

Expresión de endotelina-1 y receptores para endotelina ET_A y ET_B en arteria pulmonar en un modelo de daño pulmonar agudo

Claudia Hernández-Jiménez,* J. Raúl Olmos-Zúñiga,* Rogelio Jasso-Victoria,* Matilde Baltazar-Lipp,* Miguel Gaxiola-Gaxiola,* Jaime Villalba-Caloca,* Lidia Saraí Sánchez-Arrozena,* Martha E. Quiroz-Villegas,* Berenice López-González*

* Departamento de Cirugía Experimental, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas.

Trabajo recibido: 11-IX-2010; aceptado: 03-XI-2010

RESUMEN. Introducción: En el daño pulmonar agudo (DPA) inducido por ácido oleico (AO) existe un incremento en la producción de ET-1, pero no se ha reportado la distribución de sus receptores en las arterias pulmonares.

Objetivo: Determinar la expresión inmunohistoquímica de ET-1, ET_A y ET_B, y su distribución en las arterias pulmonares de perro con daño pulmonar agudo inducido por ácido oleico.

Material y métodos: Se utilizaron 12 perros que fueron divididos en 2 grupos de estudio: Grupo I (n = 6): control sano; Grupo II (n = 6): DPA producido con AO. Se evaluó mediante inmunohistoquímica la presencia de ET-1, ET_A y ET_B en los segmentos proximales y distales de las arterias pulmonares de ambos grupos.

Resultados: En ambos grupos se encontró expresión de ET-1 principalmente en endotelio y músculo liso, la localización de los receptores A fue en la capa media de los segmentos proximales de las arterias pulmonares; en los animales normales así como en los que desarrollaron DPA, los receptores B se expresaron en la capa media e íntima; los de la capa media se observaron en la región distal de la arteria, mientras que los de la íntima se expresaron en la región proximal de la misma.

Conclusiones: La expresión inmunohistoquímica de ET-1 en perros sanos como con DPA inducido por AO, se presenta en endotelio y músculo liso; mientras que los receptores ET_A se observaron en la capa media de las arterias pulmonares en su porción proximal, a diferencia de los ET_B que se expresan en la capa media de la porción distal, mientras que la tinción en la íntima es más abundante en los segmentos proximales.

Palabras clave: Endotelina, receptores ET_A, receptores ET_B, daño pulmonar agudo.

ABSTRACT. Introduction: In acute lung injury induced by oleic acid there is an increase in the production of ET-1, but has not reported the distribution of their receptors in the pulmonary arteries.

Objective: To determine the immunohistochemical expression of ET-1 ET_A and ET_B and its distribution in the pulmonary arteries of dogs with acute lung injury induced by oleic acid.

Material and methods: There were 12 dogs were divided into two study groups: Group I (n = 6): healthy control; Group II (n = 6): acute lung injury produced with AO DPA. Was evaluated immunohistochemically the presence of ET-1, ET_A and ET_B in the proximal and distal segments of the pulmonary arteries of both groups.

Results: In both groups found expression of ET-1 primarily in endothelial and smooth muscle, the location of the ET_A was in the middle layer of the proximal segments of the pulmonary arteries, in normal animals and in those who developed DPA; the B receptors were expressed in the media and intima, the middle layer observed in the distal region of the artery, while the intima is expressed in the proximal part of it.

Conclusion: The immunohistochemical expression of ET-1 in healthy dogs as oleic acid-induced DPA is shown in endothelial and smooth muscle, while ET_A receptors were observed in the middle layer of the pulmonary arteries in their proximal portion, unlike the ET_B expressed in the middle layer of the distal portion, while the staining in the intima is more abundant in the proximal segments.

Key words: Endothelin, ET_A receptors, ET_B receptors, acute lung injury.

