

MICROEMBOLIA PULMONAR EXPERIMENTAL Participación relativa de trombina, serotonina y tromboxano A₂

*Rosa Amalia Bobadilla**
*Alicia Arévalo Padilla**
*Víctor M. Pérez-Álvarez***
*Dolores Hernández Hernández**

RESUMEN

En el presente trabajo se empleó un modelo que genera trombosis arterial y simultáneamente trombosis miliar pulmonar, mediante la administración intravenosa de una suspensión de fibrillas de colágena, y se evaluó la participación relativa de sustancias vasoactivas (serotonina, tromboxano A₂ y trombina) en los cambios en presión arterial media (PAM) y presión sistólica de ventrículo derecho (PSVD) producidos por dicho reto experimental en conejos blancos Nueva Zelanda. Los resultados mostraron que la serotonina es un importante mediador en los cambios observados a través de la activación de receptores 5HT₂ en la hipertensión pulmonar, en tanto que la hipotensión observada puede relacionarse con la participación de los receptores 5HT₃ y 5HT₂. Se demostró también que la mayor parte de los cambios hemodinámicos están mediados por el vago, y que la hipotensión aumenta por bloqueo de receptores muscarínicos y disminuye con el uso de agonistas colinérgicos. La inhibición de la síntesis de TXA₂ logró aumentar significativamente la supervivencia sin modificar en forma importante las variables hemodinámicas. Estos resultados sugieren que los cambios hemodinámicos durante la microembolia pulmonar se deben a la combinación de acciones de la serotonina y el tromboxano A₂. Es posible además que estos cambios estén mediados de manera refleja por estimulación del nervio vago.

INTRODUCCIÓN

La microembolia pulmonar es una de las consecuencias más graves de padecimientos como

fracturas de pelvis, de miembros inferiores, intoxicaciones y sepsis profunda. A pesar de que se ha especulado sobre las causas de las respuestas vasculares asociadas a este proceso, las causas precisas de la hipertensión pulmonar y la hipotensión sistémica que se presentan, no han podido ser totalmente esclarecidas, por lo que siguen siendo objeto de mucho interés. Los citados cambios hemodinámicos se han atribuido no sólo a la obstrucción causada por la impacta-

* Departamento de Fisiología y Farmacología. Escuela Superior de Medicina. Instituto Politécnico Nacional.

** Departamento de Farmacología. CINVESTAV-IPN.

ción de múltiples microémbolos, sino también a respuestas directas y reflejas mediadas por diferentes sustancias.

Por otro lado, parece existir una clara diferencia entre la trombosis iniciada en el territorio venoso y la que ocurre en los vasos arteriales. En efecto, el conjunto de células y mediadores participantes difieren en cada uno de estos procesos. La inyección intravenosa (i.v.) de una suspensión de colágena ha demostrado ser un modelo accesible en animal íntegro que permite explorar el terreno de los fenómenos asociados a la formación de un trombo blanco, ya que reproduce los eventos presentados en la trombosis arterial.¹ Además, este modelo permite estudiar la fisiopatología de la microembolia pulmonar, así como algunos acercamientos terapéuticos para este padecimiento.

Estudios previos han demostrado la participación de las plaquetas¹ y las sustancias liberadas durante su activación en la embolia pulmonar. La serotonina es una de las sustancias vasoactivas liberadas de mayor importancia, y existe evidencia que sugiere que la hipertensión arterial observada se debe a la estimulación de receptores 5HT₂,² en tanto que se ha sugerido que la hipotensión sistémica que se presenta en un modelo de embolia grasa, se deba a una contribución significativa de la activación de receptores 5HT₃,³ en las terminales aferentes del vago. Sin embargo, evidencia reciente indica que la activación de receptores 5HT_{1D} participa en la vasoconstricción de vasos pulmonares,⁴ en tanto que estos mismos receptores se han responsabilizado de la hipotensión ocasionada por serotonina.⁵

