

Participación de las quimioquinas MCP-1 y MIP-2 en el daño pulmonar secundario a isquemia/reperfusión

Adrián Carrasco Munera. Blanca Bermudo. Alberto Calvo.

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III. Facultad de Medicina. Plaza Ramón y Cajal, s/n. Ciudad Universitaria 28040 - Madrid. (Grado en Medicina. Universidad Complutense de Madrid).
adrianca@estumail.ucm.es

Elena Vara Ameigeiras. Sergio Damián Paredes Royano. Carlos M. Simón Adiego.

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III y Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina. Servicio de Cirugía Torácica, HGUGM
evaraami@ucm.es

Resumen: La isquemia/reperfusión (I/R) produce una respuesta inflamatoria aguda caracterizada por el reclutamiento de células inflamatorias, stress oxidativo y fallo endotelial, causando edema intersticial y disfunción del órgano. La Proteína Quimioatrayente Monocitaria 1 (MCP-1) y la Proteína Inflamatoria de Macrófago 2 (MIP-2) son quimiotácticas de neutrófilos in vitro y se ha descrito que participan en el daño tisular inflamatorio dependiente de neutrófilos. El objetivo de este trabajo fue determinar la implicación de MCP-1 y MIP-2 en el daño tisular inducido por la I/R en pulmón. Para ello, diez cerdos large-white fueron sometidos a autotrasplante de pulmón izquierdo. Para medir los niveles de MCP-1 y MIP-2, se tomaron muestras de pulmón en cuatro momentos: 5 minutos antes de clampar la arteria pulmonar, 5 minutos antes de la reperfusión y 30 y 60 minutos tras la reperfusión. Además, se midió el contenido de Mieloperoxidasa (MPO), los niveles de ICAM-1 y el edema pulmonar. La I/R pulmonar causó un daño pulmonar sustancial determinado por el edema pulmonar, que fue acompañado por un incremento de la actividad MPO ($p < 0,05$). Tras 30 minutos de reperfusión, los niveles de MCP-1 y de MIP-2 aumentaron, comparados con los observados antes de la reperfusión ($p < 0,05$) y un aumento mayor fué observado a los 60 minutos post-reperfusión ($p < 0,05$). Estos resultados sugieren que la expresión local de MCP-1 y MIP-2 puede estar implicada en el daño tisular dependiente de neutrófilos inducido por la I/R.

Palabras clave: Isquemia/Reperfusión. Pulmón. Autotrasplante. Neutrófilo. MCP-1 y MIP-2.

ANTECEDENTES

Una de las claves de la inflamación aguda es el reclutamiento de polimorfonucleares (PMNs). Se ha descrito que numerosos mediadores están

implicados en este proceso, incluyendo leucotrienos, componentes del complemento, productos bacterianos y citoquinas. La disfunción de la barrera endotelial es bien conocida por su papel como respuesta de la microvasculatura a diferentes condiciones patológicas asociadas a inflamación. El aumento en la permeabilidad vascular puede conducir a un exceso de filtración de fluidos y proteínas causando edema intersticial y disfunción del órgano.

La hiperpermeabilidad endotelial ligada a la inflamación ha sido atribuida a varios mediadores solubles liberados por células inflamatorias locales o circulantes, que interactúan con receptores endoteliales permitiendo el intercambio de líquido y solutos⁽¹⁾. Otros procesos y factores como la tasa de intercambio, adhesión y migración transendotelial de leucocitos también participan en la disfunción de la barrera endotelial asociada a la inflamación⁽¹⁾.

La acumulación de neutrófilos puede aumentar la liberación de especies reactivas de oxígeno y proteasas promoviendo un daño tisular progresivo⁽²⁾. No obstante, los mecanismos por los cuales la isquemia y la reperfusión inducen la acumulación neutrofílica y el consecuente daño tisular son desconocidos. Un aumento en la producción de citoquinas proinflamatorias se asocia con el daño tisular dependiente de neutrófilos secundario a la isquemia-reperfusión⁽³⁾ y, aunque el Factor de Necrosis Tumoral α (TNF α) no induce por sí mismo la quimiotaxis de neutrófilos, nuestro grupo recientemente demostró que la isquemia de pulmón seguida por 30 minutos de reperfusión aumenta también la expresión local de la Proteína Quimioatrayente Monocitaria 1 (MCP-1)⁽⁴⁾. Sin embargo, la participación de otras quimioquinas en el daño pulmonar por isquemia y reperfusión aún no han sido estudiadas en profundidad.