INTRODUCCIÓN

El lecho arterial pulmonar es complejo, no sólo en estructura, sino también en función, y puede verse afectado por diversas enfermedades estimulando mecanismos de defensa; y en

particular, la liberación de endotelinas (ET), las cuales son un grupo de péptidos con propiedades vasoconstrictoras producidas y liberadas por diversos tipos celulares como respuesta a diferentes estímulos; existen tres isoformas clonadas y caracterizadas de ET: ET-1, ET-2 y ET-3.¹

La ET-1 es expresada en el pulmón por las células endoteliales, bronquiales, alveolares, macrófagos tisulares, y ejerce su efecto a través de dos receptores específicos denominados A y/o B (ET_A y/o ET_B).² El subtipo A está presente en músculo liso de la vasculatura pulmonar y participa en la vasoconstricción, proliferación, además de mediar la respuesta en arterias proximales. Mientras que los receptores B (que también participan en la depuración de ET-1) se encuentran, tanto en células endoteliales como en el músculo liso, su función principal es producir vasodilatación a través de la liberación de óxido nítrico y prostaglandinas con lo cual regulan la respuesta de las arterias distales.^{3,4}

En la literatura se ha descrito que en patologías que provocan hipoxia, como asma, hipertensión arterial pulmonar y daño pulmonar agudo (DPA) existe incremento de ET-⁵⁻⁸ sin embargo, la expresión y distribución de sus receptores aún no se ha reportado en arterias pulmonares con DPA.

En el Laboratorio de Cirugía Experimental del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas se ha trabajado desde hace varios años con un modelo de DPA inducido por ácido oleico (AO), observando un daño patológicamente similar al descrito en el síndrome de dificultad respiratoria aguda.⁹ Por este motivo, en el presente trabajo se consideró importante estudiar la distribución de los receptores ET_A y ET_B en las arterias pulmonares de perros con DPA.

Nuestro objetivo fue determinar la expresión inmunohistoquímica de ET-1, ET_A y ET_B y su distribución sobre la simetría axial de la arteria pulmonar de perro con DPA inducido por AO.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales de experimentación

Se utilizaron 12 perros mestizos adultos sanos, sin importar el sexo, con peso entre 15-20 kg que fueron manejados de acuerdo con las Especificaciones Técnicas para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999,¹⁰ así como la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio en Estados Unidos.¹¹

Grupos de estudio

Para su estudio los animales fueron divididos en dos grupos:

Grupo I (n = 6): control sano

Grupo II (n = 6): se le produjo DPA con AO (*cis*-9- ácido octadenoico; sigma Aldrich, Germany).

Modelo experimental

Previo a la inducción de DPA, los animales fueron anestesiados con clorhidrato de tiletamina y zolazepam (Zoletil 50 Virbac S.A., Guadalajara, México) 8 mg/kg IV Fentanil (Janssen-Cilag, Puebla, México) 0.02 mg/kg IV, atropina (*Atropisa, Pisa, Guadalajara, México*) 0.02 mg/kg IV, acepromacina (Calmivet Vetoquinol S.A., México) 0.02 mg/kg IV y ésta se mantuvo durante todo el estudio con isofluorano al 1.5% con FiO_2 al 100%, volumen corriente a 10 mL/kg y 20 respiraciones por min, además, se les administró solución Hartman 10 mL/kg/h. Inmediatamente después se colocaron catéteres de una sola luz en la arteria y vena femoral (Cordis Corp, Johnson & Johnson, CA, USA) para la producción del DPA, la evaluación de las presiones arteriales sistémicas y toma de muestras para los estudios gasométricos. También se colocó un catéter de termodilución de 5F (Swan Ganz, Standard Thermodilution Balloon Catheter, Edwards Lifesciences, Ontario, Canadá) en la yugular para el registro del gasto cardíaco, resistencias vasculares pulmonares y sistémicas (Hemodynamic Profile Computer Spectramed model SP-1445, Oxnard, CA-USA), presiones pulmonares y presión venosa central con el monitor electrocardiográfico.

Inducción del daño pulmonar agudo

Para la inducción de DPA en el grupo II, a través del catéter femoral se administró durante 20 min y con flujo constante 0.5 mL/min una solución que contenía AO (*cis*-9- ácido octadenoico; Sigma Aldrich, Germany) a dosis de 0.09 mL/kg de peso vivo, el cual fue diluido en una solución 1:1 con etanol y llevado a un volumen final cbp 10 mL con solución salina fisiológica.

EVALUACIÓN

El estudio tuvo una duración de 165 minutos. Durante este tiempo se realizó evaluación gasométrica, hemodinámica, así como radiográfica para la identificación de DPA y se consideró que estaba presente cuando se mostró: hipoxemia ($PaO_2/FIO_2 < 300$), presión de la arteria pulmonar en cuña < 18 mmHg e infiltrados alveolares bilaterales en placa simple de tórax.