Por tanto, se realizó el presente trabajo con el objeto de aportar mayor información sobre la participación relativa de diversos receptores a la serotonina en la hipotensión sistémica e hipertensión pulmonar suscitadas a consecuencia de la impactación de múltiples microémbolos blancos en la microvasculatura pulmonar. Se evaluó además en este fenómeno, la participación relativa del tromboxano A₂ y de la trombina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron conejos blancos Nueva Zelanda, con peso entre 2.5 a 3.5 kg, divididos en tres grupos con una media de seis animales por grupo. Los

animales se anestesiaron con pentobarbital sódico a una dosis de 30 mg/kg, administrándolo por vía intravenosa a través de la vena marginal de la oreja. Los conejos se colocaron en posición supina, y previa anestesia subcutánea en la región cervical anterior con xilocaína simple al 2%, se les realiza una incisión longitudinal sobre la línea media, posteriormente se disecan las venas yugulares de ambos lados y la arteria carótida del lado izquierdo. Dichos vasos se catecterizaron con tubos de polietileno de 1.14 mm y 0.86 mm de diámetro interno para las venas y la arteria, respectivamente. Con objeto de registrar la presión sistólica del ventrículo derecho (PSVD) se introduce el catéter colocado en la vena yugular derecha hasta el ventrículo. Para registrar la presión arterial sistémica (PAM) y la presión de ventrículo derecho, los catéteres de arteria carótida y la vena yugular se conectaron a transductores *Spectramed* acoplados a un polígrafo *Grass* de cuatro canales. La vena yugular izquierda se utilizó como vía de acceso para administrar el pretratamiento y la suspensión de colágena.

Preparación de colágena

Se extirparon los tendones de Aquiles de algunos conejos, los cuales fueron limpiados con solución salina y finamente cortados con tijeras. Un gramo de tendón fue puesto en 75 ml de solución de ácido acético al 0.25 M. Esta solución fue mezclada con el agitador magnético a 4°C durante 24 horas. La suspensión resultante fue centrifugada a 3,000 r.p.m. durante 20 minutos, utilizando únicamente el sobrenadante. La concentración de proteína fue determinada por el método de Lowry, estableciendo en un experimento piloto una dosis estándar de 200 µL/kg, por ser una dosis no letal, capaz de producir cambios hemodinámicos consistentes. La suspensión fue conservada a 4°C durante una semana.

Grupos experimentales

Se empleó como estímulo la administración de una suspensión de fibrillas de colágena a dosis de 200 µL/kg, ajustando el volumen de administración a 2 ml infundida en 2 minutos. Los grupos experimentales se indican a continuación:

Grupo Pretratamiento

1.	Control
2.	Vagotomía (resección de ambos vagos previa a la exposición del reto)
3.	Atropina 2 mg/kg
4.	Pindolol 300 µg/kg
5.	Metiotepina 300 µg/kg
6.	Ritanserina 300 µg/kg
7.	Ketanserina 300 µg/kg
8.	Ondansetrón 250 µg/kg
9.	Metoclopramida 300 µg/kg
10.	Heparina 200 UI/kg
11.	Dazmegrel 5 mg/kg

Cuando se utilizaron fármacos como pretratamiento, éstos se administraron por vía intravenosa 30 minutos antes del reto trombótico, ajustando el volumen a 2 ml. En los grupos control se empleó un volumen igual de solución salina.

Análisis estadístico

Para establecer las diferencias entre las medias, se practicó análisis de varianza seguida de una prueba de Newman-Keuls. Las diferencias se consideraron significativas cuando p resultó $<$ que 0.05μ .