Las Proteínas Inflamatorias de Macrófagos (MIP) pertenecen a la familia de las quimioquinas quimiotácticas. Son cruciales en las respuestas inmunes frente a infección e inflamación⁽⁵⁾. Estas quimioquinas activan granulocitos humanos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) que pueden conducir a una inflamación neutrofílica aguda. También inducen la síntesis y liberación de otras citoquinas proinflamatorias como Interleuquina 1 (IL-1), Interleuquina 6 (IL-6) y Factor de Necrosis Tumoral α (TNF α). El objetivo del presente estudio fue determinar la implicación de MIP-2 en el daño tisular local en pulmón en I/R.

MÉTODOS

Este estudio se realizó bajo la aprobación del Comité de Investigación y Experimentación animal, cumpliendo las directrices de la Convención Europea para la utilización de animales de experimentación.

Diez cerdos large-white de entre 35 y 45 kg de peso fueron sometidos a un autotrasplante de pulmón izquierdo ortópico (neumonectomía izquierda, lobectomía craneal ex situ y reimplantación del lóbulo caudal izquierdo), seguido de una reperfusión del injerto de 30 minutos. El protocolo de anestesia y la técnica quirúrgica para este modelo de autotrasplante pulmonar han sido recientemente descritos detalladamente por Simón-Adiego y cols⁽⁶⁾. Biopsias de tejido pulmonar fueron tomadas en cuatro momentos diferentes: 5 minutos antes de clampar la arteria pulmonar, 5 minutos antes de la reperfusión y 30 y 60 minutos tras la reperfusión. Cada muestra de pulmón se introdujo en un criotubo e inmediatamente fue congelada con nitrógeno líquido y conservada a -80° C hasta el análisis bioquímico. La preparación de las muestras ha sido previamente descrita en detalle⁽⁴⁾.

Para la determinación de los niveles de MCP-1 y MIP-2 en pulmón, se utilizaron kits específicos de ELISA. Además, se determinaron los niveles de ICAM-1, actividad mieloperoxidasa (MPO) y el edema pulmonar. La determinación de MPO, como índice de acumulación de neutrófilos, se realizó usando el método de Bradley modificado⁽⁷⁾. El edema pulmonar fue determinado por el ratio peso húmedo - peso seco.

RESULTADOS

La isquemia-reperfusión (I/R) pulmonar indujo un daño tisular, objetivado por el edema pulmonar. Este edema fue acompañado de un aumento de actividad MPO, ($p < 0,05$). Tras 30 minutos de reperfusión, tanto los niveles de MCP-1 como los de MIP-2 aumentaron significativamente comparados con los niveles de la neumonectomía ($p < 0,05$) y hubo un aumento mayor observado a los 60 minutos tras reperfundir ($p < 0,05$). La isquemia elevó los niveles de ICAM-1 en el pulmón y de nuevo estos niveles se incrementaron aún más tras 30 y 60 minutos de reperfusión.

DISCUSIÓN

El trasplante pulmonar, el trasplante de lóbulo pulmonar de donante vivo, las resecciones pulmonares y las arterioplastias pulmonares son procedimientos complejos que requieren la isquemia del pulmón durante un tiempo determinado. La isquemia pulmonar y la consecuente reperfusión pueden precipitar en LIRI (*Lung Ischemia-Reperfusion Injury*), que es una causa de morbilidad funcional y mortalidad. Estudios clínicos y experimentales han sugerido que el daño por I/R ocurre en un patrón bifásico. Se ha demostrado que los macrófagos alveolares, que se activan durante la isquemia, tienen un papel crucial en la fase temprana de reperfusión⁽⁸⁾, mientras que la actividad de neutrófilos y linfocitos tiene mayor importancia en la fase tardía, durante las 24 h subsiguientes^(8, 9, 10). Además, numerosos estudios han documentado que la I/R incrementa el stress oxidativo y que los macrófagos producen

citoquinas pro y antiinflamatorias ante este stress⁽¹⁰⁾. Algunas de estas citoquinas liberadas por los macrófagos antes y después de la reperfusión estarán implicadas en el reclutamiento de neutrófilos y linfocitos hacia el pulmón durante la reperfusión⁽¹¹⁾. Los resultados del presente estudio son consistentes con aquellos hallazgos dado que un incremento en la actividad de la MPO, que es indicador de la activación neutrofílica, fue observado sólo tras la reperfusión, mientras que el edema pulmonar era evidente antes de la acumulación de neutrófilos.