Inmunohistoquímica

Al concluir el estudio, aún bajo anestesia, los animales se sometieron a eutanasia con sobredosis de pentobarbital sódico (Anestesal, Pfizer S.A. de C.V. México)⁹ y se tomaron las arterias pulmonares izquierdas desde su salida en el tronco; posteriormente, fueron colocadas en

formol al 10% por 24 h, incluidas en parafina y con cortes de 3 micras, se montaron en laminillas silanizadas, se desparafinaron durante 20 min a 80°C, se deshidrataron mediante transferencia en xilol 5 min a alcohol absoluto durante 1 min, después se colocaron en la cámara de recuperación de antígenos con buffer de citratos pH: 6 para ET-1; y para receptores ETA y ETB TRIS-HCL, pH: 10, se recuperaron antígenos con calor en horno de microondas¹² a punto de ebullición 5 min, se dejó enfriar y se lavaron con TBST 3 veces por 3 min. La peroxidasa endógena se removió con peróxido de hidrógeno y suero bloqueador durante 10 min, se lavó nuevamente con TBST. Una vez eliminada la peroxidasa endógena se utilizó el sistema Biotina-Streptavidina-peroxidasa, (Vectastain Universal Quick Kit., Burlingame, CA), las secciones de tejido fueron incubadas con los anticuerpos primarios (ABR-Affinity BioReagents, ANTI-Endothelin Monoclonal Antibody, Fitzgerald Endothelin B Receptor Polyclonal Antibody, Fitzgerald Endothelin Receptor A Polyclonal Antibody), diluidos en un buffer (suero bloqueador) durante 24 h a 4°C; pasado este tiempo fueron lavadas nuevamente con TBST 3 lavados de 3 min cada uno y se procedió a la incubación con el segundo anticuerpo biotilinado universal (Vectastain Universal Quick Kit, Burlingame, CA) 10 min, lavándose al final 3 tiempos 3 min cada uno, fueron incubadas con streptavidina/peroxidasa (Vectastain Universal Quick Kit Burlingame, CA) por 10 min y se lavaron como ya se describió, se utilizó Amino-etilcarbazol (AEC substrate Pack Biogenex, San Ramón CA, USA) como revelador durante 5 minutos y finalmente se trataron con hematoxilina para virar el contraste.¹³ Se realizaron controles negativos en ambos grupos sustituyendo el anticuerpo primario por TBST.

Las secciones fueron evaluadas con microscopía de luz y la intensidad de la inmunotinción fue graduada semicuantitativamente con una escala de 0 a 3: Grado 0, sin tinción; Grado 1, focal o tinción débil; Grado 2, difuso moderado; y Grado 3, tinción intensa. La revisión de las laminillas fue realizada de manera independiente por dos investigadores.

Análisis estadístico

El análisis de datos se realizó mediante el programa SPSS versión 15.0 (SPSS Inc. Chicago Illinois); los datos obtenidos fueron analizados por t-Student. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron significativos.

RESULTADOS

Después de realizar las evaluaciones gasométrica, hemodinámica y radiográfica se observó que el 100%

del Grupo I no desarrolló DPA durante todo el tiempo de estudio, mientras que el 100% de los animales del grupo II desarrolló DPA posterior a la inyección de AO desde el minuto 60, manteniéndose hasta el final del estudio (figura 1), lo cual se caracterizó por incremento en la presión de la arteria pulmonar (17.6 ± 3.6 mmHg), resistencias vasculares pulmonares (598 ± 288) y disminución en la PaO_2 (76 ± 51.2 mmHg).

Hallazgos inmunohistoquímicos

El análisis inmunohistoquímico reveló tinción difusa moderada (Grado 2) de ET-1 en el 33.33% de las muestras del grupo I; mientras que en el grupo II, se observó tinción focal (Grado 1) en el 66.66% de las muestras ($p < 0.007$ t-Student). Con respecto al sitio de distribución se encontró principalmente en endotelio seguido por músculo liso, en ambos, con un patrón citoplasmático difuso (figura 2).

Respecto a la expresión de receptores, los estudios revelaron que el ET_{A} , presentó tinción intensa (Grado 3) en el 50% de las muestras de tejido de los grupos I, y 100% del grupo II ($p = \text{NS}$ t-Student). En el grupo I, los receptores A se localizaron en la capa media de las arterias con una expresión predominante en los segmentos proximales (figura 3).