RESULTADOS

En la tabla 1 se muestra en forma resumida los resultados obtenidos utilizando diversos antagonistas serotoninérgicos. Dichos resultados confirman que la serotonina (liberada durante la agregación plaquetaria) juega un papel determinante en los cambios hemodinámicos observados en nuestro modelo experimental, tanto de manera directa como refleja. En cuanto al aumento de la PSVD, el efecto de la serotonina parece estar mediado principalmente por la estimulación de receptores 5-HT₂, en la vasculatura pulmonar, ya que este incremento se redujo al administrar ritanserina y ketanserina como pretratamientos, lo que confirma lo reportado anteriormente.² Sin embargo, el pindolol ejerce también efecto protector y aumenta la sobrevida, por lo que no debe descartarse la participación

de la activación de receptores 5HT₁ en el cuadro. El efecto de estos antagonistas también puede atribuirse a su capacidad de disminuir la agregación plaquetaria al bloquear a los receptores 5-HT₂. Por lo que respecta a la disminución de la PAM, es posible que se deba, en parte, a la disminución del gasto cardiaco ocasionado por la hipertensión pulmonar, pues la caída de esta presión fue menor en animales pretratados con ritanserina y ketanserina. En el descenso de la PAM puede además contribuir la respuesta refleja despertada por la estimulación de receptores 5-HT₃ (reflejo de Bezold-Jarisch) ya que tanto la metoclopramida como el ondasetron ejercen un efecto inhibitorio.

Por otra parte, como se aprecia en la tabla 2, la vagotomía disminuye y la administración de atropina incrementa la hipotensión ocasionada por la administración de colágena, mientras que ambas maniobras reducen el incremento en la PSVD.

Finalmente, en la tabla 3 se puede apreciar que la heparina previene en alguna proporción la hipertensión pulmonar que se presenta asociada a la administración de colágena. Esto revela la participación de la trombina o de otros factores de la coagulación en los eventos vasculares observados, de modo que la heparina tiene acciones adicionales a la inhibición de la propagación del crecimiento del coágulo. Finalmente, la inhibición de la síntesis de TXA₂ provocó una disminución significativa en la caída de la PAM. Sin embargo, su participación en la hipertensión pulmonar no pudo ser demostrada con las herramientas utilizadas en nuestro modelo.

DISCUSIÓN

Los mediadores humorales más estudiados en relación con la trombosis son aquellos liberados por las plaquetas durante los fenómenos de activación y agregación. La liberación de serotonina y ADP desde los gránulos densos de estos elementos formes son determinantes en la vasoconstricción asociada a la trombosis. También se ha planteado la participación del TXA₂, producto del metabolismo oxidativo del ácido araquidónico, cuya síntesis es estimulada por la serotonina y el ADP así como la de las condiciones facilitadas por la hipoxia.⁶ Por otro lado, se ha

Tabla 1. Efecto del pretratamiento con antagonistas serotoninérgicos en la disminución de la PAM y el incremento en la PSVD ocasionadas por la inyección intravenosa de colágena. Pindolol (antagonista 5HT_{1A} y beta adrenérgico); metiotepina (antagonista 5HT₁ y 5HT₂); ritanserina (antagonista 5HT₂); ketanserina (5HT₂ y alfa adrenérgico), ondasetron (antagonista 5HT₃), metoclopramida (antagonista 5HT₃, agonista 5HT₄ y antagonista dopaminérgico).

Grupo	Disminución de la presión arterial media (%)	Error tipo	p<0.05	Aumento de la presión de ventrículo derecho (%)	Error tipo	p<0.05	Supervivencia (%)	n
Control	-70.1	10.2	—	40.1	5.0	—	50	6
Pindolol	-45.0	11.2	—	21.1	9.0	*	83	6
Metiotepina	-71.1	13.9	—	30.5	16.1	—	40	6
Ritanserina	-17.1	5.4	*	10.6	4.2	*	70	7
Ketanserina	-20.0	10.3	*	17.5	4.6	*	70	6
Ondasetron	-27.9	6.6	*	28.0	12.0	—	100	6
Metoclopramida	-25.4	16.0	*	38.8	26	—	80	6

Tabla 2. Efecto de la sección de los vagos o de la administración i.v. de atropina (2 mg/kg) antes de la inyección de colágena por la misma vía en la disminución en la P.A.M. y aumento en la P.S.V.D. ocasionados.

