

Expresión hormonal y de receptores opioides en pulmón fetal y del adulto

J.J. Gómez-Román^a, J.M. Cifrián Martínez, S. Fernández Rozas, J. Fernando Val-Bernal^a

^aDepartamento de Anatomía Patológica. Servicio de Neumología. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Santander.

OBJETIVOS: Describir la distribución celular y el grado de expresión de diversas hormonas y receptores de opioides en el desarrollo embrionario y en el pulmón sano del adulto.

MÉTODO: Seleccionamos tejido pulmonar de las tres etapas del desarrollo fetal (seudoglandular, canalicular y sacular, tres muestras por etapa), de recién nacidos (tres), niños de 10 meses (dos) y adultos (tres) fallecidos sin afección pulmonar. Practicamos tinción inmunohistoquímica para hormonas específicas (calcitonina, parathormona, serotonina y hormona adrenocorticotropa [ACTH]) y receptores de opioides tipo delta y mu. Valoramos el porcentaje de células positivas así como el tipo celular reactivo en cada caso.

RESULTADOS: La serotonina es la primera en aparecer (estadio seudoglandular en células neuroendocrinas aisladas) para posteriormente desaparecer. La calcitonina aparece en el estadio canalicular en células neuroendocrinas y neumocitos. Su expresión máxima es al nacimiento y disminuye en el pulmón adulto. No hemos encontrado producción de ACTH ni de parathormona. Los receptores de opioides aparecen en la fase canalicular y alcanzan el máximo grado en el nacimiento. En el adulto sólo existen receptores para opioides tipo delta en neumocitos, células musculares bronquiales y mesoteliales.

CONCLUSIONES: La hormonos secreción pulmonar es importante durante el desarrollo fetal y alcanza su máxima expresión en el nacimiento. La principal hormona que produce el pulmón fetal es la calcitonina. Existen receptores opioides durante el desarrollo fetal en diferentes tipos celulares y alcanzan su máxima expresión al nacimiento. El conocimiento de la expresión de sustancias activas podría tener consecuencias terapéuticas en determinados procesos patológicos como el síndrome de distrés respiratorio en el niño o el asma bronquial.

Palabras clave: Hormonas. Receptores opioides. Pulmón.

Hormone expression and opioid receptors in fetal and adult lung

OBJECTIVES: To describe the cellular distribution and level of expression of certain hormones and opioid receptors during fetal development and in the lung of the healthy adult.

METHOD: We sampled lung tissue from fetuses at three stages of development (pseudoglandular, canalicular and saccular) (3 samples per stage), from newborn infants (3), from 10-month-old infants (2) and from adults (3) who had died without lung disease. After specific immunohistochemical staining for hormones (calcitonin, parathormone, serotonin and adrenocorticotrophic hormone - ACTH) and opioid receptors, we assessed the percentage of positive cells for each cell type in each sample.

RESULTS: Serotonin is the first to appear (pseudoglandular stage in isolated neuroendocrine cells) and it disappears later. Calcitonin appears in the canalicular stage in neuroendocrine and lung cells. Expression is at its peak at birth and is less in the adult lung. We found no ACTH or parathormone production. Opioid receptors appear in the canalicular stage and peak at birth. In adult lung, bronchiolar muscle and mesothelial cells, only delta-type opioid receptors are present.

CONCLUSIONS. Pulmonary hormone secretion is significant during fetal development and peaks at birth. Calcitonin is the main hormone produced in the fetal lung. Opioid receptors are present during fetal development in various types of cells and peak at birth. An understanding of the expression of active substances could have therapeutic relevance in certain conditions, such as bronchial asthma or respiratory distress syndrome in the child.

Key words: Hormones. Opioid receptors. Lung.

Introducción

El sistema endocrino difuso es un potente inductor de múltiples funciones orgánicas. Sus componentes pul-

monares comienzan a desarrollarse en el estadio seudoglandular de la embriogénesis (6-16 semanas de gestación), y aumentan en número y extensión hasta el nacimiento para disminuir posteriormente en la vida adulta. En el pulmón adulto existe una célula endocrina por cada 2.500 células epiteliales; la bombesina y la calcitonina son las hormonas mejor estudiadas¹. Se ha descrito, además, un incremento de su número en determinadas situaciones patológicas, como la displasia broncopulmonar, la muerte súbita infantil² e incluso la exposición aguda al humo del tabaco³.

