el grado de deterioro funcional, de modo que el momento óptimo de incluir al paciente en la lista de espera para trasplante es aquél cuando la enfermedad está ya en fase avanzada y con grave deterioro funcional. Sin embargo, al mismo tiempo debe cumplirse el tercer aspecto que consiste en que la expectativa de vida del paciente sea lo suficientemente amplia (entre 1 y 2 años) como para permitirle esperar a que se presente la oportunidad de realizar el trasplante pulmonar.

Morbilidad y mortalidad postrasplante

Incluyendo todas las modalidades de trasplante pulmonar, la supervivencia actual registrada es del 78% al año y del 45% a los cinco años [22]. Las causas de morbilidad o

mortalidad son las mismas en todos los tipos de trasplante pulmonar. Por convención, se define como morbilidad o mortalidad temprana cuando el evento morboso o el fallecimiento ocurre dentro de los primeros 90 días postrasplante, o tardía si ocurre más allá de este período [23].

Morbilidad o mortalidad temprana. Como se puede observar en la **Figura 1**, la falla primaria del injerto (generalmente manifestación de la lesión por isquemia-reperusión) es la causa más frecuente de muerte temprana. Le siguen las infecciones bacterianas y/o por citomegalovirus, insuficiencia cardíaca o hemorragia, dehiscencia de la sutura bronquial u otras fallas o complicaciones técnicas, rechazo inmune agudo o hiperagudo, etc. [24].

Morbilidad o mortalidad tardía. El rechazo crónico en forma de bronquiolitis obliterante es responsable de hasta un 29% de muertes tardías. Los cuadros infecciosos y sépticos suponen el 30%. Estos últimos tienen a la bronquiolitis obliterante como factor de predisposición y se desarrollan, con frecuencia, en su presencia como enfermedad de base [25].

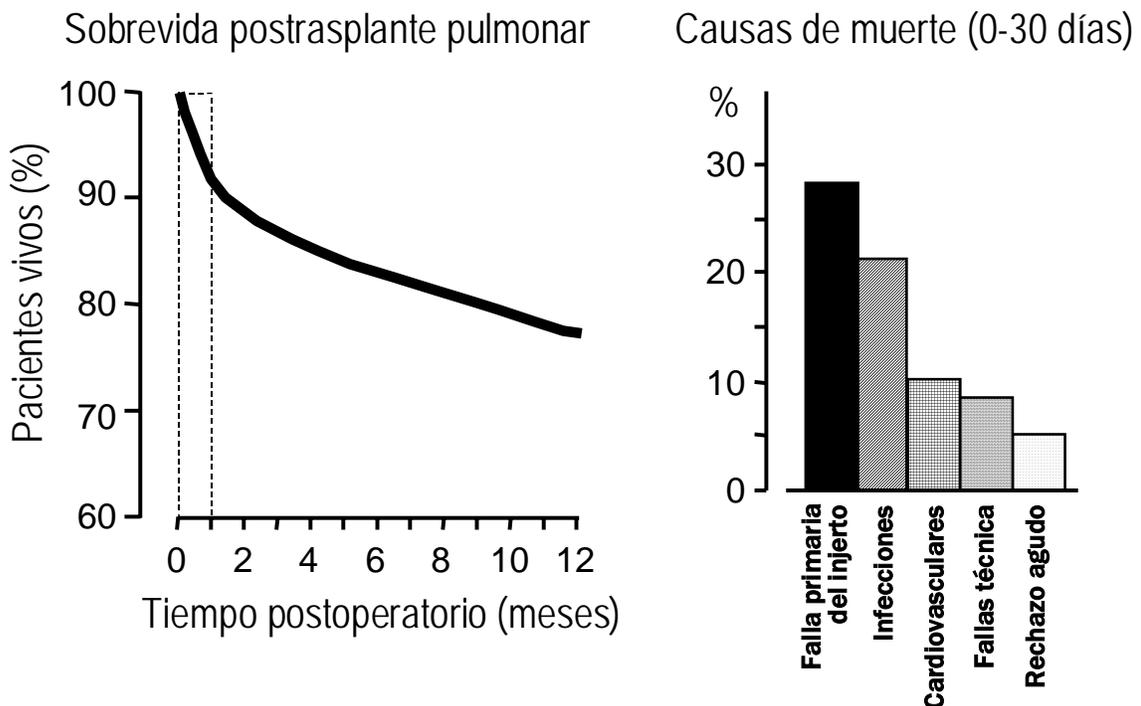


FIGURA 1. Sobrevida y principales causas de mortalidad en pacientes que recibieron un trasplante pulmonar. Gráficas construidas con datos publicados por Trulock y col. [1]

LA PRESERVACION PULMONAR

El término *preservación* denota al conjunto de técnicas y/o tratamientos cuyo objetivo es el mantenimiento estructural y funcional del órgano que se trasplanta. En la práctica clínica actual la totalidad de los centros que trasplantan pulmón realizan la preservación pulmonar mediante el método de perfusión anterógrada e inmersión fría [26,27]. Todos los autores resaltan la importancia de evitar que haya zonas del pulmón que no resulten perfundidas por la solución de preservación y que no estén, por tanto, preservadas. Para conseguir que la distribución de la solución de preservación en los pulmones sea uniforme y completa se aconseja perfundir a baja presión, con el pulmón insuflado y mientras está siendo ventilado [21,26,27]. También se aconseja adicionar a la solución prostaciclina (PGI₂), que es un potente vasodilatador arterial pulmonar. Se pretende con ello evitar la vasoconstricción refleja que puede provocar la perfusión del árbol vascular pulmonar [21,26]. Por lo demás, no existe unanimidad en cuanto a qué tratamientos deben administrarse al donador, qué composición debe tener el líquido a perfundir, qué condiciones de almacenamiento del órgano son las más adecuadas, cómo debe hacerse la reperfusión, o qué tratamientos deben darse al receptor.

LA FALLA PRIMARIA DEL INJERTO

Entre el 13 y el 35% de los pacientes que son sometidos a trasplante pulmonar presentan falla primaria del injerto en las primeras horas después del trasplante, manifestada por edema agudo pulmonar [28]. Esta frecuencia, sin embargo, podría elevarse hasta un 97% de los sujetos trasplantados si se considera exclusivamente el punto de vista radiológico [29]. La falla primaria del injerto suele manifestarse durante las primeras 48 h posteriores al trasplante, llegar a su máxima expresión alrededor del día 5 y, en aquellos pacientes que sobreviven, resolverse en las siguientes 2 semanas [30]. El espectro clínico de esta complicación puede ir desde ligera hipoxemia asociada con algunos infiltrados en la radiografía, hasta un síndrome completo de dificultad respiratoria aguda con infiltrados extensos en la radiografía, deterioro grave del intercambio gaseoso y aumento de la resistencia pulmonar (**Figura 2**) [21,31]. La falla primaria del injerto reviste gran relevancia, ya que la *International Society for Heart and Lung Transplantation* (ISHLT) menciona que es responsable de hasta un tercio de la mortalidad perioperatoria [1].

La falla primaria del injerto ha recibido diversos sinónimos, tales como lesión por

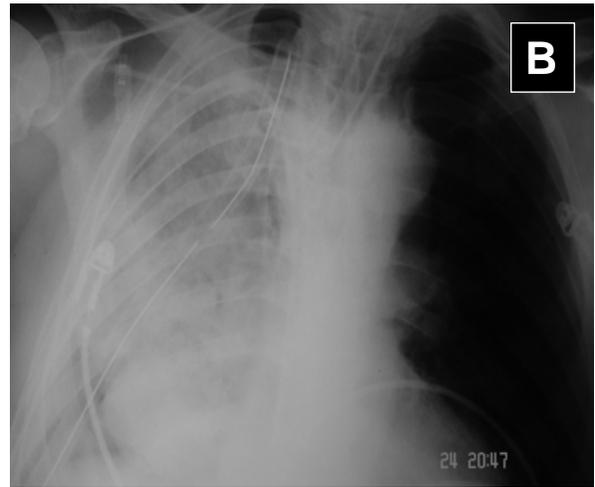
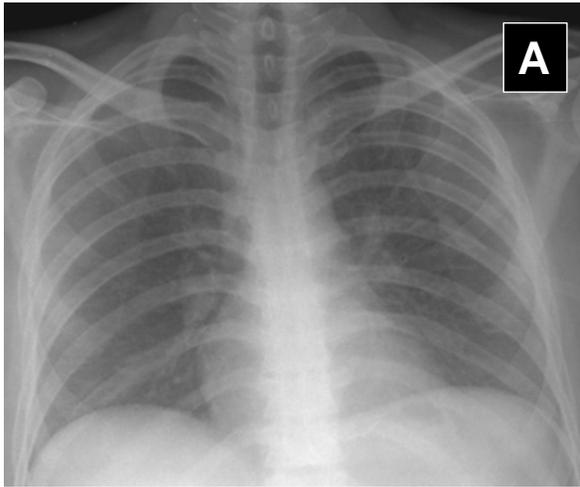
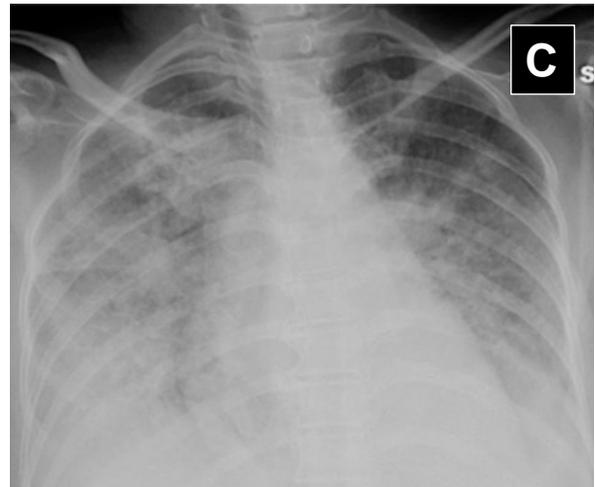


FIGURA 2. Manifestaciones radiológicas de falla primaria del injerto. En comparación con una radiografía de tórax normal (A), en la falla primaria del injerto aparecen imágenes de llenado alveolar que abarcan la totalidad de un pulmón, en el caso del trasplante unilateral (B). En el trasplante pulmonar bilateral los infiltrados pueden estar en uno o ambos (C) pulmones.



isquemia-reperfusión, respuesta de reimplantación pulmonar, disfunción temprana del injerto, lesión por reperfusión, edema por reperfusión y edema por reimplantación [21].

Aunque el mecanismo básico de esta falla es controversial, se considera que es debida a daño endotelial ocasionado por el período de isquemia durante la preservación pulmonar, lo que ocasiona incremento de la permeabilidad vascular [32]. El pulmón es muy sensible a los estados de isquemia. El curso temporal del deterioro del pulmón sin preservar, después del paro circulatorio, fue examinando mediante microscopia electrónica semicuantitativa por D'Armini y col. [33], quienes concluyeron que la mayoría de los tipos celulares sólo toleraban de 30 a 60 min de hipoxia isquémica sin presentar lesiones irreversibles. Song y col. [34] estudiaron un modelo de trasplante unilateral de pulmón en rata, con preservación del pulmón de donador a 4°C hasta por 24 h. Después de preservación por 12 h había menos del 2% de células muertas (30% de ellas por apoptosis), a las 18 y 24 h esta cifra se elevaba a 11% y 27%, respectivamente (con muy

escasa apoptosis). Estos autores corroboraron, además, que la función de intercambio gaseoso disminuyó significativamente al aumentar el tiempo de preservación. En la actualidad se considera que la tolerancia del pulmón a la isquemia caliente o normotérmica sin preservación es de apenas una hora [35]. Sin embargo, a pesar de esta gran sensibilidad a la isquemia, las diversas técnicas de preservación que se emplean en el trasplante clínico humano (hipotermia, perfusión de soluciones especiales) han permitido que el pulmón donador tolere períodos de isquemia de entre 5 y 7 horas con una relativamente buena función pulmonar [20,36,37]. Este margen de tiempo resulta ser excesivamente corto para la utilización óptima de un recurso escaso y valioso como son los pulmones humanos aptos para trasplante, y contrasta notablemente con otros órganos como hígado y riñón, que pueden ser preservados hasta por períodos de 12 a 24 h.

MECANISMOS DE PRODUCCIÓN DE LA FALLA PRIMARIA DEL INJERTO

Lesión por isquemia

El trasplante de cualquier órgano, y por ende del pulmón, supone su extracción del donador para trasplantarlo en el receptor. Esto exige la sección completa de las conexiones viscerales del órgano. Durante el lapso de tiempo entre la extracción y la implantación quedan interrumpidos el flujo sanguíneo y la ventilación. La consecuencia del cese de la perfusión pulmonar es la interrupción del normal intercambio hídrico, electrolítico, de sustratos metabólicos y de oxígeno y bióxido de carbono entre la sangre y el espacio intersticial, y entre éste y las células.

El oxígeno es el aceptor último de los electrones en la cadena respiratoria mitocondrial. La falta de oxígeno paraliza la cadena respiratoria y el ciclo de Krebs. Se paraliza, por tanto, la producción aeróbica de adenosintrifosfato (ATP). Se estimula entonces la glucógenolisis y la glicólisis [38]. La síntesis de ATP queda a expensas de la glicólisis anaeróbica, capaz de rendir sólo el 5% de las moles de ATP que rinde la fosforilación oxidativa completa con igual cantidad de glucosa. El metabolismo anaeróbico supone la producción y acumulación de ácido láctico, capaz de atravesar la membrana celular y de salir de la célula, con la consiguiente disminución del pH intra y extracelular. Se ha demostrado que la acidosis puede alterar la estabilidad de los lisosomas, e inducir ruptura de los mismos y lesión celular [20,39]. El ATP es el aportador universal de energía de utilización inmediata en la célula. Durante la isquemia la síntesis limitada de ATP hace

que disminuya rápidamente la carga energética celular [20,31,40]. En consecuencia, las funciones celulares que precisan energía (es decir, dependientes de ATP) quedan rápidamente afectadas, tales como la síntesis proteínica y de ácidos nucleicos y el transporte transmembranal de iones en contra de gradientes de concentración, eléctricos u osmóticos. Los procesos celulares regenerativos y generativos no pueden llevarse a cabo, con lo que aparece lesión primero y necrosis después.

El pulmón es un órgano muy sensible a la isquemia [35,41-43]. Las lesiones pulmonares, inicialmente reversibles, aparecen ya entre los 20 y 30 minutos de isquemia caliente o normotérmica [42,43]. Estas lesiones iniciales consisten en ingurgitación celular por entrada de agua al interior de la célula, agua que acompaña la entrada de iones Na^+ y Ca^{2+} . Al fracasar la bomba Na^+/K^+ dependiente de ATP (Na^+/K^+ ATPasa) la célula es incapaz de evacuar el Na^+ que entra pasivamente a favor de gradientes de concentración, y es incapaz de retener ión K^+ que sale de la célula también pasivamente. Al entrar relativamente más Na^+ que el K^+ que sale, se va perdiendo el potencial eléctrico transmembranal (en condiciones normales, el exterior celular es ligeramente positivo con relación al interior) y se irán perdiendo, consiguientemente, aquellas funciones que dependen directamente de la normalidad del mismo, como la excitabilidad o la transmisión de potenciales de acción [39,43]. La entrada de Na^+ al interior celular arrastra al ión Cl^- a favor de gradiente eléctrico y ambos arrastran agua a favor de gradiente osmótico, con lo que la célula se ingurgita [44]. La carencia de ATP deteriora también la función de los canales del Ca^{2+} . La entrada de Ca^{2+} a favor de gradiente de concentración al interior de las células (las concentraciones citosólicas de Ca^{2+} son del orden de 10^{-7} M y las del líquido extracelular de 10^{-3} M) induce la activación de enzimas calcio-sensibles, como la lipasa A_2 y proteasas, las cuales pueden iniciar procesos de degradación proteínica y de los fosfolípidos de membrana [39].

A los 90 ó 120 minutos las lesiones son ya irreversibles. El hecho de que la lesión sea o no reversible depende fundamentalmente de la depleción intracelular de nucleótidos de adenosina: los nucleótidos (ATP, ADP y AMP) no pueden atravesar la membrana celular, pero sí lo hacen los nucleósidos. La adenosina, producto del nucleótido al perder su último grupo fosfato, se degrada aún más a inosina, xantina e hipoxantina, y ésta finalmente a ácido úrico. Si ha habido pérdida masiva de adenosina será imposible, por falta de sustrato disponible, recuperar las concentraciones intracelulares normales de nucleótidos y por ende, de la carga energética celular, incluso aunque se restablezcan las condiciones de aerobiosis [27].

Mecanismos metabólicos de adaptación celular a la hipoxia. La respuesta celular a la hipoxia se ha estudiado en modelos experimentales de células en cultivo. Parece que las células son capaces de una cierta regulación del metabolismo en respuesta a presiones parciales bajas de O₂ especialmente si han sido sometidas previamente a una cierta adaptación a la hipoxia, es decir, si la hipoxia se ha producido de forma lenta y progresiva [27,45].

La regulación metabólica consiste básicamente en una inhibición de la fosforilación oxidativa, que necesita O₂ como aceptor de electrones, acompañada de la inhibición simultánea y complementaria de algunas de las funciones celulares que necesitan ATP. En concreto, quedan inhibidas la síntesis proteínica y de urea y la gluconeogénesis (esto último ha sido observado en hepatocitos aislados) [46]. Por el contrario, aunque las demandas de ATP para la bomba Na⁺/K⁺ ATPasa se reducen también, su supresión en términos porcentuales es inferior a la de la inhibición general del metabolismo del ATP. El resultado es que la bomba Na⁺/K⁺ ATPasa consume hasta un 75% del total del gasto celular de ATP. En definitiva, se inhiben de modo selectivo las vías metabólicas de gasto de ATP, quedando fuertemente inhibidas aquellas funciones que no son imprescindibles de modo inmediato para mantener la viabilidad celular. De ese modo, las células intentan desviar el poco ATP disponible para su utilización en aquellas funciones que no admiten suspensión, como lo es el mantenimiento de la permeabilidad selectiva de iones por parte de la membrana citoplásmica. Como mecanismo a nivel molecular se ha sugerido que la enzima citocromo-oxidasa mitocondrial puede funcionar como sensor de la falta de oxígeno, y como inductor de los mecanismos antes citados de adaptación reversible a la hipoxia tisular [21,27,45].

Lesión por reperfusión

El implante del pulmón en el receptor significa la reconstrucción de las conexiones viscerales fundamentales del órgano: arteria y venas pulmonares y vía aérea. La vasculatura bronquial, dependiente de la circulación sistémica, habitualmente no se reconstruye. Tampoco se reconstruye la inervación pulmonar. No se conoce el impacto deletéreo que la falta de circulación bronquial puede producir en el pulmón implantado [24].

El reimplante del órgano es seguido inmediata y súbitamente de la reperfusión y reventilación del mismo. La reperfusión es causa de nuevas lesiones pulmonares, provoca mayor deterioro estructural y funcional del que el órgano presentaba sólo por

isquemia y enfriamiento [26,47,48]. Obviamente, no habría lesión por reperfusión si no hubiera lesiones previas por isquemia. Es decir, si el órgano no hubiera sufrido isquemia, o no hubiera sufrido ningún cambio o daño durante la fase de isquemia, no debería haber lesión por reperfusión [26].

La lesión celular y orgánica que comienza a producirse en la fase de isquemia/enfriamiento se incrementa en la de reperfusión. Se han realizado estudios histológicos de pulmón de rata tras el período de isquemia (caliente o fría) antes de la reperfusión [47] y/o después de la misma [49,50]. Tras una preservación fría, la lesión histológica se caracteriza por adelgazamiento de las células endoteliales y de los neumocitos tipo I y agregación de los cuerpos lamelares en los neumocitos tipo II. Aparece edema perivascular y peribronquiolar y engrosamiento de la membrana basal con rupturas ocasionales de la continuidad de la membrana alveolo-capilar, y las alteraciones se hacen más intensas a medida que aumenta el tiempo de preservación [47,49,50]. Parecidos hallazgos han sido referidos para pulmones humanos [13,51].

La reperfusión de un órgano sometido a isquemia, con o sin enfriamiento, produce intensificación y progresión de sus lesiones estructurales. En el caso del pulmón, las estructuras blanco de la lesión por reperfusión son fundamentalmente las células endoteliales y los neumocitos tipo I y II [33,52-55]. A las 24 horas de reperfusión *in vivo* hay edema intersticial y alveolar, congestión vascular difusa y hemorragia intraalveolar, ésta última de distribución irregular [56]. Es de destacar que estas alteraciones están ya presentes en el pulmón a los 5 minutos de reperfusión [57]. A las 24 horas de reperfusión el endotelio vascular presenta pérdida de la conexión intercelular. Las rupturas de la continuidad de la membrana alveolo-capilar se hacen más intensas y generalizadas, presentando numerosos agujeros. Durante la isquemia las células del epitelio bronquial muestran signos de degeneración y pérdida de cilios, pero al parecer estas alteraciones son reversibles tras 24 horas de reperfusión [57]. Todavía a los 30 días de reperfusión los pulmones suelen mostrar signos de inflamación crónica, cicatrización e infiltración por abundantes macrófagos cargados de hemosiderina [57].

También han sido estudiadas las alteraciones ultraestructurales de mitocondrias de las células del epitelio bronquial y del endotelio. Las lesiones mitocondriales consisten en distorsión de las crestas de la lámina interna, ingurgitación y alteraciones de la cromatina [58,59]. Igualmente, la intensidad de las alteraciones ultraestructurales descritas en los cuerpos lamelares de los neumocitos tipo II parecen tener una relación inversa con el rendimiento funcional del injerto tras el reimplante [56,58].

Producción de radicales libres de oxígeno. Es muy probable que los efectores últimos de la lesión por reperfusión pulmonar sean los radicales libres de oxígeno o especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés). Estos incluyen el radical superóxido (O_2^{\bullet}), el radical hidroxilo (OH^{\bullet}), el peróxido de hidrógeno o agua oxigenada (H_2O_2) y el oxígeno monoatómico (O). Los ROS se caracterizan por poseer electrones no emparejados, que son responsables de su alta reactividad química oxidante y consecuente capacidad lesiva [20,60]. En condiciones normales los ROS son producidos en escasa cantidad en las mitocondrias y liberados al citosol. También se producen en el citoplasma de las células endoteliales durante la síntesis de prostaglandinas y por neutrófilos y macrófagos activados. También en condiciones normales los ROS no causan lesión, pues son rápidamente degradados a O_2 y H_2O por tres sistemas enzimáticos. La superóxido-dismutasa (SOD) cataliza la transformación del O_2^{\bullet} en H_2O_2 y H_2O . La catalasa y la glutatión-peroxidasa catalizan la descomposición del H_2O_2 en H_2O y O_2 [60].

En la lesión por isquemia-reperfusión el origen de los ROS es doble. Durante la hipoxia algunos de los cambios metabólicos que acontecen en el órgano hipóxico van a conducir a un desarreglo en la producción y eliminación de los ROS. En concreto, la enzima que en condiciones normales cataliza el paso de xantina a hipoxantina es la xantina-deshidrogenasa. En la fase de hipoxia esta enzima se convierte en xantina-oxidasa por la acción de una proteasa calcio-dependiente. Igualmente, durante la hipoxia se producen cantidades anormalmente elevadas de xantina e hipoxantina por degradación de ATP, por mecanismos ya comentados anteriormente. En el momento de la reperfusión, la xantina-oxidasa produce O_2^{\bullet} siendo los sustratos metabólicos la hipoxantina producida durante la isquemia y el O_2 aportado en la reperfusión. El radical O_2^{\bullet} , aunque por sí mismo es relativamente inocuo, reacciona a su vez con el H_2O_2 para producir radical OH^{\bullet} y oxígeno monoatómico. Estas dos últimas especies químicas, altamente reactivas y peligrosas son capaces de causar daño e incluso muerte celular por ataque oxidativo al DNA, que pierde su estructura normal, a las proteínas, provocando inactivación enzimática, y por peroxidación lipídica de los lípidos poliinsaturados, causando ruptura de las membranas e inactivación de los sistemas enzimáticos ligados a membranas [27,60].