Grupo	P.A.M. (%)	Error tipo	p<0.05	P.S.V.D. (%)	Error tipo	p<0.05	Supervivencia (%)	n
Control	-70.1	10.2	—	40.1	5.0	—	50	6
Vagotomizados	-13.1	1.5	*	8.2	2.3	*	100	6
Atropina	-97.6	2.4	*	23.6	5.4	*	0	6

TABLA 3. Efecto protector del pretratamiento con heparina (200 UI/kg) como inhibidor de la acción de la trombina o con dazmegrel (5 mg/kg) como inhibidor de la síntesis de tromboxano A₂.

Grupo	P.A.M. (%)	Error tipo	p<0.05	P.S.V.D. (%)	Error tipo	p<0.05	Supervivencia (%)	n
Control	-70.1	10.2	—	40.1	5.0	—	50	6
Heparina	-62.0	4.7	—	21.9	4.5	—	49	6
Dazmegrel	-28.2	10.1	*	33.8	41.8	—	83.3	6

demostrado la participación de las respuestas reflejas mediadas por el vago, cuyos receptores aferentes parecen ser activados por las mismas sustancias mencionadas con anterioridad, específicamente por la serotonina.⁵

La hipotensión arterial observada durante la microembolia y la embolia pulmonar se ha tratado de explicar en función de que la obstrucción de una arteria pulmonar de gran o mediano calibre puede ocasionar insuficiencia cardiaca derecha (*cor pulmonale* agudo), disminución del gasto cardiaco y choque. Es posible que la reduc-

ción del flujo por estas arterias se deba a la suma de varios efectos: 1) obstrucción mecánica, 2) vasoconstricción producida por la presencia de sustancias vasoconstrictoras y de hipoxia, y 3) la consecuente a la estimulación neural refleja.

Los resultados presentados apoyan la idea de que la serotonina, liberada por las plaquetas al tener contacto con la colágena, es determinante en la vasoconstricción del territorio vascular pulmonar ya que, como se observa en la tabla 1, los antagonistas serotoninérgicos reducen el incremento en la PSVD. Con respecto a esta variable,

resultó particularmente efectivo el pretratamiento con los antagonistas de los receptores 5-HT₂, ketanserina y ritanserina. Esto se explica en función de que la activación de receptores 5-HT₂ se ha asociado a vasoconstricción en diversos lechos vasculares.⁵ Estos resultados sugieren que la acción de la serotonina liberada en el presente modelo de agregación plaquetaria inducida experimentalmente, favorece la vasoconstricción vascular pulmonar mediante la activación de dichos receptores serotoninérgicos.

En efecto, se ha demostrado que la ketanserina es un potente antagonista de los efectos vasoconstrictores de serotonina, pero también es capaz de bloquear los receptores alfa₁ adrenérgicos, propiedad que favorece sus acciones vasodilatadoras.⁷ La ketanserina ha logrado disminuir la presión de la arteria pulmonar en el embolismo pulmonar canino,⁸ además de mejorar la hipertensión pulmonar y la presión arterial de oxígeno si se administra en los días subsecuentes a un cuadro de tromboembolia pulmonar en estudios clínicos.⁷ Adicionalmente, no debe descartarse que los antagonistas de este subtipo son capaces de inhibir la agregación plaquetaria mediada por serotonina ya que este efecto también es mediado por receptores 5HT₂. Sin embargo, también se atenuó el aumento en la PSVD al pretratar a los conejos con pindolol, un beta bloqueador con capacidad antagonista 5-HT₁. Este efecto puede deberse en parte a una acción antiserotonérgica inespecífica dada su moderada selectividad para bloquear el efecto vasoconstrictor de la serotonina y, en parte, a la inhibición de la respuesta refleja inducida por la serotonina; sin embargo, no debe descartarse la posibilidad de que existen receptores 5HT₁ vasoconstrictores en el territorio vascular pulmonar⁴ y que son bloqueados por el pindolol.

