

REVISION BIBLIOGRAFICA PULMON AISLADO DE CURIEL. SUPERFUSION A UNA SERIE DE TEJIDOS DE BIOENSAYO EN CASCADA. POSIBILIDADES Y USOS EN FARMACOLOGIA EXPERIMENTAL

M. de L. Arruzazabala Valmaña

Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de La Habana, Cuba

Recibido: 21 de abril de 1988

ABSTRACT. This work describes the release of arachidonic acid metabolites from isolated lungs of guinea-pigs induced by various stimuli and its measurement by bioassay (superfusion technique). The effects of levamisole and ozone in this experimental model is shown.

RESUMEN. Se brinda una revisión bibliográfica de la utilidad del pulmón aislado de curiel como modelo experimental para la evaluación por bioensayo de la liberación de metabolitos del ácido araquidónico. Se ofrecen los resultados del efecto del levamisol y del ozono en este modelo experimental.

La principal función de los pulmones es el intercambio gaseoso: extrae CO_2 de la sangre y añade O_2 con el fin de satisfacer la demanda metabólica del organismo).

Los pulmones, sin embargo, ejercen otras funciones aparte de la asociada con el intercambio de gases. Una es la función farmacocinética en la cual los sistemas enzimáticos de las células del lecho vascular pulmonar cambian la actividad biológica de una variedad de sustancias presentes en el paso del torrente sanguíneo¹ y otra, es la función endocrina en la que, sustancias biológicamente activas como péptidos, eicosanoides y otras son sintetizadas y liberadas de las células pulmonares. Estas dos últimas funciones son llamadas funciones metabólicas de los pulmones.

Metabolismo del ácido araquidónico en los pulmones

En la circulación, el ácido araquidónico (AA) es transportado por una proteína y es avidamente incorporado a la membrana celular de todos los tejidos corporales.² Antes de la incorporación a los diferentes lípidos, el AA se convierte en un intermediario activo, la araquidonil-Coa, en presencia de ATP y coenzima A y se incorpora a glicerofosfolípidos preformados, esterificándose en posición 2 en la mayoría de los tejidos de mamíferos.

El AA es liberado principalmente a través de la activación de la fosfolipasa tipo A_2 . Se piensa que esta reacción debe ser el paso limitante en la síntesis de metabolitos del AA biológicamente activos.³ En plaquetas, se ha demostrado que el AA puede ser liberado de los fosfolípidos por la acción de la fosfolipasa C.

Otra vía para la liberación del AA se obtiene a través de la acción de lipasas capaces de liberar ácidos grasos de lípidos neutros, aunque esta liberación no está totalmente aclarada.

Metabolismo oxidativo del AA

Una vez liberado de los fosfolípidos el AA del pulmón es metabolizado a través de dos vías enzimáticas: la ciclo-oxigenasa y la lipoxigenasa. Mientras la ciclo-oxigenasa se encuentra unida a la membrana, la 5-lipoxigenasa es una enzima soluble.^{4,5}

La ciclo-oxigenasa oxigena y cicliza el AA para formar los endoperóxidos cíclicos (P_GG_2 y P_GH_2) que son químicamente inestables (vida media 5 min a 37 °C y pH 7,5). Estos son isomerizados enzimáticamente o no a diferentes productos: P_GE_2 , P_GD_2 y

$\text{P}_G\text{F}_2\alpha$.³ Estos son también metabolizados enzimáticamente formando dos compuestos inestables: el tromboxano A_2 ($\text{Tx}A_2$) y la prostaciclina (P_GI_2), los cuales tienen efectos opuestos en el sistema cardiovascular.

El $\text{Tx}A_2$ es formado por un enzima denominada $\text{Tx}A_2$ sintetasa y presenta una vida media muy corta (30 s a 37 °C y pH 7,5).⁶ Su producto metabólico el $\text{Tx}B_2$ es prácticamente inactivo.