La lesión celular así iniciada induce la activación de neutrófilos y macrófagos, que se constituyen en el eje central de la respuesta inflamatoria [61]. Estas células activadas son también productoras de ROS mediante un mecanismo calcio dependiente [60,62].

14 Mediadores químicos e infiltración por células inflamatorias. Tanto los neumocitos como las células endoteliales dañadas son productoras y liberadoras de factores mediadores de la inflamación, citocinas e interleucinas [61,63]. Factores mediadores de la inflamación son los eicosanoides, grupo de sustancias biológicamente activas que se generan a partir del ácido araquidónico, constituyente normal de las membranas celulares y que se libera por acción de la fosfolipasa A₂. Si el ácido araquidónico entra a la llamada “vía de la ciclooxigenasa” se producirán tromboxanos A₂ y B₂ (TxA₂ y TxB₂), prostaciclina (PGI₂) y prostaglandinas PGD₂, PGE₂ y PGF_{2α}. También a partir del ácido araquidónico, pero por la “vía de la lipoxigenasa” se originan los leucotrienos LTA₄, LTB₄, LTC₄, LTD₄ y LTE₄ [64]. El factor de activación plaquetaria (PAF) es también sintetizado a partir de lípidos, en este caso por acción de la lipasa A₂ [65,66]. Otras citocinas liberadas son el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), interferón gamma (IFN-γ), e interleucinas IL-1, IL-2, IL-6 y IL-8 [67,68]. La liberación de estos mediadores resulta en el reclutamiento exponencial, en cascada, del segundo componente de la lesión por reperfusión, la respuesta inflamatoria, con activación leucocitaria, del sistema del complemento y de la coagulación [61,65,69]. La activación del sistema del complemento lleva a la liberación de C3a y C5a que pueden aumentar la permeabilidad vascular, causar contracción del músculo liso, inducir quimiotaxis y migración de leucocitos, opsonización y fagocitosis y provocar agregación plaquetaria. Las proteínas terminales del complemento forman el complejo terminal C5b-C9, el cual es capaz de provocar lisis celular por ataque directo a la membrana [70]. La inflamación produce aumento de la permeabilidad vascular, secuestro leucocitario, agregación plaquetaria e infiltración del órgano y lesión inflamatoria por leucocitos, macrófagos y plaquetas activados. Se cierra así un círculo vicioso lesivo, puesto que la respuesta inflamatoria está originada por, y dirigida contra el órgano injertado [61,65,69]. La importancia e intensidad de la lesión por los mecanismos sistémicos de inflamación queda patente con la demostración de que, tras el trasplante unipulmonar, la lesión posreperfusión desencadenada por el pulmón trasplantado afecta también al pulmón nativo, sin que éste haya sufrido hipoxia, reperfusión o trauma quirúrgico [71]. Efecto del enfriamiento

15 El enfriamiento provoca una disminución general del metabolismo. La mayoría de las enzimas de animales homeotérmicos muestran una disminución de su actividad a la mitad por cada 10°C de descenso de la temperatura [72]. Al disminuir la actividad metabólica el enfriamiento produce el efecto deseado de disminuir las necesidades

celulares de energía y, por tanto, de ATP, aumentando de ese modo la tolerancia del órgano a la isquemia. El enfriamiento disminuye pero no detiene el metabolismo. Durante la preservación pulmonar fría se ha demostrado consumo de O₂ y eliminación de CO₂, incluso a temperaturas tan bajas como 10°C [72,73].

Está demostrado que el enfriamiento brinda una extraordinaria protección, puesto que el tiempo de exposición necesario para causar lesión isquémica a bajas temperaturas excede francamente del requerido para producir lesión por isquemia caliente [26,48]. Sin embargo, el enfriamiento puede ser lesivo en sí mismo. La presencia de lesiones adicionales a las propias de la isquemia caliente sugiere que existen mecanismos de lesión que son propios del frío intenso [74,75]. El frío disminuye el metabolismo de forma no selectiva [74,75]. El enfriamiento interrumpe también los mecanismos de inhibición selectiva que la célula despliega frente a la hipoxia. Durante la fase de frío se disminuye la producción de ATP, incluso en presencia de suficiente O₂. Parece que hay una inhibición por frío de la fosforilación oxidativa, mediada por la entrada de Ca²⁺ en la mitocondria [15]. La eficiencia de la bomba de Na⁺/K⁺ queda reducida con el frío, por lo que la entrada de iones y la ingurgitación celular acompañante son fenómenos más intensos en la isquemia fría que en la normotérmica [23]. Se inhibe la síntesis proteínica, por lo que los mecanismos normales de regeneración y reparación celular estarán limitados. También lo estarán las enzimas de la glucólisis anaeróbica. Es posible que los mecanismos de adaptación que sobre el metabolismo energético induce la isquemia caliente no sean exactamente los mismos que los de la isquemia fría. En este sentido, algunos autores han apuntado la posibilidad de que en condiciones de hipotermia intensa los ácidos grasos y/o los cuerpos cetónicos se usen preferentemente en lugar de la glucosa como sustratos del metabolismo energético [76]. Finalmente, el cambio de fase del agua líquida a sólida puede ser lesivo no sólo a nivel del citoplasma, sino especialmente a nivel de las membranas y/o del citoesqueleto [77]. La formación de cristales de hielo se inicia a los 4°C, lo que puede ser causa de rigidez de las estructuras celulares y secundariamente de lesión. En concreto, aunque la temperatura de congelación de las membranas lipídicas no se conoce, es posible que esté por encima de la de congelación del agua. De ser así, a temperatura de 4 ó 5°C puede que las membranas de fosfolípidos se hayan solidificado, o simplemente hayan perdido flexibilidad y se hagan más frágiles, lo que podría dar lugar a rupturas o desgarros de las membranas citoplásmica, nuclear o de los organelos intracitoplásmicos [77].

Disfunción endotelial y vascular

En condiciones normales las células endoteliales resultan claves en la regulación del tono vasomotor y en el mantenimiento de la homeostasis vascular. La lesión endotelial en la isquemia-reperfusión produce alteración de la fisiología endotelial [78,79]. A nivel intracelular, y dependiendo del receptor que haya sido estimulado, las sustancias efectoras de la relajación del músculo liso vascular son el AMP cíclico y el GMP cíclico [79]. En condiciones normales, el óxido nítrico (NO) es continuamente sintetizado y liberado por el endotelio. En el interior de las células musculares lisas de los vasos el NO activa la guanilato-ciclase, enzima que cataliza la producción de GMP cíclico, el cual efectúa la relajación muscular y, consiguientemente, la disminución del tono y de la resistencia vasculares [79-81]. Se ha demostrado inhibición del NO en la reperfusión. Junto a la acción vasodilatadora, el NO posee, además, actividad antiinflamatoria pues inhibe la adhesión y diapedesis de neutrófilos y la agregación plaquetaria [79,82-84]. Profundizando en el mecanismo de acción del NO, en un estudio realizado en un modelo de trasplante de pulmón en rata se observó que los efectos preservadores de la nitroglicerina (sustrato metabólico en la producción de NO) adicionada a la solución de preservación, fueron mejores que si se adicionaba hidralacina, aunque esta última tuviera un efecto vasodilatador más potente, precisamente porque la primera era capaz de inhibir la reacción inflamatoria [85]. Del mismo grupo es un estudio en el que se administra dibutilil AMP cíclico, compuesto análogo al AMP cíclico y capaz de atravesar la membrana celular. Los efectos benéficos observados no se limitan a la simple vasodilatación [70]. Sin embargo, el NO puede también tener efecto deletéreo en la isquemia-reperfusión. En determinadas condiciones de pH ácido e hiperoxia, el NO puede reaccionar con el O_2^* con producción de peroxinitrito ($ONOO^-$), el cual puede inducir muerte celular por toxicidad directa o por inducción de apoptosis [86,87].

En resumen, algunas alteraciones morfológicas características de la isquemia-reperfusión son ingurgitación y ruptura celular, edema intersticial y taponamiento intraluminal por agregados y/o restos celulares. A ello debe adicionarse la desregulación funcional del tono vasomotor pulmonar por inhibición del NO, potente vasodilatador, y por la liberación, por parte de leucocitos y plaquetas activadas, de péptidos vasoactivos y otras sustancias vasoconstrictora como la serotonina y el TxA_2 [88,89].

Alteración del surfactante pulmonar

El surfactante pulmonar está compuesto de una mezcla de proteínas y fosfolípidos, el

más importante de los cuales es la dipalmitoil-fosfatidilcolina. El surfactante, producido por los neumocitos tipo II y secretado al interior de la luz alveolar, tapiza la faz aérea de la membrana alveolo-capilar. Su función es disminuir la tensión superficial de la interfase líquido-gas en el interior del pulmón, lo que evita el colapso de unidades alveolares en la espiración y facilita la expansión pulmonar en la inspiración, es decir, aumenta la distensibilidad pulmonar, disminuyendo así el trabajo respiratorio [88]. Posee también función inmunológica y de defensa física frente a partículas y microorganismos inhalados [90]. Cada vez más se está reconociendo el papel que la lesión específica de los neumocitos tipo II y/o del deterioro de la composición, función o metabolismo del surfactante pulmonar pueden jugar como mecanismos de lesión en la isquemia-reperusión [53,88,91-93].

Es de suponerse que durante el período de isquemia fría la síntesis de surfactante está inhibida en el marco general de la inhibición metabólica que produce el enfriamiento. En el momento de la reperusión el déficit de surfactante empeora, en tanto son lesionados los neumocitos tipo II y en tanto los fosfolípidos constituyentes del surfactante hayan sido objeto de peroxidación por los ROS. Cualesquiera que sean los mecanismos implicados, la alteración cuantitativa y/o cualitativa del surfactante va a provocar disminución de la distensibilidad pulmonar. El pulmón precisará mayores presiones en la vía aérea para poder ser ventilado. Habrá más facilidad para que se produzcan zonas de atelectasia. El déficit de surfactante favorece y se acumula a los demás factores que conducen a la falla aguda del injerto.

POSIBLE PAPEL DE ACETILCOLINA Y SUSTANCIA P EN LA FALLA PRIMARIA DEL INJERTO

Durante la extracción del pulmón donador ocurre inevitablemente la sección total de su inervación. Si bien en diversos tejidos se ha realizado mucha investigación sobre las consecuencias de la denervación, la mayoría de los estudios se enfocan a los cambios que ocurren a nivel del sistema nervioso central (médula espinal, encéfalo), más que a nivel de fibras nerviosas periféricas, que en el caso del pulmón donador son las relevantes. Tay y Wong observaron que las fibras nerviosas inmunorreactivas a sustancia P de los ganglios cardíacos del mono disminuían progresivamente después de una vagotomía proximal [94]. Sin embargo, estos cambios ocurrían en el curso de varias semanas, por lo que podrían no ser aplicables a los eventos agudos posteriores a la

denervación pulmonar. Stanley y Drachman encontraron que la liberación no cuantitativa de acetilcolina en músculo esquelético diafragmático de ratones declinaba a un 50% en las primeras 4 h después de la denervación aguda y, después de una recuperación transitoria, desaparecía horas más tarde [95]. La liberación cuantitativa, por otro lado, permanecía más o menos constante durante al menos las primeras 8 h.

El tejido nervioso es uno de los tejidos más sensibles al efecto nocivo de la hipoxia. Por ejemplo, se sabe que las neuronas del cerebro cesan rápidamente su metabolismo a los 5 ó 10 segundos de suspenderse completamente la irrigación sanguínea [96] y que al cabo de pocos minutos de isquemia puede ocurrir daño irreversible de este tejido [97,98]. Algunos estudios sugieren que a nivel del sistema nervioso periférico períodos de hipoxia no completa tienen también un efecto nocivo. Por ejemplo, un período agudo de isquemia produce activación de las fibras sensoriales y provocan la liberación de sustancia P [99]. Zee y col. desarrollaron un modelo experimental en donde ratas recién destetadas fueron expuestas a condiciones de hipoxia hipobárica (equivalente a una FiO_2 del 10%) durante 24, 48 y 72 h [100]. Estos autores demostraron que la hipoxia incrementa la expresión del receptor NK1 en la microvasculatura pulmonar y en los macrófagos alveolares y que aumenta los niveles de sustancia P a las 48 y 72 h, pero disminuye los niveles de mRNA de preprotaquicína. Matsuda y col. sometieron ratas por períodos más prolongados de hipoxia (3 meses), encontrando que al final de este lapso existía un aumento en la longitud y la densidad de fibras inmunorreactivas a sustancia P y a CGRP en la mucosa nasal [101].

Por lo tanto, es posible que uno de los primeros fenómenos que ocurra durante el período de preservación pulmonar sea la lesión de las células nerviosas, con liberación subsecuente de sus neurotransmisores. Muchos de estos neurotransmisores pueden tener efecto al nivel de la microvasculatura pulmonar. En especial dos de ellos, la acetilcolina, conocido neurotransmisor de las fibras colinérgicas, y la sustancia P, neurotransmisor de las fibras C sensoriales, son potentes mediadores que incrementan la permeabilidad vascular en diversos tejidos, incluyendo el pulmón [102]. Además, el pulmón posee una gran densidad de ambos tipos de fibras nerviosas, tanto al nivel de vías aéreas como a nivel del parénquima pulmonar. Sorprendentemente, a pesar de la gran capacidad que estos neurotransmisores poseen para incrementar la permeabilidad vascular de la microcirculación, después de una revisión exhaustiva de la literatura, pudimos constatar que el papel específico de acetilcolina o sustancia P en el desarrollo de la falla primaria del injerto ha sido muy poco explorado hasta el momento. El estudio que

más se relaciona con este aspecto es el realizado por Souza y col. en un modelo de isquemia-reperfusión en intestino de ratas [103]. Estos investigadores provocaron la lesión por isquemia-reperfusión mediante el pinzamiento de la arteria mesentérica superior durante 30 ó 120 min, seguido de iguales períodos de perfusión (despinzamiento). Además de las lesiones esperadas (edema e infiltración neutrofílica, tanto intestinal como pulmonar, y alteraciones sistémicas como hipotensión, neutropenia o muerte) los autores detectaron producción de citocinas (TNF- α e IL-10) en tejido y suero después de la perfusión de la arteria mesentérica. De forma por demás interesante, la administración de dos antagonistas de los receptores NK1 (SR140333 y CP99,994) estructuralmente distintos, administrados 5 min antes de la perfusión, inhibieron cada uno por separado el incremento de la permeabilidad capilar y el reclutamiento de neutrófilos en el intestino y en pulmón. Por el contrario, el tratamiento con un antagonista de los receptores NK2 (SR48968) o NK3 (SR142801) no tuvo efecto en el reclutamiento de neutrófilos en el pulmón o intestino después de la perfusión, si bien el antagonista SR48968 inhibió de manera marginal la permeabilidad vascular en intestino, pero no en pulmón.

Por todo lo anterior, el principal interés del presente estudio fue evaluar si la acetilcolina y/o la sustancia P podrían estar involucradas en el incremento de la permeabilidad vascular en un modelo de falla primaria del injerto en pulmón aislado y perfundido de conejo.

La inervación pulmonar

Desde el punto de vista anatómico el sistema nervioso humano está integrado por el encéfalo y la médula espinal, que conforman el sistema nervioso central, del cual emergen fibras nerviosas que se distribuyen en los diferentes órganos corporales, a las que en conjunto se les denomina sistema nervioso periférico. Sin embargo, desde el punto de vista funcional el sistema nervioso se ha clasificado en dos grandes categorías, el sistema nervioso somático, encargado de controlar aquellas funciones que están bajo el control voluntario, y el sistema nervioso autónomo, responsable de las actividades orgánicas involuntarias [96].

El sistema nervioso autónomo está dividido en dos partes, el sistema nervioso simpático, cuyo mediador principal es la noradrenalina, y el sistema nervioso parasimpático, cuyo mediador más relevante es la acetilcolina, motivo por el cual también se le denomina colinérgico. En el decenio de los años 1980s la visión clásica de una

inervación colinérgica excitatoria y una adrenérgica inhibitoria cambió considerablemente al demostrarse la existencia del sistema no adrenérgico-no colinérgico (NANC). El sistema NANC puede ser inhibitorio (iNANC) o excitatorio (eNANC). Varias purinas y péptidos han sido postulados como neurotransmisores de este sistema. Algunos de ellos coexisten con la acetilcolina o la noradrenalina, por ejemplo, el péptido intestinal vasoactivo (VIP) en los nervios colinérgicos y el neuropéptido Y en los nervios adrenérgicos.

En el pulmón se encuentran nervios sensoriales aferentes y motores eferentes. Los nervios vagos y los ganglios torácicos simpáticos 4 y 5 contribuyen con fibras que forman los plexos pulmonares anterior y posterior en el hilio pulmonar. De estos plexos surgen dos redes nerviosas, los plexos peribronquial y periarterial. El plexo peribronquial se divide en extracondral (entre el cartílago y la adventicia) y subcondral (entre el cartílago y el epitelio). Algunas células ganglionares están repartidas en el plexo peribronquial, disponiéndose principalmente en el plexo extracondral [104].

Nervios eferentes. Los nervios eferentes parasimpáticos inician en los núcleos vagales, de donde parten fibras preganglionares que corren en los nervios vagos, penetran a las paredes de las vías aéreas y llegan a los plexos extraconduales, donde hacen relevo en los ganglios parasimpáticos. Desde estos ganglios, fibras posganglionares inervan al músculo liso, a las glándulas submucosas y a los vasos sanguíneos. Muchos mediadores influyen en la liberación de acetilcolina de los nervios posganglionares en las vías aéreas. Los mediadores inflamatorios y los neuropéptidos sensitivos sensibilizan los ganglios parasimpáticos, e incrementan de esa forma los mecanismos reflejos colinérgicos [105,106].

Las fibras nerviosas preganglionares simpáticas provienen de la médula espinal y hacen sinapsis en los ganglios cervicales y paravertebrales. De estos sitios nacen las fibras posganglionares, que al ingresar a las paredes de las vías aéreas se entremezclan con las fibras nerviosas colinérgicas para ir a inervar los tejidos blanco. Las vías aéreas humanas tienen muy escasa inervación simpática, en especial en las vías aéreas de mayor calibre, donde proveen inervación a las glándulas submucosas y a los vasos sanguíneos, y en menor grado al músculo liso.

Nervios aferentes. La presencia de nervios aferentes ha sido descrita mediante estudios fisiológicos, registrando los impulsos nerviosos de las rutas aferentes desde el receptor. Se han descrito tres tipos diferentes de receptores [107]:

1. Los receptores de adaptación lenta, que son terminales nerviosas mielínicas con

- una velocidad de conducción de 30-50 m/seg que se localizan muy profundamente en la pared de las vías aéreas, con frecuencia en el músculo liso. Son responsables del reflejo de inflación de Hering-Breuer y del reflejo de broncodilatación o distensión de las vías aéreas.
2. Los receptores de adaptación rápida, también conocidos como receptores de irritación, que son fibras nerviosas aferentes mielínicas con una velocidad de conducción de 20-40 m/seg. Algunas de sus ramas terminales se localizan en el epitelio, cercanas al lumen de las vías aéreas. Responden a una gran variedad de estímulos mecánicos y químicos. Su estimulación causa broncoconstricción refleja, tos e hiperventilación.
 3. Las terminaciones nerviosas denominadas fibras C, que son fibras nerviosas amielínicas, con velocidad de conducción de 1-2 m/seg. Se han clasificado en fibras C pulmonares y fibras C bronquiales. Las fibras C pulmonares corresponden a los denominados receptores J y probablemente se localizan cerca de los capilares pulmonares. Las fibras C bronquiales producen broncoconstricción refleja, incremento reflejo en la secreción de moco en las vías aéreas, respiración rápida y superficial o apnea, hipotensión y bradicardia.

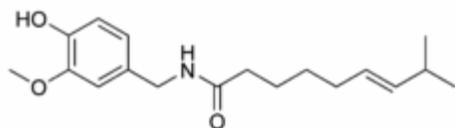
La inervación NANC. La inervación *inhibitoria* NANC de las vías aéreas fue demostrada por primera vez en la tráquea del cobayo, donde una estimulación eléctrica de campo producía una respuesta bifásica. La contracción inicial era bloqueada por atropina, y la relajación subsecuente sólo parcialmente inhibida por el propranolol. La porción de la relajación resistente al propranolol era bloqueada por la incubación de tetrodotoxina (TTX), lo que indicaba una respuesta de origen nervioso. La broncodilatación no adrenérgica ha sido demostrada en varias especies, incluyendo el ser humano. El sistema nervioso no adrenérgico inhibitorio puede activarse de manera refleja. En los felinos, la estimulación mecánica de la mucosa laríngea produce una broncoconstricción transitoria sensible a atropina, y una broncodilatación prolongada, resistente a la inhibición adrenérgica β con propranolol. El neurotransmisor broncodilatador no adrenérgico de las vías aéreas ha sido identificado como el óxido nítrico (NO). La liberación neuronal del NO modula la respuesta colinérgica en las vías aéreas humanas *in vitro*, aparentemente a través de un antagonismo funcional con la acetilcolina liberada [106,108]. En las vías aéreas de cobayos, pero no en las humanas, el péptido intestinal vasoactivo (VIP) también media la respuesta del NANC inhibitorio. Ha sido reportado que el número de terminaciones nerviosas inmunorreactivas al VIP

disminuye en pacientes que han fallecido de asma, aunque estudios subsecuentes no encontraron esta disminución en pacientes con asma [106,109,110].

Los nervios *excitatorios* NANC han sido demostrados en las vías aéreas de cobayos *in vivo* e *in vitro*. En presencia de atropina y propranolol el bronquio principal de los cobayos se contrae lentamente en respuesta a la estimulación eléctrica de campo. Esta contracción resistente a la atropina abarca aproximadamente 60% de la contracción máxima que puede ser inducida por la estimulación eléctrica. Los principales mediadores de este sistema excitatorio NANC son la sustancia P, la neurocinina A y el péptido relacionado al gen de la calcitonina (CGRP), liberados de fibras sensoriales.

Este sistema de nervios no colinérgicos excitatorios (fibras C) es estimulado por irritación química (diisocianato de tolueno, SO₂, éter, formalina, capsaicina, humo de cigarro, bajo pH) o por diversos mediadores químicos (histamina, bradisinina, acetilcolina, prostaglandinas, leucotrienos). Se considera que la liberación de neurotransmisores se realiza mediante un reflejo axónico, involucrando conducción nerviosa antidrómica. El concepto de un reflejo axónico implica que los nervios sensitivos pueden tener una función efectora periférica. La estimulación de los nervios sensitivos inicia, no solamente impulsos ortodrómicos que viajan hacia la médula espinal, sino también impulsos antidrómicos que se dispersan a través de las ramas terminales (colaterales axónicas) de los nervios sensitivos. El concepto de reflejo axónico se desarrolló aún más en la piel, donde se ha demostrado que la respuesta de rubor o vasodilatación, que se dispersa por varios centímetros desde el punto de la lesión, está mediado por reflejos axónicos de las terminaciones nerviosas sensitivas. A este fenómeno de vasodilatación, edema local debido a incremento en la permeabilidad vascular, aunado a infiltración y activación de células inflamatorias y presencia de dolor se le conoce como *inflamación neurogénica* [111].