Adicionalmente, resulta interesante observar que la metoclopramida actualmente considerada como antagonista 5HT₃, además de su reconocida acción como agonista colinérgico y antagonista dopaminérgico, aumenta de manera significativa la supervivencia y evita considerablemente la hipertensión pulmonar. Este efecto merece un estudio posterior.

La administración de dazmegrel, anteriormente al reto con colágena, no es capaz de antagonizar la respuesta hipertensiva pulmonar. El dazmegrel

es capaz de inhibir específicamente la síntesis de TXA₂, de modo que una posible explicación al hecho de que carezca de efecto en la hipertensión pulmonar es que durante el evento trombótico el metabolismo del ácido araquidónico es susceptible de ser desviado hacia la formación de endoperóxidos cíclicos y otras prostaglandinas (PGD₂) que también demuestran propiedades vasoconstrictoras.

La heparina, por su parte, no es capaz de prevenir las modificaciones asociadas a la administración de colágena. La heparina actúa al unirse a la trombina y a otros factores activados de la coagulación, previniendo la diseminación de la trombosis. Por su parte, la trombina posee propiedades vasorelajantes atribuidas a la síntesis de PGI₂ y de NO.⁹ Sin embargo, también se le ha atribuido a esta sustancia capacidad vasoconstrictora, particularmente en territorios donde el endotelio vascular ha sido dañado.¹⁰ Durante la obstrucción masiva de las arteriolas pulmonares se desarrolla un proceso hipóxico que posiblemente ocasione daño endotelial, situación que pondría en evidencia la acción vasoconstrictora de la trombina, como se ha demostrado en otros modelos de tromboembolia pulmonar.¹ Sin embargo, el papel de la trombina no resultó ser relevante en nuestro modelo experimental, hecho que puede atribuirse a que la colágena origina un trombo blanco en el que la agregación de las plaquetas es el principal componente en tanto que la formación de la malla de fibrina mediante la activación de la cascada de la coagulación juega un papel secundario.

En algunos casos la caída de la presión arterial guarda relación directa con el grado de aumento de la presión en ventrículo derecho, posiblemente como consecuencia directa de la disminución del gasto cardiaco ocasionado por aumento en la presión del circuito pulmonar, pero en otras ocasiones la hipotensión no puede explicarse de esta manera. Por otro lado, la sección de los nervios vagos reduce significativamente la hipertensión producida por la inyección de colágena. Es conocida la respuesta que origina la estimulación de receptores yuxtapulmonares por circunstancias como la embolia pulmonar. La estimulación de estos receptores manda impulsos mediante las ramas aferentes del vago, lo que ori-

gina una suspensión del eflujo simpático con la producción de taquipnea e hipotensión.

Para descartar que el efecto de la sección del vago se debe a la inhibición de la estimulación de receptores aferentes, se realizaron experimentos en presencia de atropina. La inhibición de receptores muscarínicos con esta sustancia, aunque reduce la hipertensión pulmonar, acentúa la caída de la presión arterial sistémica evocada por colágena y la mortalidad se ve aumentada de manera considerable. Lo anterior confirma la importancia de la estimulación refleja del vago en los cambios hemodinámicos estudiados y plantea además la posibilidad de que la estimulación de receptores muscarínicos ejerza un efecto protector en este modelo.

En conclusión, los resultados sugieren que la serotonina, liberada como consecuencia de la activación plaquetaria por la inyección de colágena, actúa directamente sobre receptores 5-HT₂ en el territorio vascular pulmonar y simultáneamente sobre receptores 5-HT₃ localizados en las terminales aferentes vagales, desencadenando el reflejo de Bezold-Jarisch⁵ responsable en gran parte de la bradicardia y la hipotensión arterial sistémica observada; sin embargo, la inhibición con estos antagonistas no es total, por lo que no debe descartarse la participación de otros factores como el tromboxano A₂. La trombina, formada durante el proceso de coagulación, no demostró tener participación en los cambios hemodinámicos observados.