El $\text{Tx}A_2$ es un potente vasoconstrictor, broncoconstrictor, agregante plaquetario y citolítico mientras, la P_GI_2 es formada por una enzima, la prostaciclina sintetasa, inicialmente descrita en tejido vascular.⁷ La P_GI_2 es también inestable (vida media 3 min a 37 °C y pH 7,5) y es hidrolizada no enzimáticamente a un compuesto inestable, 6 oxo $\text{P}_G\text{F}_1\alpha$. La P_GI_2 es un potente anti y desagregante plaquetario con acción trombolítica, citoprotectora y fibrinolítica. La 6 oxo $\text{P}_G\text{F}_1\alpha$ retiene muy pocos de los efectos de su predecesor.

McGiff reportó⁸ que la P_GI_2 y la 6 oxo $\text{P}_G\text{F}_1\alpha$ pueden ser metabolizados por la 9 hydroxiprostaglandina dehidrogenasa hacia un compuesto estable y biológicamente activo, la 6 oxo P_GE_1 .

Los endoperóxidos son también transformados enzimáticamente ($\text{Tx}A_2$ sintetasa) o no hacia el ácido 17 hidroxil (HHT) con la formación de malonaldehído.⁹

La inactivación de prostaglandinas ocurre enzimáticamente mediante: su oxidación por la prostaglandina 15 OH dehidrogenasa,¹⁰ seguido de reducción de los 15 oxo derivados por la prostaglandina 13 reductasa¹¹ y una oxidación lenta de las cadenas laterales β y ω .¹² En pulmón la mayor vía metabólica es la P_GDH .¹³

Lipoxigenasa. Se han descrito varias lipoxigenasas que oxidan a peróxido el AA en diferentes posiciones. La 12 lipoxigenasa se encontró originalmente en pulmones y plaquetas.

La acción de la 5 lipoxigenasa inicia la formación de 5 HPTETE (ácido 5 hidroperoxil eicosatetraoico), el que a su vez es convertido en 5,6 epoxido más comúnmente conocido como leucotrieno A_4 ($\text{LT}A_4$). Este compuesto puede ser metabolizado por dos enzimas: una hidrolasa hacia ácido 5,12 dihidroxil eicosatetraoico^{14,16} o hacia sulfidipeptidoleucotrieno ($\text{LT}C_4$),¹⁷ por una glutatión S transferasa. La eliminación de glutamina del $\text{LT}C_4$ por la enzima γ -glutamyltranspeptidasa da lugar al $\text{LT}D_4$.

La unión de la glicina al $\text{LT}D_4$ por una dipeptidasa origina la formación de $\text{LT}E_4$.¹⁸

El LT F₄ es formado por la incorporación del ácido γ -glutámico al LT E₄ a través de la γ -glutamyl transpeptidasa.¹⁹

Los LT C₄, LT D₄ y LT E₄ son los principales mediadores bioactivos de la sustancia de reacción lenta de la anafilaxia (SRS-A,^{20,22}), los cuales poseen un potente efecto broncoconstrictor por lo que se sitúa entre los mediadores más importantes involucrados en el asma bronquial.

Localización celular y funciones metabólicas

La localización celular del metabolismo del AA en el pulmón no está aún bien aclarada. Un método para la identificación de las células involucradas en la síntesis de eicosanoides es la destrucción selectiva o inducción de daño de algún tipo de célula en el pulmón. Otro lo constituye la aplicación de un estímulo a una parte específica del tejido para la liberación de eicosanoides. Debido a que el pulmón posee dos superficies importantes con diferentes células, las vías aéreas y la vascular, la aplicación de los estímulos a cada superficie puede producir diferente liberación de eicosanoides.²³

Preparación del pulmón aislado

En este modelo experimental se emplean curieles machos (300 a 400 g de peso) y se anestesian con pentobarbital (60 mg/kg i.p.). Después de realizar la extracción del pulmón de la caja torácica, se canula la arteria pulmonar, perfundiéndose durante 5 min con 25 mL de solución Krebs heparinizada (10 U/mL). La tráquea se canula y los pulmones se suspenden en una cámara termostataada, perfundiéndose con solución Krebs (37 °C) y burbujeada con O₂ 95 % y CO₂ 5 % a una velocidad constante²⁴ de 5 mL/min. Esta perfusión puede realizarse a través de la tráquea.