Debido a que la capsaicina es capaz de estimular las fibras C, este compuesto se ha usado ampliamente como herramienta farmacológica para vaciar a estas fibras de sus neurotransmisores [112]. La capsaicina es la sustancia que le da el característico sabor picante a los chiles y su fórmula química es la siguiente:



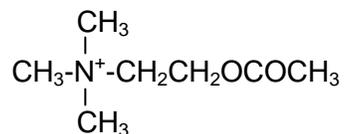
El efecto de la capsaicina se lleva a cabo a través de la estimulación de los receptores TRPV1 (*transient receptor potential vanilloid*), que es un canal iónico localizado en la fibra

peptidérgica cuya activación permite la entrada de Ca^{2+} . Todos los receptores de la familia TRPV tienen 6 dominios transmembranales que poseen el grupo amino y el grupo carboxilo en la parte intracelular y un poro localizado entre los dominios 5 y 6. Además de la capsaicina, otros estímulos que excitan a la fibra C también realizan su efecto a través de la activación del TRPV1, tales como la disminución del pH, el incremento en la temperatura ($>43^{\circ}\text{C}$), la bradiginina y algunos metabolitos del ácido aráquidónico como la anandamida y prostaglandinas. Diversas células inflamatorias también tienen el receptor TRPV1 y en ellas la capsaicina tiene un efecto inhibitorio sobre la liberación de mediadores proinflamatorios [112].

La actividad del TRPV1 puede ser modulada mediante el estado de fosforilación en diversos sitios del receptor [113,114]. Así, cinasas de proteína (PK) como PKA y PKC, además de elementos de la vía de la MAPK (como el ERK) producen fosforilación del TRPV1 lo que disminuye su umbral de activación dejándolo en un estado de sensibilización. Además, la presencia de PIP_2 y p38 también pueden sensibilizar al TRPV1. Por el contrario, la actividad de las fosfatasas puede eliminar el estado de sensibilización del TRPV1 al desfosforilarlo.

Acetilcolina

La acetilcolina es el principal neurotransmisor posganglionar del sistema nervioso parasimpático [115], así como de las motoneuronas, las fibras preganglionares tanto del parasimpático como del simpático y muchas neuronas del sistema nervioso central (SNC) (ganglios basales, corteza motora, etc). La fórmula química de la acetilcolina es la siguiente:



Se sintetiza en la terminal nerviosa a partir de la colina y la acetilcoenzima A procedente de las mitocondrias, por medio de la enzima colina-acetiltransferasa [115,116]. Las concentraciones de acetilcolina en los botones sinápticos están reguladas por la actividad de la colina-acetiltransferasa y por la recaptación de colina por las mismas terminales nerviosas que la liberaron. Este neurotransmisor se almacena en vesículas de la terminal nerviosa, de donde puede ser liberada al exterior cuando la fibra nerviosa es

estimulada. Se ha demostrado que la estimulación directa de la terminal nerviosa por factores locales como la hipoxia puede liberar acetilcolina [117]. Una vez liberada, la acetilcolina es capaz de interactuar con dos tipos de receptores: nicotínicos y muscarínicos. La estimulación del receptor colinérgico muscarínico interviene en múltiples fenómenos celulares tales como la contracción y relajación del músculo liso en diferentes órganos, la disminución del cronotropismo e inotropismo cardiacos, la estimulación de glándulas exocrinas y en acciones excitatorias e inhibitorias en el SNC. En el pulmón la acetilcolina provoca contracción del músculo liso bronquial y vascular a través de los receptores M2 y M3, respectivamente, y en la microcirculación provoca retracción de la célula endotelial, con lo que incrementa la permeabilidad vascular, favoreciendo la salida de líquido al espacio intersticial [118]. La interacción de la acetilcolina con su receptor cesa rápidamente debido a la hidrólisis de la acetilcolina en colina y acetato, mediada por la enzima acetilcolinesterasa (AChE) que se encuentra cerca de los receptores.

Sustancia P

La sustancia P es un péptido que se encuentra en altas concentraciones en pulmón, y es producido tanto por las fibras nerviosas sensoriales como por células inflamatorias. Al unirse a su principal receptor, conocido como NK1, realiza diversas funciones biológicas como aumento de la permeabilidad vascular y broncoconstricción.

La sustancia P pertenece a una familia de péptidos conocidos como taquicininas, que además de la sustancia P incluyen a la neurocinina A (NKA), neurocinina B (NKB), neurocinina K (NKK) y neuropéptido Y (NPY). Las tres primeras tienen funciones excitatorias sobre neuronas, actúan como potentes vasodilatadores y participan en la contracción del músculo liso; sin embargo se diferencian en la potencia relativa de sus acciones farmacológicas [119]. Como familia, las taquicininas conservan en común una misma secuencia C-terminal de Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂, donde X es un aminoácido aromático (Tyr o Phe) o hidrofóbico (Val o Ile), que les confiere la interacción con su receptor específico [119].

En el pulmón se ha reportado la presencia de tres neuropéptidos que se originan de fibras nerviosas sensoriales: CGRP y las taquicininas sustancia P y NKA. Además, se ha reportado la presencia del NPY, de origen simpático, y del péptido intestinal vasoactivo (VIP), de probable origen parasimpático [120,121]. Las fibras nerviosas que contienen sustancia P, NKA y CGRP juegan un papel clave en la inflamación neurogénica [120]. En mamíferos dos diferentes genes codifican las preprotaquicininas, denominados PPT-I y

PPT-II. El gen PPT-I puede expresar cuatro distintas formas de mRNA a través de *splicing* alternativo, dos de las cuales (las formas b y g) codifican la síntesis de sustancia P y NKA, mientras las otras dos (las formas a y d) codifican para sustancia P únicamente [119].

La primera publicación sobre la sustancia P apareció en 1931 en el *Journal of Physiology*. En este artículo Ulf von Euler y John Gaddum [122], quienes estudiaban la distribución de la acetilcolina en el tubo gastrointestinal, describen que en el cerebro e intestino de conejo se encuentra un factor “resistente a la atropina”, el cual estimula la contracción del músculo liso y tiene efectos hipotensivos. Llamaron sustancia P a este nuevo agente, refiriéndose con la letra P a *powder* (polvo, en inglés), ya que observaron que las propiedades de ese nuevo extracto se mantenían cuando se evaporaba a polvo seco [123].

En 1971, Chang y Leeman, identificaron la sustancia P como un undecapéptido cuya estructura es [123]:

Arg- Pro- Lys- Pro- Gln- Gln- Phe- Phe- Gly- Leu- Met- NH₂

La síntesis de sustancia P ocurre en los ribosomas como una proteína larga, que luego es empacada en vesículas de almacenamiento y transportada axonalmente a los extremos terminales (en fibras nerviosas peptidérgicas) para su procesamiento enzimático final y almacenamiento en vesículas junto con otros neuropéptidos. La sustancia P se libera en respuesta a estímulos térmicos, eléctricos y químicos que actúan sobre estas terminaciones nerviosas.

La sustancia P se encuentra ampliamente distribuida en el sistema nervioso central y periférico de los vertebrados. Se piensa que la sustancia P participa en varias respuestas de comportamiento, en la regulación de la supervivencia y degeneración neuronal, en las funciones cardiovascular y respiratoria y en la activación de los reflejos eméticos. En la médula espinal participa en la neurotransmisión del dolor y estímulos nocivos y modula los reflejos autonómicos. En el sistema nervioso periférico se localiza principalmente en las neuronas sensoriales y neuronas propias de las vías gastrointestinales, genitourinarias y respiratorias [124].

Se ha demostrado la producción de sustancia P por células inflamatorias como macrófagos, eosinófilos, linfocitos y células dendríticas [119]. Se ha reportado además su producción por fibroblastos [125].

Efectos biológicos de la sustancia P. La sustancia P parece estar involucrada

en una gran variedad de mecanismos biológicos. Uno de los más importantes a nivel pulmonar es la inflamación neurogénica, la cual está caracterizada por: vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular, edema, infiltrado celular e hipersensibilidad secundaria a alteraciones en neuronas sensoriales.

La acción de la sustancia P es particularmente prominente sobre las células endoteliales de los vasos sanguíneos. Así, este neuropéptido provoca retracción las células endoteliales, lo que al reducir su tamaño ocasiona aumento de la permeabilidad vascular y extravasación de proteínas plasmáticas en las vénulas poscapilares. Asimismo, estimula a la célula endotelial para que produzca NO, generando vasodilatación de arteriolas. La sustancia P también está involucrada en la modulación funcional de células inmunes, la regulación del crecimiento de las células endoteliales y los mecanismos de protección y reparación de los tejidos [126].

La sustancia P puede estimular también la adhesión de leucocitos a las células endoteliales de vénulas [120]. Se ha observado además que la sustancia P es capaz de inducir la liberación de mediadores como la serotonina [127].

La sustancia P es degradada principalmente por dos enzimas, la endopeptidasa neutra (NEP), también llamada neprilisina, y la enzima convertidora de angiotensina (ACE). La NEP se localiza principalmente en las vías aéreas y mantiene niveles bajos de sustancia P en el líquido extracelular bajo condiciones basales y controla sus efectos proinflamatorios [127,128]. La ACE se ubica principalmente en las células endoteliales, por lo que regula especialmente las concentraciones intravasculares de sustancia P [128].

Las acciones biológicas de la sustancia P son mediadas en diferentes tejidos y sistemas (piel, sistema cardiovascular, sistema respiratorio, sistema gastrointestinal) básicamente por los receptores NK1. Los otros receptores de taquicininas, NK2 y NK3, tienen preferencia por NKA y NKB, respectivamente [119]. Aunque en general las taquicininas se unen a su receptor específico, exhiben reactividad cruzada hacia los otros subtipos de receptores de esta familia. Esto se debe, probablemente, al reconocimiento por cada uno de los distintos receptores del núcleo carboxilo terminal fundamental de los ligandos (los distintos péptidos de esta familia), a los que son capaces de acoplarse igualmente bien [129]. Por esta razón, la sustancia P activa no sólo a los receptores NK1, sino que también puede tener efecto sobre los NK2 y NK3 en diversos tejidos y bajo determinadas circunstancias [129]. Los tres receptores para taquicininas son glicoproteínas constituidas por siete dominios hidrofóbicos transmembranales conectados por *loops* intra y extracelulares acoplados a proteína G [129]. Los receptores acoplados a

proteína G forman una superfamilia grande y funcionalmente diversa de receptores de la superficie celular, que realizan sus acciones intracelulares a través de una vía que involucra la activación de una o más proteínas G. Los receptores que pertenecen a este grupo responden a una variedad de hormonas y neurotransmisores, que van desde pequeñas aminas, como la epinefrina e histamina, pasando por péptidos, tales como la sustancia P y la bradicinina, hasta grandes hormonas glicoproteínicas como las hormonas luteinizante y paratiroidea [129]. La vía de señalización común a esta familia de receptores es iniciada por la unión del agonista (por ejemplo, la sustancia P) a su receptor específico en la superficie celular. Esta unión causa un cambio conformacional en el receptor y le permite interactuar con la proteína G en la membrana celular, formando un complejo de alta afinidad: agonista-receptor-proteína G. La forma activada de la proteína G se disocia del receptor y activa la proteína efectora, modulando los niveles de segundos mensajeros intracelulares. Las proteínas G activadas realizan la mediación de la estimulación o inhibición de diversas enzimas efectoras y canales iónicos, incluyendo adenilato-ciclase, guanilato-ciclase, fosfolipasa C, fosfolipasa A₂, y canales de calcio y potasio [129,130]. La sustancia P efectúa sus funciones sobre el receptor NK1 a través de la activación de un sistema de segundos mensajeros, causando la producción de IP₃ (fosfatidil-inositol), el que a su vez eleva los niveles de Ca²⁺ citoplasmático [120,129,130].

En condiciones normales el receptor NK1 se encuentra en la superficie de la membrana celular; sin embargo, su expresión es modificada por la presencia de inflamación periférica. Un estímulo mecánico nocivo induce la liberación de sustancia P, que al unirse al receptor NK1 produce la internalización del mismo hacia el medio interno celular. Se ha observado una rápida endocitosis del receptor NK1 en presencia de sustancia P y en relación directa con su concentración. Esta endocitosis es reversible después de 30 minutos, lo que sugiere que el receptor internalizado es “reciclado” hacia la superficie celular. Este fenómeno contribuye a la desensibilización de las células a la sustancia P (taquifilaxis o desensibilización inducida por un agonista) [129,131]. Los antagonistas de la sustancia P no provocan este fenómeno, sino por el contrario, bloquean la internalización del receptor. De igual forma, una disminución en la temperatura de las membranas celulares, de forma tal que alcancen temperaturas de aproximadamente 4°C, provoca su solidificación y el receptor no es capaz de internalizarse [132].

Interacciones entre acetilcolina y sustancia P

Se han descrito interacciones recíprocas entre la acetilcolina y la sustancia P. Empleando un modelo de pulmones aislados y perfundidos de conejo, similar al empleado en nuestro estudio, Delaunois et al. encontraron que la acetilcolina exógena induce liberación de sustancia P de las fibras nerviosas del sistema NANC excitatorio [133]. Más aún, en un estudio subsecuente este mismo grupo de investigadores demostraron también, en este mismo modelo, que el aumento de la permeabilidad vascular producido por la sustancia P exógena está mediado parcialmente por la liberación de acetilcolina [134]. Esta interacción de la sustancia P como promotor de la liberación de acetilcolina también fue demostrada por Colasurdo et al. a nivel de las vías aéreas de conejo *in vitro* [135].

PULMÓN AISLADO Y PERFUNDIDO EN ESTUDIOS DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN

El pulmón aislado y perfundido (PAP) es una técnica de laboratorio que consiste en extraer el bloque cardiopulmonar del animal tras haber canulado la tráquea, arteria pulmonar y aurícula izquierda, siendo entonces ventilado y perfundido en condiciones controladas [127]. Las ramas pulmonares de los vagos y la circulación arterial bronquial quedan seccionadas y el drenaje linfático se interrumpe, sin que queden claras las consecuencias deletéreas que ello pueda suponer sobre la función del pulmón aislado. El PAP presenta la gran ventaja de conservar *ex vivo* la integridad estructural y funcional del órgano. Es posible, por tanto, medir y registrar, y en otros casos calcular, parámetros de gran importancia en función pulmonar, como son el intercambio de gases, la mecánica respiratoria, la resistencia vascular pulmonar, la permeabilidad capilar, y la formación de edema pulmonar. También es posible hacer estudios sobre funciones metabólicas del pulmón. Así mismo, al final de cada experimento se pueden utilizar parte o la totalidad de ambos pulmones para estudios analíticos, de viabilidad celular e histológicos, estructurales y/o ultraestructurales [136]. Frente a los modelos de trasplante en animales, el PAP presenta una ventaja muy importante: su más fácil reproducibilidad. El PAP permite controlar con exactitud y a voluntad las condiciones de ventilación y de perfusión (lo que es imposible en el animal vivo), facilitando así la evaluación funcional del pulmón [96,137]. Permite también administrar fármacos o aditivos en la dosis y por la ruta deseada. Por el contrario, es obvio que el PAP no puede evaluar supervivencia. Sólo los modelos de trasplante pulmonar en animales, que reproducen con la máxima precisión la

realidad clínica del trasplante en humanos, permiten evaluar la supervivencia postrasplante, parámetro que es definitivo por cuanto constituye el objetivo de toda acción terapéutica. Además, otro problema del modelo es que, en el PAP, la función pulmonar sufre deterioro espontáneo con el tiempo. Incluso sin que se de ningún estímulo específico el órgano aislado va reteniendo agua y formándose edema perivascular y peribronquiolar, con lo que el pulmón va perdiendo distensibilidad y ofreciendo cada vez más resistencia vascular al flujo [137,138]. El pulmón aislado puede mantenerse en buenas condiciones un máximo de 3 horas. Por el contrario, en los modelos experimentales de trasplante pulmonar en animales la función del pulmón puede analizarse a corto, medio y largo plazo, días o semanas después de la implantación. El problema de los modelos *in vivo* es que exigen una mayor complejidad instrumental y técnica, y que son económicamente mucho más caros. Con sus ventajas indudables y con sus limitaciones, el PAP es el modelo experimental más ampliamente utilizado en investigación de la fisiología, fisiopatología y farmacología pulmonar. El uso del PAP para el estudio de la lesión por isquemia-reperfusión después de un período de preservación es relativamente reciente [139].

Variaciones técnicas del modelo de PAP

Patrón de ventilación. El patrón de ventilación para el PAP de conejo suele ser de ~55 respiraciones por minuto y volumen corriente (V_t) de ~10 ml. Se aconseja mantener un nivel de presión positiva al final de la espiración (PEEP) de +3 ó +4 cmH_2O para mantener los alveolos “abiertos” y facilitar la ventilación [137].

El PAP puede ser ventilado mediante presión positiva en vía aérea o mediante técnicas de presión negativa. En este último caso, el pulmón debe permanecer colgado de la tráquea en el interior de una cámara completamente cerrada [140]. El sistema de presión negativa reproduce con mayor fidelidad las condiciones fisiológicas del pulmón en el interior del tórax.

Composición del gas inspirado. El gas inspirado puede ser aire ambiental, cuya fracción inspirada de oxígeno (FiO_2) es del 21%, o pueden utilizarse mezclas de gases como el carbógeno (cuya composición es 95% O_2 y 5% CO_2) u otras combinaciones. Estas mezclas gaseosas están disponibles en el mercado, contenidas en tanques, las cuales simplemente se abren a un reservorio (bolsa) sellada y ésta se conecta al ventilador.

Perfusión a volumen constante o a presión constante. Para la perfusión puede

utilizarse una bomba que impulsa un volumen constante de solución de perfusión, o bien puede éste fluir desde un reservorio, el cual queda colocado a una altura determinada y constante con relación al pulmón, lo que producirá un flujo de perfusión a presión constante [91,141].

Líquido de perfusión. El modelo de PAP puede ser perfundido con diferentes líquidos. Las soluciones polielectrolíticas son las más sencillas y las más frecuentemente utilizadas, tales como la solución de Krebs, cuya composición es (g/L): glucosa 0.98, NaCl 6.90, KCl 0.354, CaCl \cdot 2H $_2$ O 0.373, MgSO $_4$ 0.293, KH $_2$ PO $_4$ 0.162, NaHCO $_3$ 2.1, y 2.5% de albúmina bovina, pH 7.4 a 7.5 y temperatura de 37 a 38°C. El pH se controla añadiendo NaHCO $_3$ (1M) o burbujeando el líquido de perfusión en el reservorio venoso con una mezcla de 95% CO $_2$ y 5% O $_2$, cuya osmolaridad es de 310 mOsm/L. Puede también perfundirse el pulmón con sangre total o con sangre diluida en solución K-H. Será preciso en estos casos adicionar heparina sódica a la solución. La perfusión con sangre total reproduce más fielmente la realidad fisiológica de la lesión por isquemia-reperfusión. Los registros de función pulmonar son más fidedignos, puesto que la sangre, con su contenido celular y de proteínas posee características oncóticas y reológicas diferentes de las que exhiben las soluciones electrolíticas [142]. De igual forma, al emplear sangre se perfunde el pulmón con leucocitos, que tienen un papel importante en la génesis y mantenimiento de la lesión por reperfusión. Como inconveniente, la perfusión con sangre diluida o total obliga a obtener sangre homóloga en cantidad suficiente para llenar el circuito de perfusión con su reservorio. De cada conejo sólo pueden extraerse aproximadamente 60 cc. de sangre por punción cardiaca.

RELEVANCIA DEL ESTUDIO

Uno de los principales problemas que dificulta la realización de trasplante pulmonar es el rápido deterioro de la función capilar, que genera edema y dificultad para el intercambio gaseoso. Los mecanismos responsables de este deterioro aún no se conocen con certeza. Si en este estudio demostramos que la liberación de acetilcolina y sustancia P participan en la alteración de la permeabilidad capilar, podrían desarrollarse nuevos procedimientos de preservación que no solo reduzcan la incidencia de falla primaria del injerto, sino que también prolonguen el período de viabilidad del pulmón del donador.

HIPÓTESIS

La liberación de acetilcolina y sustancia P durante la preservación pulmonar producen aumento de la permeabilidad capilar en un modelo de lesión por isquemia-reperfusión en pulmón aislado y perfundido de conejo.

OBJETIVOS

1. Determinar la tasa de producción de acetilcolina y sustancia P a diferentes intervalos durante la preservación pulmonar de pulmones de conejo.
2. Determinar la actividad de la NEP y de la AChE a diferentes intervalos durante la preservación pulmonar.
3. Demostrar que el pretratamiento de los conejos con capsaicina (agonista de los receptores TRPV1) disminuye el deterioro del coeficiente de filtración capilar modificado (mKf,c) ocasionado por la preservación pulmonar durante 24 h.
4. Demostrar que la atropina (bloqueador de receptores colinérgicos muscarínicos), el fragmento SP 4-11 (bloqueador de receptores de sustancia P), y el L-732,138 (antagonista específico de los receptores NK1) producen los siguientes efectos, en comparación con grupos control sin estos bloqueadores:
 - Disminuye el deterioro del mKf,c en pulmones de conejo reperfundidos con solución de Krebs con albúmina bovina, después de haber estado en preservación por 24 h.
 - Disminuye el deterioro del mKf,c en pulmones de conejo reperfundidos con sangre autóloga, después de haber estado en preservación por 24 h.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron conejos Nueva Zelanda machos con un peso aproximado de 2.5 a 3.0 Kg que se mantuvieron en condiciones convencionales de bioterio y alimentación *ad libitum*, de acuerdo con los lineamientos para el uso de animales de laboratorio de la Ley General de Salud de México y la Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio para el Distrito Federal [138].

Obtención y preparación del bloque cardiopulmonar

Los conejos se anestesiaron profundamente con una inyección única intramuscular de clorhidrato de xilazina (3 mg/kg i.m., Rompun[®], Bayer) y pentobarbital sódico (28 mg/kg i.v., AnestesaI[®], Pfizer). Para obtener el bloque cardiopulmonar se disecó y canuló la tráquea de cada animal para ventilarlos mecánicamente (10 ml/kg, frecuencia respiratoria de 50/min) con un ventilador para pequeñas especies (modelo Starling, Harvard Apparatus, Holliston, MA), después de lo cual se realizó una esternotomía media. Se refirieron las venas cavas superior e inferior. Inmediatamente después se inyectó en el ventrículo derecho heparina (2000 UI/kg) para posteriormente ligar las venas cavas y exsanguinar al animal. El bloque cardiopulmonar se extrajo de la cavidad torácica. El corazón se seccionó transversalmente en ambos ventrículos, por debajo de las válvulas auriculoventriculares, para colocar dos cánulas de cristal de 15 mm de longitud por 3 mm de diámetro interno, una de las cuales se introdujo en la arteria pulmonar y la otra en la aurícula izquierda. Las estructuras adyacentes fueron incluidas en la ligadura de la arteria pulmonar y la aurícula izquierda, con el fin de disminuir la distensibilidad de dichas estructuras para que no interfieran en el registro de la presión vascular.

Lavado y preservación pulmonar

Una vez obtenido el bloque cardiopulmonar y mantenido bajo ventilación mecánica a 50 respiraciones por minuto y a 10 ml/Kg de volumen corriente, la sangre intravascular de los pulmones se eliminó introduciendo de manera anterógrada 100-150 ml de solución de preservación a través de la cánula colocada en la arteria pulmonar, a una presión de 20 cmH₂O (generada mediante la elevación del reservorio que contenía la solución de

preservación a una altura de 20 cm). Al finalizar este lavado se pinzaron simultáneamente las cánulas arterial y venosa, de forma que el lecho vascular se mantuviera lleno de la solución de preservación. Los pulmones fueron hiperinsuflados (3 veces el volumen corriente) para evitar zonas atelectásicas y en estas condiciones la tráquea fue pinzada. El bloque cardiopulmonar se sumergió en un recipiente conteniendo solución salina al 0.9% y se mantuvo a 4°C durante un período de hasta 24 h hasta su estudio.

