



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**PARTICIPACIÓN DE LA SEROTONINA EN LOS  
CAMBIOS DE PERMEABILIDAD VASCULAR EN LA  
PRESERVACIÓN PULMONAR EN CONEJO**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIOLOGO**

**P R E S E N T A :**

**JESUS ALQUICIRA MIRELES**



**DIRECTOR DE TESIS:  
Dr. JOSE LUIS ARREOLA RAMIREZ  
2013**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

1. Datos del alumno

Alquicira

Mireles

Jesús

56551403

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

303238502

2. Datos del tutor

Dr.

José Luis

Arreola

Ramírez

3. Datos del sinodal 1

Dra.

María Luisa

Fanjul

Peña

4. Datos del sinodal 2

Dra.

Blanca Margarita

Bazán

Perkins

5. Datos del sinodal 3

Dra.

Patricia

Segura

Medina

6. Datos del sinodal 4

M en C

Enrique

Moreno

Sáenz

7. Datos del trabajo escrito

Participación de la serotonina en los cambios de permeabilidad vascular en la preservación pulmonar en conejo.

33 p

2013





Esta tesis fue realizada en el Departamento de Hiperactividad  
Bronquial del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias  
“ISMAEL COSIO VILLEGAS”



La tesis estuvo registrada en el Programa de Becas de Inicio a la Investigación  
(PROBEI) que otorga La Comisión Coordinadora de Institutos Nacionales de Salud  
y Hospitales de Alta Especialidad (CCINSHAE)



## Agradecimientos

---

Principalmente les agradezco a mis padre Vicente Alquicira y María Briseida Mireles por el apoyo incondicional que me han dado a lo largo de todos estos años ya sea económico y/o emocionalmente. A mi hermana Eréndira Alquicira ya que algunas ocasiones me ayudo en trabajos.

También a cada una de las personas que conforman el departamento de Hiperactividad Bronquial del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias al Dr. José Luis Arreola Ramírez por darme la oportunidad de realizar mi tesis así como la amistad que me ha brindado, a la Dra. Patricia Segura por el apoyo y ánimo que me han impulsado a continuar, a los doctores Jaime Chávez, Bettina Sommer y Verónica E. Carbajal ya que sin sus recomendaciones, tips y técnicas no habría crecido en relación de cómo trabajar en un laboratorio para obtener buenos resultados, a la Dra. Blanca Bazán por los consejos y el tiempo que me dedico, además no podría faltar Toñita por esas pláticas tan agradables junto con su rico café. Finalmente a mis compañeros Pablo y Julio por todas esas horas de duro trabajo que compartimos.



# Índice

---

|  |    |
|--|----|
| <b>Abreviaturas</b> .....                                | 1  |
| <b>Resumen</b> .....                                     | 2  |
| <b>1. Introducción</b> .....                             | 3  |
| • Antecedentes históricos.....                           | 3  |
| • Preservación pulmonar.....                             | 4  |
| • Falla primaria del injerto.....                        | 6  |
| • Serotonina (5-HT).....                                 | 11 |
| <b>2. Justificación</b> .....                            | 14 |
| <b>3. Hipótesis</b> .....                                | 14 |
| <b>4. Objetivos</b> .....                                | 15 |
| <b>5. Material y Métodos</b> .....                       | 15 |
| • Animales de estudio.....                               | 15 |
| • Obtención y preparación del bloque cardiopulmonar..... | 15 |
| • Lavado y Preservación pulmonar.....                    | 17 |
| • Pulmón aislado y perfundido.....                       | 17 |
| • Permeabilidad vascular.....                            | 19 |
| • Determinación de Mediadores Bioquímicos.....           | 20 |
| • Determinación de 5-HT.....                             | 21 |
| • Determinación de Monoamino oxidasa (MAO).....          | 23 |
| <b>6. Análisis estadístico</b> .....                     | 24 |
| <b>7. Resultados</b> .....                               | 24 |
| <b>8. Discusión</b> .....                                | 27 |
| <b>9. Conclusión</b> .....                               | 29 |
| <b>10. Referencias</b> .....                             | 30 |

## Abreviaturas

---

|                        |  |
|------------------------|--|
| <b>5-HT</b>            | Serotonina   |
| <b>5-HTP</b>           | 5-hidroxitriptófano  |
| <b>AFE</b>             | Almacenamiento de Frío Estático  |
| <b>ELISA</b>           | Inmunoensayo enzimático  |
| <b>ERO</b>             | Especies Reactivas del Oxígeno   |
| <b>FiO<sub>2</sub></b> | Valor de oxígeno inspirado   |
| <b>FPI</b>             | Falla Primaria del Injerto   |
| <b>HO-</b>             | Radicales Hidroxilo  |
| <b>I/R</b>             | isquemia-reperfusión   |
| <b>INER</b>            | Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias                               |
| <b>ISHLT</b>           | Sociedad Internacional de Corazón y Pulmón                                     |
| <b>K<sub>fc</sub></b>  | Coefficiente de filtración capilar   |
| <b>MAO</b>             | Monoamino oxidasa  |
| <b>MPH</b>             | Máquina de Perfusión Hipotérmica   |
| <b>NC-IUPHAR</b>       | Comité de Nomenclatura de Receptores de la Unión Internacional de Farmacología |
| <b>OME</b>             | Oxigenación por Membrana Extracorpórea   |
| <b>ON</b>              | Oxido Nítrico  |
| <b>ONOO-</b>           | Peroxinitrilos   |
| <b>Pa</b>              | Presión arterial   |
| <b>PaO<sub>2</sub></b> | Presión alveolar de oxígeno  |
| <b>P<sub>c</sub></b>   | Presión capilar  |
| <b>P<sub>e</sub></b>   | Presión de la espiración   |
| <b>P<sub>v</sub></b>   | Presión venosa   |
| <b>PNECs/NEBs</b>      | Células neuroendocrinas pulmonares/cuerpos neuroepiteliales                    |
| <b>RLO</b>             | Radicales Libres de Oxígeno  |
| <b>SNC</b>             | Sistema Nervioso Central   |
| <b>SSF</b>             | Solución Salina Fisiológica  |

## Resumen

---

El trasplante pulmonar se ha constituido como una opción terapéutica efectiva para pacientes con enfermedad pulmonar irreversible. Sin embargo el éxito del trasplante continúa siendo afectado principalmente por la falla primaria del injerto caracterizada por daño en la membrana alveolo capilar con la consecuente generación de edema, estableciéndose como la principal causa de mortalidad posoperatorio. En el presente estudio postulamos que ante la lesión de células nerviosas por la hipoxia y otras fuentes no neuronales se da la liberación de serotonina (5-HT) (5-hidroxitriptamina) la cual podría tener un efecto sobre la permeabilidad vascular, para ello se extrajo el bloque cardiopulmonar de 24 conejos divididos en 4 grupos: Control, SSF 24h, SSF + Metiotepina  $1 \times 10^{-6}$  M y SSF + SB204741  $1 \times 10^{-6}$  M. El coeficiente de filtración capilar (K<sub>fc</sub>) y el peso pulmonar se midieron inmediatamente en el grupo control para evaluar permeabilidad vascular y ganancia de peso a expensas de edema; el resto se preservó en SSF a 4°C por 24h previo a su análisis. Los resultados indican que durante la preservación pulmonar se encuentra presente 5-HT y esta es lo suficientemente necesaria para provocar daño al tejido y producir edema; sin embargo, al utilizar antagonistas para los receptores de 5-HT se puede aminorar el daño e inclusive tener mediciones de K<sub>fc</sub> muy cercanas a las obtenidas en nuestro grupo control. Podemos concluir que 5-HT juega un papel importante durante la isquemia/reperfusión (I/R) al favorecer la lesión endotelial provocando cambios en la permeabilidad vascular pero con el uso de antagonistas de 5-HT (Metiotepina y SB 204741) se puede atenuar significativamente el daño pulmonar, lo que guiaría a implementar estrategias de intervención farmacológica para prolongar la viabilidad del órgano con fines de trasplante.



# Introducción

---

## ***Antecedentes Históricos***

Los trasplantes han sido uno de los avances más significativos en medicina a partir de la segunda mitad del siglo XX y continúan siendo en muchos casos el único tratamiento efectivo en la insuficiencia orgánica terminal. A principios de los 60's, ya existía una base de conocimientos por parte de fisiólogos y anatomistas acerca de los requisitos para mantener viables los órganos y su funcionamiento fuera del cuerpo. El desarrollo de bombas de perfusión, permitió el uso de circuitos artificiales para estudiar la fisiología orgánica, facilitándose este tipo de estudios en mayor medida por la sustitución de la sangre por perfundidos sintéticos, soluciones de electrolitos, solutos y vitaminas, así como el uso de temperaturas bajas para alterar el metabolismo, convirtiéndose en una poderosa herramienta.

El trasplante de órganos ha avanzado experimentalmente desde hace 50 años hasta establecerse como el tratamiento de elección para pacientes con enfermedad terminal del órgano involucrado, con tasas de supervivencia del paciente e injerto superiores al 90% anual, por lo que la última década ha sido marcada por un aumento significativo en el número de trasplantes, receptores en lista de espera y centros de ejecución, pero ante la escasez de órganos disponibles para el procedimiento, hay una extrema necesidad de mejorar el uso de los mismos por lo tanto un paso crucial en el proceso de trasplante radica en su preservación, descrita como "la línea de suministro para el trasplante de órganos" [1], cuyo objetivo principal es mantener el tejido y la función orgánica durante el almacenamiento (24 h o menos) de modo que el injerto funcione en la reperfusión. En la actualidad hay dos enfoques en la conservación de la mayoría de órganos transplantables: estática o dinámica. El almacenamiento de frío estático (AFE) es el método estático principal, mientras que la máquina de perfusión hipotérmica (MPH) y otros métodos de perfusión como la máquina de perfusión normotérmica y persuflación de oxígeno corresponden a la conservación dinámica [2].

### ***Preservación pulmonar***

Desde 1983, el trasplante de pulmón ha disfrutado de un éxito cada vez mayor y se ha convertido en el apoyo principal para la mayoría de las patologías pulmonares en etapa terminal, sin embargo el pulmón es un órgano que históricamente ha presentado un reto importante, debido a su alta sensibilidad ante la lesión hipóxica [2].