Estímulos para la liberación de eicosanoides de pulmón aislado de curiel

La liberación de eicosanoides del pulmón de curiel puede ser ejecutada por diferentes estímulos y agentes químicos entre los que se encuentran, la histamina,^{24,26} la bradiquinina,^{24,27} la serotonina,²⁸ el ionóforo A23187 (A23187,²⁹), LTS,³⁰ PAF-aceter,³¹ traumas mecánicos³² y antígenos.^{24,33}

Técnica de Superfusión

El efluente pulmonar superfunde una serie de tejidos de bicensayo en forma de cascada,³⁴ como son: aorta de conejo (AC), tiras de estómago de rata (ER), aorta de rata (AR), tráquea de curiel (TC) y músculo liso de fleón de curiel (IC).

La selectividad de los tejidos de ensayo para evaluar eicosanoides se incrementa añadiendo al efluente que baña los tejidos una mezcla de antagonistas para la histamina (mepiramina, 1 μ mol/L; acetilcolina (atropina, 1,5 μ mol/L, catecolaminas (fenoxibenzamina 0,3 μ mol/L y propanolol 7 μ mol/L) y 5 hidroxitriptamina (metisergide 0,3 μ mol/L,³⁵ junto con indometacina (5,6 μ mol/L para prevenir la síntesis endógena de prostaglandinas por los tejidos de ensayo.³⁶

Bioensayo de eicosanoides

La administración de los diferentes agentes químicos se realiza a través de la arteria pulmonar que perfunde al pulmón con solución Krebs, después de estabilizado tanto el pulmón (20 min) como los tejidos (60 min).

La máxima liberación de eicosanoides inducida por AA (4 a 8 μ g) se obtiene, después del segundo minuto de haberse administrado este compuesto.

Vargaftig y Dao²⁷ y Palmer y col.³² han reportado que el AA exógeno promueve la liberación de TxA₂, endoperóxidos, PgE₂ y Pgl₂ en pulmón aislado de curiel.

El TxA₂ y en una extensión menor los endoperóxidos, son capaces de contraer la AR o AC así como la TC pero no el ER, mientras la PgE₂ solamente contrae el ER.

Las contracciones inducidas por la liberación de estos eicosanoides en los tejidos son reproducibles utilizando el doble de la dosis inicial de AA (8 a 16 μ mol/L) después de 40 min de reposo después de lavar tanto el pulmón como los tejidos con la superfusión continuada de solución Krebs.

Este entonces, representa un modelo adecuado para la evaluación de drogas inhibitoras: de la ciclo-oxigenasa (si cuando se administran a través del pulmón son capaces de inhibir la respuesta constrictora de los tres tejidos) de la TxA₂ sintetasa (si al perfundirse el pulmón con ellas se inhibe la respuesta constrictora en AR y TC pero no en ER como ocurre con el levamisol,³⁸ o antagonistas del TxA₂ (si al perfundirse a través de los tejidos son capaces de inhibir la contracción de la AR y la TC pero no del ER. En todos los casos debe chequearse la respuesta biológica de los tejidos con PgE₂ o PgF_{2 α} y adrenalina con el fin de conocer la variabilidad de la respuesta de los tejidos en el transcurso del experimento.

En cuanto a las células del pulmón que están involucradas con la liberación de eicosanoides por AA se ha sugerido que la Pgl₂ es liberada principalmente por el endotelio vascular y el TxA₂ por las células del parénquima pulmonar.³⁸ El AA es capaz de liberar más TxA₂ que Pgl₂ en el pulmón aislado de curiel.²³

El ácido araquidónico no induce un estímulo suficiente para promover la formación de LTS aún en presencia de indometacina, lo que sugiere que la síntesis de LTS en pulmón aislado de curiel no sólo depende de la disponibilidad de sustrato, sino también de la activación de la enzima 5 lipoxigenasa.²³ Sin embargo, el ionóforo de calcio A23187, así como la albúmina de huevo en pulmón de curieles sensibilizados, promueven la liberación de LTS. Esta liberación de LTS presenta un período de latencia de 5 a 10 min. Una explicación a esta demora pudiera encontrarse en el hecho que la población de células se encuentre físicamente distantes al estímulo.