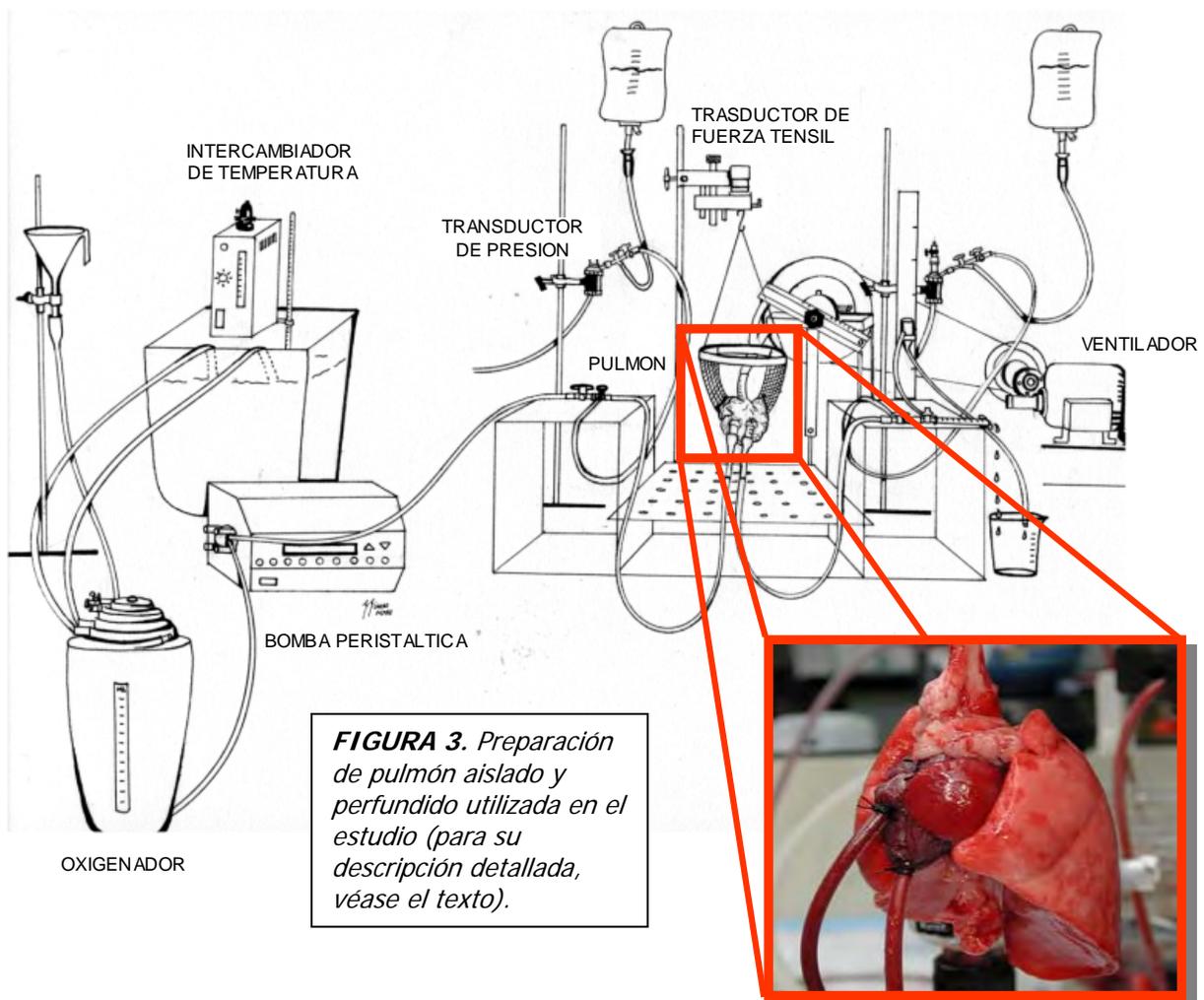
Pretratamiento con capsaicina

Con el fin de depletar a las fibras C de sus neurotransmisores, en algunos conejos se utilizó capsaicina de acuerdo al protocolo seguido por D'Agostino y col. (2002). Este protocolo consiste en administrar por vía subcutánea 5 mg/Kg de capsaicina por vía subcutánea el primer día, 50 mg/Kg el segundo día y 25 mg/Kg el tercer día. Tres días después de la última inyección los animales fueron eutanasiados para su estudio. La capsaicina se preparó en una mezcla de etanol (10%), Tween 80 (10%) y solución salina al 0.9% (80%) [143].

Medición del mKf,c

Para la medición del mKf,c (coeficiente de permeabilidad vascular) se realizó la preparación del pulmón aislado y perfundido (**Figura 3**). El bloque cardiopulmonar se conectó a un circuito de perfusión recirculatorio, donde fue perfundido a un flujo constante de 20 ml/min/Kg de peso del animal. El circuito incluyó una bomba peristáltica de circulación (NY-7550-62 Masterflex, Barrington, IL) con indicador de flujo de perfusión y termómetro, así como un reservorio venoso con trampa de burbujas. Para tener este reservorio se utilizó un oxigenador de burbujas (modelo Bentley 5, Baxter Irvine, CA). Se tuvo especial cuidado para evitar la entrada de aire al sistema de perfusión. El bloque cardiopulmonar se colocó en una hamaca hecha con malla de Marlex[®] colgada de un transductor de fuerza tensil (FT03, Grass Instruments, Co., Boston, MA). Una vez montados en esta hamaca, los pulmones se lavaron haciendo pasar líquido de perfusión por la arteria pulmonar hasta eliminar al máximo la sangre existente en el lecho vascular, para mantenerlos posteriormente perfundidos con 400 ml de la solución artificial de perfusión Krebs conteniendo (g/l): glucosa 0.98, NaCl 6.90, KCl 0.354, CaCl₂·2H₂O 0.373, MgSO₄ 0.293, KH₂PO₄ 0.162, NaHCO₃ 2.1, y 1.25% de albúmina bovina. El pH y la temperatura fueron continuamente medidos y mantenidos

en límites fisiológicos (pH 7.4 a 7.5, 37 a 38°C). El pH se controló añadiendo NaHCO_3 (1 M) o burbujeando el líquido de perfusión en el reservorio venoso con una mezcla de 95% CO_2 y 5% O_2 . Como medida preventiva para evitar que al momento de iniciar la perfusión anterógrada se presentaran embolias gaseosas, antes de iniciar dicha perfusión se pasó solución de Krebs de forma retrógrada (por la cánula venosa) hasta que las burbujas de aire que estuvieran en el lecho vascular fueran expulsadas por el extremo arterial.



En algunos experimentos, para la medición del mKf_c los pulmones se perfundieron con sangre autóloga heparinizada y hemodiluida. La heparina (300 UI/Kg) se administró por vía endovenosa una vez que estuvo anestesiado el conejo. Antes de la perfusión la sangre autóloga fue hemodiluida con Krebs hasta un hematocrito aproximado de 15%. Para restituir el grado de heparinización de esta sangre hemodiluida y evitar así la

formación de coágulos, antes de utilizarla en la reperfusión se le añadió una nueva dosis de heparina (2 UI/ml). La duración de la reperfusión con sangre antes de la primera medición del mKf,c fue de alrededor de 15-20 min. Para evaluar el efecto aislado de la heparina, en otro grupo diferente de experimentos los pulmones se perfundieron con la misma solución de Krebs descrita en el párrafo anterior a la cual se le añadió heparina (2 UI/ml).

Los pulmones se ventilaron con aire ambiental humedecido a un volumen corriente de 10 ml/kg de peso, una frecuencia de 50 respiraciones/min, y una presión final espiratoria (P_e) de 2 cmH₂O. Además, los pulmones se hiperinsuflaron (3 veces el volumen corriente) periódicamente para evitar atelectasias.

Las presiones arterial (P_a) y venosa (P_v) se midieron en las cánulas fijadas en la arteria pulmonar y la aurícula izquierda, respectivamente, a través de catéteres (diámetro externo, 2.5 mm; diámetro interno, 1.5 mm) conectados a transductores de presión (Gould 23XL, Quincy, MA). Dichas presiones se ajustaron a cero a nivel del hilio pulmonar.

Al cabo de 10 a 15 min se obtuvo el equilibrio en el sistema, que se caracterizó por un estado isogravimétrico en el cual el peso del pulmón se mantuvo relativamente constante y las presiones arterial y venosa se mantuvieron estables. Dentro de nuestras condiciones experimentales la máxima apertura de los vasos sanguíneos se obtiene cuando la presión arterial es mayor que la venosa y ésta es a su vez mayor que la presión al final de la espiración ($P_a > P_v > P_e$). A dicha condición se le conoce como la zona III. Las presiones y el peso se registraron en un polígrafo multicanales (R612, Beckman, Schiller Park, IL).

La permeabilidad capilar se midió a través del coeficiente de filtración capilar, ligeramente modificado por nosotros [139]. El primer paso para calcular este coeficiente fue obtener un estimado de la presión capilar. Con este fin, de forma súbita se realizó un pinzamiento simultáneo de las cánulas arterial y venosa (mediante el cierre de llaves de tres vías), lo que produjo inmediatamente un incremento de la P_v y un decremento de la P_a , con estabilización de ambas presiones al cabo de 2 ó 3 segundos. En estas condiciones la P_v fue considerada como un indicador de la presión capilar (P_c). Después de haber transcurrido aproximadamente 10 segundos, se quitó la doble oclusión y se restableció el flujo. Unos segundos después de la maniobra anterior se incrementó súbitamente la P_v en 10 cmH₂O, mediante el desvío del flujo de salida venoso hacia una columna abierta de 10 cm de altura, y se mantuvo así durante 3 min.

En los primeros 30 a 60 segundos de este período el peso del pulmón aumentó rápidamente (probablemente debido a congestión capilar), mientras que en los siguientes 60 a 180 segundos la ganancia de peso fue más lenta (presuntamente debida a filtración de líquido a través del capilar)(**Figura 4**). Esta fase lenta de ganancia de peso es la que se utilizó para calcular el mKf,c . Al final de los 3 minutos, y aún con la elevación de la P_v de 10 cmH_2O , se realizó otra doble oclusión para obtener la P_c . El mKf,c se expresó como $ml/min/cmH_2O/g$, lo que representó el líquido que se filtró a través del capilar (es decir, la ganancia de peso del pulmón, asumiendo que el líquido filtrado tiene una densidad de 1.0), por minuto de obstrucción venosa, por diferencia de P_c y por gramo de tejido pulmonar. Para evitar la influencia de la ventilación mecánica al momento del registro del mKf,c , los pulmones se desconectaron temporalmente del ventilador (por aproximadamente 4 minutos). Todas las mediciones del mKf,c se

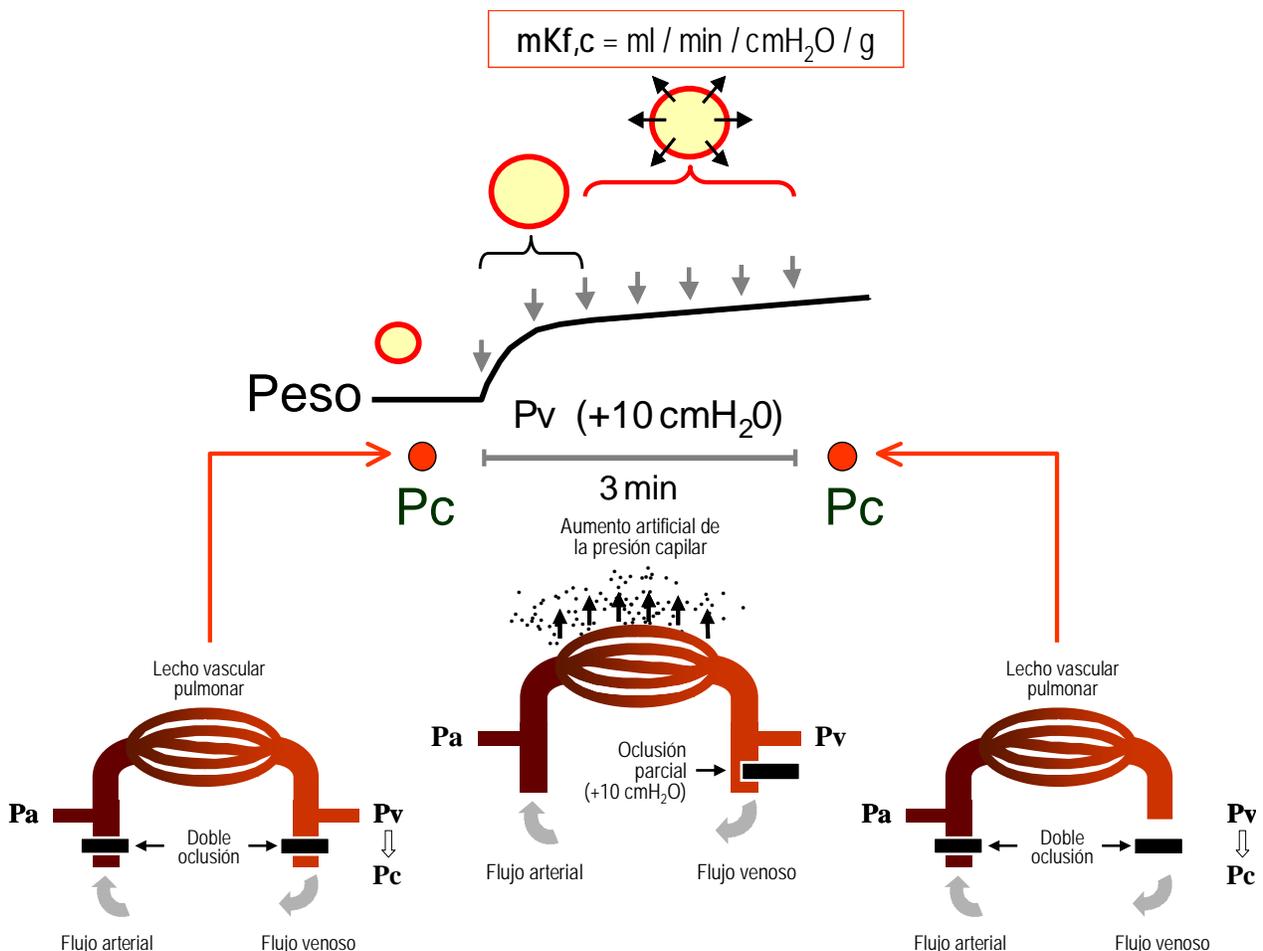


FIGURA 4. Esquema de la medición del mKf,c (para su descripción, véase el texto).

realizaron por triplicado, con un intervalo entre ellas de alrededor de 15 min. El valor final reportado del mKf,c fue el promedio de estas tres mediciones.

Determinación de mediadores bioquímicos

Algunos bloques cardiopulmonares se lavaron (como se describió arriba) usando solución salina al 0.9% con fisostigmina (10^{-6} M) para inhibir a la acetilcolinesterasa, o bien con aprotinina (1500 unidades inhibitoras de calicreína por mililitro, KIU/ml) para inhibir a la NEP. Estos compuestos (fisostigmina y aprotinina) se emplearon con el fin de evitar la degradación de acetilcolina y sustancia P, respectivamente. Los pulmones se preservaron en estas soluciones por 24 h a 4°C, y durante este período el líquido intravascular se recambió cinco veces en su totalidad a diferentes intervalos (15 min, 1, 6, 12 y 24 h). Para efectuar este recambio de líquido intravascular, el bloque cardiopulmonar era sacado del refrigerador, se conectaba en el extremo arterial un frasco conteniendo el mismo tipo de solución usada (a 4°C), el cual se elevaba a una altura de 20 cm con el fin de que por el extremo venoso se expulsara el total de la solución intravascular. Para asegurar que la muestra de líquido intravascular proviniera del lecho capilar pulmonar, los primeros 5 ml de solución se desecharon, los siguientes 5 ml se colectaron en un tubo de ensayo, y los siguientes 10 ml se desecharon también. En mediciones previas corroboramos que 20 ml de solución son suficientes para hacer un recambio total de líquido intravascular. Las cánulas arterial y venosa fueron nuevamente pinzadas y el pulmón sumergido otra vez en su solución de preservación a 4°C. Todo este procedimiento de toma de muestras duraba no más de 5 min. Las muestras para determinar acetilcolina se congelaron a -70°C, y las destinadas para medir sustancia P a -30°C hasta su estudio.

Determinación de sustancia P. A las muestras de solución salina al 0.9% con aprotinina extraídas del lecho vascular de los pulmones preservados se les realizó un proceso de extracción. Éste consistió en que a 1 ml de la muestra se le añadió 1 ml de ácido trifluoroacético al 1%, se mezcló bien en un agitador magnético, se centrifugó a 17,000 g (10497 rpm) durante 15 min a 4°C en una ultracentrífuga (modelo J2-21M/E, Beckman), y se recuperó el sobrenadante. Para separar la sustancia P del sobrenadante se preparó una columna de cromatografía (Biorad, Hercules, CA), que se equilibró añadiéndole 200 mg de BioGel P-2 fino (Biorad), seguido de 1 ml de acetonitrilo y después se le añadió 10-25 ml de ácido trifluoroacético al 1%. Ya lista la columna se le añadió el sobrenadante de las muestras, quedando la sustancia P

atrapada en el gel de la columna. El siguiente paso fue añadir 10 ml de ácido trifluoroacético para lavar, descartándose lo eluido. Para despegar la sustancia P de la columna se le aplicaron lentamente 3 ml de una solución 60:40 de acetonitrilo:ácido trifluoroacético al 1%, y el eluido recuperado (los mismos 3 ml que se añadieron a la columna) se recuperaron en un tubo de plástico estéril. Este eluido se concentró mediante una centrífuga al vacío a 37°C (Speed Vac, Savant, France). La muestra se almacenó a -20°C hasta el momento de realizar el ELISA.

Para la concentración de sustancia P en las muestras de líquido intravascular se utilizó un equipo comercial de ELISA (catálogo 1400, R&D, Minneapolis, MN). Este equipo consta de una microplaca de 96 pozos, que en su concavidad tienen fijos anticuerpos de cabra anti-conejo. A estos pozos se les añadieron 50 µl de sustancia P conjugada con fosfatasa alcalina, 50 µl de muestra, y 50 µl de anticuerpos de conejo anti-sustancia P. Durante las 2 h de incubación a temperatura ambiental en un agitador horizontal, la sustancia P contenida en la muestra compite con la sustancia P conjugada con fosfatasa alcalina por los anticuerpos anti-sustancia P. Durante esta reacción los anticuerpos anti-sustancia P son captados por los anticuerpos fijos en la placa. Después de un lavado con solución amortiguadora para eliminar el exceso de sustancia P no unida a anticuerpos, se añadieron 200 µl de para-nitrofenilfosfato, que es un sustrato para la fosfatasa alcalina, cuya reacción genera un compuesto con color. La microplaca se leyó en un lector de ELISA (Multiskan MS, Labsystems, Helsinki, Finlandia) a 405 nm, y los resultados se comparan con una curva estándar elaborada con concentraciones conocidas de sustancia P. De acuerdo a este principio, cuanto más sustancia P había en las muestras, menor cantidad de sustancia P conjugada fue captada y, por lo tanto, menor color en la lectura.

De acuerdo al fabricante del equipo empleado para la determinación de sustancia P, este análisis tiene una sensibilidad de 9.76 a 10,000 pg/ml, y muestra reactividad cruzada de 50% con otros péptido muy relacionados como son los fragmentos 3-11, 4-11, 7-11 y 1-4 de la sustancia P, eledosina, alfa neurocinina, beta neurocinina y somatostatina.

Determinación de acetilcolina. Para la determinación de acetilcolina se utilizó un cromatógrafo líquido de alta presión (HPLC, Varian Inc., Palo Alto, CA), integrado, entre otros elementos, por una bomba (modelo 629, Perkin-Elmer, Norwalk, CT), un sistema para la toma automática de muestras (iss100c, Perkin-Elmer) y un programa

computacional para el análisis de datos (StarVarian v4.0, Varian Inc.).

Las muestras de solución salina al 0.9% con fisostigmina, extraídas del lecho vascular pulmonar, se descongelaron en hielo inmediatamente antes de su análisis. Se tomaron 10 µl con una microjeringa y se introdujeron al equipo de HPLC. En este equipo la muestra pasa sucesivamente por un sistema atrapador de fisostigmina, luego por una columna C18 (Varian Inc.) y finalmente por una unidad IMER que contiene acetilcolinesterasa y colinaoxidasa (Bionalytical System Inc., West Lafayette, IN). Mediante este sistema toda la acetilcolina presente en la muestra es hidrolizada por la primera enzima en acetato y colina y, posteriormente, la colina es oxidada por la colinaoxidasa en betaína y peróxido. Este último elemento (peróxido) es registrado por un detector electroquímico (Lc-4C, Bioanalytical System Inc.). Cuando existe colina en la muestra, ésta también puede ser detectada al entrar a la segunda reacción enzimática (colinaoxidasa). Sin embargo, los picos de elución de la acetilcolina y colina son diferentes, lo que permite su identificación por separado. La información obtenida fue analizada y almacenada mediante el programa computacional específico. El tiempo de la corrida de la muestra fue de 20 min a una presión de 115-130 mmHg. Los tiempos de retención (donde aparecían los picos correspondientes a acetilcolina y colina) se corroboraron previamente durante la elaboración de las curvas estándar de ambos compuestos, y fueron de 9.5 y 13.6 min, respectivamente. Después de obtener el cromatograma, se determinó la altura de cada pico mediante el programa y los resultados se compararon con curvas estándar de acetilcolina y colina, elaboradas a partir de concentraciones conocidas de estos compuestos y procesadas en el HPLC de la misma forma que las muestras.

Determinación de la actividad enzimática

Actividad de la AChE. La actividad de la AChE fue determinada utilizando un método colorimétrico. Para ello, los pulmones fueron homogenizados en un equipo automático (Polytron, PT 4000, Kinematica, Luzern, Suiza.) usando solución amortiguadora de fosfatos (PBS), el homogenizado se centrifugó por 15 min a 3000 g y el sobrenadante fue filtrado (filtro de 22 µm PTFE). Se tomaron 300 µl del sobrenadante, que se adicionaron a un tubo conteniendo 2.5 ml de 5,5'-ditiobis-(2-ácido nitrobenzoico) (DTNB, 0.32 mM) y 300 µl de PBS (64 mM). Después de medir la absorbancia basal a 405 nm y a 25°C con un fotómetro (DU 640, Beckman) se añadieron 100 µl de un sustrato para la AChE, la acetilticolina (42 mM), y se midió el

cambio de absorbancia ocurrido 10 min después. Una vez que se restó la absorbancia de fondo, la actividad de la AChE se calculó en unidades internacionales (UI, es decir, milimoles de sustrato hidrolizado/min/g tejido).

Actividad de la NEP. La actividad de la NEP fue medida con un método fluorométrico por la generación de dansil-D-Ala-Gly (DAG) libre proveniente de N-dansil-Ala-Gly-D-nitro-Phe-Gly (DAGNPG), que es un sustrato de la NEP. Para este fin, los pulmones fueron homogenizados, centrifugados a 3000 g por 15 min a 4°C y el sobrenadante se usó para el análisis. Por otro lado, se prepararon dos soluciones conteniendo sustrato. La primera se hizo con DAGNPG 1 mM y enalapril 10 µM en 50 mM Tris-HCl. El enalapril se usó para inhibir a la enzima convertidora de angiotensina, para evitar que ésta degrade al sustrato y medir así únicamente la actividad de la NEP. La segunda solución fue similar a la primera, pero con la adición de un inhibidor de la NEP, el fosforamidón (10 µM). Posteriormente, 100 µl de cada solución se preincubaron a 37°C por 10 min y al final de este período se les añadió 50 µl de la muestra, continuando la incubación por 10 min más. La reacción se detuvo calentando las soluciones a 90°C por 10 min. Las muestras se diluyeron 1:10 con 50 mM Tris-HCl y se centrifugaron por 5 min en una microcentrífuga a 9000 g. La fluorescencia de los sobrenadantes se midió en un espectrofotómetro de fluorescencia (Fluoroskan Ascent FL, Foster City, CA) a una longitud de onda de excitación de 355 nm y una longitud de onda de emisión de 538 nm. La actividad de la NEP fue calculada como la diferencia de fluorescencia entre las muestras incubadas con y sin fosforamidón y expresada como densidades ópticas/mg de proteína/min. La concentración de proteína se determinó con un equipo comercial (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), mediante su comparación con una curva estándar de albúmina sérica bovina.