Se ha propuesto que las quimioquinas podrían jugar un papel crucial en el reclutamiento de macrófagos en la inflamación y el daño tisular⁽⁵⁾. El aumento de los niveles de MIP-2 y MCP-1, tras 30 minutos post-reperfusión, apoyan esta hipótesis. Además, el hecho de que los niveles de MIP-2 en el pulmón fueran aún mayores tras 60 minutos desde la reperfusión, sugiere que MIP-2 es una quimioquina inducible.

Varios mecanismos del daño tisular mediado por neutrófilos han sido propuestos, incluyendo el aumento de la expresión de moléculas de adhesión en la superficie celular que incrementa la adherencia de los neutrófilos al endotelio. Se ha demostrado que MIP-2 aumenta la expresión en neutrófilos de Integrinas $\beta 2$ ⁽¹²⁾ y por ello, además de servir como un potente quimioatrayente de neutrófilos, MIP-2 podría incrementar las interacciones adhesivas entre neutrófilos y endotelio. En el presente estudio, observamos una elevación de los niveles de ICAM-1 en pulmón relacionado con un aumento en los niveles de MIP-2, sugiriendo que MIP-2 podría tener un papel en el daño pulmonar inducido por I/R como se había observado en otros tejidos.

En conclusión, estos resultados sugieren que la expresión local de MCP-1 y MIP-2 podría estar implicada en el daño pulmonar dependiente de neutrófilos inducido por I/R.

BIBLIOGRAFÍA

1. Carden DL and Granger DN. Pathophysiology of ischaemia–reperfusion injury. *J Pathol* 2000; 190:255–266.
2. Jaeschke H, Farhood A et al. Functional inactivation of neutrophils with a Mac-1 (CD11b/CD18) monoclonal antibody protects against ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Hepatology* 1993;17:915-923.5.
3. Casanova J, Garutti I et al. The effects of anesthetic preconditioning with sevoflurane in an experimental lung autotransplant model in pigs. *Anesthesia and Analgesia* 2011; 113(4):742-748.
4. Simón C, Vara E et al. Modulation of monocyte chemoattractant protein-1 expression by ischemic preconditioning in a lung Autotransplant model. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2012; 41(4):933-9.

5. Ren M, Guo Q, et al. "Polymerization of MIP-1 chemokine (CCL3 and CCL4) and clearance of MIP-1 by insulin-degrading enzyme". *EMBO J.* 2010; 29 (23): 3952–66.
6. Simón Adiego C, González-Casaurrán G et al. Experimental swine lung autotransplant model to study lung ischemia-reperfusion injury. *Arch Bronconeumol* 2011; 47:283–9.
7. Bradley PP, Priebe DA et al. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 1982; 78:206–9.
8. Eppinger MJ, Deeb GM et al. Mediators of ischemia-reperfusion injury of rat lung. *Am J Pathol* 1997;150:1773–84.
9. Fiser SM, Tribble CG et al. Lung transplant reperfusion injury involves pulmonary macrophages and circulating leukocytes in a biphasic response. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001; 121:1069–75.
10. Eppinger MJ, Jones ML et al. Pattern of injury and the role of neutrophils in reperfusion injury of rat lung. *J Surg Res* 1995; 58:713–8.
11. de Perrot M, Sekine Y et al. Interleukin-8 release during early reperfusion predicts graft function in human lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165:211–15.
12. Shanley TP, Schmal H et al. Requirement for C-X-C chemokines (macrophage inflammatory protein-2 and cytokine-induced neutrophil chemoattractant) in IgG immune complex-induced lung injury. *J Immunol* 1997; 158:3439-3448.

Recibido: 17 marzo 2014.

Aceptado: 26 abril 2014.