La actividad biológica de los LTS liberados por ionóforo es muy similar a la inducida por la inyección de albúmina de huevo en pulmones de curieles sensibilizados. En diferentes estudios se ha demostrado que el principal LT liberado por estas sustancias²³ es el LT D₄.

Ambos agentes (el ionóforo y la albúmina de huevo) son capaces también de liberar los eicosanoides producidos por la vía de la ciclo-oxigenasa, al igual que el AA.

Los LTS son los únicos capaces de contraer la TC después de varios minutos de su liberación.

Este es por tanto, un modelo adecuado para la evaluación de drogas que inhiban la enzima 5 lipooxigenasa con la subsiguiente inhibición de la liberación de LTS, si previamente a estos estímulos (ionóforo y albúmina de huevo) se ha tratado al pulmón con indometacina (2 mg/L).

Una característica de este modelo es su no reproducibilidad cuando se utiliza como estímulo al ionóforo, debiendo utilizarse pulmones tratados y controles.

No todos estos estímulos o agentes químicos liberan iguales concentraciones de eicosanoides. Por radio inmuno-ensayo se conoce que el AA, ionóforo y la albúmina de huevo liberan más TxB₂ que la 6 oxo PgF_{1 α} , mientras la bradiquinina es el único agente que libera más 6 oxo PgF_{1 α} que TxB₂. La proporción TxB₂/6 oxo PgF_{1 α} no cambia con la variación de la dosis de los agentes empleados. Todas estas sustancias promueven la producción de eicosanoides a través de la liberación de AA endógeno.

Estos modelos también pueden ser utilizados para evaluar sustancias o agentes capaces de liberar eicosanoides del pulmón aislado de curiel, como el ozono, conocido agente oxidante, capaz de producir irritabilidad e hiperreactividad bronquial, el cual administrado en forma de gas, a través de la arteria pulmonar, es capaz de inducir liberación de TxA₂ y prostaglandinas en esta preparación.³⁹

BIBLIOGRAFIA

1. Vane J.R. Excerpta Medica, Amsterda. Symp. on Metabolic Functions of the lung, 1-10, 1980.
2. Ramwell P.W., Leovey E.K.M. and Sintetos A.L. *Biol. Reprod.*, **16**, 7, 1977.
3. Flower R.J. Handbook of Experimental Pharmacology, 50, Vane J.R. and Ferreira S.H. (eds) 374-422, Springer-Verlag, Berlin, 1978.
4. Borgeat P. and Samuelson B. *J. Biol. Chem.*, **254**, 2 643, 1979.
5. Ochi K., Yoshimoto T. and Yamamoto S. *J. Biol. Chem.*, **258**, 5 754, 1983.