SUMMARY

We have studied the relative role of serotonin, thromboxane A₂ and thrombin on the rise of right ventricular blood pressure (RVP) and the fall in systemic blood pressure (SBP) evidenced during experimentally induced miliary pulmonary embolism in rabbits. The effects of the i.v. administration of a collagen fiber suspension were evaluated in the absence and presence of selective 5HT₁, 5HT₂ and 5HT₃ receptor antagonists, of a specific thromboxane synthesis inhibitor and of heparin as an inhibitor of thrombin effects. Results showed activation of 5HT₂ serotonin receptors is the major mechanism responsible of pulmonary hypertension, whereas 5HT₃ receptor stimulation seem to be responsi-

ble of fall in SBP. Most of the changes in SBP and RVP seem to be mediated by afferent vagal stimulation since they were avoided by bilateral vagotomy. Stimulation of muscarinic receptors appeared to play a protective effect considering the deleterious hemodynamic consequences of atropine administration in this model. Even when TXA₂ synthesis inhibition could not modify RVP, it increased survival rate whereas thrombin participation could not be demonstrated. According to our results it is possible that serotonin and thromboxane A₂ vascular effects have a synergistic effect in the hemodynamic changes that follow pulmonary microembolism and point out an important role for vagal reflex responses in the lung.

BIBLIOGRAFÍA

1. Amezcua, J.L.; Hong, E. and Bobadilla, R.A. Effects of selective 5-HT₂ receptor antagonists on some haemodynamic changes produced by experimental pulmonary embolism in rabbits. *Serotonin: Molecular Biology, Receptors and Functional Effects* by R. Fozard/P-R. Saxena 1991, Birkhäuser Verlag Basel/Switzerland.
2. Bobadilla, R.A.; García-Juárez, J.A.; Hong, E.; Castillo, C. and Amezcua, J.L. "Serotonergic receptors involved in the hemodynamic changes observed during pulmonary embolism". *Proc. West. Pharmacol. Soc.*, **34**:439-422 (1991).
3. Leañón, O.L.; Hong, E. and Amezcua, J.L. "Reflex circulatory collapse following intrapulmonary entrapment of activated platelets: mediation via 5-HT₃ receptor stimulation". *Br. J. Pharmacol.*, **116**:2048-2052, 1995.
4. Mc Lean, M.; Clayton, R.A.; Templeton, A.G.B. and Morecroft, T. "Evidence for 5HT₁-like receptor-mediated vasoconstriction in human pulmonary artery". *Br. J. Pharmacol.*, **119**:277-282, 1996.
5. Saxena, P. and Villalón, C. "Cardiovascular effects of serotonin agonists and antagonists". *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **15**(Supp. 17):S17-S34, 1990.
6. Hiruyiki, M. and Taniguchi *et al.* "Proteintyrosine kinase p72syk is activated by thromboxane A₂ mimetic U44069 in platelets". *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **197**:62-67, 1993.
7. Huet, Y. and Brun-Buisson, B. "Cardiopulmonary effects of ketanserin infusion in human pulmonary embolism". *Am. rev. Respir. Dis.*, **135**:114-117, 1987.

8. Huval, W. V. and Mathieson, M. A. "Therapeutic benefits of 5HT inhibition following pulmonary embolism". *Ann. Surg.* **197**:220-225, 1983.
9. Tesmafariam, B. "Distinct receptors and signaling pathways in alpha-thrombin and thrombin receptor peptide-induced vascular contractions". *Circ. res.* **74**:930-936, 1994.
10. Glusa, E.; Brestchneider, E. and Paintz, M. "Contractile effects of thrombin in porcine pulmonary arteries and the influence of thrombin inhibitors". *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **349**:101-106, 1994.