En 1986, Haverich y col. encontraron que el lavado pulmonar con un volumen y velocidad de flujo de perfundido altos, resultaba en una mejor refrigeración y funcionamiento después de la reperfusión [3]. No obstante, los problemas significativos de edema y daño por isquemia- reperfusión (I/R) seguían presentes, lo que incentivó a continuar el refinamiento de la preservación, reconociendo a la perfusión continua como un método complejo debido a la pregunta asociada sobre el mantenimiento de la ventilación mecánica junto con la perfusión vascular. De igual forma, existen propuestas para utilizar la perfusión continua caliente en la evaluación de la función pulmonar después del AFE; sin embargo, estos métodos no han alcanzado una extensa aplicación en la clínica ya que favorecen la infección pulmonar, sepsis y falla multiorgánica eventual en el paciente trasplantado [4].

En la actualidad ciertos problemas durante el trasplante pulmonar relacionados con la técnica quirúrgica e inmunosupresión han sido superados, a pesar de ello la supervivencia a largo plazo apenas se ha modificado. En el proceso del trasplante es necesaria la utilización de un injerto previamente sometido a un periodo isquémico determinado, dicha preservación tiene un doble objetivo: minimizar el efecto de la isquemia con el fin de mantener su integridad morfológica y bioquímica para así optimizar su funcionamiento una vez implantado, y por otro lado, que esta integridad se mantenga el mayor tiempo posible [4].

El mecanismo de lesión pulmonar por isquemia-reperfusión es extremadamente complejo y aún no se ha dilucidado en su totalidad, por tal motivo existe una gran cantidad de trabajos de experimentación dedicados a mejorar el conocimiento

sobre dicho mecanismo, así como la preservación pulmonar y respuesta al injerto. La mayoría de los grupos enfocados en trasplante pulmonar utilizan el lavado del lecho vascular con distintas soluciones a través de la arteria pulmonar, las cuales tienen como objetivo minimizar los efectos de la isquemia y el impacto que ésta tiene sobre la posterior reperfusión del injerto, por lo que para contrarrestar el edema celular, la composición iónica de la solución es fundamental [5].

Las soluciones intracelulares como la Euro-Collins modificada o la de Universidad de Wisconsin son ricas en  $K^+$  para evitar que el  $Na^+$  penetre en la célula; sin embargo uno de los problemas que plantean estas soluciones es que su elevado contenido en potasio favorece la vasoconstricción del lecho pulmonar y la posibilidad de paro cardíaco debido a hipercalemia tras la perfusión. Por otro lado la utilización de soluciones cristaloides con una presión oncótica baja puede favorecer el paso de agua desde el espacio intravascular al intersticial, provocando la generación de edema el cual puede comprometer la red capilar y dificultar una perfusión homogénea durante la preservación, lo que contribuiría a la aparición de lesiones por I/R [6].

De igual forma, en la práctica clínica algunas soluciones de preservación incluyen en su composición inhibidores de xantina oxidasa debido a que las lesiones de reperfusión se inician con una serie de acontecimientos bioquímicos durante la fase isquémica caracterizados por un aumento de la hipoxantina tisular, la encargada de convertir la xantina oxidasa es la enzima xantina deshidrogenasa, que en presencia del oxígeno aportado por la reperfusión forma radicales libres de oxígeno (RLO). Además el estrés oxidativo, en particular el producido por los radicales Hidroxilo ( $HO\cdot$ ) y los Peroxinitrilos ( $ONOO\cdot$ ) es el responsable de la oxidación de los grupos sulfhidrilo, lo que provoca peroxidación de los lípidos de membrana y determina importantes lesiones celulares, sobre todo en el endotelio vascular pulmonar. Dicha peroxidación lipídica genera potentes mediadores como las fosfolipasas, en concreto la fosfolipasa  $A_2$ , la cual facilita la movilización del ácido araquidónico y su metabolización posterior generando tromboxanos y leucotrienos, mediadores proinflamatorios e importantes vasoconstrictores y

broncoconstrictores, por lo cual los inhibidores de la fosfolipasa A<sub>2</sub> también se han estudiado en el campo experimental [4].

### ***Falla Primaria del Injerto (FPI)***

Ante el reconocimiento de las limitaciones terapéuticas frente al progreso de la patología pulmonar, el trasplante representa una opción viable a la cual recurrir; sin embargo no está libre de complicaciones siendo la falla primaria del injerto (FPI) una de ellas, caracterizada por ser una forma de lesión pulmonar aguda desarrollada generalmente durante el postoperatorio inmediato, estableciéndose como la principal causa de la mortalidad precoz a pesar de las refinadas técnicas quirúrgicas y preservación empleadas, lo que ha llevado a realizar consensos y estudios que intenten identificar factores de riesgo y la fisiopatología subyacente para desarrollar posibles opciones terapéuticas [7].

En el año 2005 la Sociedad Internacional de Corazón y Pulmón (ISHLT por sus siglas en inglés) informó de un consenso para la estandarización de los criterios de FPI precisando su definición basada en el receptor de presión alveolar de oxígeno ( $PaO_2$ ) /fracción del valor de oxígeno inspirado ( $FiO_2$ ) y los resultados de la radiografía de tórax, donde se acordó considerar a la falla primaria del injerto como la presencia de edema pulmonar no cardiogénico en las primeras 72 horas de la perfusión debido a una alteración del propio parénquima pulmonar. Dicha patología es de gravedad variable (*Tabla 1*), llegándose a presentar un estado severo en el 15% al 35% de los pacientes y según datos de la ISHLT tiene relación con un 30% del éxito en el postoperatorio inmediato.

**Tabla 1. Clasificación de la falla primaria del injerto de la ISHLT. Presión alveolar de oxígeno (PaO<sub>2</sub>)/fracción del valor de oxígeno inspirado (FiO<sub>2</sub>) [8].**

| <b>Grado</b> | <b>PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub></b> | <b>Infiltrados radiográficos compatibles con Edema Pulmonar</b> |
|--------------|--|---|
| 0            | >300                                   | <b>Ausente</b>  |
| 1            | >300                                   | <b>Presente</b>   |
| 2            | 200–300                                | <b>Presente</b>   |
| 3            | <200                                   | <b>Presente</b>   |

El curso clínico de la FPI grave se caracteriza por hipoxemia progresiva en asociación con la disminución de la distensibilidad pulmonar, el cual puede ocurrir inmediatamente tras la reperfusión del injerto o en días posteriores. En la mayoría de los casos, la mejoría clínica se puede lograr con la terapia de apoyo, aunque en algunos pacientes con FPI la capacidad para mantener la ventilación y oxigenación continuará deteriorándose. Si no se trata adecuadamente y con prontitud, esta hipoxemia persistente puede progresar a la inestabilidad hemodinámica y disfunción multiorgánica. Ante tal situación, la oxigenación por membrana extracorpórea (OME) ha sido considerada como un sistema útil para proporcionar apoyo cardiorrespiratorio en pacientes con disfunción pulmonar grave postrasplante y se ha utilizado en el 2% a 9% de los pacientes sometidos a este procedimiento [9].

La isquemia-reperfusión es un factor determinante en la FPI pero algunos datos sugieren que la prolongación del periodo isquémico, el uso prolongado de bypass cardiopulmonar, la transfusión masiva de sangre, muerte encefálica, preservación del injerto o la implantación del mismo y posterior reperfusión pueden exacerbarla o provocarla. Varios estudios han intentado demostrar el efecto del tipo de trasplante en el desenlace obtenido, incluyendo la FPI (*Figura 1*). Los resultados aplicados tanto en los trasplantes pulmonares simples como bilaterales no son concluyentes debido a que en estos estudios fueron empleadas diferentes definiciones, variables de resultado y/o enfermedades subyacentes [10].

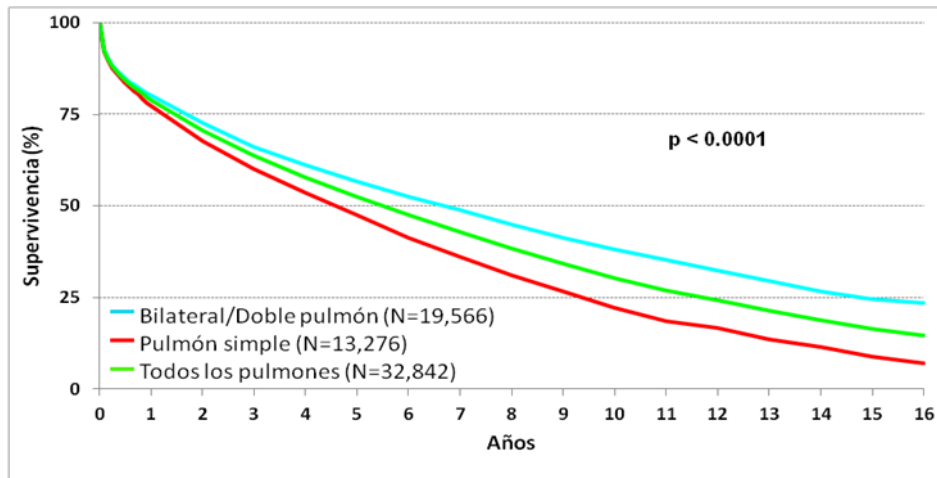


Figura 1. Supervivencia global de pacientes con FPI de acuerdo al tipo de trasplante [11].

En relación a la FPI, si bien se han hecho progresos para comprender mejor las consecuencias del procedimiento de trasplante de pulmón y su relación con la manifestación clínica de esta patología (muerte cerebral del donante, isquemia pulmonar, preservación en frío de órganos, reperfusión), todavía queda mucho trabajo por hacer. Está claro que el estrés generado por las especies reactivas del oxígeno (ERO) durante el proceso de I/R es una importante fuerza motriz para la FPI. Además de la lesión directa por las ERO en el endotelio y epitelio pulmonar, se inician cascadas inflamatorias y aumentan los factores procoagulantes que contribuyen a la lesión pulmonar [12].

Las investigaciones anteriores se han centrado en la mejora de las técnicas de preservación pulmonar para prevenir el daño por isquemia-perfusión y FPI. Tales técnicas incluyen factores como el volumen, temperatura, presión, componentes de las soluciones de preservación, la inflación y los parámetros de ventilación de los órganos durante el transporte. Estos protocolos no son universales y varían entre las instituciones, lo que hace difícil su comparación [13].

Han existido sólo unos pocos ensayos controlados aleatorizados que examinan la prevención de la FPI durante el trasplante de pulmón, con un impacto modesto en los parámetros clínicos [8]. Dentro de estos trabajos se han tomado diferentes características específicas para el donador como: sexo, edad, altura, peso, tipo de procedimiento, días con apoyo ventilatorio, estado de citomegalovirus, mecanismo

de la muerte, gasometría arterial, antecedentes de tabaquismo, tiempos de isquemia, broncoscopia, y los resultados de la tinción de Gram. Mientras que para los beneficiarios son: algunas variables sociodemográficas, tipo de trasplante, altura, peso, diagnóstico, citomegalovirus, función pulmonar, comorbilidades, estado preoperatorio, la monitorización hemodinámica intraoperatoria, la necesidad de circulación extracorpórea durante el trasplante y la solución de preservación utilizada.