En relación con la expresión de los receptores ET_{B} , en ambos grupos se presentó tinción intensa (Grado 3) en el 66.66% de las muestras del grupo I, y el 83.33% del grupo II ($p = \text{NS}$ T-Student). Estos receptores se expresaron en la capa media e íntima de los segmentos distales de la arteria pulmonar. Aunque la tinción en la íntima fue mayor en los segmentos proximales (figura 3).



Figura 1. Rayos X de tórax en proyección ventrodorsal que muestra infiltrados alveolares difusos a los 165 minutos post administración del ácido oleico.

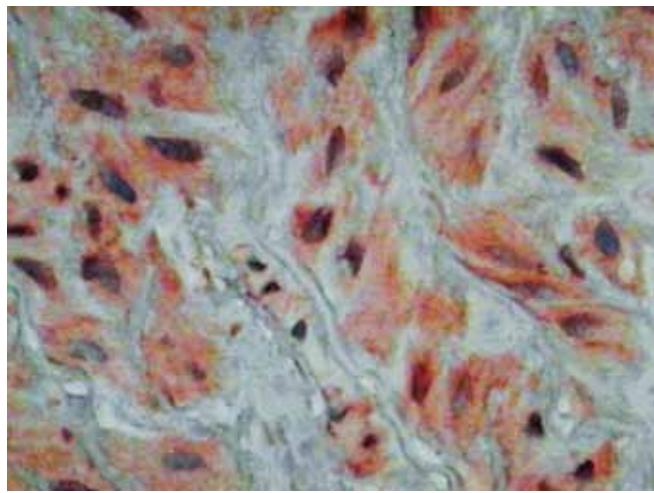


Figura 2. Micrografía de la capa media de arteria pulmonar 40X que muestra el patrón citoplasmático difuso de la inmunotinción.

DISCUSIÓN

La ET-1 actúa como modulador local del tono vascular y sus receptores son expresados en células endoteliales y musculares lisas. La ET-1 actúa de forma autocrina o paracrina, tanto en condiciones normales como en algunas patologías que provocan hipoxia; sin embargo, la distribución de los receptores durante el DPA aún no ha sido descrita, por lo que en este estudio se determinó la expresión y distribución de la ET-1 y sus receptores ET_B y ET_A en las arterias pulmonares de perro con DPA inducido por AO.

En este trabajo se observó que todos los perros a los que se les administró AO desarrollaron DPA que alteró la hemodinamia (incremento en la presión y resistencias vasculares pulmonares), así como las gasometrías y la imagenología de los animales, como ha sido descrito por otros autores que han utilizado este ácido graso en perro al igual que en otras especies animales.¹⁴

La presencia de ET-1 en ambos grupos de estudio coincide con lo descrito en la literatura, en donde se menciona que ésta se expresa en condiciones normales, así como en situaciones de hipoxia (como se observó en este estudio).¹⁵⁻¹⁷ El grado mayor de tinción de receptores A en los animales con DPA, los cuales presentaron incremento en la presión y las resistencias vasculares, indica que la ET-1 estimuló la expresión del receptor y por eso se provocó la vasoconstricción pulmonar concordando con lo descrito en estudios farmacológicos en los que utilizaron anillos vasculares de arteria pulmonar que mostraron disminución de la contracción inducida por ET-1 por antagonismo selectivo de receptores A, que fue