Este trabajo fue presentado parcialmente como comunicación póster en el Congreso Nacional SEPAR celebrado en La Coruña en 2001.

Correspondencia: Dr J.J. Gómez-Román.
Departamento de Anatomía Patológica. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla.
Avda. Valdecilla, s/n. 39008 Santander.
Correo electrónico: apagrj@humv.es

Recibido: 18-9-2001; aceptado para su publicación: 12-3-2002.

Por otro lado, los derivados opiáceos parecen ejercer ciertos efectos directos sobre el pulmón, como la inducción de maduración del pulmón fetal en ratas o el hecho de que los hijos de madres adictas a la heroína tienen una menor incidencia de síndrome de distrés respiratorio⁴, las exacerbaciones asmáticas⁵ y la disminución de la tasa de proliferación celular en algunas neoplasias pulmonares⁶. Existen tres tipos bioquímicos de receptores opioides: delta, kappa y mu⁷. Su presencia en el pulmón se ha demostrado en estudios sobre animales de experimentación, encontrándose en la pared alveolar y en el músculo liso de grandes vías aéreas del pulmón de ratas sin que se hayan descrito en la pequeña vía aérea ni en estructuras vasculares⁸, aunque este dato ha sido discutido por otros autores que encuentran mayor densidad de unión a morfina en bronquiolos y áreas distales⁹. Sólo existe una reseña acerca de la presencia de este tipo de receptores en el pulmón humano, aunque sólo trata de los receptores de tipo mu¹⁰. Hasta el momento no se ha publicado la distribución del resto de los receptores opioides en el pulmón humano. Nuestro objetivo es describir la distribución celular y el grado de expresión de diversas hormonas y receptores de opioides en el desarrollo embrionario y en el pulmón humano sano del adulto.

Material y métodos

Revisamos los archivos del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla de Santander y seleccionamos tres muestras de pulmón procedente de autopsias de estadios pseudoglandular, canalicular y sacular del desarrollo fetal; tres muestras pulmonares de niños recién nacidos; dos muestras pulmonares de niños de 10-12 meses de vida (las muestras incluyeron en todos los casos lóbulos superior e inferior, indistintamente de pulmón derecho e izquierdo), y tres muestras pulmonares de adultos (de lóbulo superior), todos ellos sin enfermedad pulmonar. En todos los casos se trataba de tejido fijado en formol tamponado al 5% e incluido en parafina.

Realizamos en todas las muestras tinciones inmunohistoquímicas frente a cromogranina (Dako, Glostrup, Dinamarca; policlonal, dilución: 1/1.500), sinaptofisina (Dako, Glostrup, Dinamarca; monoclonal, clon SY38, dilución: 1/150), Leu-7 (Becton-Dickinson, Mountain View, CA, EE.UU.; monoclonal, clon CD-57, dilución: 1/50) (estos tres marcadores son indicativos genéricos de diferenciación celular neuroendocrina), calcitonina (Dako, Glostrup, Dinamarca; policlonal, dilución: 1/400), serotonina (Dako, Glostrup, Dinamarca; policlonal prediluida), parathormona (Dako, Glostrup, Dinamarca; policlonal, dilución 1/200), hormona adrenocorticotropa (ACTH) (Dako, Glostrup, Dinamarca; policlonal dilución: 1/200) y receptores de opioides delta (Dia Sorin, Stillwater, Minn, EE.UU.; clon 442H, policlonal, dilución: 1/1.000) y mu (Dia Sorin, Stillwater, Minn, EE.UU.; clon 55II, policlonal, dilución: 1/2.000), con la técnica de estreptavidina-biotina. Brevemente, realizamos recuperación antigénica en las secciones de 5 micras mediante calentamiento en olla a presión y tampón citrato durante un minuto y 30 s. Posteriormente aplicamos el método EnVision Plus (Dako Glostrup, Dinamarca) en un inmunoteñidor automático Techmate 500-220 (Biotek, Santa Barbara, CA, EE.UU.)¹¹. Como cromógeno usamos diaminobenzidina.