En estos ensayos se encontró que el trasplante pulmonar de donadores mayores a 50 años parece estar asociado con riesgos muy altos de FPI grado 3. De hecho, la relación entre las probabilidades de desarrollo de este grado y la edad de los donadores muestra una tendencia lineal desde la edad de 35 años, una tendencia muy similar a la encontrada en los análisis de otra serie de datos del registro en la ISHLT. Los resultados más favorables parecen estar asociados con donadores entre 20 y 30 años de edad (*Figura 2*). Además el desarrollo de la FPI grave está asociado con una alta mortalidad operatoria y una pobre supervivencia a largo plazo, donde uno de los factores de riesgo adicionales del grado 3 durante las primeras 48 horas después del trasplante es el aumento de la presión arterial pulmonar preoperatoria. Por lo cual, la identificación de pacientes en riesgo, la gestión selectiva a través de estrategias de ventilación para reducir la presión de las vías respiratorias, el bloqueo para limitar la perfusión, el empleo de agentes farmacológicos para reducir la lesión por isquemia-reperfusión o la oxigenación por membrana extracorpórea, podría mejorar los resultados de los pacientes sometidos a trasplante de pulmón [14].

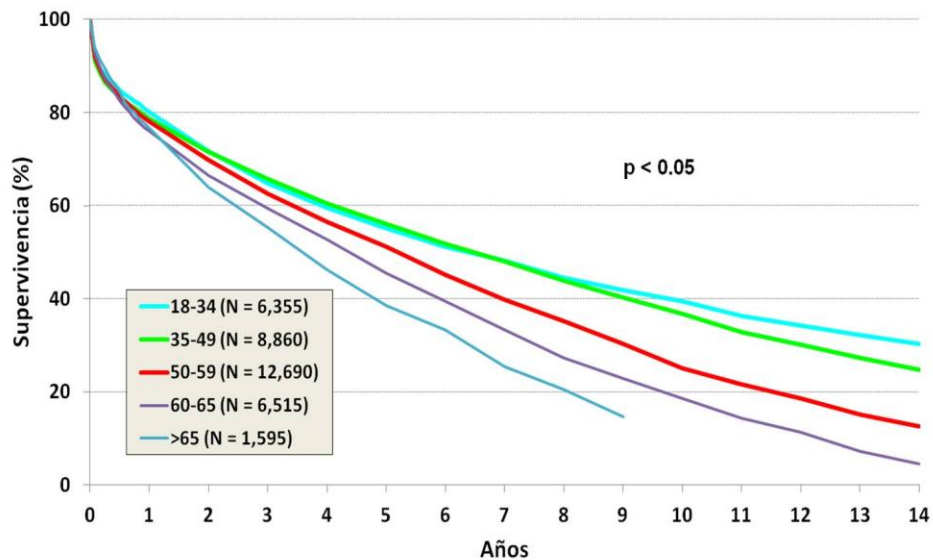


Figura 2. Relación de la edad del donante con la supervivencia del paciente en el trasplante pulmonar [11].

El mecanismo de lesión pulmonar debido a la isquemia-reperfusión es el resultado de la interacción entre diferentes procesos como los mencionados anteriormente, y a pesar de que se han realizado diferentes investigaciones al respecto, se ha dejado de lado el efecto que pudieran tener los neurotransmisores en dicha lesión. El sistema nervioso autónomo controla muchos aspectos de la funciones de las vías respiratorias, incluyendo la regulación de tono del músculo liso, la secreción de moco por parte de las glándulas submucosas y células epiteliales superficiales caliciformes, la permeabilidad vascular y el flujo sanguíneo. Los datos recientes sugieren que el mejoramiento de la actividad neuronal puede jugar un papel clave en la sintomatología y la fisiopatología de las enfermedades inflamatorias de las vías respiratorias [15]. De esta forma, al ser las células nerviosas las más susceptibles ante la baja en la concentración de oxígeno, es necesario estudiar lo que sucede durante la preservación pulmonar, en relación a los cambios que pudieran ocasionar algunos neurotransmisores.

En el Departamento de Investigación en Hiperreactividad Bronquial del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) se ha iniciado una línea de investigación al respecto, comenzado a estudiar la participación de acetil-colina y sustancia P como inductores de cambios en la permeabilidad vascular en el modelo de preservación pulmonar, la literatura reporta que 5-HT juega un papel



importante en muchas patologías, como la hiperreactividad bronquial, asma y la hipertensión arterial pulmonar, lo cual nos da pauta para investigar este neurotransmisor en la preservación pulmonar.

### ***Serotonina (5-HT)***

La serotonina es una molécula con diversos efectos a nivel del sistema nervioso central (SNC), así como en la periferia. Actúa como una hormona y un neurotransmisor ubicuo en el reino animal, 5-HT también conocida como 5-hidroxitriptamina, se aisló y caracterizó en 1948 por Maurice Rapport e Irvine Page. El aislamiento de 5-HT se produjo después de décadas de investigación para caracterizar una sustancia vasoconstrictora que se sospechaba figuraba en las plaquetas. En 1937, el científico italiano Vittorio Erspamer [16] aisló una sustancia extraída de las células enterocromafines del tracto gastrointestinal, responsable de causar la contracción del músculo liso a la cual denominó “enteramina”. Fue hasta 1952 que se demostró que tanto la enteramina como la 5-HT eran lo mismo. Tras el descubrimiento original de 5-HT, muchos laboratorios llevaron a cabo estudios paralelos para localizar e investigar la función de 5-HT. Rápidamente se identificó que está presente en diversos tejidos incluyendo el cerebro, pulmón, riñón, plaquetas, y el tracto gastrointestinal y que es una monoamina biogénica, similar a la adrenalina, noradrenalina, dopamina y la histamina [17].

La síntesis de 5-HT se lleva a cabo en un proceso de doble paso a partir del aminoácido esencial triptófano, el cual por medio de la Triptofano-hidroxilasa se cataliza su conversión en 5-hidroxitriptófano (5-HTP). En un segundo paso el 5-HTP se descarboxila para formar finalmente la 5-hidroxitriptamina (*Figura 3*). Los primeros estudios farmacológicos demuestran que la hidroxilación y descarboxilación ocurren casi instantáneamente en presencia de triptófano.

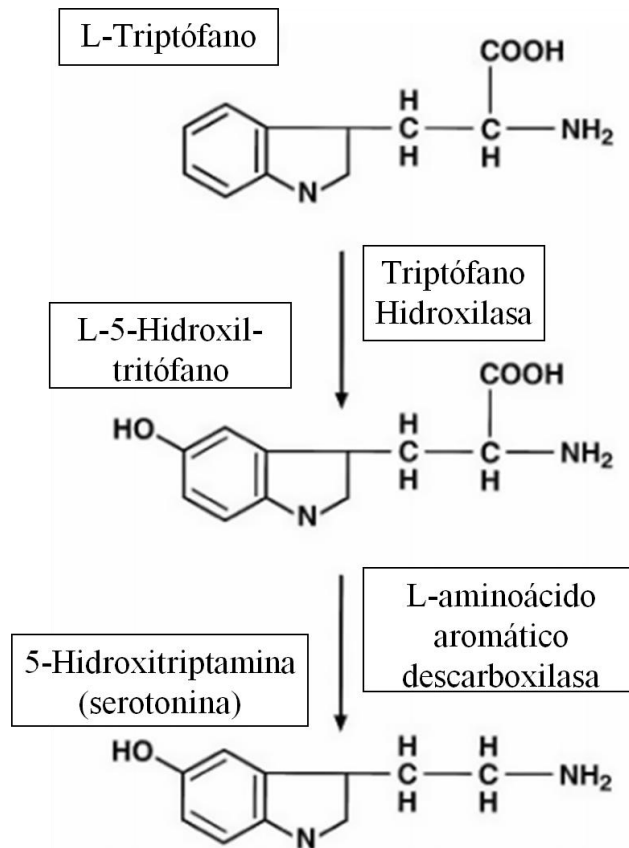


Figura 3. Síntesis de 5-HT [18].

Dentro del SNC, 5-HT es sintetizada y almacenada por las neuronas presinápticas (neuronas serotoninérgicas, glándula pineal, y las neuronas catecolaminérgicas). Igualmente, 5-HT se encuentra en nueve grupos de cuerpos celulares de la protuberancia y del mesencéfalo. Un pequeño número de núcleos serotoninérgicos también están presentes en formación reticular con fibras que permanecen localmente dentro de la médula. De igual forma puede ser sintetizada no neuronalmente, las fuentes en el tejido pulmonar son las células pulmonares neuroendocrinas, posiblemente por mastocitos pulmonares y la liberación de neurotransmisores por parte de fibras nerviosas aferentes. Se ha mostrado experimentalmente que 5-HT es liberada de células neuroendocrinas pulmonares/cuerpos neuroepiteliales (PNECs/NEBs) durante la hipoxia aguda. Sin embargo, pocos estudios han informado de los niveles de 5-HT en la circulación pulmonar *in vivo* o en un modelo de pulmón aislado. La síntesis periférica de 5-HT

se limita a las células enterocromafines y las plaquetas representan un sitio principal de almacenamiento para 5-HT fuera del SNC [19] [20] [21].

Las acciones de 5-HT en el organismo son numerosas y complejas debido a la gran variedad de subtipos de receptores sobre los que actúa. Existen siete tipos de receptores (5-HT1 a 5-HT7) que se dividen en subcategorías denominadas con letras capitales (A-F) (Figura 4) [18]. El término receptor sólo deberá ser aplicado a una entidad para la cual las clases de información están disponibles, y que presente evidencia razonable de un papel funcional. Estos principios posteriormente han sido adaptados para familias de receptores adicionales por el Comité de Nomenclatura de Receptores de la Unión Internacional de Farmacología (NC-IUPHAR). La clasificación actual ha ido progresivamente adaptándose para acomodar la nueva información que se obtiene de los receptores tanto recombinantes y nativos, además de favorecer un alineamiento de la nomenclatura con el genoma humano para evitar diferencias entre especies [22].