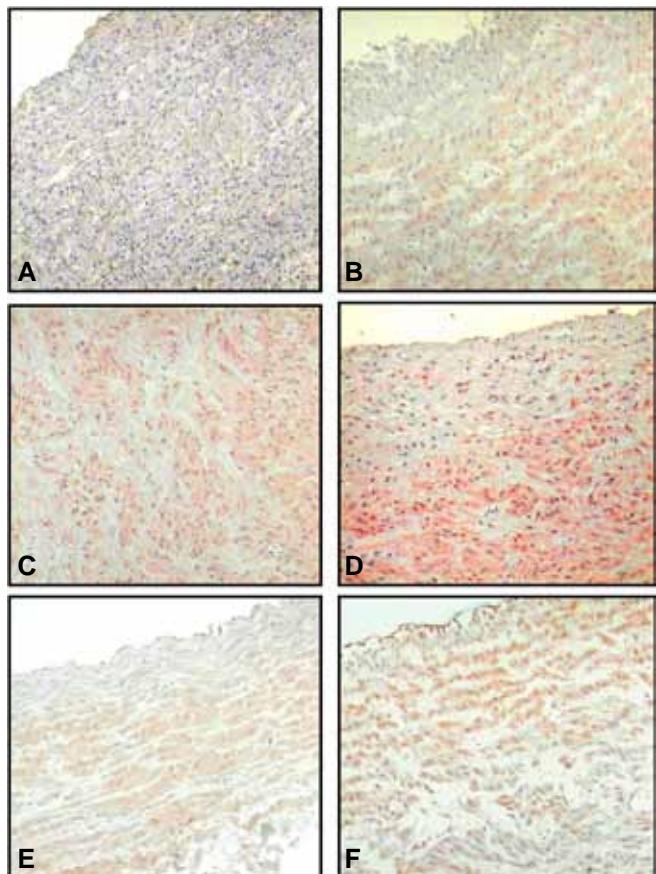


Figura 3. Micrografías de tejido arterial (inmunohistoquímica). Las secciones de arteria pulmonar fueron incubadas con anticuerpos anti ET-1, anti- ET_A , anti- ET_B , detectadas como en el método descrito, y muestran: **A)** tinción negativa anti-ET-1 en la capa media de arteria pulmonar de un animal del grupo I; **B)** expresión de ET-1 en la capa media de un animal del Grupo II; **C** y **D)** inmunotinción con receptores anti- ET_A de un segmento proximal de arteria pulmonar de un animal del grupo I y II, respectivamente; **E)** corte inmunohistoquímico de un animal del grupo I con tinción positiva para anti- ET_B ; y **F)** expresión de ET_B en segmento distal en capa íntima y media de un animal del grupo II.

más significativo en vasos grandes que en pequeños.^{18,19} En relación con los receptores B, en la literatura se ha descrito que producen vasoconstricción asociada a la expresión de ET-1²⁰ y estos hallazgos coinciden con lo observado en este estudio en el que se observó mayor expresión en el grupo con DPA.

Acerca de la localización de ET-1, en ambos grupos se expresó principalmente en células musculares lisas y, posteriormente, en endotelio de arterias pulmonares, lo que concuerda con lo visto por Takahashi et al¹⁸ quienes al realizar estudios de hipoxia en ratas demostraron que la Big ET-1 y la enzima convertidora de endotelina se

coexpresaron *in vivo*, tanto en la capa media como en la íntima de las arterias pulmonares que se sometieron a condiciones normales de oxigenación y a hipoxia, siendo mayor la localización de la Big ET en la capa media que en la íntima de los segmentos distales de la arteria pulmonar, mientras que en los segmentos proximales se encontró en mayor proporción en la íntima. También nuestros hallazgos son consistentes con un estudio donde células musculares lisas aisladas de arteria pulmonar de borrego expresaron Big ET y ECE,¹⁵ lo que sugiere que las células musculares lisas, así como las células endoteliales son una importante fuente de ET-1 en arteria pulmonar con normoxia y DPA.

En este estudio se encontró que la localización de los receptores A fue en la capa media de los segmentos proximales de las arterias pulmonares y se correlaciona con lo descrito por Bonvallet *et ál*¹⁹ y MacLean *et ál*,²⁰ quienes observaron mayor presencia de éste también en la zona proximal al evaluar los efectos de diferentes fármacos sobre la contracción inducida por la ET-1 en la circulación pulmonar de ratas.

En los animales normales así como en los que desarrollaron DPA, los receptores B se expresaron en la capa media e íntima; los de la capa media se observaron en la región distal de la arteria, mientras que los de la íntima se expresaron en la región proximal de la misma. Estos resultados coinciden con lo descrito por MacLean *et ál*,²¹ quienes al evaluar en ratas el efecto de ambos receptores como mediadores de vasoconstricción observaron que los ET_B provocan este efecto en los segmentos distales de arteria pulmonar. Además, refieren que cuando estos receptores se expresan en las capas de músculo liso de arterias elásticas y arterias musculares grandes, su efecto vasoconstrictor puede ser cancelado por el efecto vasodilatador mediado por los receptores B expresados en el endotelio.

Con base en lo anterior se puede concluir que la expresión inmunohistoquímica de ET-1 en perros sanos como con DPA inducido por AO, se presenta en endotelio y músculo liso; mientras que los receptores ET_A se observaron en la capa media de las arterias pulmonares en su porción proximal, a diferencia de los ET_B que se expresan en la capa media de la porción distal, y que la tinción en la íntima es más abundante en los segmentos proximales.