Para evaluar los resultados efectuamos recuento de células positivas, determinación de tipo de células positivas y deter-

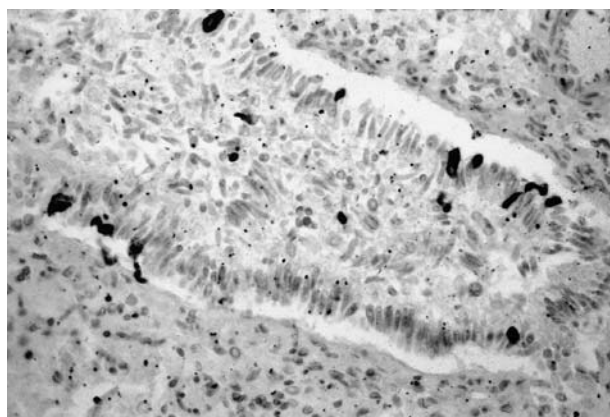


Fig. 1. Inmunofluorescencia frente a calcitonina en el estadio sacular del desarrollo fetal. (Aumentos originales 100.)

minación del porcentaje de células positivas sobre el total celular. Los resultados se expresan en forma de media, mediana y rango.

Resultados

En el estadio pseudoglandular del desarrollo fetal sólo se pudo apreciar positividad para serotonina en células aisladas de estirpe neuroendocrina, ya que reaccionaban también para otros marcadores de dicha estirpe. La serotonina, sin embargo, posteriormente desaparecía para no volver a manifestarse en el desarrollo ni en el pulmón del adulto. La calcitonina aparecía en el estadio canalicular (el segundo del desarrollo fetal) en células de estirpe neuroendocrina en vías aéreas (fig. 1) y en neumocitos. Dicha expresión aumentaba hasta alcanzar un máximo en estadio sacular tardío y al nacimiento. Posteriormente existía una disminución del nivel de expresión y en la vida adulta se mantenía limitada a células neuroendocrinas de las vías aéreas y su manifestación neuroendocrina desaparecía (tabla I). No encontramos producción de las otras hormonas estudiadas (ACTH y parathormona) en ningún momento del desarrollo ni en el pulmón adulto.

Los receptores de opioides comenzaron a aparecer en el estadio canalicular, aumentando su presencia para alcanzar un máximo al nacimiento. Aparecieron en neumocitos (fig. 2), células musculares de vías aéreas finas

TABLA I
Número de células productoras de cada hormona expresadas en porcentaje. Células epiteliales de revestimiento de vía aérea en cada etapa examinada. Media de los casos examinados

	Serotonina	Calcitonina	ACTH	Parathormona
Seudoglandular	2 (1-3)	0	0	0
Canalicular	0	2 (0-4)	0	0
Sacular	0	12 (9-16)	0	0
Nacimiento	0	8 (7-10)	0	0
10 meses	0	4 (3-5)	0	0
Adulto	0	2 (1-3)	0	0

Entre paréntesis, límites. ACTH: hormona adrenocorticotropa.

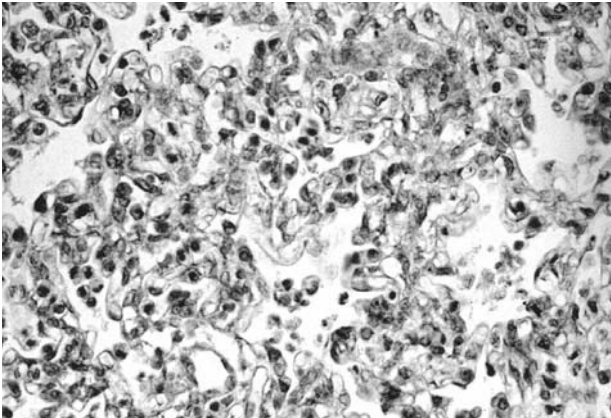


Fig. 2. Inmunotinción frente a receptores opioides de tipo delta al nacimiento. Positividad de membrana en células neumocitarias. (Aumentos originales 100.)

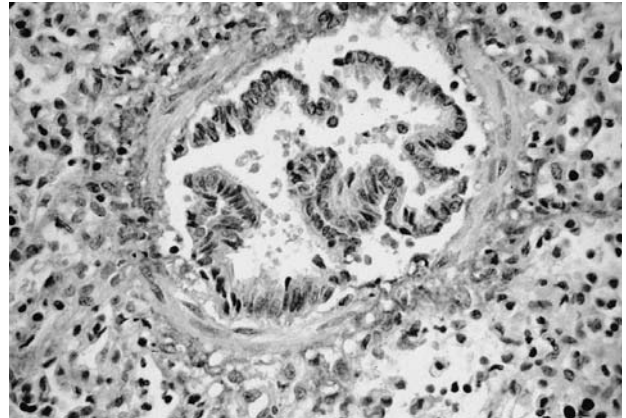


Fig. 3. Inmunotinción frente a receptores opioides de tipo delta en capa muscular bronquiolar. (Aumentos originales 100.)