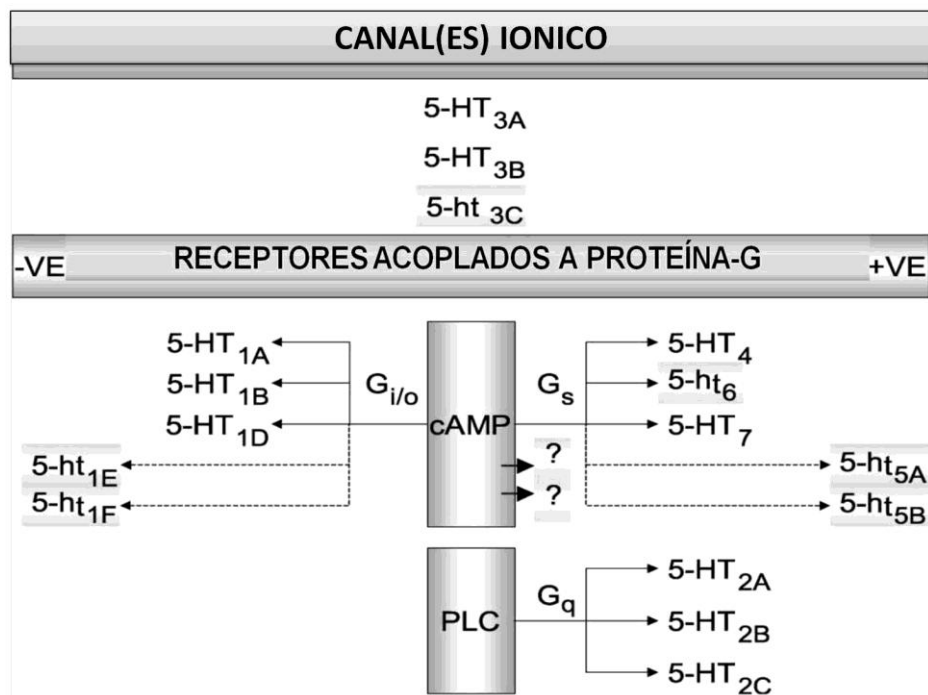


Figura 4. Representación gráfica de la clasificación de los receptores 5-HT. Subtipos de receptores representados por cuadros y minúsculas no han demostrado una función definitiva en sistemas nativos. Adenosín monofosfato cíclico (AMPC); Fosfolipasa C (PLC); negativo (-ve); positivo (+ve) [22].

Como ya se comentó anteriormente uno de los problemas más importantes que conducen al fracaso del trasplante pulmonar es el deterioro de la función capilar que genera edema y dificulta el intercambio gaseoso, los mecanismos responsables aun no se conocen con certeza por lo que en este trabajo pretendemos encontrar nuevas estrategias que permitan aminorar el daño en el tejido pulmonar existiendo evidencia de que 5-HT favorece la lesión endotelial induciendo cambios en la permeabilidad vascular, si podemos bloquear este efecto con el uso de herramientas farmacológicas se podrían prolongar la viabilidad del pulmón.

## Justificación

Uno de los problemas que dificulta la realización de trasplante pulmonar es el rápido deterioro de la función capilar, presentándose la falla primaria del injerto provocando edema, lo que dificulta el intercambio gaseoso. Los mecanismos responsables de este deterioro aún no se conocen con certeza; sin embargo, la optimización de las condiciones de preservación para minimizar el daño endotelial continúa siendo la clave del éxito temprano del trasplante. Si en este estudio se demuestra que 5-HT participa en la alteración de la permeabilidad vascular, guiaría a implementar nuevas estrategias de intervención farmacológica que prolongaran la viabilidad y aumentaran la cantidad de órganos con fines de trasplante.

## Hipótesis

La serotonina incrementa la permeabilidad capilar en el órgano almacenado, por lo tanto, la inhibición de 5-HT durante el periodo isquémico proporcionaría un efecto protector para aminorar el daño endotelial provocada por la I/R.

## Objetivos

---

### Principal

- ❖ Evaluar la participación de serotonina en los cambios de permeabilidad vascular durante la preservación pulmonar.

### Particulares

- ❖ En pulmones de conejo preservados por 24h.
  - Determinar la tasa de liberación de 5-HT y MAO.
  - Demostrar que la inhibición de 5-HT disminuye el deterioro de la permeabilidad capilar.
  - Evaluar el efecto de antagonistas de serotonina, específico 5-HT<sub>2B</sub> (SB204741) e inespecífico 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>5</sub>, 5-HT<sub>6</sub> y 5-HT<sub>7</sub> (Metiotepina) sobre la permeabilidad vascular de pulmones preservados.

## Material y Métodos

---

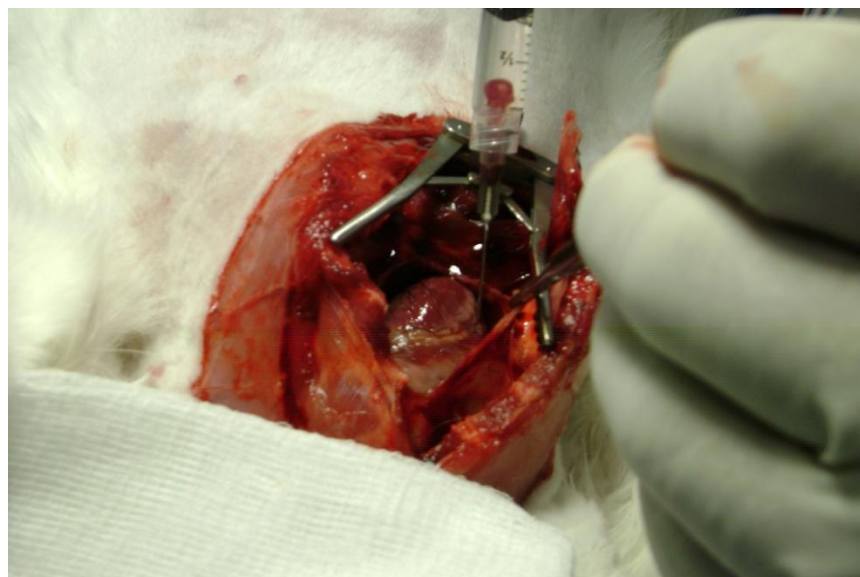
### ***Animales de estudio***

En el estudio se utilizaron conejos macho, raza Nueva Zelanda (peso corporal de 2.5-3.0 kg), mantenidos en el bioterio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias bajo un ambiente controlado de temperatura  $21 \pm 1$  °C, 50-70% de humedad y ciclos de luz oscuridad 12/12h, con un régimen de alimentación y agua *ad libitum*. Los animales fueron manejados de acuerdo a los lineamientos 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 [23].

### ***Obtención y preparación del bloque cardiopulmonar***

El bloque cardiopulmonar se extrajo de 24 conejos divididos en 4 grupos: Control y SSF 24h perfundidos con 250mL de solución salina al 0,9% (SSF), SSF + Metiotepina  $1 \times 10^{-6}$  M y SSF + SB204741  $1 \times 10^{-6}$  M. El coeficiente de filtración capilar (K<sub>fc</sub>) y el peso pulmonar se midieron inmediatamente en el grupo control para evaluar permeabilidad vascular y ganancia de peso a expensas de edema; el resto se preservó en SSF a 4°C por 24h previo a su análisis.

Cada animal se anestesió mediante inyección de clorhidrato de Xilazina (3mg/kg i.m, Procin® / Pisa Agropecuaria) y una dosis de pentobarbital sódico (28mg/Kg i.v, AnestesaI®, Pfizer). Se disecó y canuló la tráquea para ventilarlos mecánicamente (volumen corriente de 10mL/Kg, frecuencia respiratoria de 55/min) usando un ventilador para pequeñas especies (Starling, Harvard Apparatus, Holliston, MA), tras lo cual se realizó una esternotomía media para exponer el bloque cardiopulmonar. De manera inmediata se inyectó en el ventrículo derecho heparina (2000 UI/kg) para posteriormente ligar las venas cavas y exsanguinar al animal.



**Fig. 5** Exposición del bloque cardiopulmonar e inyección de heparina.

El bloque cardiopulmonar se extrajo de la cavidad torácica. El corazón se seccionó transversalmente a nivel de las válvulas auriculoventriculares, para colocar dos cánulas de cristal de 5 cm de longitud por 3 mm de diámetro interno, una en la arteria pulmonar a través del ventrículo derecho y otra ubicada en la aurícula izquierda. Las estructuras adyacentes fueron incluidas mediante la ligadura de la arteria pulmonar y aurícula izquierda con seda trenzada 2-0, para disminuir la distensibilidad de las mismas y evitar que interfirieran en el registro de la presión vascular.

### ***Lavado y Preservación pulmonar***

Una vez obtenido el bloque, se mantuvo bajo ventilación mecánica, la sangre intravascular de los pulmones se eliminó mediante infusión anterógrada (100-150mL de solución de preservación) a través de la cánula pulmonar, a una presión de 20 cmH<sub>2</sub>O (generada mediante la elevación a 20 cm de altura del reservorio con solución). Al final del lavado, se pinzaron simultáneamente las cánulas de forma que el lecho vascular mantuviera dicha solución. 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 isotónica (NaCl al 0,9%), y se mantuvo a 4°C durante 1, 6, 12 y 24h hasta su estudio.

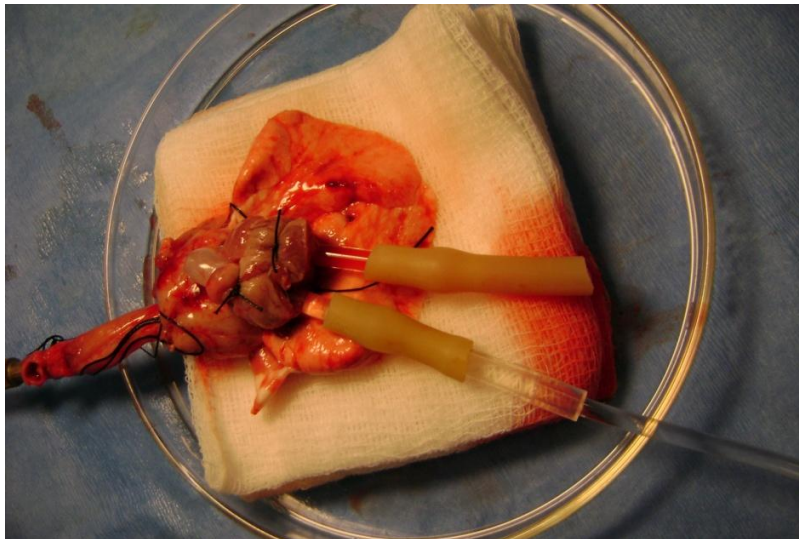


Fig. 6 Ventilación y lavado del bloque cardiopulmonar.