Actividad de la ACE. La actividad de la ACE se midió utilizando básicamente la misma metodología que para la medición de la actividad de la NEP, pero invirtiendo el uso de fosforamidón y enalapril. Así, la primera solución contenía fosforamidón para eliminar la participación de NEP, mientras que la segunda solución contenía también enalapril, de modo que la actividad de la ACE fue calculada como la diferencia de fluorescencia entre las muestras incubadas con y sin enalapril.

Reactivos empleados

De los Laboratorios J.T. Baker, México, se compraron los siguientes reactivos: cloruro de calcio dihidratado granular, fosfato de potasio monobásico, metanol.

De Laboratorios Bayer de México se adquirió la aprotinina (Trasylo[®]) y el cloruro de xilacina (Rompun[®]).

De Laboratorios Baxter, México, se adquirió la solución salina fisiológica.

De Laboratorios Pfizer, México, se compró el pentobarbital sódico (Anestesal[®]).

De Laboratorios Pisa, México, se compró la heparina.

De Sigma-Aldrich Chemical Company, Saint Louis, MO, se compraron los siguientes *reactivos específicos*: albúmina bovina, acetilcolina, atropina, capsaicina, DAG, DAGNPG, DTNB, enalapril, fisostigmina (eserina), fosforamidón, fragmento 4-11 de sustancia P, L-732,138, sustancia P. De esta misma compañía se compraron también los siguientes *reactivos generales*: acetonitrilo, ácido nítrico, ácido trifluoroacético, bicarbonato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, glucosa, sulfato de magnesio heptahidratado, Trizma.

Análisis estadístico

Después de corroborar la distribución normal de los valores obtenidos mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov, se efectuó estadística descriptiva mediante promedio y error estándar. Las pruebas estadísticas empleadas incluyeron análisis de varianza de una vía, seguido de prueba de Student-Newman-Keuls para comparaciones múltiples. Para mayor claridad, en cada figura se indican las pruebas estadísticas usadas. La significancia estadística se fijó en $p < 0.05$ bimarinal.

RESULTADOS

Producción de acetilcolina y sustancia P durante la preservación pulmonar

Como se puede observar en la **Figura 5**, la acetilcolina tuvo una alta tasa de liberación durante los primeros quince minutos de preservación (57.9 ± 1.2 nmol/ml/h), con un decremento importante en los siguientes períodos de tiempo, alcanzando valores de 21.8 ± 1.4 , 3.1 ± 0.1 , 2.6 ± 0.2 y 1.3 ± 0.1 nmol/ml/h a las 1, 6, 12 y 24 h, respectivamente ($n=4$ por cada intervalo). Por su parte, en la **Figura 6** se ilustra la tasa de liberación de sustancia P, que tuvo un comportamiento muy similar al de la acetilcolina, ya que al inicio fue de 17.0 ± 2.1 pg/ml/h y disminuyó progresivamente en los subsiguientes períodos para alcanzar valores de 8.4 ± 1.7 , 0.6 ± 0.1 , 0.7 ± 0.2 y 0.3 ± 0.1 pg/ml/h a las 1, 6, 12 y 24 h, respectivamente ($n=5$ por cada intervalo). La **Figura 7** ilustra la cinética de ambas sustancias, expresadas en porcentaje de la tasa inicial, y se observa que una hora después del inicio de la preservación su producción ha caído alrededor de un 50%, y después de 6 horas ya es menor al 6% de la inicial.

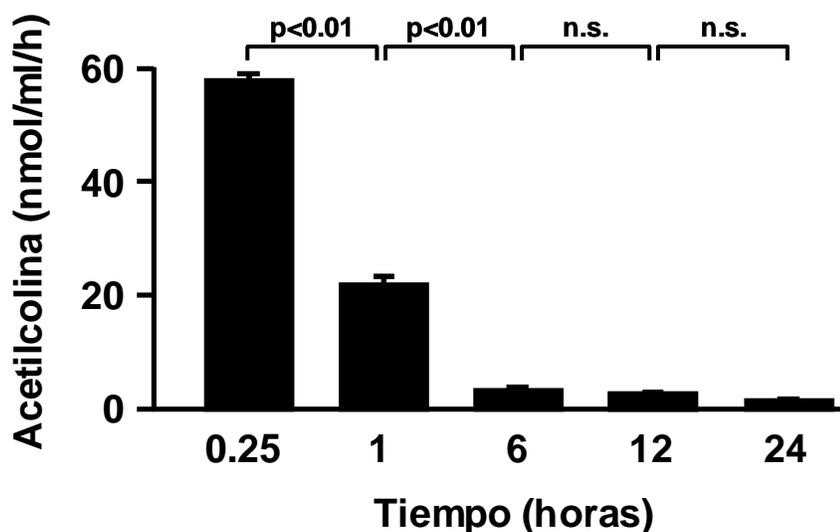


FIGURA 5. Tasa de liberación de acetilcolina en pulmones de conejo preservados a 4°C por diferentes períodos. La concentración se ajustó por volumen y tiempo. Los datos corresponden a promedio \pm error estándar. La significancia estadística entre los grupos se evaluó mediante prueba de Student-Neuman-Keuls, posterior a ANOVA de una vía.

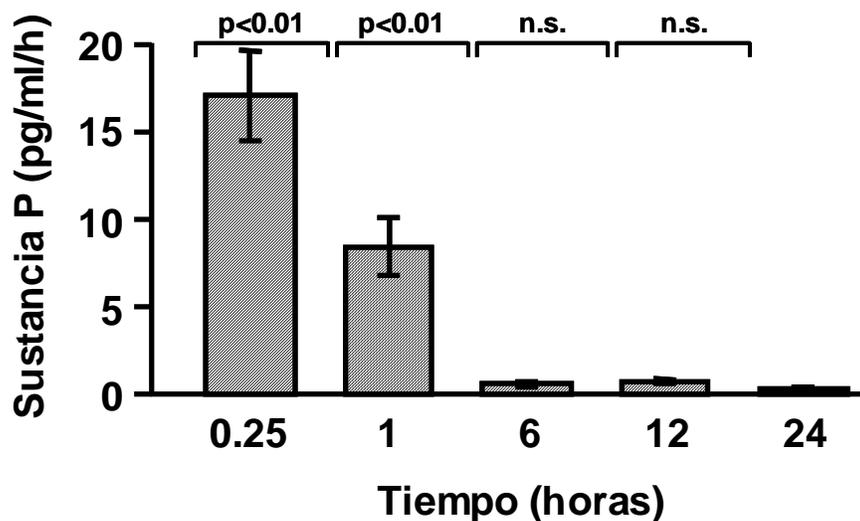


FIGURA 6. Tasa de liberación de sustancia P en pulmones de conejo preservados a 4°C por diferentes períodos. La concentración se ajustó por volumen y tiempo. Los datos corresponden a promedio \pm error estándar. La significancia estadística entre los grupos se evaluó mediante prueba de Student-Neuman-Keuls, posterior a ANOVA de una vía.

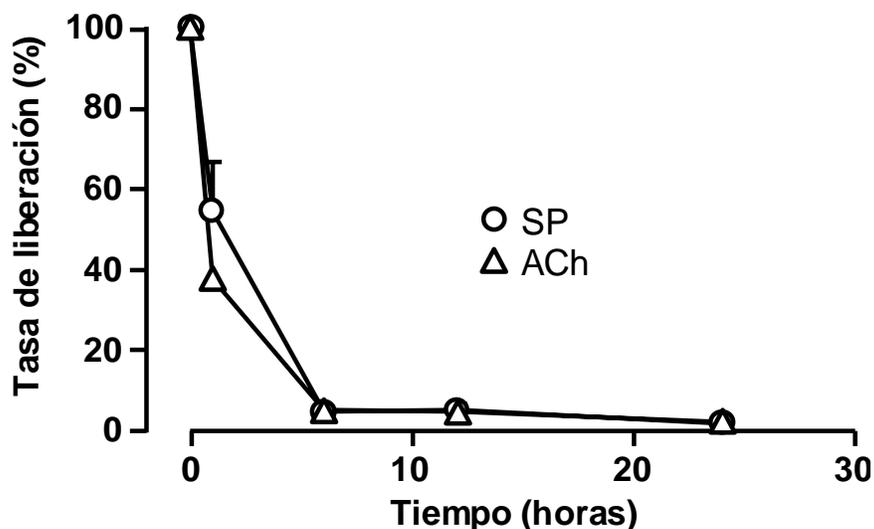


FIGURA 7. Cinética de liberación de acetilcolina y sustancia P. Se ilustran los mismos datos de las dos figuras previas, expresados en porcentaje del valor inicial. Los datos corresponden a promedio \pm error estándar.

Actividad de la NEP, AChE y ACE durante la preservación pulmonar

En la medición basal la actividad enzimática de la AChE fue de 2.58 ± 0.48 IU (mmoles de sustrato hidrolizado/min/g de tejido). Aunque hubo un discreto cambio en el promedio de actividades en los siguientes períodos de tiempo, con tendencia a aumentar a la hora (3.50 ± 1.14), estos cambios no alcanzaron significancia estadística en ninguno de los intervalos de tiempo estudiados (ANOVA de una vía, $n=5$ por intervalo) (**Figura 8**). La actividad enzimática inicial de la NEP fue de 32.57 ± 2.18 densidades ópticas/mg proteína/min y tuvo un ligero incremento a las 6 h de preservación (59.93 ± 10.09). Sin embargo, estos cambios tampoco tuvieron significancia estadística (ANOVA de una vía, $n=5$ por intervalo) (**Figura 9**). Finalmente, la actividad enzimática de la ACE fue de 8.20 ± 1.13 densidades ópticas/mg proteína/min, en el período inicial de la preservación y, aunque tuvo una ligera disminución en la primera hora (6.66 ± 1.46) la tendencia posterior fue al incremento progresivo, aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los intervalos de tiempo (ANOVA de una vía, $n=5$ por intervalo) (**Figura 10**).

Efecto de la preservación pulmonar sobre la permeabilidad capilar

En una serie de experimentos iniciales cuya finalidad fue evaluar el efecto de la preservación sobre la permeabilidad capilar se midió el valor de mKf_c en pulmones recién

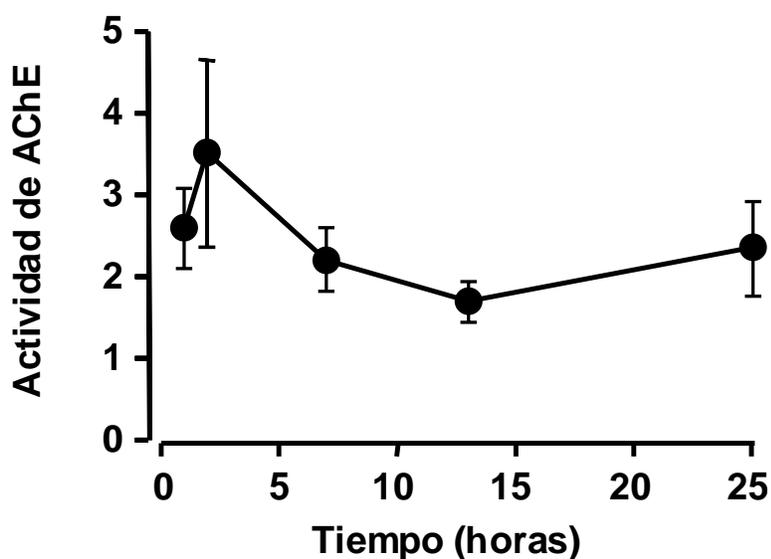


FIGURA 8. Actividad enzimática de la acetilcolinesterasa (AChE) en pulmones de conejo preservados a 4°C por diferentes períodos. La actividad de la AChE se expresa en unidades internacionales, que corresponden a milimoles de sustrato hidrolizado/min/g de tejido. Los datos muestran promedio \pm error estándar. El ANOVA de una vía mostró que los grupos no eran diferentes.

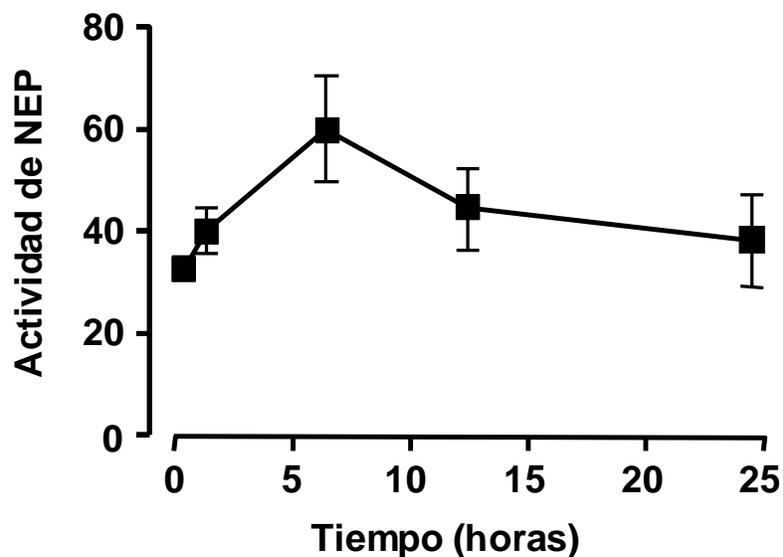


FIGURA 9. Actividad enzimática de la endopeptidasa neutra (NEP) en pulmones de conejo preservados a 4°C por diferentes períodos. La actividad de la NEP se expresa en densidades ópticas/mg de proteína/min. Los datos muestran promedio \pm error estándar. El ANOVA de una vía mostró que los grupos no eran diferentes.

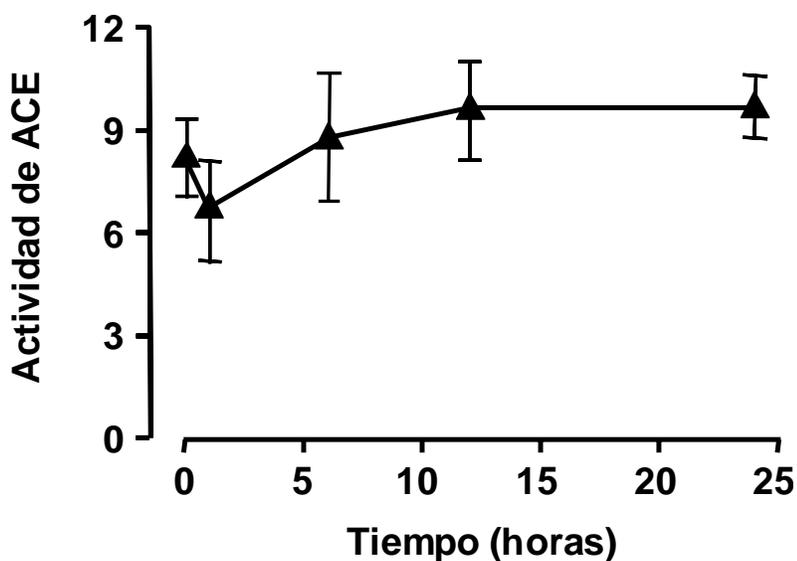


FIGURA 10. Actividad enzimática de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) en pulmones de conejo preservados a 4°C por diferentes períodos. La actividad de la ACE se expresó en densidades ópticas/mg de proteína/min. Los datos muestran promedio \pm error estándar. El ANOVA de una vía mostró que los grupos no eran diferentes.

obtenidos (grupo control) o preservados en solución salina al 0.9%, a 4°C, a diferentes intervalos de tiempo. En comparación con el grupo control, cuyo valor de mKf,c expresado en ml/min/cmH₂O/g tejido fue 2.8 ± 0.8 (n=7), se observó un incremento progresivo conforme más prolongado era el tiempo de preservación. Así, a las 6 h de preservación el mKf,c fue de 7.5 ± 1.4 (n=6), a las 12 h alcanzó 10.8 ± 2.3 (n=6, p=0.05, Dunnett), y después de 24 h aumentó hasta 16.3 ± 2.5 (n=6, p=0.01, Dunnett) (**Figura 11**).

Efecto de la capsaicina, la atropina, el fragmento SP 4-11 y el L-732,138

Reperusión con solución de Krebs. Como se puede observar en la **Figura 12**, el mKf,c, cuyo valor basal en estos experimentos (ml/min/cmH₂O/g tejido) fue de 2.9 ± 0.8 , n=8, aumentó significativamente en el grupo de conejos en los cuales se realizó preservación por 24 horas con solución salina al 0.9% (17.4 ± 2.3 , n=8, p<0.01, Dunnett). Este incremento en la permeabilidad no se modificó por el pretratamiento con capsaicina (19.0 ± 4.9 , n=4, Dunnett), pero fue contrarrestado notablemente por los dos antagonistas de los receptores de sustancia P, tanto el específico (L-732,138, 6.0 ± 1.2 , n=5, p<0.01, Dunnett) como el inespecífico (fragmento 4-11, 6.9 ± 0.9 , p <0.01, Dunnett). Sin embargo, la atropina no pudo evitar el deterioro de la permeabilidad (12.4 ± 1.9 , n=6, Dunnett).

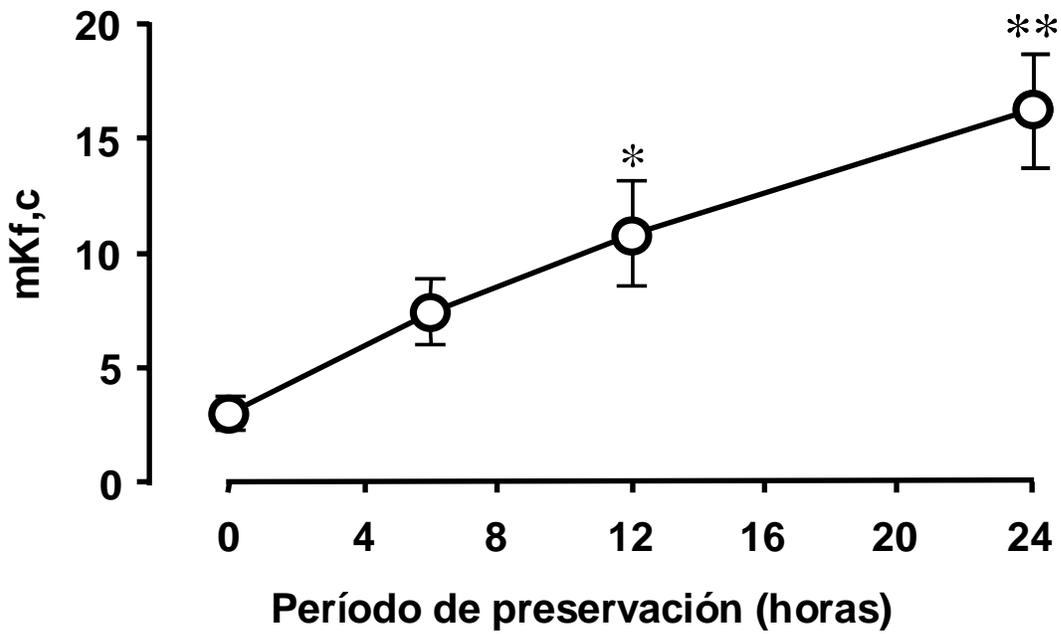


FIGURA 11. Efecto de la preservación pulmonar a 4°C durante 6, 12 y 24 h. En comparación con pulmones de conejo estudiados inmediatamente después de su procuración (tiempo 0). La preservación produjo un incremento progresivo del mKf,c (ml/min/cmH₂O/g tejido). Los datos muestran promedio ± error estándar. *p<0.05, **p<0.01 (prueba de Dunnett, posterior a ANOVA de una vía).

Reperfusión con sangre. Cuando el mKf,c se evaluó empleando sangre autóloga para la reperfusión, se encontró que pulmones controles recién obtenidos tenían un mKf,c de 5.2 ± 0.7 , n=7 (**Figura 13**). Este valor se incrementó significativamente cuando los pulmones se preservaron durante 24 h en solución salina al 0.9% (9.3 ± 1.6 , n=5, p<0.05, Dunnett) y dicho incremento persistió aun cuando durante la preservación se usó el antagonista de los receptores NK1, el L-732,138 (9.9 ± 0.6 , n=6, Dunnett). Adicionalmente, en pulmones estudiados inmediatamente después de su obtención se pudo comprobar que el mKf,c fue mayor si se reperfundían con sangre, en comparación con los pulmones reperfundidos con Krebs, aunque dicha diferencia fue marginalmente significativa (p=0.05, t de Student). Por contraste, los pulmones que fueron preservados sin antagonistas durante 24 h mostraron menor mKf,c cuando fueron reperfundidos con sangre, en comparación con aquellos pulmones que fueron reperfundidos con Krebs (p=0.02, t de Student).

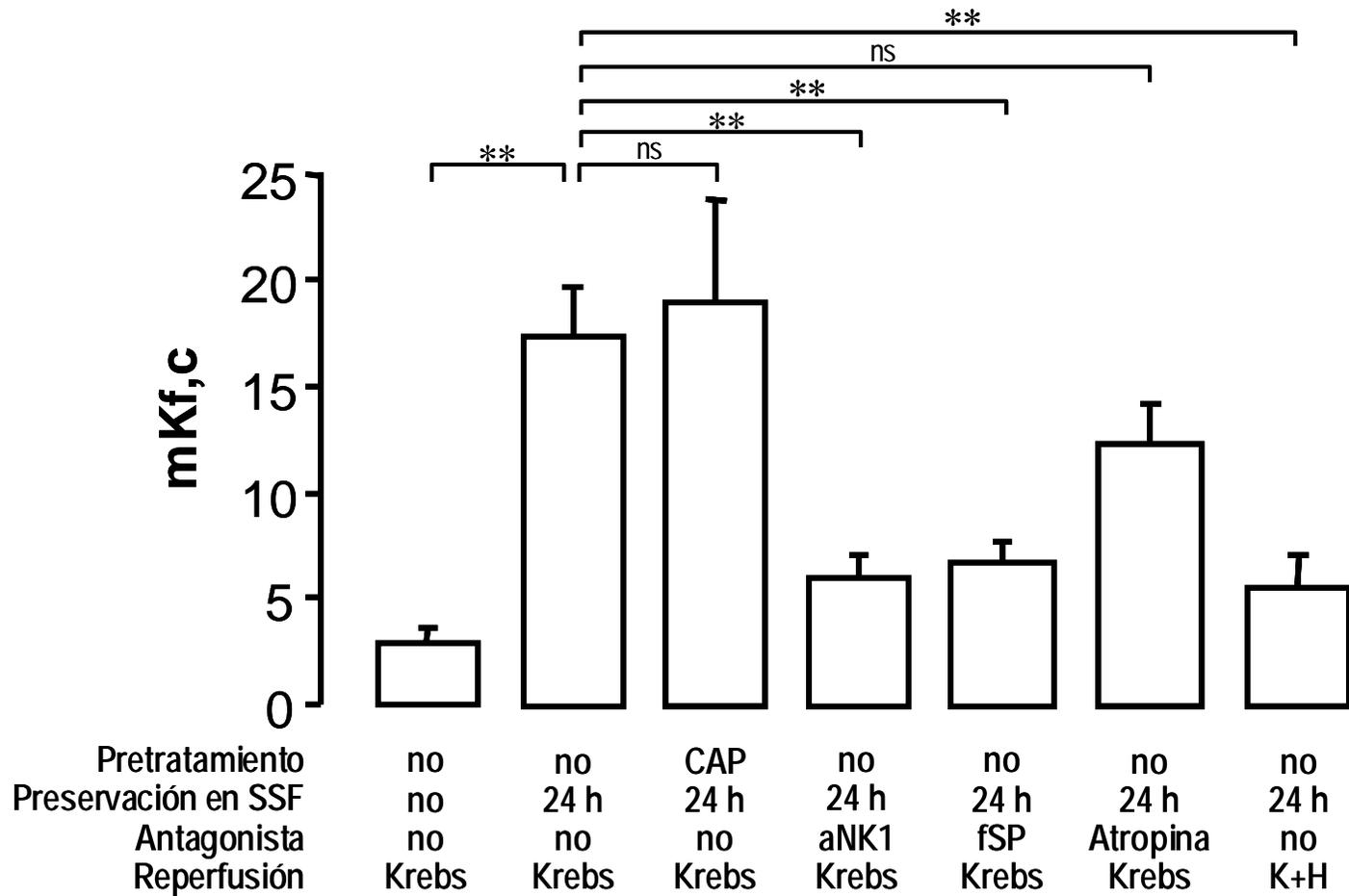


FIGURA 12. Valores de mKf,c de pulmones aislados y perfundidos de conejo en diversas condiciones de preservación y reperfundidos con Krebs o con Krebs + heparina (K+H). Se puede observar el incremento significativo del mKf,c causado por la preservación por 24 h, y las modificaciones producidas por diversos antagonistas. aNK1=L732,138, antagonista específico de los receptores NK1; CAP=capsaicina; fSP=fragmento 4-11 SP, antagonista inespecífico de la sustancia P; ns=no significancia; **p<0.01 (prueba de Dunnett, posterior a ANOVA de una vía).