REFERENCIAS

- Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, et ál. *The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isoforms predicted by three separated genes.* Proc Natl Acad Sci USA 1989;86:2863-2867.
- Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S. *Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor.* Nature 1990;348:730-732.
- Summer MJ, Cannon TR, Mundin JW, White DG, Watts IS. *Endothelin ET_A and ET_B receptors mediate vascular smooth muscle contraction.* Br J Pharmacol 1992;107:858-860.
- Levin ER. *Endothelins.* N Engl J Med 1995;333:356-363.
- Maguire JJ, Davenport AP. *ET_A receptor-mediated constrictor responses to endothelin peptides in human blood vessels in vitro.* Br J Pharmacol 1995;115:191-197.
- Michael JR, Markowitz BA. *Endothelins and the lung.* Am J Respir Crit Care Med 1996;154(3 Pt 1):555-581.
- Simmet T, Pritze S, Thelen KI, Peskar BA. *Release of endothelin in the oleic acid-induced respiratory distress syndrome in rats.* Eur J Pharmacol 1992; 211:319-322.
- Finsnes F, Christensen G, Lyberg T, Sejersted OM, Skjønsberg OH. *Increased synthesis and release of endothelin-1 during the initial phase of airway inflammation.* Am J Respir Crit Care Med 1998;158(5 Pt 1):1600-1606.
- Hernández-Jiménez C, Jasso-Victoria R, Olmos-Zúñiga R, et ál. *Modelo experimental canino de daño pulmonar agudo producido con ácido oleico: estableciendo un modelo de trabajo.* Rev Invest Clin 2010;62:222-230.
- Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.* Diario Oficial de la Federación de los Estados Unidos Mexicanos. AFIA 6 diciembre, 1999.
- National Institutes of Health USA. *Guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio.* Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health USA. México, DF: Academia Nacional de Medicina; 2002.
- Shi SR, Key ME, Kalra KL. *Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections.* J Histochem Cytochem 1991;39:741-748.
- Luttmann W, Bratke K, Myrtek D. *Inmunología. Manual de técnicas de investigación en el laboratorio.* Zaragoza, España: Acribia; 2009.
- Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. *Animal models of acute lung injury.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2008;295:L379-L399.
- Tcheknava E, Quertermous T, Christman BW, Lawrence ML, Meyrick B. *Regional variability in prepro-endothelin-1 gene expression in sheep pulmonary artery and lung during the onset of air-induced chronic pulmonary hypertension. Participation of arterial smooth muscle cells.* J Clin Invest 1998;101:1389-1397.
- Zamora MR, Stelzner TJ, Webb S, Panos RJ, Ruff LJ, Dempsey EC. *Overexpression of endothelin-1 and enhanced growth of pulmonary artery smooth muscle cells from fawn-hooded rats.* Am J Physiol 1996;270 (1 Pt 1):L101-L109.
- Tcheknava E, Lawrence ML, Meyrick B. *Cell-specific differences in ET-1 system in adjacent layers of main pulmonary artery. A new source of ET-1.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2000;278:L813-L821.
- Takahashi H, Soma S, Muramatsu M, Oka M, Ienaga H, Fukuchi Y. *Discrepant distribution of big endothelin (ET)-*

- 1 and ET receptors in the pulmonary artery. Eur Respir J 2001;18:5-14.
19. Bonvallet ST, Oka M, Yano M, Zamora MR, McMurtry IF, Stelzner TJ. BQ123, an ET_A receptor antagonist, attenuates endothelin-1-induced vasoconstriction in rat pulmonary circulation. J Cardiovasc Pharmacol 1993; 22:39-43.
20. MacLean MR, McCulloch KM, Baird M. Effects of pulmonary hypertension on vasoconstrictor responses to endothelin-1 and sarafotoxin S6C and on inherent tone in rat pulmonary arteries. J Cardiovasc Pharmacol 1995;26:822-830.
21. MacLean MR, McCulloch KM, Baird M. Endothelin ET_A - and ET_B -receptor-mediated vasoconstriction in rat pulmonary arteries and arterioles. J Cardiovasc Pharmacol 1994;23:838-845.

✉ Correspondencia:

Dra. Claudia Hernández Jiménez,
Departamento de Cirugía Experimental. Instituto
Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael
Cosío Villegas. Calzada de Tlalpan Núm. 4502,
colonia Sección XVI. México, D.F., 14080.
Teléfono 54 87 17 06 extensión 5180
Correo electrónico: claudia_herjim@yahoo.com

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.