### ***Pulmón aislado y perfundido***

El bloque cardiopulmonar se montó en una hamaca hecha con malla de Marlex<sup>®</sup> colgada de un transductor de fuerza tensil (FT03, Grass Instruments, Co., Boston, MA). A su vez, se conectó a un circuito de perfusión recirculatorio, constituido por una bomba peristáltica de circulación (NY-7550-62 Materflex, Barrington, IL) con indicador de flujo de perfusión y termómetro. Durante esta etapa se mantuvieron ventilados con aire ambiental humedecido a un volumen corriente de 10mL/Kg, frecuencia respiratoria de 55/min, PEEP de 2 cmH<sub>2</sub>O. Además, periódicamente se hiperinsuflaron para evitar atelectasias.

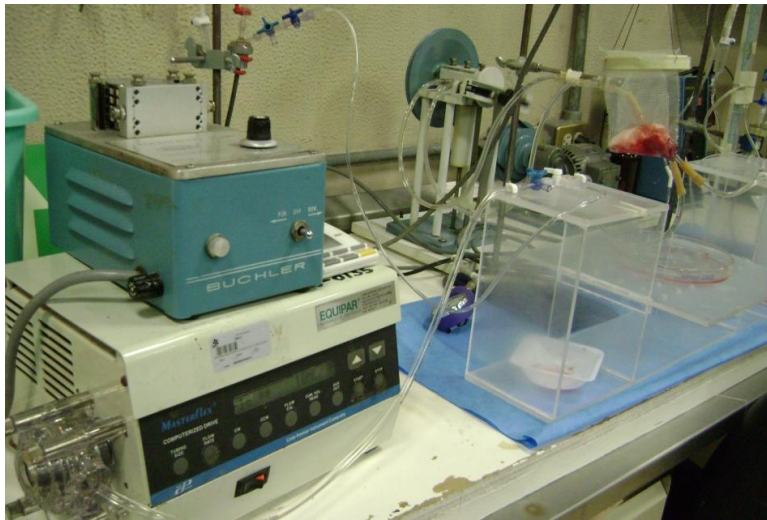


Fig. 7 Equipo de pulmón aislado y perfundido para las mediciones de mKfc.

Los pulmones se lavaron haciendo pasar líquido de perfusión hasta eliminar al máximo la sangre remanente en el lecho vascular, para posteriormente mantenerlos perfundidos a un flujo constante de 10mL/min con 500 mL de la solución artificial de perfusión Krebs-Ringer-bicarbonato conteniendo (g): NaCl 6.90, KCl 0.354, CaCl $\cdot$ 2H $_2$ O 0.373, KH $_2$ PO $_4$  0.162, MgSO $_4$  $\cdot$ 7 H $_2$ O 0.293, NaHCO $_3$  2.1, Glucosa 0.98 y 2.5% de albúmina bovina (g/L). 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 HCl (1M).

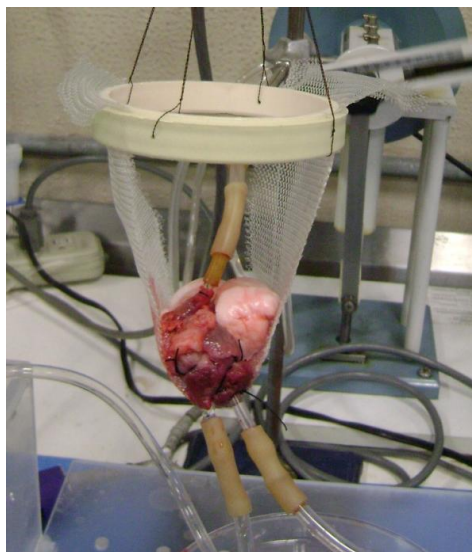


Fig. 8 Bloque cardiopulmonar en el sistema de pulmón aislado y perfundido.



### ***Permeabilidad vascular***

Las presiones arterial (Pa) y venosa (Pv) se midieron a través de las cánulas fijadas en la arteria pulmonar y la aurícula izquierda respectivamente, conectadas 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, las presiones arterial y venosa se mantuvieron relativamente estables; dichos parámetros (peso y presión) se registraron mediante un polígrafo multicanales (Dynograph Recorder R611, Beckman Instruments, Palo Alto, CA). Dentro de nuestras condiciones experimentales la máxima apertura de los vasos sanguíneos se obtuvo cuando la presión arterial sea mayor que la venosa y ésta es a su vez mayor que la presión al final de la espiración ( $P_a > P_v > P_e$ ).

Para evitar la influencia de la ventilación mecánica al momento del registro del mKfc, los pulmones se desconectaron temporalmente (aproximadamente 4 min). La permeabilidad capilar se midió a través del método de la doble oclusión, el cual consistió en realizar de forma súbita un pinzamiento simultáneo de las cánulas arterial y venosa, lo que produjo inmediatamente un incremento de la Pv y un decremento de la Pa, y al cabo de 2 ó 3 seg ambas presiones se estabilizaron. En estas condiciones la Pv se consideró como un indicador de la presión capilar (Pc). Después de haber transcurrido aproximadamente 10 seg, se quitó la doble oclusión y se restableció el flujo. Unos segundos después, se incrementó la Pv en 10 cmH<sub>2</sub>O mediante la oclusión parcial del flujo de salida venosa y se mantuvo así durante 3 min. Esto causó un aumento rápido de peso pulmonar debido a la congestión capilar, que duró aproximadamente de 30 a 60 seg, seguido de una ganancia más lenta de peso, que significó el líquido filtrado a través del capilar entre los 60 a 180 seg después de haber iniciado la oclusión parcial del lado venoso. Esta fase lenta de ganancia de peso es la que se utilizó para calcular el mKfc. Al final de los 3 min, y aún con la elevación de la Pv de 10 cmH<sub>2</sub>O, se efectuó otra doble oclusión para obtener la Pc. El mKfc se expresó como mL·min<sup>-1</sup>·cmH<sub>2</sub>O<sup>-1</sup>·g<sup>-1</sup>, 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.

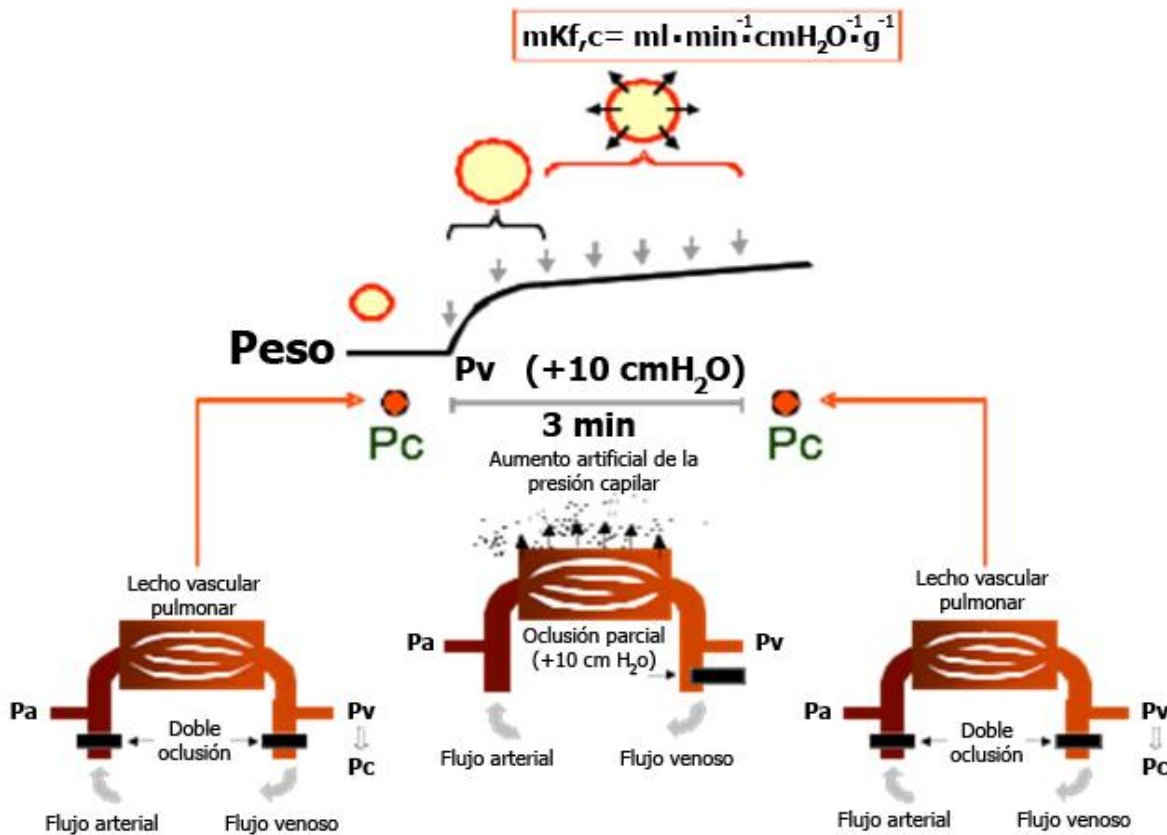


Fig. 9 Representación grafica de un registro de coeficiente de filtración capilar ( $mKf_c$ ), el primer minuto se caracteriza por un incremento en la ganancia de peso y los siguientes dos corresponden la filtración de líquido a través del capilar al aumentar la presión venosa  $10\text{cmH}_2\text{O}$ . Presión arterial ( $P_a$ ), presión venosa ( $P_v$ ), presión capilar ( $P_c$ ) [24].

## Determinación de Mediadores Bioquímicos

### Mediadores bioquímicos

Algunos bloques cardiopulmonares se lavaron usando SSF con pargilina  $1 \times 10^{-6} \text{ M}$  para inhibir a la Monoamino oxidasa (MAO). Este compuesto se empleó con el fin de evitar la degradación de 5-HT. Los pulmones se preservaron en esta solución por 24h a  $4^\circ\text{C}$  y durante este periodo el líquido intravascular se cambió 5 veces en su totalidad a diferentes intervalos de tiempo (15 min, 1, 6, 12 y 24h). 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 una temperatura de 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 5mL de solución se desecharon, los siguientes 5mL se colectaron en 5 tubos eppendorf oscuros colocando 1mL en cada uno de ellos, y los siguientes 10mL se desecharon también. En mediciones previas se corroboró que con 20mL de solución son suficientes para hacer un recambio total del líquido intravascular. Las cánulas arterial y venosa fueron nuevamente pinzadas y el pulmón nuevamente sumergido en su solución de preservación a 4°C. Todo este procedimiento de toma de muestras duraba no más de 5 min. Las muestras para la determinación de la serotonina fueron congeladas a -70°C.