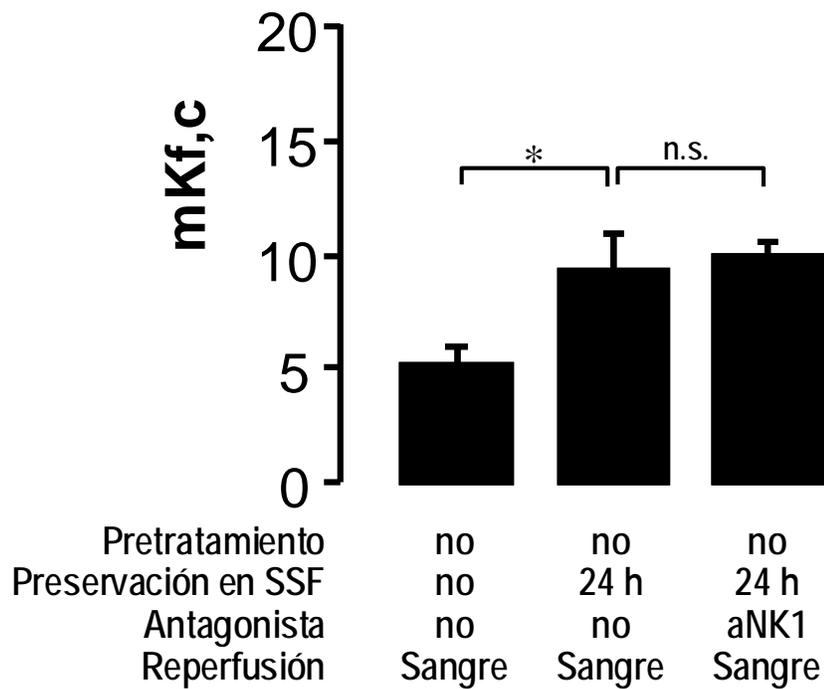


FIGURA 13. Valores de mKf,c de pulmones aislados y perfundidos de conejo en diversas condiciones de preservación y reperfundidos con sangre autóloga. La preservación por 24 h causó un incremento significativo del mKf,c, que no fue modificado por un antagonista de los receptores NK1 (aNK1) el L732,138. ns=no significancia; *p<0.05 (prueba de Dunnett,

Reperusión con solución de Krebs heparinizada. Para nuestra sorpresa, el mKf,c en el grupo de pulmones que se preservaron durante 24 h y se reperfundieron con solución de Krebs heparinizada fue notablemente menor (5.5 ± 1.5 , n=3) que el observado en el grupo de pulmones que también se preservaron durante 24 h pero se reperfundieron sin heparina (17.4 ± 2.3 , n=8, $p<0.01$, Figura 11, Dunnett).

DISCUSIÓN

La sustancia P participa en el deterioro de la permeabilidad vascular

Los resultados del presente estudio muestran que la acetilcolina y la sustancia P se liberan espontáneamente durante la preservación pulmonar. De la literatura se sabe que ambos neurotransmisores aumentan la permeabilidad vascular [144,145] y, por lo tanto, podrían participar en la lesión por isquemia-reperfusión. Sin embargo, nuestros resultados indican que solamente los antagonistas inespecífico y específico de los receptores para la sustancia P fueron capaces de disminuir el deterioro del mKf,c, mientras que la atropina no lo evitó. Esto sugiere que la sustancia P fue la principal causa del aumento en la permeabilidad vascular en los pulmones preservados por 24 horas, y concuerda con dos estudios en donde la sustancia P es el principal mediador de daño pulmonar “a distancia” en modelos animales de quemadura cutánea y de isquemia-reperfusión intestinal [103,146]. El hecho de que la acetilcolina tiene una potencia mucho menor que la sustancia P para modificar la permeabilidad vascular [147], podría explicar que no estuviera interviniendo en los cambios ocurridos durante la preservación, a pesar de tener un patrón de liberación semejante al de la sustancia P. Una explicación adicional sería que el efecto de la acetilcolina sobre la permeabilidad vascular se lleve a cabo principalmente a través de la liberación secundaria de sustancia P. En este contexto, se ha descrito que la fibra C posee receptores nicotínicos cuya estimulación libera sustancia P [148], y estudios farmacológicos con este mismo modelo de pulmón aislado y perfundido también concluyen que parte del efecto de la acetilcolina es a través de la liberación secundaria de sustancia P, histamina y derivados de la ciclooxygenasa [147].

Considerando que la liberación de sustancia P y acetilcolina fue mucho mayor en las primeras horas, y si los hallazgos de nuestro estudio se extrapolaran a una situación clínica, podría surgir la pregunta de ¿por qué los pulmones humanos procurados del donador se conservan viables para el trasplante durante 4-8 horas [20], a pesar de la liberación de estos neurotransmisores? Una explicación hipotética podría ser que la AChE, la NEP y/o la ACE bloquean eficientemente el daño potencial de la acetilcolina y la sustancia P durante las primeras horas de preservación, hasta que los niveles de estas enzimas disminuyen progresivamente por la isquemia. En este contexto,

Carpenter y Stenmark (2001) encontraron que la hipoxia en ratas jóvenes disminuye la expresión de la NEP en el tejido pulmonar, que a su vez se correlacionó con un incremento de la permeabilidad vascular [117]. En este estudio, los autores pusieron a ratas recién destetadas bajo un ambiente hipóxico (fracción inspirada de oxígeno del 10%) durante 72 h. Ellos encontraron que a las 12 h de hipoxia había una disminución significativa de la transcripción del mRNA de la NEP, medida mediante RT-PCR, así como una disminución progresiva de la actividad de la NEP, evaluada por ensayo fluorométrico, que alcanzó significancia estadística a las 24 h. Además, los autores demostraron por inmunohistoquímica que la NEP perivascular disminuía a las 24 h y prácticamente desaparecía a las 48 h. Interesantemente, mientras más disminuía la actividad de la NEP más se incrementaba la permeabilidad vascular (medida por el método de azul de Evans). Este cambio de la permeabilidad fue revertido administrando NEP recombinante o antagonistas de la sustancia P. Por otro lado, Tamaru y col. (2000) encontraron que la hipoxia suprime la actividad de la ACE en cultivos celulares de endotelio pulmonar de perro, especialmente en las células endoteliales provenientes de la microvasculatura (en comparación con el endotelio de arteria pulmonar) [149]. A pesar de lo atractivo de esta hipótesis, nosotros no encontramos una caída franca en la actividad de ninguna de las enzimas estudiadas, por lo que no pudimos confirmar la hipótesis de que la deficiencia progresiva de estas enzimas, conforme avanza el tiempo de preservación permite que ocurra el efecto nocivo de los neurotransmisores.

La reperfusión con sangre anula el efecto protector del antagonista NK1

Los cambios patológicos y funcionales que ocurren en un órgano que ha perdido su irrigación durante algún tiempo y luego la recupera clásicamente se han descrito en dos fases, la de isquemia y la de reperfusión (de ahí su nombre de lesión por isquemia-reperfusión). Como ya se describió en párrafos anteriores, en una primera fase de este estudio se evaluó la posible participación de la sustancia P y la acetilcolina en el daño por isquemia durante la preservación pulmonar durante 24 h, concluyendo que la sustancia P interviene importantemente en el daño capilar. Con el fin de evaluar si este mismo mecanismo sigue manifestándose de igual forma cuando hay sangre, hicimos algunos experimentos en los cuales el pulmón aislado de conejo fue reperfundido con sangre autóloga. Esto tiene la ventaja de que semeja más lo que ocurre en condiciones clínicas, donde después de preservar y trasplantar al pulmón, éste es sometido a reperfusión con sangre. Nuestros resultados muestran que, al igual que ocurrió en los

pulmones reperfundidos con solución de Krebs, los preservados durante 24 h y reperfundidos con sangre tenían un incremento estadísticamente significativo del mKf,c en comparación con pulmones controles estudiados inmediatamente después de su procuración. Sin embargo, en esta serie de experimentos el antagonista de los receptores NK1 fue incapaz de modificar el deterioro del mKf,c.

La explicación para estos resultados es difícil de delinear. Si se equipara con sus correspondientes experimentos donde los pulmones se reperfunden con solución de Krebs, se observa que: 1) El grupo control reperfundido con sangre tiende a tener un mKf,c mayor que el del grupo control reperfundido con Krebs. 2) Por el contrario, después de una preservación por 24 h el aumento de la permeabilidad capilar fue menos intenso en el grupo reperfundido con sangre, en comparación con los pulmones reperfundidos con Krebs. 3) El antagonista de los receptores NK1 no modificó el mKf,c en el grupo reperfundido con sangre, aunque sí evitó completamente el deterioro de la permeabilidad en los pulmones reperfundidos con Krebs. Una posibilidad que explicaría estos cambios es la existencia de un mecanismo dual. Por un lado, la sangre podría estar evitando el deterioro capilar inducido por sustancia P pero, por el otro lado, podría estar generando simultáneamente deterioro de la permeabilidad capilar a través de otras acciones. A continuación se presentan argumentos que podrían sustentar esta posibilidad.

Tal como hemos descrito anteriormente (ver *Antecedentes*, pág. 7), la isquemia es capaz de iniciar mecanismos de daño pulmonar, mismos que son amplificadas durante la reperfusión con sangre. Entre estos últimos destaca la producción de radicales libres, la generación de diversos mediadores químicos proinflamatorios, y el infiltrado por células inflamatorias. Además de lo anterior, la sangre contiene múltiples compuestos biológicamente activos, algunos de los cuales, como la histamina y la serotonina, tienen la capacidad de incrementar la permeabilidad vascular [150]. Así pues, la presencia de estos mecanismos desencadenados por la reperfusión sanguínea debería empeorar la permeabilidad del pulmón preservado, en comparación con la reperfusión con Krebs solo, y el hecho de que los pulmones controles no preservados (es decir, estudiados inmediatamente después de extraídos) muestren un mayor mKf,c si se reperfunden con sangre parece apoyar este hecho. Sin embargo, cuando el pulmón fue preservado por 24 h el deterioro de la permeabilidad cuando se reperfundió con sangre no fue tan evidente como cuando se hizo la reperfusión con Krebs, lo que sugiere la presencia de un mecanismo protector. Uno de los compuestos que podría

estar confiriendo este efecto es la heparina que se adicionó a la sangre con el objetivo de evitar su coagulación. Los experimentos hechos con Krebs adicionado de heparina nos permitieron corroborar que la presencia de esta molécula durante la reperfusión es capaz de evitar de forma muy notable el deterioro del mKf,c generado por la preservación. Estos resultados concuerdan con un estudio de Jones y col. en el que la heparina evitó el daño endotelial causado por leucocitos polimorfonucleares al afectar su función e inactivar sus péptidos policatiónicos [151]. Concuerdan, además, con algunos estudios en modelos animales en donde la heparina disminuyó el edema pulmonar durante el síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS, por sus siglas en inglés) [152,153]. Se ha descrito que, independientemente de su efecto anticoagulante, la heparina tiene un efecto antiinflamatorio al inhibir la producción de NF- κ B [154]. Sin embargo, en nuestro estudio el efecto benéfico de la heparina sobre el deterioro de la permeabilidad vascular inducido por sustancia P podría ser debido más bien a su acción como antagonista del receptor a IP₃ [155], por lo que es capaz de antagonizar directamente el efecto de la sustancia P [156].

En resumen, es probable que durante la reperfusión con sangre la heparina que se usó como anticoagulante esté contrarrestando el deterioro de la permeabilidad capilar inducido por la sustancia P. Sin embargo, la sangre misma genera deterioro de la permeabilidad capilar por mecanismos independientes de la sustancia P.

La capsaicina no previno el deterioro de la permeabilidad vascular

La capsaicina se ha utilizado desde hace muchos años como herramienta farmacológica para depletar las fibras C de sus neurotransmisores y explorar la participación de la sustancia P en diversos fenómenos. A primera vista, en el presente trabajo el nulo efecto de la capsaicina sobre el deterioro de la permeabilidad capilar parece ir en contra de nuestra hipótesis de que neurotransmisores como la sustancia P están involucrados en dicho deterioro. Sin embargo, pudiera haber varias explicaciones para este hallazgo.

En primer lugar, si bien una fuente importante de sustancia P son las fibras C, otras fuentes no neuronales también podrían estar liberando sustancia P durante la preservación. Así, se sabe que muchas células, incluyendo macrófagos, eosinófilos, neutrófilos, linfocitos, células dendríticas, células epiteliales, fibroblastos, e incluso el propio músculo liso, pueden producir y liberar sustancia P [119,125]. De este modo, aunque la capsaicina haya evitado la liberación de neurotransmisores, la sustancia P

producida por las otras fuentes podría ser la causante del deterioro de la permeabilidad vascular.

Una posibilidad alternativa es que no todas las fibras C expresan el receptor para la capsaicina (TRPV1). Esta posibilidad es apoyada por el estudio de Watanabe y col., quienes mediante microscopia confocal encontraron que si bien muchas fibras peptidérgicas (productoras de sustancia P o CGRP) coincidían con el marcaje para TRPV1, algunas otras no tenían este último receptor, por lo que es de suponer que no todas las fibras nerviosas sensoriales son sensibles a capsaicina [157]. La sustancia P liberada de estas últimas fibras podría ser la responsable del deterioro de la permeabilidad durante la preservación pulmonar a pesar del uso de capsaicina.

Por otro lado, se ha demostrado plasticidad neuronal en vías aéreas. En un modelo de hipoxia crónica Matsuda y col. encontraron un incremento notable de la densidad y tamaño de las fibras peptidérgicas en las narices de ratas sometidas a 10% de FiO₂ por 3 meses, comparadas con ratas controles [101]. Más aún, se ha demostrado que fibras aferentes mielínicas (A δ) pueden sufrir plasticidad neuronal y cambiar su fenotipo para convertirse en peptidérgicas, es decir, en productoras de sustancia P y CGRP, ante condiciones como la inflamación alérgica [158]. Si esta neuroplasticidad ocurriera durante la preservación pulmonar, las fibras A δ podrían ser una fuente adicional de SP no afectada por la capsaicina.

Finalmente, una posibilidad adicional para explicar la falta de efecto de la capsaicina es que, simultáneamente con evitar el efecto dañino de la sustancia P, la depleción de las fibras C también elimine algún mecanismo protector. En este sentido, se ha descrito que el CGRP, que se encuentra en las mismas fibras C donde se localiza la sustancia P, desempeña un efecto protector durante el fenómeno conocido como precondicionamiento isquémico. Este fenómeno consiste en aplicar uno o más episodios breves de isquemia antes de una isquemia prolongada, con lo cual se logra disminuir importantemente los efectos nocivos de ésta última. El precondicionamiento isquémico del músculo cardíaco fue descrito por primera vez en 1986 por Murry y col. [159] y posteriormente se constató su existencia en otros órganos como el músculo estriado, el cerebro, el intestino, los riñones y el hígado y los pulmones [160-162]. Algunos estudios han corroborado que para que el precondicionamiento sea eficaz deben activarse fibras sensoriales y liberarse CGRP [163]. Así, la pérdida simultánea de este mecanismos protector contrarrestaría el posible efecto benéfico de depletar la fibra C por la capsaicina.

CONCLUSIONES

La falla primaria del injerto, manifestada por edema pulmonar, sigue siendo una grave complicación que aparece en las primeras horas del trasplante pulmonar. Una técnica que se ha comenzado a usar como modelo para estudiar los efectos de la preservación pulmonar es la preparación de pulmón aislado y perfundido. En el presente trabajo demostramos que al final de un período de preservación de 24 h los pulmones de conejo presentaron un aumento significativo de la permeabilidad vascular, evaluada mediante la medición del mKf,c.

Encontramos que durante la preservación pulmonar la sustancia P y la acetilcolina se liberaron hacia el espacio intravascular, con tasas máximas de liberación en los primeros minutos y disminución exponencial durante las 24 h de estudio. Durante este período de preservación las actividades de las principales enzimas encargadas de su degradación, la NEP y la ACE en el caso de la sustancia P, y la acetilcolinesterasa en el caso de la acetilcolina, no variaron en forma significativa.

El deterioro de la permeabilidad vascular producido durante la preservación pulmonar pudo ser evitado mediante el uso de antagonistas de la sustancia P, tanto inespecíficos (fragmento 4-11 SP) como específicos (L-732,138), lo que sugiere la participación de esta taquicinina en este fenómeno. El efecto nocivo de la sustancia P se observó claramente cuando los pulmones fueron reperfundidos con Krebs, pero no pudo ser evidenciado cuando la reperfusión fue realizada con sangre autóloga heparinizada, probablemente debido al efecto antagónico de la heparina sobre la actividad de la sustancia P.

Finalmente, a diferencia de la sustancia P, la acetilcolina no parece intervenir en los cambios de permeabilidad durante la preservación, ya que la atropina no logró evitar su presentación.

REFERENCIAS

1. Hardy JD, Webb WR, Dalton ML, Jr., Walker GR, Jr. Lung Homotransplantation in Man. *Jama* 1963;186:1065-74.
2. Hardy JD, Eraslan S, Dalton ML, Jr. Autotransplantation and Homotransplantation of the Lung: Further Studies. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1963;46:606-15.
3. Hardy JD. The Transplantation of Organs. *Surgery* 1964;56:685-705.
4. Derom F. Current state of lung transplantation. *Transplant Proc* 1971;3(1):313-7.
5. Reitz BA, Wallwork JL, Hunt SA, Pennock JL, Billingham ME, Oyer PE, et al. Heart-lung transplantation: successful therapy for patients with pulmonary vascular disease. *N Engl J Med* 1982;306(10):557-64.
6. Patterson GA. Indications. Unilateral, bilateral, heart-lung, and lobar transplant procedures. *Clin Chest Med* 1997;18(2):225-30.
7. Kaiser LR, Pasque MK, Trulock EP, Low DE, Dresler CM, Cooper JD. Bilateral sequential lung transplantation: the procedure of choice for double-lung replacement. *Ann Thorac Surg* 1991;52(3):438-45; discussion 445-6.
8. Starnes VA, Barr ML, Cohen RG, Hagen JA, Wells WJ, Horn MV, et al. Living-donor lobar lung transplantation experience: intermediate results. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996;112(5):1284-90; discussion 1290-1.
9. Mal H, Andreassian B, Pamela F, Duchatelle JP, Rondeau E, Dubois F, et al. Unilateral lung transplantation in end-stage pulmonary emphysema. *Am Rev Respir Dis* 1989;140(3):797-802.
10. Hosenpud JD, Novick RJ, Bennett LE, Keck BM, Fiol B, Daily OP. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: thirteenth official report--1996. *J Heart Lung Transplant* 1996;15(7):655-74.
11. Cooper JD. The lung donor: special considerations. *Transplant Proc* 1988;20(5 Suppl 7):17-8.
12. King-Biggs MB. Acute pulmonary allograft rejection. Mechanisms, diagnosis, and management. *Clin Chest Med* 1997;18(2):301-10.
13. Hertz MI, Aurora P, Boucek MM, Christie JD, Dobbels F, Edwards LB, et al. Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: introduction to the 2007 annual reports--100,000 transplants and going strong. *J Heart Lung Transplant* 2007;26(8):763-8.
14. Corris PA. Lung transplantation. *Clin Med* 2007;7(5):448-9.
15. Estenne M, Kotloff RM. Update in transplantation 2005. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173(6):593-8.

16. Chang AC, Chan KM, Lonigro RJ, Lau CL, Lama VN, Flaherty KR, et al. Surgical patient outcomes after the increased use of bilateral lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007;133(2):532-40.
17. Date H. [Current status of living-donor lobar lung transplantation]. *Kyobu Geka* 2008;61(1):55-60.
18. Boucek MM, Aurora P, Edwards LB, Taylor DO, Trulock EP, Christie J, et al. Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: tenth official pediatric heart transplantation report--2007. *J Heart Lung Transplant* 2007;26(8):796-807.
19. de Perrot M, Weder W, Patterson GA, Keshavjee S. Strategies to increase limited donor resources. *Eur Respir J* 2004;23(3):477-82.
20. de Perrot M, Liu M, Waddell TK, Keshavjee S. Ischemia-reperfusion-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167(4):490-511.
21. de Perrot M, Snell GI, Babcock WD, Meyers BF, Patterson G, Hodges TN, et al. Strategies to optimize the use of currently available lung donors. *J Heart Lung Transplant* 2004;23(10):1127-34.
22. Moffatt SD, Demers P, Robbins RC, Doyle R, Wienacker A, Henig N, et al. Lung transplantation: a decade of experience. *J Heart Lung Transplant* 2005;24(2):145-51.
23. Trulock EP, Christie JD, Edwards LB, Boucek MM, Aurora P, Taylor DO, et al. Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-fourth official adult lung and heart-lung transplantation report-2007. *J Heart Lung Transplant* 2007;26(8):782-95.
24. Baile EM, Jasso-Victoria R, Sotres-Vega A, Selman-Lama M, Villalba J, Arreola JL, et al. Tracheobronchial blood flow after a modified canine lung autotransplant: effect of omental wrapping. *Transplant Proc* 1992;24(5):2024-9.
25. Lawrence EC. Lung transplantation for COPD: one lung, two lungs, or none? *Lancet* 2008;371(9614):702-3.
26. Cooper JD, Vreim CE. NHLBI workshop summary. Biology of lung preservation for transplantation. *Am Rev Respir Dis* 1992;146(3):803-7.
27. de Perrot M, Keshavjee S. Lung preservation. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2004;16(4):300-8.
28. Duarte AG, Lick S. Predicting outcome in primary graft failure. *Chest* 2002;121(6):1736-8.
29. Oto T, Griffiths AP, Levvey BJ, Williams TJ, Snell GI. Unilateral radiographic abnormalities after bilateral lung transplantation: exclusion from the definition of primary graft dysfunction? *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006;132(6):1441-6.
30. Christie JD, Kotloff RM, Ahya VN, Tino G, Pochettino A, Gaughan C, et al. The effect of primary graft dysfunction on survival after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171(11):1312-6.