6. Hamberg M., Svensson J. and Samuelsson B. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **72**, 2 994, 1975.
7. Moncada S., Gryglewski R. and Vane J.R. *Nature*, **263**, 665, 1976.
8. Mc Giff J.C., Strand J.C. and Lee J.B. *Nature(London)* **223**, 742, 1969.
9. Smith J.B. *J. Lab. Clin. Med.*, **88**, 167, 1976.
10. Anggard E. and Samuelsson B. *J. Biol. Chem.*, **239**, 4 097, 1964.
11. Anggard E. and Samuelsson B. *Bioch.*, **4**, 1 864, 1965.
12. Hamberg M. and Samuelsson B. *J. Biol. Chem.*, **245**, 6 713, 1971.
13. Anderson M.W. and Eling T.E. *Prostaglandins*, **11**, 645, 1976.
14. Borgeat P. and Samuelsson B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 2 148, 1979.
15. Borgeat P. and Samuelsson B. *J. Biol. Chem.*, **254**, 7 865, 1979.
16. Borgeat P. and Samuelsson B. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **76**, 3 213, 1979.
17. Murphy R.C., Hammarstrom S. and Samuelsson B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4 275, 1980.
18. Orning L., Hammarstrom S. and Samuelsson B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 2 014, 1980.
19. Anderson M.E., Allison D.R. and Meister A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 1 088, 1982.
20. Lewis R.A., Drazen J.M., Austen K.F. and Clark D.A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **96**, 271, 1980.
21. Morris H.R., Taylor G.W., Jones C.M., Piper R.J. and Samhoun M.N. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **79**, 4 838, 1982.
22. Morris H.R., Taylor G.W., Piper P.J. and Tippins J.R. *Nature (London)* **285**, 104, 1980.
23. De Nucci G. Thesis for the degree of Doctor of Philosophy in the University of London, 1986.
24. Piper P.J. and Vane J.R. *Nature (London)* **223**, 29, 1969.
25. Bakle T.S. and Smith T.W. *Br. J. Pharmacol.* **46**, 543, 1972.
26. Liebig R., Bernaver W. and Peskar B.A. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch.*, **284**, 279, 1974.
27. Vargaftig B. and Dao N. *Pharmacol.*, **6**, 99, 1972.
28. Alabaster V.A. and Bakle T.S. *Br. J. Pharmacol.*, **40**, 582, 1970.
29. Al-Ubaidi F. and Bakle Y.S. *Eur. J. Pharmacol.*, **62**, 89, 1980.
30. Piper P.J. y Samuelsson M.N. *Br. J. Pharmacol.* **77**, 267, 1982.
31. Lefort J., Rotilio D. and Vargaftig B.B. *Br. J. Pharmacol.*, **82**, 565, 1984.
32. Palmer M.A., Piper P. and Vana J.R. *Br. J. Pharmacol.* **49**, 228, 1973.
33. Hamberg M., Svensson J., Hedqvist P. and Samuelsson B. *Adv. Prost. Thromb. Res.*, **1**, 495, 1976.
34. Vane J.R. *Br. J. Pharmacol.*, **23**, 360, 1964.
35. Glimore N. *Nature (London)* **218**, 1 135, 1968.
36. Eckenfels A. and Vane J.R. *Br. J. Pharmacol.*, **45**, 451, 1972.
37. Arruzabala M.L. *Agents and Actions*, (in press).
38. Gryglewski R., Korbut R., Ocetkiewicz A., Splawinski J. and Swies J. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **304**, 45, 1978.
39. Arruzabala Valmaña M. de L. I Conferencia Nacional de Aplicaciones del Ozono, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de La Habana, Cuba, 9 y 10 de diciembre, 1989.

SISTEMA AUTOMATIZADO PARA EL CONTROL DE LA CALIDAD DE LAS AGUAS (SAMA)

El sistema está constituido por:

- Equipos electrónicos ECCA-1, ECCA-2, ECCA-3 los cuales miden pH, conductividad, temperatura, oxígeno disuelto y potencial
- Paquete SAMA con cinco programas de computación
- Electrodo y celda de conductividad
- Soluciones amortiguadoras y patrones

DESCRIPCION

Los equipos ECCA son equipos portátiles digitales que están diseñados para el trabajo en el campo y contemplan la posibilidad de su utilización en los laboratorios. Tienen la posibilidad de realizar mediciones *in situ* con gran exactitud lo que permite ejecutar determinaciones rápidas y seguras sin requerir el traslado de muestras. Admiten cualquier tipo de electrodo y celda de conductividad por tener un rango amplio de pendiente y ajuste de cero.

SAMA es un sistema que a partir del conocimiento de los valores de temperatura, pH y conductividad a una temperatura constante de 25 grados Celsius y la concentración de aniones y cationes en el agua, calcula:

ERRORES EN LA MEDICION

- pH: $\pm 0,02$
- Conductividad: $\pm 5 \%$
- Temperatura: $\pm 0,3$ grados Celsius
- Potencial: $\pm 0,1$ mV
- Veinticuatro relaciones iónicas de interés geoquímico
- El tipo de agua
- El grado de saturación en minerales que presente el agua
- El contenido de CO₂ disuelto
- La conductividad eléctrica teórica con vistas a corroborar la precisión de los análisis o completar la información hidroquímica

PRODUCIDO Y EXPORTADO POR:
PRODUCED AND EXPORTED BY:



Centro Nacional de Investigaciones Científicas

Avenida 25 y calle 158, Cubanacán, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba
Apartados Postales: 6880 y 6990 Teléfono: 21-8066 Télex: 51-1582 CNIC CU