### ***Determinación de 5-HT***

A las muestras de SSF con pargilina extraídas durante diferentes intervalos de tiempo (15 min, 1, 6, 12 y 24h) del lecho vascular de los pulmones preservados se les realizó un Inmunoensayo enzimático (ELISA del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) para la determinación cuantitativa de 5-HT. Se utilizó un kit de ELISA comercial (catálogo 40-371-25002, GenWay, San Diego, USA), con un rango de detección 0.08 ng/mL –19.8 ng/ mL el cual contiene una microplaca con 96 pozos en tiras separables cubierto con antisuero anti-conejo (cabra). De tal manera y siguiendo las instrucciones del fabricante, la preparación de las muestras se realizó colocando 20µL de cada una de las muestras y controles en un tubo de vidrio, para después colocar 100µL de Buffer de ensayo en cada uno de los tubo y agitar, después se pipeteo 25µL de Reactivo de acilación e inmediatamente, se agito, se cubrieron los tubos y se colocaron en baño maría por 15 min a 37°C, después se les colocó 2mL de Buffer de ensayo en cada tubo se agito y se centrifugaron por 10 min a 1500 x g.

Una vez que las muestras fueron centrifugadas damos paso al procedimiento de la prueba ya que el sobrenadante solo es estable por 1h a 18- 25°C, así que siguiendo las indicaciones del fabricante se colocaron 50µL de cada estándar,

control y muestra acilados en su respectivo pozo de la microplaca, después 50 $\mu$ L de serotonina biotina y 50 $\mu$ L de serotonina antisuero en cada pozo, enseguida se cubrió la placa con un plástico adhesivo y se dejó incubando por 90 min a temperatura ambiente (18-25°C) sobre un agitador orbital a 500 rpm. Una vez terminado el tiempo de incubación se retiró el plástico, se desechó la solución incubada y se lavó la placa 3 veces añadiendo en cada pozo 250 $\mu$ L de buffer de lavado diluido 1:20, retirando el exceso de la solución invirtiendo la placa sobre una toalla de papel. Ya que se retiró el exceso, se colocó en cada pozo 150 $\mu$ L de conjugado de enzima recién preparado con una dilución 1:101, se cubrió la placa nuevamente con un plástico y se dejó incubando por 60 min a temperatura ambiente (18-25°C) sobre un agitador orbital a 500 rpm. Terminado el tiempo de incubación se retiró el plástico y se lavó la placa 3 veces añadiendo en cada pozo 250 $\mu$ L de buffer de lavado removiendo el exceso de solución invirtiendo la placa y poniéndola sobre una toalla de papel. Después se le colocó 200 $\mu$ L en cada pozo de PNPP solución sustrato se cubre la placa y se deja incubar por 60 min a temperatura ambiente (18-25°C) en un agitador orbital a 500 rpm. Una vez terminado el tiempo de incubación se destapó la placa y se le colocaron 50 $\mu$ L de PNPP solución de alto en cada pozo mezclándolo al agitar suavemente la placa. Finalmente se leyó la placa en un lector de ELISA (Multiskan MS, Labsystems, Helsinki, Finlandia) a una densidad óptica de 405 nm, dentro de 60 min después de haber colocada la solución de alto. Los datos se analizaron utilizando el programa "Curve Expert 1.3" el cual nos permitió realizar una curva estándar de los datos colocando los valores de las absorbancias (OD) en el eje de las X y las concentraciones en el eje de las Y, la concentración de las muestras se tomaron directamente de la curva estándar ya que este método lo permite así.

### ***Determinación de MAO***

Pulmones preservados por 24h, donde durante este tiempo el líquido intravascular se recambio 5 veces en su totalidad a diferentes intervalos (15 min, 1, 6, 12 y 24h), se les realizó una prueba de ELISA para la determinación cuantitativa de MAO (catalogo CSB-E110144h, CUSABIO, Hubei, China). Las muestras se colectaron y almacenaron de tal manera y siguiendo las instrucciones del fabricante; se centrifugaron por 15 min a 1000 x g, se removió el sobrenadante colocando la muestra en tubos nuevos y se guardaron a -20 o -80°C hasta la realización de la prueba.

Para el análisis de las muestras y siguiendo las indicaciones del fabricante, se colocaron 100µL de los estándares previamente preparados y de cada una de las muestras. Se cubrió con un plástico adhesivo y se dejó incubando por 2h a temperatura de 37°C. Después se remueve el líquido de cada pozo pero no se lava. A continuación se añadió 100µL de anticuerpo Biotina 1X en cada pozo, se cubrió con un nuevo plástico y se dejó incubando por 1h a 37°C, después se aspiró y lavo cada pozo para añadir 200µL de buffer de lavado usando una pipeta multicanal, esto se repitió un total de tres veces dejando el buffer de lavado 2 min entre cada uno de ellos, en el último lavado se invirtió la placa en toallas de papel para retirar todo el líquido posible. Seguido se colocaron 100µL de HRP-avidin 1X en cada pozo, se cubrió con un nuevo plástico y se dejó incubando por 1h a 37°C. Pasada la hora se repite el proceso de lavado previamente explicado, al terminar se colocaron 90µL de TMB sustrato en cada pozo y se dejó incubar de 15-30 min a 37°C protegiéndolo de la luz. Finalmente transcurrido ese tiempo se colocaron 50µL de la solución stop en cada pozo y se midió la densidad óptica a 450 nm y 540 nm dentro de un lapso de 5 min después de haber colocado la solución de paro. Los datos se analizaron utilizando el programa "Curve Expert 1.3" el cual nos permitió realizar una curva estándar de los datos colocando los valores de las absorbancias (OD) en el eje de las X y las concentraciones en el eje de las Y, la concentración de las muestras se tomaron después de haber realizado el análisis con el programa.

## Análisis Estadístico

---

Los datos se expresaron en forma de media aritmética  $\pm$  desviación estándar y error estándar de la media. El análisis estadístico para más de dos grupos se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguida de una prueba post hoc Tukey / Dunnett. Se consideró estadísticamente significativas las diferencias con un valor  $p < 0.05$ .

## Resultados

---

Con el propósito de evaluar el efecto de 5-HT durante la preservación pulmonar prolongada, primero se comprobó que dicho neurotransmisor se liberaba en el lecho vascular durante este proceso. En la *Figura 10* se puede apreciar la cinética de serotonina durante 24h, destacando que alcanza su pico máximo ( $0.702 \pm 0,391$  ng/mL) de liberación al tiempo cero (15 min), para después sufrir un decremento importante en el tiempo 6 ( $0.274 \pm 0,126$  ng/mL,  $p < 0.01$ ) en comparación a la basal. A partir de ese momento y hasta las 24h se incrementaron los valores de 5-HT en dos fases sin llegar a ser estadísticamente significativo.

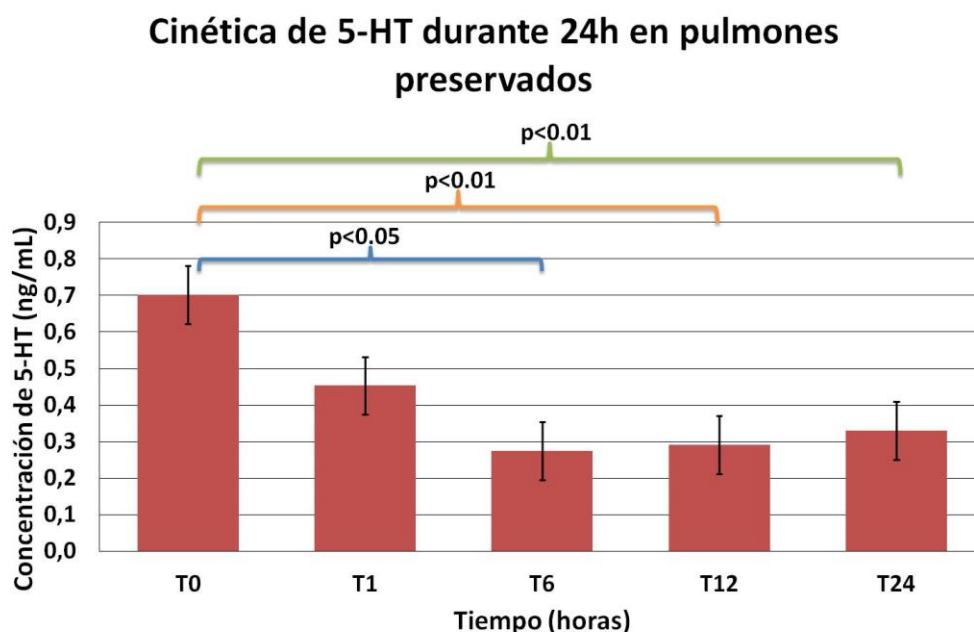


Fig. 10 Tasa de liberación de 5-HT en pulmones preservados por 24h a 4°C. Se muestra la desviación estándar para cada grupo presentando significancia estadística ( $p < 0.05$ ) a partir de las 6h mediante prueba de Dunnett (posterior a ANOVA de una vía).

Mediante la prueba de ELISA en líquido vascular se realizó la cuantificación de la MAO durante la preservación (Figura 11), siendo esta la enzima que cataboliza a 5-HT. En el tiempo cero (15 min) se observó al el pico más alto ( $1,909 \pm 1,103$  IU/mL), en los siguientes intervalos se presentó un decremento progresivo hasta transcurridas las 12 horas ( $0,757 \pm 0,292$  UI/mL  $p<0.05$ ) para después presentar un aumento discreto a las 24 horas en la concentración de la enzima sin llegar a ser estadísticamente significativo ( $1,215 \pm 0,978$  UI/mL).

### Cinética de MAO durante 24h en pulmones preservados

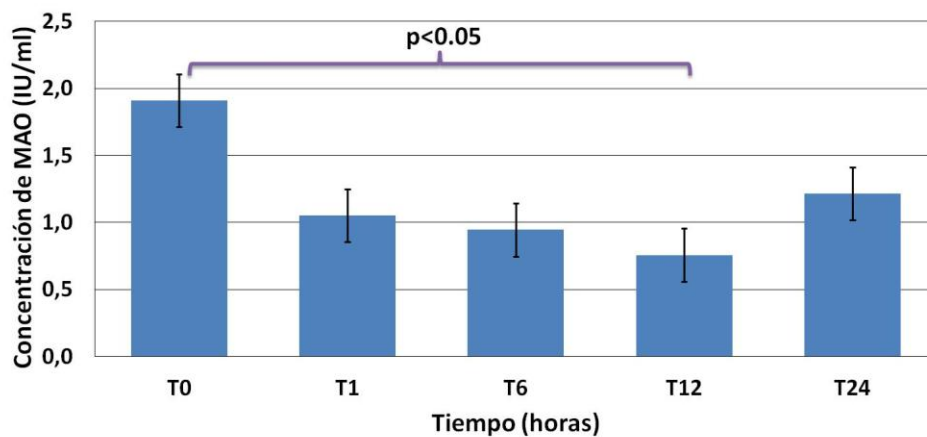


Fig. 11 Tasa de liberación de MAO en pulmones preservados por 24h a 4°C. Se muestra la desviación estándar para cada grupo presentando significancia estadística ( $p<0.05$ ) mediante prueba de Dunnett (posterior a ANOVA de una vía) a las 12h.