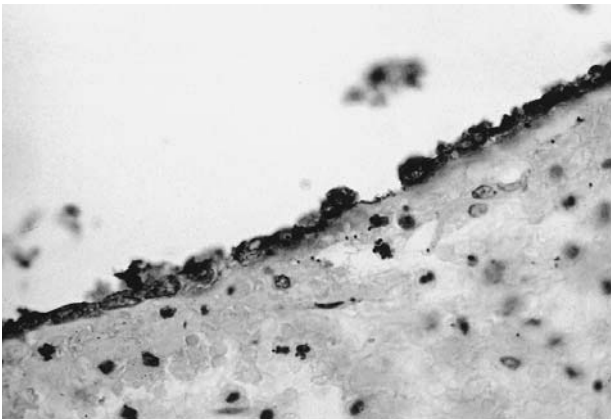


Fig. 4. Inmunotinción frente a receptores opioides tipo delta en pleura visceral. Positividad en las células mesoteliales. (Aumentos originales 160.)

(fig. 3) y en células mesoteliales (fig. 4). Después del nacimiento, disminuyeron hasta desaparecer los receptores para opioides de tipo mu, y se mantiene la expresión de los receptores de tipo delta (tabla II).

Discusión

La historia del sistema endocrino difuso es antigua y controvertida como demuestran los múltiples nombres con los que ha sido conocido. Los componentes pulmo-

nares son diferentes dependiendo de la edad del individuo y del estado fisiológico del pulmón. En el pulmón adulto no patológico aparecen en forma de células solitarias incluidas en el epitelio de revestimiento de la vía aérea. Están en contacto con la membrana basal y en su ápice tienen prolongaciones citoplasmáticas que les sirven para inyectar las sustancias que producen en las células vecinas y establecer una acción paracrina. Probablemente se trate de estructuras carentes de inervación nerviosa¹. En el pulmón fetal y en los pulmones que están sometidos a situaciones de hipoxia mantenida, aumentan en número (sufren hiperplasia) y se forman las así llamadas filas interrumpidas, que acaban agrupándose para formar los cuerpos neuroepiteliales, que ya son verdaderas asociaciones de células neuroendocrinas con una organización interna y con inervación por parte del sistema nervioso². Estos cuerpos neuroepiteliales no son sólo simples receptores sino que controlan el tono muscular bronquiolar y vascular y también son fundamentales en la relación ventilación-perfusión y en el tono vascular diferente que existe en el feto y en la etapa posnatal. En el pulmón humano no patológico del adulto no aparecen nunca, aunque sí lo hacen en otras especies animales.

Los productos de secreción hormonal propios del pulmón son asimismo controvertidos, y los más abundantes son los péptidos semejantes a bombesina y calcitonina, algo que también hemos demostrado en nuestro estudio. Se ha discutido la presencia de otros como la leucoencefalina, la ACTH o la subunidad alfa de la gonadotropina coriónica¹². Nuestros datos eliminan la controversia acerca de la ACTH y de la parathormona, ya que demostramos que no existe producción de dichas hormonas en ningún momento del desarrollo fetal ni en el pulmón adulto. Los datos recogidos acerca de la serotonina que contrastan con los que hemos obtenido provienen de un estudio en pulmones de conejo, en el que se miden concentraciones de proteína a partir de extractos tisulares¹³, y de otro estudio en cultivos celulares¹⁴, si bien es cierto que en este tipo de muestras los contenidos de serotonina pueden ser debidos a la presencia de plaquetas en el extracto¹⁵ y a la transformación celu-

TABLA II
Número de células que presentan receptores de opioides expresadas en tanto por cien células neumocitarias. Media de los casos examinados

	Receptores mu	Receptores delta
Seudoglandular	0	0
Canalicular	1 (0-2)	1 (0-2)
Sacular	0	1 (0-2)
Nacimiento	4 (3-6)	4 (3-5)
10 meses	0	2 (1-3)
Adulto	0	1 (0-2)

Entre paréntesis, límites.

lar producida por el propio cultivo. Otros dos estudios más tratan la presencia de receptores de serotonina en pulmones de animales de experimentación¹⁶ y, por fin, el único que utiliza material semejante al nuestro presenta unos datos similares¹⁷. Nuestro estudio demuestra una producción temprana de serotonina (de hecho es la primera hormona que se produce en el desarrollo embrionario) que desaparece posteriormente. Pensamos que debe de tener una función en la formación de los elementos iniciales del pulmón, quizá en la inducción de las estructuras vasculares e intersticiales en el estadio pseudoglandular.