31. de Perrot M, Bonser RS, Dark J, Kelly RF, McGiffin D, Menza R, et al. Report of the ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction part III: donor-related risk factors and markers. *J Heart Lung Transplant* 2005;24(10):1460-7.
32. Christie JD, Bavaria JE, Palevsky HI, Litzky L, Blumenthal NP, Kaiser LR, et al. Primary graft failure following lung transplantation. *Chest* 1998;114(1):51-60.
33. D'Armini AM, Roberts CS, Griffith PK, Lemasters JJ, Egan TM. When does the lung die? I. Histochemical evidence of pulmonary viability after "death". *J Heart Lung Transplant* 1994;13(5):741-7.
34. Song C, Al-Mehdi AB, Fisher AB. An immediate endothelial cell signaling response to lung ischemia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;281(4):L993-1000.
35. Van Raemdonck DE, Jannis NC, De Leyn PR, Flameng WJ, Lerut TE. Warm ischemic tolerance in collapsed pulmonary grafts is limited to 1 hour. *Ann Surg* 1998;228(6):788-96.
36. Sommer SP, Warnecke G, Hohlfeld JM, Gohrbandt B, Niedermeyer J, Kofidis T, et al. Pulmonary preservation with LPD and celsior solution in porcine lung transplantation after 24 h of cold ischemia. *Eur J Cardiothorac Surg* 2004;26(1):151-7.
37. Warnecke G, Struber M, Hohlfeld JM, Niedermeyer J, Sommer SP, Haverich A. Pulmonary preservation with Bretschneider's HTK and Celsior solution in minipigs. *Eur J Cardiothorac Surg* 2002;21(6):1073-9.
38. Ovechkin AV, Lominadze D, Sedoris KC, Robinson TW, Tyagi SC, Roberts AM. Lung ischemia-reperfusion injury: implications of oxidative stress and platelet-arteriolar wall interactions. *Arch Physiol Biochem* 2007;113(1):1-12.
39. Belzer FO, Southard JH. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation* 1988;45(4):673-6.
40. Suzuki S, Sugita M, Noda M, Kondo T, Tsubochi H, Fujimura S. Na⁺/K⁺-ATPase activity in rat lungs preserved with EP4 solution. *Transplant Proc* 1999;31(1-2):193-4.
41. Bund M, Struber M, Heine J, Jaeger K, Wahlers T, Haverich A, et al. Effect of lung allograft ischaemia duration on postreperfusion graft function and postoperative course. *Thorac Cardiovasc Surg* 1998;46(2):93-6.
42. Fisher AB, Dodia C, Ayene I, al-Mehdi A. Ischemia-reperfusion injury to the lung. *Ann N Y Acad Sci* 1994;723:197-207.
43. Hirata T, Fukuse T, Nakamura T, Ueda M, Kawashima M, Hitomi S, et al. Reperfusion lung injury after cold preservation correlates with decreased levels of intrapulmonary high-energy phosphates. *Transplantation* 2000;69(9):1793-801.
44. Macknight AD, Leaf A. Regulation of cellular volume. *Physiol Rev* 1977;57(3):510-73.
45. Chandel NS, Budinger GR, Schumacker PT. Molecular oxygen modulates cytochrome c oxidase function. *J Biol Chem* 1996;271(31):18672-7.

46. Vreugdenhil PK, Ametani MS, Haworth RA, Southard JH. Biphasic mechanism for hypothermic induced loss of protein synthesis in hepatocytes. *Transplantation* 1999;67(11):1468-73.
47. Fehrenbach H, Schepelmann D, Albes JM, Bando T, Fischer F, Fehrenbach A, et al. Pulmonary ischemia/reperfusion injury: a quantitative study of structure and function in isolated heart-lungs of the rat. *Anat Rec* 1999;255(1):84-9.
48. Hicks M, Hing A, Gao L, Ryan J, Macdonald PS. Organ preservation. *Methods Mol Biol* 2006;333:331-74.
49. Fehrenbach A, Wittwer T, Cornelius J, Ochs M, Fehrenbach H, Wahlers T, et al. Improvement of rat lung structure and function after preservation with celsior. *J Surg Res* 1999;82(2):285-93.
50. Fehrenbach A, Ochs M, Warnecke T, Wahlers T, Wittwer T, Schmiedl A, et al. Beneficial effect of lung preservation is related to ultrastructural integrity of tubular myelin after experimental ischemia and reperfusion. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161(6):2058-65.
51. Gnaiger E, Rieger G, Kuznetsov A, Fuchs A, Stadlmann S, Lassnig B, et al. Mitochondrial ischemia-reoxygenation injury and plasma membrane integrity in human endothelial cells. *Transplant Proc* 1997;29(8):3524-6.
52. Levine AJ, Parkes K, Rooney S, Bonser RS. Reduction of endothelial injury after hypothermic lung preservation by initial leukocyte-depleted reperfusion. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000;120(1):47-54.
53. Novick RJ. Innovative techniques to enhance lung preservation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002;123(1):3-5.
54. Fehrenbach H, Wahlers T, Ochs M, Brasch F, Schmiedl A, Hirt SW, et al. Ultrastructural pathology of the alveolar type II pneumocytes of human donor lungs. Electron microscopy, stereology, and microanalysis. *Virchows Arch* 1998;432(3):229-39.
55. Dreyer N, Muhlfield C, Fehrenbach A, Pech T, von Berg S, Nagib R, et al. Exogenous surfactant application in a rat lung ischemia reperfusion injury model: effects on edema formation and alveolar type II cells. *Respir Res* 2008;9:5.
56. Carbognani P, Rusca M, Solli P, Spaggiari L, Alessandrini F, Ferrari C, et al. Pneumocytes type II ultrastructural modifications after storage in preservation solutions for transplantation. *Eur Surg Res* 1997;29(5):319-26.
57. Pickford MA, Manek S, Price AB, Green CJ. The pathology of rat lung isografts following 48 or 72-hour cold storage and subsequent reperfusion in vivo for up to 1 month. *Int J Exp Pathol* 1992;73(5):685-97.
58. Muhlfield C, Muller K, Pallesen LP, Sandhaus T, Madershahian N, Richter J, et al. Impact of preservation solution on the extent of blood-air barrier damage and edema formation in experimental lung transplantation. *Anat Rec (Hoboken)* 2007;290(5):491-500.

59. Fukuse T, Hirata T, Ueda M, Nakamura T, Kawashima M, Hitomi S, et al. Energy metabolism and mitochondrial damage during pulmonary preservation. *Transplant Proc* 1999;31(5):1937-8.
60. Weinbroum AA, Hochhauser E, Rudick V, Kluger Y, Karchevsky E, Graf E, et al. Multiple organ dysfunction after remote circulatory arrest: common pathway of radical oxygen species? *J Trauma* 1999;47(4):691-8.
61. Welbourn CR, Goldman G, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: central role of the neutrophil. *Br J Surg* 1991;78(6):651-5.
62. Fiser SM, Tribble CG, Long SM, Kaza AK, Cope JT, Laubach VE, et al. Lung transplant reperfusion injury involves pulmonary macrophages and circulating leukocytes in a biphasic response. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001;121(6):1069-75.
63. Bochner BS, Luscinskas FW, Gimbrone MA, Jr., Newman W, Sterbinsky SA, Derse-Anthony CP, et al. Adhesion of human basophils, eosinophils, and neutrophils to interleukin 1-activated human vascular endothelial cells: contributions of endothelial cell adhesion molecules. *J Exp Med* 1991;173(6):1553-7.
64. Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev* 2001;53(1):135-59.
65. Lu YT, Hellewell PG, Evans TW. Ischemia-reperfusion lung injury: contribution of ischemia, neutrophils, and hydrostatic pressure. *Am J Physiol* 1997;273(1 Pt 1):L46-54.
66. Cook JA. Eicosanoids. *Crit Care Med* 2005;33(12 Suppl):S488-91.
67. Minamiya Y, Tozawa K, Kitamura M, Saito S, Ogawa J. Platelet-activating factor mediates intercellular adhesion molecule-1-dependent radical production in the nonhypoxic ischemia rat lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;19(1):150-7.
68. Chen D, Assad-Kottner C, Orrego C, Torre-Amione G. Cytokines and acute heart failure. *Crit Care Med* 2008;36(1 Suppl):S9-16.
69. van Griensven M, Stalp M, Seekamp A. Ischemia-reperfusion directly increases pulmonary endothelial permeability in vitro. *Shock* 1999;11(4):259-63.
70. Naka Y, Marsh HC, Scesney SM, Oz MC, Pinsky DJ. Complement activation as a cause for primary graft failure in an isogeneic rat model of hypothermic lung preservation and transplantation. *Transplantation* 1997;64(9):1248-55.
71. Kotloff RM, Ahya VN. Medical complications of lung transplantation. *Eur Respir J* 2004;23(2):334-42.
72. Tan K, Morrissey P. Solid organ transplantation--overview. *Med Health R I* 2007;90(3):72-5.
73. Padilla AM, Padilla JD. [Lung preservation: current practices]. *Arch Bronconeumol* 2004;40(2):86-93.

74. Haverich A, Aziz S, Scott WC, Jamieson SW, Shumway NE. Improved lung preservation using Euro-Collins solution for flush-perfusion. *Thorac Cardiovasc Surg* 1986;34(6):368-76.
75. Novick RJ, Menkis AH, McKenzie FN. New trends in lung preservation: a collective review. *J Heart Lung Transplant* 1992;11(2 Pt 1):377-92.
76. Keshavjee S, Zhang XM, Fischer S, Liu M. Ischemia reperfusion-induced dynamic changes of protein tyrosine phosphorylation during human lung transplantation. *Transplantation* 2000;70(3):525-31.
77. Storey KB. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz J Med Biol Res* 1996;29(12):1715-33.
78. Radovits T, Lin LN, Zotkina J, Koch A, Rauen U, Kohler G, et al. Endothelial dysfunction after long-term cold storage in HTK organ preservation solutions: effects of iron chelators and N-alpha-acetyl-L-histidine. *J Heart Lung Transplant* 2008;27(2):208-16.
79. Pinsky DJ, Naka Y, Chowdhury NC, Liao H, Oz MC, Michler RE, et al. The nitric oxide/cyclic GMP pathway in organ transplantation: critical role in successful lung preservation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(25):12086-90.
80. Pinsky DJ. The vascular biology of heart and lung preservation for transplantation. *Thromb Haemost* 1995;74(1):58-65.
81. Pinsky DJ, Yan SF, Lawson C, Naka Y, Chen JX, Connolly ES, Jr., et al. Hypoxia and modification of the endothelium: implications for regulation of vascular homeostatic properties. *Semin Cell Biol* 1995;6(5):283-94.
82. Scalia R. Evaluation of endothelial function by in vivo microscopy. *Methods Mol Med* 2007;139:225-36.
83. Scalia R, Booth G, Lefler DJ. Vascular endothelial growth factor attenuates leukocyte-endothelium interaction during acute endothelial dysfunction: essential role of endothelium-derived nitric oxide. *Faseb J* 1999;13(9):1039-46.
84. Meldrum DR, Shames BD, Meng X, Fullerton DA, McIntyre RC, Jr., Grover FL, et al. Nitric oxide downregulates lung macrophage inflammatory cytokine production. *Ann Thorac Surg* 1998;66(2):313-7.
85. Bhabra MS, Hopkinson DN, Shaw TE, Hooper TL. Modulation of lung reperfusion injury by nitric oxide: impact of inspired oxygen fraction. *Transplantation* 1999;68(9):1238-43.
86. Stewart BW. Mechanisms of apoptosis: integration of genetic, biochemical, and cellular indicators. *J Natl Cancer Inst* 1994;86(17):1286-96.
87. Eppinger MJ, Ward PA, Jones ML, Bolling SF, Deeb GM. Disparate effects of nitric oxide on lung ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 1995;60(5):1169-75; discussion 1176.
88. Griese M. Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: state of the art. *Eur Respir J* 1999;13(6):1455-76.

89. Santillan-Doherty P, Sotres-Vega A, Jasso-Victoria R, Olmos-Zuniga R, Arreola-Ramirez L, Cedillo-Ley I. Plasma thromboxane B2 concentrations and pulmonary vascular resistance during lung reperfusion. *J Invest Surg* 1997;10(4):165-71.
90. Griese M, Beck J. The interaction of phosphatidylcholine with alveolar type II pneumocytes is dependent on its physical state. *Exp Lung Res* 1999;25(7):577-94.
91. Andrade RS, Wangenstein OD, Jo JK, Tsai MY, Bolman RM, 3rd. Effect of hypothermic pulmonary artery flushing on capillary filtration coefficient. *Transplantation* 2000;70(2):267-71.
92. Erasmus ME, Hofstede GJ, Petersen AH, Batenburg JJ, Haagsman HP, Oetomo SB, et al. SP-A-enriched surfactant for treatment of rat lung transplants with SP-A deficiency after storage and reperfusion. *Transplantation* 2002;73(3):348-52.
93. Novick RJ, MacDonald J, Veldhuizen RA, Wan F, Duplan J, Denning L, et al. Evaluation of surfactant treatment strategies after prolonged graft storage in lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154(1):98-104.
94. Tay SS, Wong WC. The effects of bilateral vagotomy on substance P-like immunoreactive nerves in the cardiac ganglia of the monkey (*Macaca fascicularis*). *J Hirnforsch* 1997;38(1):125-32.
95. Stanley EF, Drachman DB. The effects of nerve section on the non-quantal release of ACh from the motor nerve terminal. *Brain Res* 1986;365(2):289-92.
96. Guyton AC, Hall JE. *Tratado de Fisiologia Medica*. decima edicion ed; 2003.
97. Fukuse T, Hirata T, Nakamura T, Ueda M, Kawashima M, Hitomi S, et al. Role of saccharides on lung preservation. *Transplantation* 1999;68(1):110-7.
98. Fukuse T, Hirata T, Omasa M, Wada H. Effect of adenosine triphosphate-sensitive potassium channel openers on lung preservation. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165(11):1511-5.
99. Maggi CA. Principles of tachykininergic co-transmission in the peripheral and enteric nervous system. *Regul Pept* 2000;93(1-3):53-64.
100. Zee ED, Schomberg S, Carpenter TC. Hypoxia upregulates lung microvascular neurokinin-1 receptor expression. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;291(1):L102-10.
101. Matsuda H, Kusakabe T, Hayashida Y, Furukawa M, Kawakami T, Takenaka T, et al. Substance P- and calcitonin gene-related peptide-containing nerve fibers in the nasal mucosa of chronically hypoxic rats. *Brain Res Bull* 1998;45(6):563-9.
102. Segura P, Chavez J, Montano LM, Vargas MH, Delaunoy A, Carbajal V, et al. Identification of mechanisms involved in the acute airway toxicity induced by parathion. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1999;360(6):699-710.
103. Souza AL, Jr., Poggetti RS, Fontes B, Birolini D. Gut ischemia/reperfusion activates lung macrophages for tumor necrosis factor and hydrogen peroxide production. *J Trauma* 2000;49(2):232-6.

104. Belvisi MG. Overview of the innervation of the lung. *Curr Opin Pharmacol* 2002;2(3):211-5.
105. Belvisi MG. Airway sensory innervation as a target for novel therapies: an outdated concept? *Curr Opin Pharmacol* 2003;3(3):239-43.
106. Belvisi MG, Stretton CD, Verleden GM, Ledingham SJ, Yacoub MH, Barnes PJ. Inhibition of cholinergic neurotransmission in human airways by opioids. *J Appl Physiol* 1992;72(3):1096-100.
107. Barnes PJ, Baraniuk JN, Belvisi MG. Neuropeptides in the respiratory tract. Part II. *Am Rev Respir Dis* 1991;144(6):1391-9.
108. Ward JK, Belvisi MG, Fox AJ, Miura M, Tadjkarimi S, Yacoub MH, et al. Modulation of cholinergic neural bronchoconstriction by endogenous nitric oxide and vasoactive intestinal peptide in human airways in vitro. *J Clin Invest* 1993;92(2):736-42.
109. Ollerenshaw S, Jarvis D, Woolcock A, Sullivan C, Scheibner T. Absence of immunoreactive vasoactive intestinal polypeptide in tissue from the lungs of patients with asthma. *N Engl J Med* 1989;320(19):1244-8.
110. Howarth PH, Springall DR, Redington AE, Djukanovic R, Holgate ST, Polak JM. Neuropeptide-containing nerves in endobronchial biopsies from asthmatic and nonasthmatic subjects. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995;13(3):288-96.
111. Richardson JD, Vasko MR. Cellular mechanisms of neurogenic inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;302(3):839-45.
112. Szallasi A, Cortright DN, Blum CA, Eid SR. The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nat Rev Drug Discov* 2007;6(5):357-72.
113. Cheng JK, Ji RR. Intracellular signaling in primary sensory neurons and persistent pain. *Neurochem Res* 2008;33(10):1970-8.
114. Ferrer-Montiel A, Garcia-Martinez C, Morenilla-Palao C, Garcia-Sanz N, Fernandez-Carvajal A, Fernandez-Ballester G, et al. Molecular architecture of the vanilloid receptor. Insights for drug design. *Eur J Biochem* 2004;271(10):1820-6.
115. Phillis JW. Acetylcholine release from the central nervous system: a 50-year retrospective. *Crit Rev Neurobiol* 2005;17(3-4):161-217.
116. Re L. Modulation of acetylcholine release by presynaptic muscarinic autoreceptors. *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam* 1999;49(4):215-23.
117. Carpenter TC, Stenmark KR. Hypoxia decreases lung neprilysin expression and increases pulmonary vascular leak. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;281(4):L941-8.
118. Delaunois A, Gustin P, Ansay M. Multiple muscarinic receptor subtypes mediating pulmonary oedema in the rabbit. *Pulm Pharmacol* 1994;7(3):185-93.
119. Severini C, Improta G, Falconieri-Erspamer G, Salvadori S, Erspamer V. The tachykinin peptide family. *Pharmacol Rev* 2002;54(2):285-322.

120. Groneberg DA, Harrison S, Dinh QT, Geppetti P, Fischer A. Tachykinins in the respiratory tract. *Curr Drug Targets* 2006;7(8):1005-10.
121. Pennefather JN, Lecci A, Candenas ML, Patak E, Pinto FM, Maggi CA. Tachykinins and tachykinin receptors: a growing family. *Life Sci* 2004;74(12):1445-63.
122. Von Euler US GJ. An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J Physiol* 1931;72:74-87.
123. Chang MM, Leeman SE, Niall HD. Amino-acid sequence of substance P. *Nat New Biol* 1971;232(29):86-7.
124. Tregear GW, Niall HD, Potts JT, Jr., Leeman SE, Chang MM. Synthesis of substance P. *Nat New Biol* 1971;232(29):87-9.
125. Cury PR, Canavez F, de Araujo VC, Furuse C, de Araujo NS. Substance P regulates the expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinase in cultured human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res* 2008;43(3):255-60.
126. Bost KL. Tachykinin-mediated modulation of the immune response. *Front Biosci* 2004;9:3331-2.
127. Delaunois A, Gustin P, Ansay M. Modulation of the acetylcholine- and substance P-induced pulmonary edema by calcitonin gene-related peptide in the rabbit. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;270(1):30-6.
128. Oliveri C, Ocaranza MP, Campos X, Lavandero S, Jalil JE. Angiotensin I-converting enzyme modulates neutral endopeptidase activity in the rat. *Hypertension* 2001;38(3 Pt 2):650-4.
129. Ferguson SS. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* 2001;53(1):1-24.
130. Laporte R, Hui A, Laher I. Pharmacological modulation of sarcoplasmic reticulum function in smooth muscle. *Pharmacol Rev* 2004;56(4):439-513.
131. Bennett VJ, Perrine SA, Simmons MA. A novel mechanism of neurokinin-1 receptor resensitization. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;303(3):1155-62.
132. Cascieri MA, Macleod AM, Underwood D, Shiao LL, Ber E, Sadowski S, et al. Characterization of the interaction of N-acyl-L-tryptophan benzyl ester neurokinin antagonists with the human neurokinin-1 receptor. *J Biol Chem* 1994;269(9):6587-91.
133. Delaunois A, Gustin P, Ansay M. Role of neuropeptides in acetylcholine-induced edema in isolated and perfused rabbit lungs. *J Pharmacol Exp Ther* 1993;266(2):483-91.
134. Delaunois A, Gustin P, Ansay M. Mechanisms of substance P-induced pulmonary oedema in the rabbit: interactions between parasympathetic and excitatory NANC nerves. *Fundam Clin Pharmacol* 1995;9(5):450-7.
135. Colasurdo GN, Loader JE, Graves JP, Larsen GL. SP-induced contraction of airway smooth muscle in normal and allergen-sensitized rabbits: mechanism of action. *J Appl Physiol* 1995;78(2):428-32.

136. Hakim TS, Sugimori K, Ferrario L. Analysis of the double occlusion which provides four pressure gradients. *Eur Respir J* 1996;9(12):2578-83.
137. West J. *Fisiologia Respiratoria*. 7a ed; 2005.
138. Federal ALdD. Ley de proteccion a los animales del Distrito Federal. Mexico D.F.; Gobierno del Distrito Federal; 2002.
139. Arreola JL, Segura P, Vanda B, Vargas MH. Evaluation of the vascular permeability after 12-hour preservation of rabbit lungs in HTK solution. *Transplant Proc* 2002;34(4):1105-7.
140. Uhlig S, Wollin L. An improved setup for the isolated perfused rat lung. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1994;31(2):85-94.
141. Gustin P, Urbain B, Delaunois A, Zeimes K, Ansay M. Permeability of the endothelium and partitioning of the pulmonary blood flow resistance in isolated perfused pig lungs: effects of breed and age. *Vet Res Commun* 1992;16(1):69-82.
142. Delaunois A, Gustin P, Dessy-Doize C, Ansay M. Modulatory effect of neuropeptide Y on acetylcholine-induced oedema and vasoconstriction in isolated perfused lungs of rabbit. *Br J Pharmacol* 1994;113(3):973-81.
143. D'Agostino B, Advenier C, de Palma R, Gallelli L, Marrocco G, Abbate GF, et al. The involvement of sensory neuropeptides in airway hyper-responsiveness in rabbits sensitized and challenged to *Parietaria judaica*. *Clin Exp Allergy* 2002;32(3):472-9.
144. Selig WM, Bendele AM, Fleisch JH. Antigen-induced edema formation, bronchoconstriction, and pulmonary vasospasm in the isolated perfused guinea pig lung. Evidence for a secondary edemagenic response. *Am Rev Respir Dis* 1988;138(3):552-9.
145. Brokaw JJ, Hillenbrand CM, White GW, McDonald DM. Mechanism of tachyphylaxis associated with neurogenic plasma extravasation in the rat trachea. *Am Rev Respir Dis* 1990;141(6):1434-40.
146. Sio SW, Puthia MK, Lu J, Moochhala S, Bhatia M. The neuropeptide substance P is a critical mediator of burn-induced acute lung injury. *J Immunol* 2008;180(12):8333-41.
147. Delaunois A, Gustin P, Garbarg M, Ansay M. Modulation of acetylcholine, capsaicin and substance P effects by histamine H3 receptors in isolated perfused rabbit lungs. *Eur J Pharmacol* 1995;277(2-3):243-50.
148. Taylor-Clark T, Undem BJ. Transduction mechanisms in airway sensory nerves. *J Appl Physiol* 2006;101(3):950-9.
149. Tamaru N, Watanabe K, Yoshida M, Reitz-Vick DM, Townsend L, Glover J. Angiotensin-converting enzyme activity by canine pulmonary microvascular and central pulmonary artery endothelial cells exposed to hypoxia. *Lung* 2000;178(4):249-55.
150. Breil I, Koch T, Belz M, Van Ackern K, Neuhof H. Effects of bradykinin, histamine and serotonin on pulmonary vascular resistance and permeability. *Acta Physiol Scand* 1997;159(3):189-98.