### Porcentaje de liberación de 5-HT y MAO

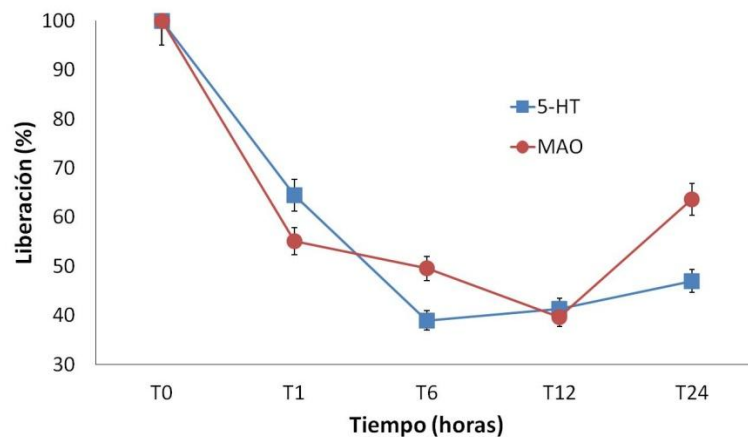


Fig. 12 Tasa de liberación en porcentaje con su desviación estándar de 5-HT y MAO en pulmones preservados por 24h a 4°C respecto al valor inicial.

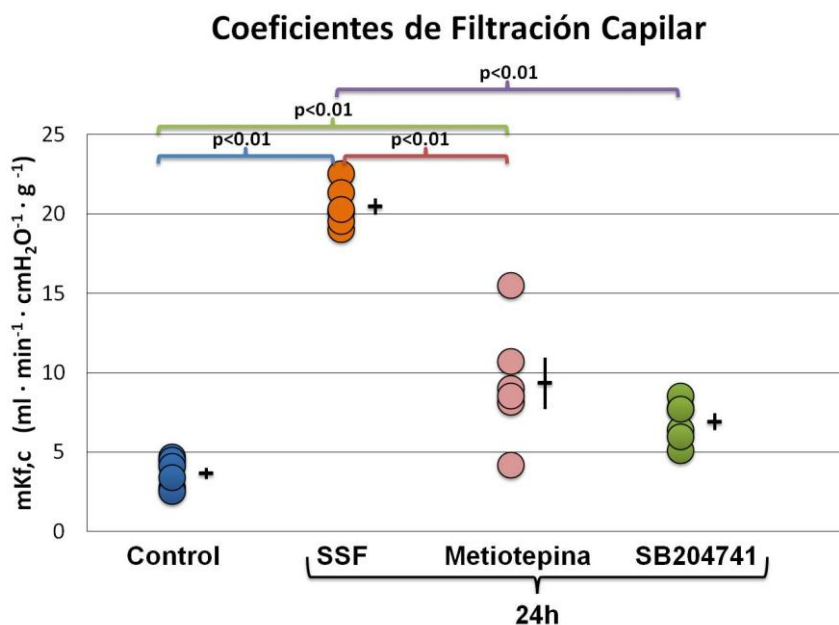


Fig. 13 Efecto de la metiotepina y de SB204741 sobre los cambios de permeabilidad vascular en pulmones de conejo preservados durante 24h a 4 °C. Cada círculo por separado representa el mKfc medido en cada animal, presentando significancia de  $p < 0.01$  mediante prueba de Tukey (posterior a ANOVA de una vía). El error estándar de la media y el promedio están representados a la derecha de cada grupo.

Respecto a la evaluación de las diferentes condiciones de preservación se encontró que el mKfc capilar del grupo control (inmediatamente después de obtenido el pulmón) fue de  $3,67 \pm 0,912 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cmH}_2\text{O}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ , mientras que en el grupo de 24h con SSF presento un promedio de  $20,48 \pm 1,278 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cmH}_2\text{O}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ , con una significancia estadística de  $p < 0.01$ , lo que corroboró el estado de daño endotelial tras la preservación prolongada en dicho grupo. Para el grupo de 24h con SSF más metiotepina (antagonista inespecífico) se obtuvo un mKf,c de  $9,36 \pm 3,707 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cmH}_2\text{O}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  siendo su comportamiento algo errático, llegando alcanzar un coeficiente parecido al de nuestra basal ó un valor casi tan alto como el de 24h con SSF, sin embargo los demás valores no tuvieron tanta dispersión por lo que fue significativo respecto al grupo control y de 24 horas sin antagonistas. Finalmente el grupo adicionado con SB204741 (antagonista específico para  $5 \text{ HT}_{2B}$ ) presentó un valor de  $6,93 \pm 1,300 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cmH}_2\text{O}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ , siendo más estable en sus mediciones comparado con el de metiotepina, conservando valores por debajo de  $10 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cmH}_2\text{O}^{-1} \cdot \text{g} \text{ tejido}^{-1}$ , mostrando significancia ( $p < 0.01$ ) con el grupo de 24h SSF.



## Discusión

---

En la realización del presente estudio pudimos comprobar que la 5-HT es un importante neurotransmisor que se libera durante la preservación pulmonar, nuestros resultados expresan que con el uso de antagonistas fuimos capaces de reducir la permeabilidad vascular evitando un mayor daño por la I/R en los pulmones preservados, además se observó una mejor respuesta por parte del antagonista específico para 5-HT<sub>2B</sub> (SB204741) que con el uso de metiotepina.

Dentro del entendimiento de la fisiopatología de la lesión por isquemia-reperfusión se ha demostrado un vínculo entre esta y el daño endotelial, los mecanismos involucrados en este fenómeno permanecen en controversia, siendo uno de ellos la participación de algunos neurotransmisores con respuesta en el tono vascular [25]. En relación a esto, mediante la utilización de antagonistas selectivos y por la comparación con la farmacología de receptores recombinantes, ha sido reportado un efecto dual de 5-HT según el receptor estimulado, así a través del receptor 5-HT<sub>1B</sub> [26] produce vasoconstricción en arterias y venas de gran calibre o efecto de vasodilatación debido a la estimulación del receptor 5-HT<sub>2B</sub> [27] [28], ambos receptores ampliamente distribuidos en el sistema cardiovascular (células endoteliales y de músculo liso) [18] [22] [29].

Basados en lo anterior y a los hallazgos de la relajación del endotelio dependiente de 5-HT antagonizado con el uso de metiotepina [30] y SB 204741 [27, 31-33] empleamos un modelo de pulmón aislado y perfundido con el propósito de evaluar el efecto de 5-HT y estos antagonistas durante la preservación pulmonar prolongada, sin embargo para tal efecto primero se comprobó que dicho neurotransmisor se encontraba en el lecho vascular durante este proceso, suponemos que dicha liberación es consecuente en primera instancia a la lesión nerviosa por la hipoxia sostenida durante el periodo isquémico, ya que se ha visto durante hipoxia aguda y crónica modificaciones en los niveles plasmáticos de serotonina, así como de otras fuentes no neuronales como las células neuroepiteliales, la actividad del transportador de 5-HT, y la expresión de sus

receptores [34]. Durante la primera hora observamos que los niveles de 5-HT fueron los mayores, para después tener un declive de los mismos a las 6h debido a su posible recaptura por parte de las células endoteliales y plaquetas, así como su catabolismo mediado por la MAO. A partir de ese momento y hasta las 24 horas se incrementó 5-HT en dos fases, la primera de ellas posiblemente por la liberación por parte de las plaquetas remanentes (una fuente importante durante la isquemia-reperfusión) en sitios isquémicos a pesar del lavado pulmonar realizado [35, 36]. Previamente a la última fase se observó un equilibrio entre 5-HT y MAO para posteriormente tener un aumento; probablemente el de 5-HT como consecuencia de su segregación proveniente de las células endoteliales (previamente capturada) y/o su síntesis *de novo* por las mismas [37] [38] [39], y la elevación de la MAO. Algo que cabe resaltar es que durante el proceso de la cinética de 5-HT y MAO uno esperaba que las concentraciones de ambas fueran inversamente proporcional a lo largo de las 24h, siendo que a mayor concentración de MAO habría una menor cantidad de 5-HT, pero en ambas se observó el mismo comportamiento presumiblemente en respuesta a un mecanismo homeostático.

Encontramos que al adicionar antagonistas de 5-HT a las soluciones de preservación durante la fase isquémica resulta en una disminución significativa de la permeabilidad vascular en los pulmones preservados. El mecanismo por el cual estos fármacos ejercen un efecto fisiológico protector permanece incierto, proponemos que estos antagonistas al acoplarse a los receptores 5-HT<sub>2B</sub> inhiben la relajación vascular mediada principalmente por óxido nítrico (ON) al aumentar la guanosina monofosfato cíclica intracelular en el músculo liso [32, 40]. En los pulmones preservados únicamente con SSF al no inhibirse la producción de ON podrían alterarse los mecanismos de adhesión que controlan el contacto celular endotelial evitando que permanezca la barrera entre la sangre y el tejido [41] favoreciendo el movimiento de fluido a través del lecho vascular acorde al equilibrio de Starling [42, 43]. En el grupo del antagonista específico (SB204741) los mKfc fueron menores respecto al de metiotepina suponemos que es debido a la menor afinidad que posee este último al receptor 5-HT<sub>2B</sub>.

Considerando que la mayor liberación de 5-HT fue durante las primeras horas, mismo intervalo en que se ha visto que son viables los pulmones para trasplante estaríamos implicados en una controversia, sin embargo una explicación hipotética podría ser que durante este tiempo MAO degrada eficientemente a 5-HT.

Otra cosa que se puede observar en relación a la eficacia de la enzima MAO es que esta va disminuyendo a lo largo del tiempo ya que en el grupo de SSF 24h donde no contiene pargilina la cual evita que MAO pueda degradar a 5-HT, al cabo de las 24h visiblemente y al realizar el análisis de mKfc el pulmón presenta edema, por lo tanto pese a que se da una disminución significativa en la cantidad de 5-HT por diferentes factores, la que permanece en el lecho vascular del pulmón por muy poca que se considere en comparación de las primera horas es lo suficientemente necesaria para producir cambios en la permeabilidad vascular.