Las células que forman el sistema endocrino pulmonar disminuyen en número a partir del nacimiento, y la mayoría se encuentra en los bronquios intrapulmonares y en los bronquiolos terminales. Se ha estimado una proporción de una célula endocrina por cada 2.500 células epiteliales, proporción similar a la hallada en nuestro estudio.

Por otro lado, las sustancias opioides están ampliamente distribuidas en la naturaleza, y las células humanas han desarrollado varios tipos de receptores para dichas sustancias, en concreto los receptores delta, kappa y mu. Las sustancias opioides, y en concreto las endógenas como las encefalinas, tienen funciones fisiológicas importantes relacionadas con el crecimiento y el desarrollo, la proliferación y la diferenciación celular¹⁸. La mayoría de los estudios practicados sobre expresión de receptores y acciones provocadas por su estimulación son en animales de experimentación, en concreto en ratas, en los que se ha demostrado que una sobreexposición a opioides acelera la maduración pulmonar *in vitro* con un aumento significativo del número de cuerpos lamelares por célula alveolar⁴. Asimismo se ha estudiado la distribución de los ligandos de opioides en los pulmones de ratas y se ha encontrado la mayor densidad en las estructuras de la pared alveolar, y la menor en el músculo liso de la tráquea y bronquios principales⁸. No se han encontrado ligando, sin embargo, en el músculo liso que rodea las vías aéreas pequeñas y los vasos pulmonares. En el pulmón humano existe una única referencia al respecto y que sólo recoge datos acerca de los receptores mu-3, con una distribución similar a la descrita en los animales de experimentación¹⁰. Existen, además, algunos hechos que podrían indicar un papel importante de las sustancias opioides y sus receptores en la fisiología pulmonar. De hecho, los hijos de adictas a drogas por vía parenteral, en concreto a la heroína, presentan una menor incidencia de síndrome de distrés respiratorio que los niños controles, y es bien conocido el efecto de la marihuana sobre los pacientes asmáticos⁵. Una interacción farmacológica entre opiáceos y receptores de tipo delta y mu en neumocitos fetales podría estimular la producción de surfactante por dichas células. Los efectos sobre el músculo liso de las vías aéreas finas se relacionan con la presencia de receptores en las células musculares. Es interesante destacar que en el pulmón adulto sólo hemos encontrado expresión de receptores de tipo delta, con lo que los posibles mecanismos de acción deberían explicarse por la activación de dicho receptor y no otros tipos de receptores.

Por otro lado, ya se ha llamado la atención recientemente sobre la importancia de estos receptores en el tratamiento de la disnea en humanos mediante morfina nebulizada⁹, aunque previamente no se habían demostrado efectos sobre los pacientes con enfermedad intersticial¹⁹.

La presencia de receptores en células mesoteliales no se había descrito hasta el momento.

La diferente expresión de receptores en el desarrollo embrionario puede tener una correlación con lo que sucede en la afección neoplásica. Las sustancias opioides aumentan la tasa de apoptosis, es decir de muerte celular programada, en algunos tumores pulmonares²⁰, y también tienen un efecto sobre la diferenciación celular¹⁸ y tanto la apoptosis como la diferenciación son fenómenos celulares esenciales en el desarrollo embrionario. Es llamativo el hecho de que este efecto apoptótico está mediado por un mecanismo que utiliza la bombesina²⁰, con lo que se demuestra también una íntima relación entre los sistemas endocrino y opioide, al menos en líneas celulares. Por otro lado, el efecto apoptótico de los opioides es suprimido por la nicotina, con lo que ésta tendría un efecto prooncogénico a través de la inhibición de apoptosis mediada por opioides²¹.

En resumen, hemos descrito la distribución celular y los diferentes grados de expresión de hormonas como calcitonina o serotonina a lo largo del desarrollo embrionario del pulmón humano. La expresión hormonal demuestra ser importante en la etapa fetal para disminuir en la vida adulta. No hemos encontrado expresión de otras hormonas como la ACTH o la parathormona. Los receptores de sustancias opioides evidencian unos valores de expresión paralelos a los hormonales, que alcanzan su máxima expresión en el nacimiento para disminuir en la vida adulta. En el pulmón adulto sólo encontramos receptores de tipo delta y la distribución es en neumocitos, células musculares de vías aéreas y células mesoteliales. El conocimiento de la expresión de sustancias activas podría tener consecuencias terapéuticas en determinadas situaciones patológicas.