151. Jones H, Paul W, Page CP. The effects of heparin and related molecules on vascular permeability and neutrophil accumulation in rabbit skin. *Br J Pharmacol* 2002;135(2):469-79.
152. Murakami K, McGuire R, Cox RA, Jodoin JM, Bjertnaes LJ, Katahira J, et al. Heparin nebulization attenuates acute lung injury in sepsis following smoke inhalation in sheep. *Shock* 2002;18(3):236-41.
153. Abubakar K, Schmidt B, Monkman S, Webber C, de SD, Roberts R. Heparin improves gas exchange during experimental acute lung injury in newborn piglets. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158(5 Pt 1):1620-5.
154. Hochart H, Jenkins PV, Smith OP, White B. Low-molecular weight and unfractionated heparins induce a downregulation of inflammation: decreased levels of proinflammatory cytokines and nuclear factor-kappaB in LPS-stimulated human monocytes. *Br J Haematol* 2006;133(1):62-7.
155. Nilsson T, Zwiller J, Boynton AL, Berggren PO. Heparin inhibits IP3-induced Ca²⁺ release in permeabilized pancreatic beta-cells. *FEBS Lett* 1988;229(1):211-4.
156. Tanabe T, Otani H, Zeng XT, Mishima K, Ogawa R, Inagaki C. Inhibitory effects of calcitonin gene-related peptide on substance-P-induced superoxide production in human neutrophils. *Eur J Pharmacol* 1996;314(1-2):175-83.
157. Watanabe N, Horie S, Michael GJ, Keir S, Spina D, Page CP, et al. Immunohistochemical co-localization of transient receptor potential vanilloid (TRPV)1 and sensory neuropeptides in the guinea-pig respiratory system. *Neuroscience* 2006;141(3):1533-43.
158. Udem BJ, McAlexander M, Hunter DD. Neurobiology of the upper and lower airways. *Allergy* 1999;54 Suppl 57:81-93.
159. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986;74(5):1124-36.
160. Featherstone RL, Chambers DJ. Long-term hypothermic lung preservation: does adenosine A1 receptor antagonism have a role in ischemic preconditioning protection? *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2004;3(1):182-7.
161. Featherstone RL, Chambers DJ, Kelly FJ. Ischemic preconditioning enhances recovery of isolated rat lungs after hypothermic preservation. *Ann Thorac Surg* 2000;69(1):237-42.
162. Pasupathy S, Homer-Vanniasinkam S. Surgical implications of ischemic preconditioning. *Arch Surg* 2005;140(4):405-9; discussion 410.
163. Li YJ, Song QJ, Xiao J. Calcitonin gene-related peptide: an endogenous mediator of preconditioning. *Acta Pharmacol Sin* 2000;21(10):865-9.

Possible Role of Substance P in the Ischemia-Reperfusion Injury in the Isolated Rabbit Lung

José L. Arreola,¹ Mario H. Vargas,^{1,2,4} Patricia Segura,¹ Jaime Chávez,¹ Bettina Sommer,¹ Verónica Carvajal,¹ and Luis M. Montaña³

The origin of the endothelial damage leading to the ischemia-reperfusion injury after lung transplantation has not been elucidated. We postulated that neurotransmitters released during the preservation of the donor lung might explain this vascular derangement. Thus, in isolated rabbit lungs preserved over 24 hours, we evaluated the release of acetylcholine (ACh) and substance P (SP), the activity of their major degrading enzymes, acetylcholinesterase (AChE) and neutral endopeptidase (NEP), and changes in the capillary permeability. Both neurotransmitters showed the highest release rate in the first 15 minutes, followed by a sharp exponential decrement at 1, 6, 12 and 24 hours. AChE and NEP activities showed no variation at these time intervals. Basal capillary permeability significantly increased ($P < 0.01$) after 24 hours preservation with saline. This increased permeability was avoided ($P < 0.01$) by the SP fragment 4–11 (an SP receptors antagonist), but not by atropine. These results suggest for the first time a pathogenic role of SP in the ischemia-reperfusion injury, and thus the potential usefulness of SP antagonists as additives in the lung preservation solutions should be explored.

Key Words: Ischemia-reperfusion, Primary graft failure, Lung transplantation, Lung preservation, Lung procurement.

(*Transplantation* 2004;78: 296–299)

Approximately 15–35% of lung transplant recipients develop a potentially lethal condition termed ischemia-reperfusion injury, also known as primary graft failure (1). This condition is manifested by noncardiogenic pulmonary edema appearing in the first days (usually the first 72 hours) after the surgery. Although ischemia-reperfusion injury is linked to endothelial damage, the specific cause of such damage is still controversial. Taking into account the extreme sensitivity of neural tissue to hypoxia, in the present work we postulated that neurotransmitters released by nerve endings might explain the vascular derangement occurring in the ischemia-reperfusion injury. Thus, our aim was to evaluate whether acetylcholine (ACh) and substance P (SP), two neurotransmitters known to be able to enhance vascular permeability (2, 3), could be released during the experimental lung preservation, and if antagonists of their respective receptors could avoid the increment of the vascular permeability after lung storage.

The rate of spontaneous release of ACh and SP was determined at different time periods in rabbit lungs preserved for up to 24 hours at 4°C in saline. For this purpose, sampling

of intravascular fluid was done by fully exchanging the intravascular saline at 15 minutes and 1, 6, 12 and 24 hours. Measurements of the concentration of ACh (n=6) and SP (n=5) in the samples were done by high-pressure liquid chromatography (HPLC) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), respectively. Following the same protocol, enzymatic activities of acetylcholinesterase (AChE, n=5) and neutral endopeptidase (NEP, n=5), the main enzyme responsible for SP degradation, were measured in the homogenates of rabbit lung lobes.

In the second part of the study, the lungs were exsanguinated with cold (4°C) saline, and then a preservation solution was left in the intravascular compartment, either saline alone (n=6), saline with 10^{-6} M atropine (n=6), or saline with 10^{-5} mg/ml SP-fragment 4–11, an antagonist of SP receptors (4) (n=6). These lungs were preserved for 24 hours at 4°C. An additional group studied immediately after lung washing was also used (n=5). Vascular permeability was evaluated by measuring a modified capillary filtration coefficient (mKf, c) using the isolated perfused lung setup (5). The research protocol was approved by our institutional Scientific and Bioethics Committees.

Male New Zealand white rabbits (2.5–3.5 kg) were anesthetized and ventilated with a small-animal respirator (Harvard Apparatus, Edenbridge, UK). The chest was opened and 2000 IU/kg heparin was injected into the right ventricle before exsanguination. The heart-lungs block was rapidly removed from the chest, both ventricles were opened, and two glass cannulas were secured into the pulmonary artery and the left atrium, respectively.

After perfusing the heart-lungs block with cold saline until exsanguination, cannulas were clamped and the block submerged into saline and stored at 4°C. Intravascular liquid was completely exchanged with saline at 15 minutes and at 1, 6, 12 and 24 hours. In a previous work, we found that in these storage conditions, increased vascular permeability can be demonstrated in rabbit lungs after 12 hours of preservation

Part of this work was presented in the poster sessions at the 2003 Congress of the American Thoracic Society, held in Seattle, Washington, May 17–21, 2003, and subsequently published as an abstract in the *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2003; 167: A363.

¹ Department of Asthma Research, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Mexico City, Mexico.

² Clinical Epidemiology Research Unit, Pediatric Hospital, Instituto Mexicano del Seguro Social, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Mexico City, Mexico.

³ Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico.

⁴ Address correspondence to: Mario H. Vargas, M.D., Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Tlalpan 4502, CP 14080, Mexico DF, Mexico. E-mail: mhvargas@yahoo.com.mx.

Received 16 June 2003. Revision requested 19 August 2003. Accepted 17 February 2004.

Copyright © 2004 by Lippincott Williams & Wilkins

ISSN 0041-1337/04/7802-296

DOI: 10.1097/01.TP.0000128192.84765.72

(5). Saline contained either 10^{-6} M physostigmine (to inhibit acetylcholinesterase), or 150 KIU/ml aprotinin (to inhibit proteases activity, as recommended by the manufacturer of the ELISA kit for SP detection). All intravascular fluid samples were stored at -70°C until their analysis.

ACh and choline concentrations in the physostigmine-containing samples were measured as described by Potter et al. (6) using a commercial kit for cation-exchange HPLC-electrochemical detection (Bioanalytical Systems, West Lafayette, IN). The detection limit of our HPLC system was ~ 1 nM in a $10\ \mu\text{l}$ sample. ACh production in the samples was expressed as the sum of ACh plus choline detected by the HPLC system.

For the SP measurement, a 5 ml sample of the aprotinin-containing fluid was mixed with 5 ml trifluoroacetic acid (1%, TFA), shaken and centrifuged at 14,000 g for 15 minutes at 4°C . Supernatant was applied to a chromatography column of Bio-Gel P-2 Gel Fine, 45–90 μm mesh (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), which was then washed with 20 ml TFA. Sample was eluted by applying 3 ml of 60:40 solution of acetonitrile:TFA, collected in plastic tubes, evaporated until dry, and reconstituted with 100 μl of buffer protein base with preservatives (R80206, R&D Systems, Minneapolis, MN). SP concentration was measured in these samples through a competitive ELISA (DE1400, R&D Systems) and read at 405 nm (Multiskan MS V4.0, Labsystems, Helsinki, Finland). The final SP concentration was expressed as pg/ml. Detection limit of the SP assay was less than 8 pg/ml.

AChE activity was determined using a colorimetric method. Briefly, the lung tissue was homogenized in phosphate buffer, centrifuged for 15 minutes at 3000 g, and the supernatant was filtered (22 μm PTFE filter). 300 ml of supernatant was added to a cuvette containing 2.5 ml of 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB, 0.32 mM) and 300 μl phosphate buffer (64 mM). The background absorbance per minute was measured at 405 nm at 25°C with a photometer (DU 640, Beckman). Afterwards, 100 μl of AChE substrate (42 mM acetylthiocholine) was added to the cuvette, and the change in absorbance per minute was measured. Once the background absorbance was subtracted, the AChE activity was calculated as International Units (IU, or millimoles of substrate hydrolyzed per minute per gram of tissue).

NEP activity was measured with a fluorometric assay for the generation of free dansyl-D-Ala-Gly (DAG) from N-dansyl-Ala-Gly-D-nitro-Phe-Gly (DAGNPG), a substrate for NEP. Lung tissue was homogenized, centrifuged at 3000 g for 15 minutes at 4°C , and the supernatant was used for the assay. Substrate solutions consisting of 1 mM DAGNPG and 10 μM enalapril (to inhibit angiotensin converting enzyme) in 50 mM TrisHCl with and without the addition of 10 μM phosphoramidon (to inhibit NEP) were prepared. The substrate solutions were preincubated at 37°C for 10 minutes. 50 μl of the sample were then incubated at 37°C for 10 minutes with 100 μl of each substrate solution. The reaction was stopped by boiling for 10 minutes at 90°C . The samples were then diluted 1:10 with 50 mM TrisHCl and spun for 5 minutes in a microfuge at 9000 g. The fluorescence of the supernatants was measured in a fluorescence spectrophotometer (Fluoroskan Ascent FL, Foster City, CA) at an excitation wavelength of 355 nm and an emission wavelength of 538 nm. NEP activity was calculated as the difference in fluorescence between samples

incubated with and without phosphoramidon and is expressed as optic densities/mg protein/min. The protein concentration of the samples was determined with a Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) and measured against bovine serum albumin standards.

Pulmonary vascular permeability was assessed through the measurement of the mKf,c, as described elsewhere (5). Briefly, the lungs were mechanically ventilated and perfused with Krebs-Ringer-bicarbonate (with 2.5% bovine albumin, pH 7.4–7.5, 37 – 38°C) through a recirculating system that includes a bubble trap and heat exchanger. Arterial and venous pressures were measured by transducers connected to side ports of the pulmonary artery and left atrium cannulas, respectively. A sudden increment of the venous pressure by 10 cmH_2O was made through a partial occlusion of the venous outflow and maintained during 3 minutes. This maneuver caused lung weight gain, initially due to vascular congestion and subsequently to fluid filtering across the capillary bed. Capillary pressure was measured before and during the venous obstruction by using the double occlusion technique (7). mKf,c was expressed as $\text{ml}/\text{min}/\text{cmH}_2\text{O}/\text{g}$ tissue, representing milliliters of fluid crossing the capillary bed (i.e., the lung weight gain, per min of venous obstruction, per capillary pressure increment, and per g of lung tissue).

Differences among time intervals in ACh and SP concentration and in AChE and NEP activities, as well as differences in the mKf,c among groups, were evaluated through one way ANOVA, followed by Student-Newman-Keuls test. Statistical significance was set at two-tailed $P < 0.05$. Data in the text and figures correspond to mean \pm SEM.

Release rates of ACh and SP are shown in Figure 1A and 1B, respectively. Both neurotransmitters showed the highest release rate during the first 15 minutes of preservation ($57.9 \pm 1.2\ \mu\text{M}/\text{h}$ and $17.0 \pm 2.6\ \text{pg}/\text{ml}/\text{h}$, respectively), with a sharp exponential decrease in the following periods, so less than 6% of the basal rate was found after 6 hours of preservation (Fig. 1C).

The baseline control mKf,c ($3.3 \pm 1.3\ \text{ml}/\text{min}/\text{cmH}_2\text{O}/\text{g}$ tissue) significantly increased after 24 hours of preservation with saline (16.2 ± 2.5 , $P < 0.01$, Figure 2). This increased permeability was avoided by the SP receptors antagonist (6.9 ± 0.9 , $P < 0.01$), but not by atropine (12.4 ± 1.9).

AChE and NEP activities did not change throughout the lung preservation period (Fig. 3), though a tendency to increase at 1 and 6 hours, respectively, could be observed.

Our results showed that ACh and SP are spontaneously released during lung preservation. These neurotransmitters are known to cause increment of the vascular permeability (2, 3), and thus hypothetically they might participate in the ischemia-reperfusion injury. Nevertheless, we found that SP fragment 4–11 was the only drug able to significantly inhibit the deterioration of the mKf,c, while atropine could not prevent it; this means SP, but not ACh, largely accounted for the increased vascular permeability observed after 24 hours of preservation. The notably lower potency of ACh to cause an increment of vascular permeability in the lungs, in comparison with SP, might partially explain our data (8). If these results were to be extrapolated to the clinical setting, why do human donor lungs remain suitable for transplantation during 4–8 hours (9) in spite of the release of these neurotransmitters? One possible explanation for this question is that AChE and

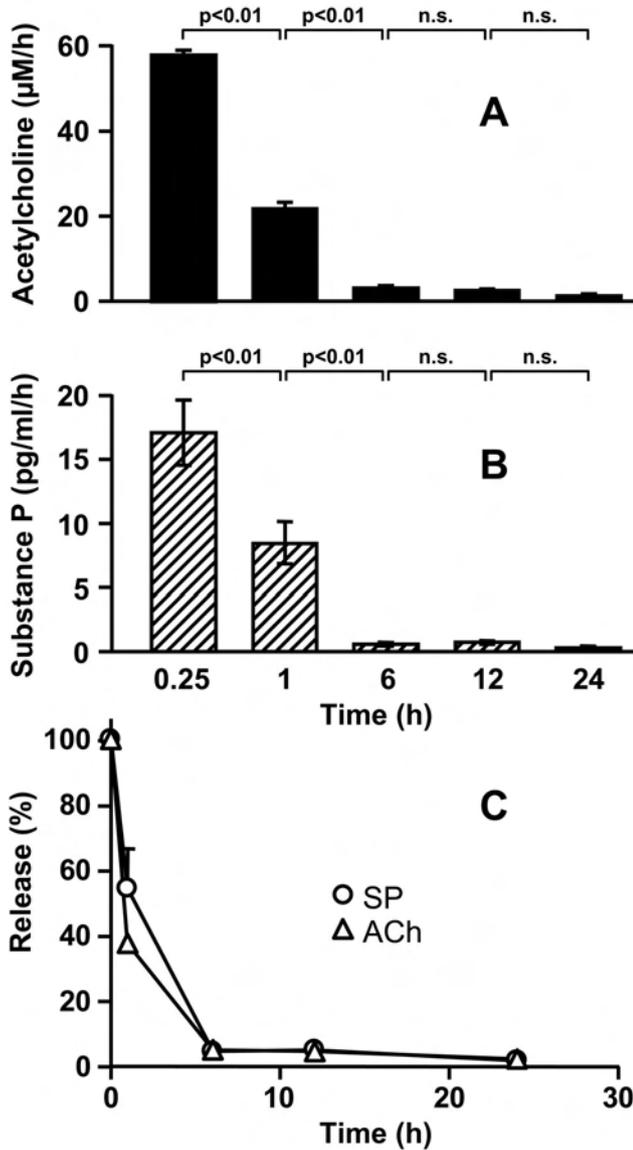


FIGURE 1. Release rates in rabbit lungs preserved for 24 hours at 4°C. The amount of (A) acetylcholine (ACh, n=6) and (B) substance P (SP, n=5) accumulated in the intravascular fluid samples, adjusted by volume and time. (C) The release rates of both neurotransmitters, expressed as percentage of the initial value. The time intervals indicate the moment in which full exchange of intravascular fluid was performed; vertical lines represent SEM.

NEP might be effectively blunting the potential damage of ACh and SP, at least during the first hours, until the tissue levels of these enzymes progressively decrease during the lung preservation. Carpenter and Stenmark recently described such a NEP decrement in rats submitted to a hypoxic ambient (10). Nevertheless, in our experimental conditions, we did not find a decrease of AChE or NEP activities, and thus this possibility remains uncertain.

Our results were obtained using saline for lung preservation, and thus it is not clear if they will similarly apply for more complex preservation solutions. Moreover, endogenous factors (cytokines, other neuropeptides, prostaglandins,

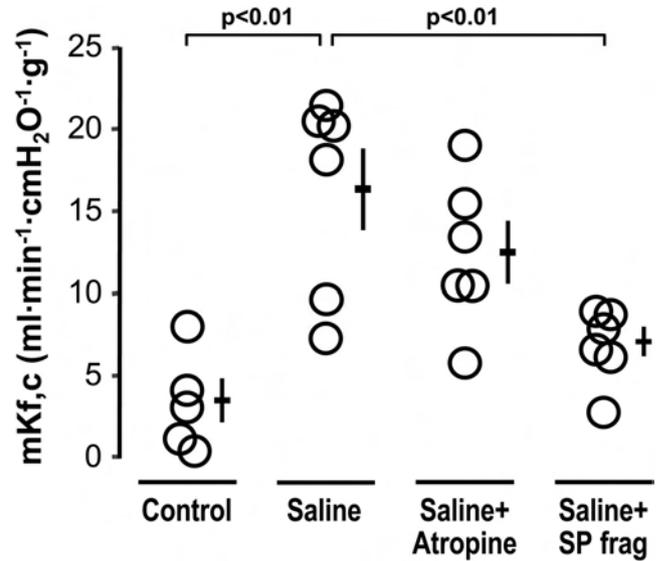


FIGURE 2. Effect of atropine and SP fragment 4-11 (SP frag) on the capillary permeability in rabbit lungs preserved during 24 hours at 4°C. Each circle represents the modified capillary filtration coefficient (mKf,c) measured in a single experiment. Average and SEM are indicated at the right of each group.

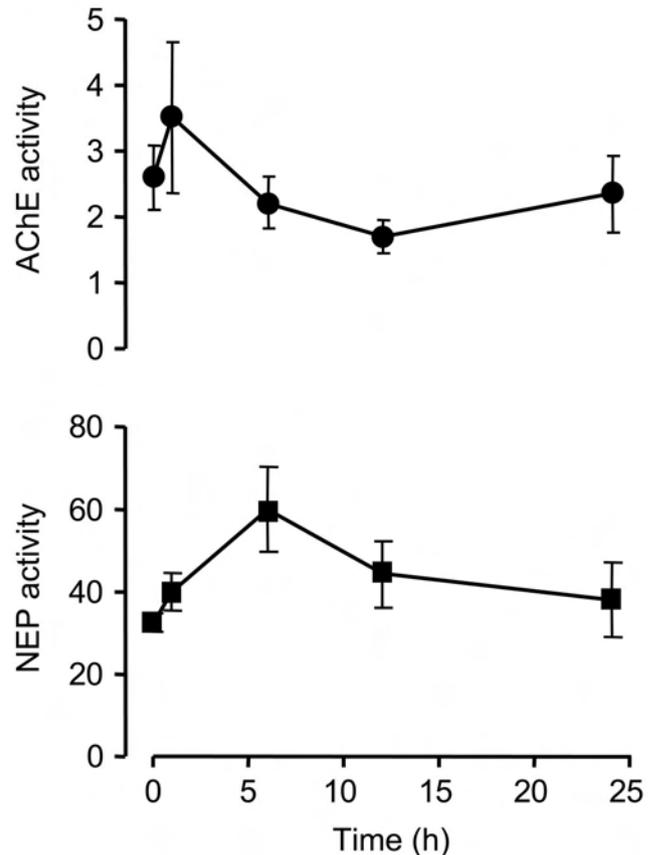


FIGURE 3. Enzymatic activities of acetylcholinesterase (AChE, millimoles of substrate hydrolyzed/min/g tissue) and neutral endopeptidase (NEP, optic densities/mg protein/min) in rabbit lungs preserved for up to 24 hours.

etc.) that might potentially modulate the effects of SP on vascular permeability should be explored in further studies.

We conclude that ACh and SP are released during lung preservation, and that the blockade of SP receptors avoids the increased vascular permeability occurring after 24 hours of lung preservation, suggesting that such blockers might be potentially useful as additives in lung preservation solutions.

REFERENCES

1. Hertz MI, Taylor DO, Trulock EP, et al. The registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: nineteenth official report-2002. *J Heart Lung Transplant* 2002; 21: 950–970.
2. Selig WM, Bendele AM, Fleisch JH. Antigen-induced edema formation, bronchoconstriction, and pulmonary vasospasm in the isolated perfused guinea pig lung. *Am Rev Respir Dis* 1988; 138: 552–559.
3. Brokaw JJ, Hillenbrand CM, White GW, et al. Mechanism of tachyphylaxis associated with neurogenic plasma extravasation in the rat trachea. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141: 1434–1440.
4. Mizrahi J, Escher E, D'Orleans-Juste P, et al. Undeca- and octa-peptide antagonists for SP, a study on the guinea pig trachea. *Eur J Pharmacol* 1984; 99: 193–202.
5. Arreola JL, Segura P, Vanda B, et al. Evaluation of the vascular permeability after 12-hour preservation of rabbit lungs in HTK solution. *Transplant Proc* 2002; 34: 1105–1107.
6. Potter PE, Meek JL, Neff NH. Acetylcholine and choline in neuronal tissue measured by HPLC with electrochemical detection. *J Neurochem* 1983; 41: 188–194.
7. Gustin P, Urbain B, Delaunois A, et al. Permeability of the endothelium and partitioning of the pulmonary blood flow resistance in isolated perfused pig lungs: effects of breed and age. *Vet Res Commun* 1992; 16: 69–82.
8. Delaunois A, Gustin P, Ansay M. Mechanisms of substance P-induced pulmonary oedema in the rabbit: interactions between parasympathetic and excitatory NANC nerves. *Fundam Clin Pharmacol* 1995; 9: 450–457.
9. De Perrot M, Liu M, Waddell TK, et al. Ischemia-reperfusion-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 490–511.
10. Carpenter T, Stenmark KR. Hypoxia decreases lung neprilysin expression and increases pulmonary vascular leak. *Am J Physiol* 2001; 281: L941–L948.