## Conclusión

---

Para conseguir un resultado óptimo en el trasplante pulmonar, es necesario una correcta extracción y preservación del pulmón donante. A pesar de los múltiples trabajos que se han desarrollado en el campo experimental con el fin de mantener el pulmón en las mejores condiciones y el mayor tiempo posible para su implantación, su repercusión en la práctica clínica ha sido excepcional y la incidencia del la FPI apenas se ha modificado en los últimos 10 años. 5-HT puede jugar un papel importante en el proceso de I/R al favorecer la lesión endotelial y generación de edema. El uso de antagonistas de 5-HT (Metiotepina y SB 204741) administrados en las soluciones de preservación durante el periodo isquémico en el modelo de pulmón aislado puede atenuar significativamente el daño pulmonar, aunque solo fuimos capaces de hipotetizar el mecanismo responsable de tal efecto protector; sin embargo, proponemos continuar explorando esta intervención farmacológica y esperemos que en un futuro el desarrollo de nuevas estrategias en la preservación pulmonar hagan mejorar los resultados del trasplante pulmonar a corto y largo plazo.

## Referencias

---

1. Southard JH, Belzer FO: **Organ preservation**. *Annu Rev Med* 1995, **46**:235-247.
2. Guibert EE, Petrenko AY, Balaban CL, Somov AY, Rodriguez JV, Fuller BJ: **Organ Preservation: Current Concepts and New Strategies for the Next Decade**. *Transfus Med Hemother* 2011, **38**(2):125-142.
3. de Perrot M, Keshavjee S: **Lung preservation**. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2004, **16**(4):300-308.
4. Padilla AM, Padilla JD: **[Lung preservation: current practices]**. *Arch Bronconeumol* 2004, **40**(2):86-93.
5. Kelly RF: **Current strategies in lung preservation**. *J Lab Clin Med* 2000, **136**(6):427-440.
6. Hopkinson DN, Bhabra MS, Hooper TL: **Pulmonary graft preservation: a worldwide survey of current clinical practice**. *J Heart Lung Transplant* 1998, **17**(5):525-531.
7. Suárez López VJ, Miñambres E, Robles Arista JC, Ballesteros MA: **[Primary graft dysfunction after lung transplantation]**. *Med Intensiva* 2012, **36**(7):506-512.
8. Lee JC, Christie JD: **Primary graft dysfunction**. *Proc Am Thorac Soc* 2009, **6**(1):39-46.
9. Bermudez CA, Adusumilli PS, McCurry KR, Zaldonis D, Crespo MM, Pilewski JM, Toyoda Y: **Extracorporeal membrane oxygenation for primary graft dysfunction after lung transplantation: long-term survival**. *Ann Thorac Surg* 2009, **87**(3):854-860.
10. Oto T, Griffiths AP, Levvey BJ, Pilcher DV, Williams TJ, Snell GI: **Definitions of primary graft dysfunction after lung transplantation: differences between bilateral and single lung transplantation**. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006, **132**(1):140-147.
11. Hertz MI: **The registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation--introduction to the 2012 annual reports: new leadership, same vision**. *J Heart Lung Transplant* 2012, **31**(10):1045-1051.
12. 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.

13. Shargall Y, Guenther G, Ahya VN, Ardehali A, Singhal A, Keshavjee S, Dysfunction IWGoPLG: **Report of the ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction part VI: treatment.** *J Heart Lung Transplant* 2005, **24**(10):1489-1500.
14. Whitson BA, Nath DS, Johnson AC, Walker AR, Prekker ME, Radosevich DM, Herrington CS, Dahlberg PS: **Risk factors for primary graft dysfunction after lung transplantation.** *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006, **131**(1):73-80.
15. Belvisi MG: **Overview of the innervation of the lung.** *Curr Opin Pharmacol* 2002, **2**(3):211-215.
16. ERSPAMER V, ASERO B: **Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine.** *Nature* 1952, **169**(4306):800-801.
17. CLARK CT, WEISSBACH H, UDENFRIEND S: **5-Hydroxytryptophan decarboxylase: preparation and properties.** *J Biol Chem* 1954, **210**(1):139-148.
18. Mohammad-Zadeh LF, Moses L, Gwaltney-Brant SM: **Serotonin: a review.** *J Vet Pharmacol Ther* 2008, **31**(3):187-199.
19. Sørhaug S, Steinshamn S, Munkvold B, Waldum HL: **Release of neuroendocrine products in the pulmonary circulation during intermittent hypoxia in isolated rat lung.** *Respir Physiol Neurobiol* 2008, **162**(1):1-7.
20. Keir S, Page C: **The rabbit as a model to study asthma and other lung diseases.** *Pulm Pharmacol Ther* 2008, **21**(5):721-730.
21. Segura P, Vargas MH, Córdoba-Rodríguez G, Chávez J, Arreola JL, Campos-Bedolla P, Ruiz V, García-Hernández LM, Méndez C, Montaña LM: **Role of 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>4</sub> and 5-HT<sub>7</sub> receptors in the antigen-induced airway hyperresponsiveness in guinea-pigs.** *Clin Exp Allergy* 2010, **40**(2):327-338.
22. Hoyer D, Hannon JP, Martin GR: **Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors.** *Pharmacol Biochem Behav* 2002, **71**(4):533-554.
23. J. JM, F. CJ: **Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio.** In. Edited by Medicina. ANd, vol. NOM-062-ZOO-1999. Estados Unidos Mexicanos; 1999.

24. Arreola JL: **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.** Universidad Nacional Autónoma de México; 2009.
25. Barton M: **The discovery of endothelium-dependent contraction: the legacy of Paul M. Vanhoutte.** *Pharmacol Res* 2011, **63**(6):455-462.
26. Nakamura E, Tanaka N, Kuwabara M, Yamashita A, Matsuo Y, Kanai T, Onitsuka T, Asada Y, Hisa H, Yamamoto R: **Relative contributions of 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptor subtypes in 5-HT-induced vasoconstriction of the distended human saphenous vein as a coronary artery bypass graft.** *Biol Pharm Bull* 2011, **34**(1):82-86.
27. Glusa E, Pertz HH: **Further evidence that 5-HT-induced relaxation of pig pulmonary artery is mediated by endothelial 5-HT(2B) receptors.** *Br J Pharmacol* 2000, **130**(3):692-698.
28. Blanpain C, Le Poul E, Parma J, Knoop C, Detheux M, Parmentier M, Vassart G, Abramowicz MJ: **Serotonin 5-HT(2B) receptor loss of function mutation in a patient with fenfluramine-associated primary pulmonary hypertension.** *Cardiovasc Res* 2003, **60**(3):518-528.
29. Linder AE, Ni W, Diaz JL, Szasz T, Burnett R, Watts SW: **Serotonin (5-HT) in veins: not all in vain.** *J Pharmacol Exp Ther* 2007, **323**(2):415-421.
30. Chapman ME, Wideman RF: **Evaluation of the serotonin receptor blockers ketanserin and methiothepin on the pulmonary hypertensive responses of broilers to intravenously infused serotonin.** *Poult Sci* 2006, **85**(4):777-786.
31. Angus JA, Cocks TM: **Endothelium-derived relaxing factor.** *Pharmacol Ther* 1989, **41**(1-2):303-352.
32. Sumner MJ: **Characterization of the 5-HT receptor mediating endothelium-dependent relaxation in porcine vena cava.** *Br J Pharmacol* 1991, **102**(4):938-942.
33. Jähnichen S, Glusa E, Pertz HH: **Evidence for 5-HT<sub>2B</sub> and 5-HT<sub>7</sub> receptor-mediated relaxation in pulmonary arteries of weaned pigs.** *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2005, **371**(1):89-98.
34. Esteve JM, Launay JM, Kellermann O, Maroteaux L: **Functions of serotonin in hypoxic pulmonary vascular remodeling.** *Cell Biochem Biophys* 2007, **47**(1):33-44.

35. Shimizu Y, Minatoguchi S, Hashimoto K, Uno Y, Arai M, Wang N, Chen X, Lu C, Takemura G, Shimomura M *et al*: **The role of serotonin in ischemic cellular damage and the infarct size-reducing effect of sarpogrelate, a 5-hydroxytryptamine-2 receptor blocker, in rabbit hearts.** *J Am Coll Cardiol* 2002, **40**(7):1347-1355.
36. Sonobe T, Akiyama T, Du CK, Zhan DY, Shirai M: **Contribution of serotonin uptake and degradation to myocardial interstitial serotonin levels during ischaemia-reperfusion in rabbits.** *Acta Physiol (Oxf)* 2013, **207**(2):260-268.
37. Eddahibi S, Guignabert C, Barlier-Mur AM, Dewachter L, Fadel E, Dartevielle P, Humbert M, Simonneau G, Hanoun N, Saurini F *et al*: **Cross talk between endothelial and smooth muscle cells in pulmonary hypertension: critical role for serotonin-induced smooth muscle hyperplasia.** *Circulation* 2006, **113**(15):1857-1864.
38. Abid S, Houssaini A, Chevarin C, Marcos E, Tissot CM, Gary-Bobo G, Wan F, Mouraret N, Amsellem V, Dubois-Randé JL *et al*: **Inhibition of gut- and lung-derived serotonin attenuates pulmonary hypertension in mice.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012, **303**(6):L500-508.
39. Sullivan CC, Du L, Chu D, Cho AJ, Kido M, Wolf PL, Jamieson SW, Thistlethwaite PA: **Induction of pulmonary hypertension by an angiotensin II/TIE2/serotonin pathway.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**(21):12331-12336.
40. Poon CC, Seto SW, Au AL, Zhang Q, Li RW, Lee WY, Leung GP, Kong SK, Yeung JH, Ngai SM *et al*: **Mitochondrial monoamine oxidase-A-mediated hydrogen peroxide generation enhances 5-hydroxytryptamine-induced contraction of rat basilar artery.** *Br J Pharmacol* 2010, **161**(5):1086-1098.
41. Vestweber D: **Regulation of endothelial cell contacts during leukocyte extravasation.** *Curr Opin Cell Biol* 2002, **14**(5):587-593.
42. Andrew PS, Deng Y, Sultanian R, Kaufman S: **Nitric oxide increases fluid extravasation from the splenic circulation of the rat.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001, **280**(4):R959-967.
43. Jacob M, Bruegger D, Rehm M, Stoeckelhuber M, Welsch U, Conzen P, Becker BF: **The endothelial glycocalyx affords compatibility of Starling's principle and high cardiac interstitial albumin levels.** *Cardiovasc Res* 2007, **73**(3):575-586.