BIBLIOGRAFÍA

- Gosney JR. Pulmonary endocrine pathology: endocrine cells and endocrine tumours of the lung. Oxford: Butterworth Heinemann, 1992.
- Gould VE, Linnoila RI, Memoli VA, Warren WH. Neuroendocrine components of the bronchopulmonary tract: hyperplasias, dysplasias and neoplasms. *Lab Invest* 1983;49:519-37.
- Tabassian AR, Snider RH, Nylen ES, Cassidy M, Becker KL. Heterogeneity studies of hamster calcitonin following acute exposure to cigarette smoke: evidence for monomeric secretion. *Anat Rec* 1993;236:253-6.
- Gewolb IH, O'Brien J, Slavin RE. Opioids accelerate fetal rat lung maturation *in vitro*. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;20:511-6.
- Tashkin DP. Airway effects of marijuana, cocaine, and other inhaled illicit agents. *Curr Opin Pulm Med* 2001;7:43-61.
- Panagiotou S, Bakogeorgou E, Papakonstanti E, Hatzoglou A, Wallet F, Dussert C, et al. Opioid agonists modify breast cancer cell proliferation by blocking cells to the G2/M phase of the cycle: involvement of cytoskeletal elements. *J Cell Biochem* 1999;73:204-11.
- Brownstein MJ. A brief history of opiate, opioid peptides and opioid receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:5391-3.

8. Cabot PJ, Cramond T, Smith MT. Quantitative autoradiography of peripheral opioid binding sites in rat lung. *Eur J Pharmacol* 1996; 310:47-53.
9. Zebraski SE, Kochenash SM, Raffa RB. Lung opioid receptors: pharmacology and possible target for nebulized morphine in dyspnea. *Life Sci* 2000;66:2221-31.
10. Fimiani C, Arcuri E, Santoni A, Rialas CM, Bilfinger TV, Peter D, et al. Mu3 opiate receptor expression in lung and lung carcinoma: ligand binding and coupling to nitric oxide release. *Cancer Lett* 1999;146:45-51.
11. Vyberg M, Nielsen S. Dextran polymer conjugate two-step visualization system for immunohistochemistry. A comparison of En-Vision plus with two three stepavidin-biotin techniques. *Appl Immunohistochem* 1998;6:3-10.
12. Clements JA, Funder JW, Tracy K, Morgan FJ, Campbell DJ, Lewis P, et al. Adrenocorticotropin, beta-endorphin and beta-lipotropin in normal thyroid and lung: possible implications for ectopic hormone secretion. *Endocrinology* 1982;111:2097-102.
13. De Bock V, Yoshikazi K, Solomon S. Serotonin content of rabbit lung and small intestine during perinatal development. *Life Sci* 1986;38:431-5.
14. Yeger H, Speirs V, Youngson C, Cutz E. Pulmonary neuroendocrine cells in cultures of human infant airway mucosa from post-mortem tissues. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996;15:232-6.
15. Yamamoto Y, Hasegawa H, Inoue F, Ikeda K, Ichiyama A. Serotonin in the lung. Demonstration of a close correlation to blood platelet. *Agents Actions* 1986;18:351-8.
16. Wang D, Post M, Cutz E. Expression of serotonin receptor 2c in rat type II pneumocytes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 20:1175-80.
17. Watanabe H. Pathological studies of neuroendocrine cells in human embryonic and fetal lung. Light microscopical, immunohistochemical and electron microscopical approaches. *Acta Pathol Jpn* 1988;38:59-74.
18. Zagon IS, Rhodes RE, McLaughlin PJ. Localization of enkephalin immunoreactivity in diverse tissues and cells of the developing and adult rat. *Cell Tissue Res* 1986;246:561-5.
19. Harris-Eze AO, Sridhar G, Clemens RE, Zintel TA, Gallagher CG, Marciniuk DD. Low-dose nebulized morphine does not improve exercise in interstitial lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:1940-5.
20. Heusch WL, Maneckjee R. Effects of bombesin on methadone-induced apoptosis of human lung cancer cells. *Cancer Lett* 1999;136:177-85.
21. Maneckjee R, Minna JD. Opioids induce while nicotine suppresses apoptosis in human lung cancer cells. *Cell Growth Differ* 1994;5:1033-40.