

Evaluación de la inocuidad del sulfuro de hidrógeno en tejido cardiaco de *Cavia porcellus* (cobayas) normales

Assessment of hydrogen sulfide innocuousness on *Cavia porcellus* (guinea pigs) cardiac tissue

César Gómez-Herreros^{1,a}, Jorge Arroyo-Acevedo^{2,3,a}, César Rojas-Maturano^{4,b},
Flor Cruz-Chávez^{4,c}, Luis Sifuentes-Gava^{4,b}

¹ Unidad de Posgrado, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

² Instituto de Investigaciones Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

³ Laboratorio de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

⁴ Unidad de Cirugía Experimental del Instituto Nacional de Salud del Niño, Lima, Perú.

^a Químico Farmacéutico; ^b Médico Cirujano; ^c Médico Veterinario.

Resumen

Introducción. El sulfuro de hidrógeno (H₂S) es tóxico y mortal para los mamíferos a elevadas concentraciones, pero a bajas concentraciones puede resultar beneficiosa. **Objetivos.** Evaluar la inocuidad del H₂S a 80 ppm en el corazón de *Cavia porcellus* in vivo. **Diseño.** Estudio experimental. **Instituciones.** Laboratorio de Farmacología Facultad de Medicina Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú, y Unidad de Cirugía Experimental del Instituto Nacional de Salud del Niño, Lima, Perú. **Material biológico.** Veintiún *Cavia porcellus* (cobayas). **Intervenciones.** El diseño experimental consideró 3 grupos (n = 7): 1) Control (exposición a aire limpio); 2) Experimental (exposición gaseosa de H₂S a 80 ± 20 ppm); 3) Referente (exposición a sevoflurano 1,5%). Los animales fueron colocados en una campana, donde fueron nebulizados por veinte minutos; al final del experimento se les retiró el corazón para estudio histopatológico. **Principales medidas de resultados.** Porcentaje de lesión en células cardíacas. **Resultados.** Los tejidos cardíacos de los grupos control y experimental no mostraron alteraciones, lo contrario al grupo expuesto a sevoflurano que mostraron moderada alteración en 3 muestras de 7, pero el resultado no fue significativo (p > 0,05) para este grupo. **Conclusión.** El H₂S a 80 ± 20 ppm fue inocuo para el tejido cardiaco de *Cavia porcellus*.

Palabras clave: Sulfuro de Hidrógeno; Sevoflurano; Cobayas; Inocuidad.

Abstract

Introduction. Hydrogen sulfide (H₂S) is toxic and lethal to mammals at high concentrations, but at low concentrations may be beneficial. **Objective.** Assessment of hydrogen sulfide harmless on *Cavia porcellus* (guinea pigs) cardiac tissue in vivo. **Design.** Experimental study. **Setting.** School of Medicine Pharmacology Laboratory, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Peru, and Experimental Surgery Unit at Instituto Nacional de Salud del Niño, Lima, Peru. **Biological material:** Twenty one *Cavia porcellus* (guinea pigs). **Interventions.** The experimental design considered three groups: 1) Clean air (control); 2) H₂S at 80 ± 20 ppm (experimental, gaseous exposure); 3) Sevoflurane 1.5% (gold standard). Animals were placed in a hood where they were nebulized for twenty minutes; at the end of the exposure, the heart was withdrawn for histopathological study. **Main outcome measures.** Cardiac cell injury. **Results.** H₂S exposure did not induce abnormalities; otherwise, exposure to sevoflurane showed moderate impairment in 3 of 7 heart tissues, but the result was not significant (p > 0.05) for this group. **Conclusion.** H₂S at 80 ± 20 ppm was innocuous on *Cavia porcellus* tissue cardiac.

Keywords. Hydrogen Sulfide; Sevoflurane; Guinea Pigs; Innocuousness.

An Fac med. 2016;77(3):213-7 / <http://dx.doi.org/10.15381/anales.v77i3.12401>

INTRODUCCIÓN

El sulfuro de hidrógeno (H₂S) ha sido conocido durante mucho tiempo como un gas nocivo con amplios efectos citotóxicos^(1,2). Se sabe también que es producido endógenamente a partir de cisteína por cistationina-γ-liasa (CSE), cistationina-β-sintetasa (CBS) y 3-mercaptopirurato sulfurtransferasa (3-MT)⁽³⁻⁵⁾. Estas enzimas específicas se expresan en diversos sistemas de

órganos y la CSE es la enzima predominantemente productora de H₂S en el sistema cardiovascular⁽⁶⁾. El mecanismo de acción principal del H₂S es la inhibición del complejo IV de la cadena de la fosforilación oxidativa en las mitocondrias⁽⁷⁾. Otro mecanismo importante a nivel cardiovascular es la apertura de los canales de potasio dependientes de ATP (K_{ATP}), que puede implicar la sulfhidración de residuos de cisteína dentro de la subunidad Kir6.1 de este

canal por H₂S⁽⁸⁾. Se ha observado que la producción de H₂S está desregulada en muchas condiciones patológicas como en aterosclerosis, hipertensión, insuficiencia cardíaca, diabetes, cirrosis, inflamación, sepsis, enfermedad neurodegenerativa, disfunción eréctil y asma⁽⁹⁾. Pero, en condiciones regulares actúa como un vasodilatador e inotrópico negativo y ha demostrado que alivia la hipertensión así como el daño a un órgano asociado⁽¹⁰⁾.

El interés en el campo de la investigación de H₂S ha crecido notablemente en los últimos años ⁽¹¹⁾. Por ejemplo, la administración exógena de H₂S redujo el tamaño del infarto en un modelo de arteria coronaria ligada en ratas ⁽¹²⁾. Dado que el H₂S es importante en la homeostasis y la patogénesis cardiovascular, los donantes de H₂S tienen potencial para ser desarrollados como efectivos agentes terapéuticos ^(13,14). El objetivo del presente trabajo fue evaluar la inocuidad del H₂S exógeno a 80 ppm en el tejido cardíaco de cobayas normales.

MÉTODOS

El material químico consistió en sulfuro de hierro (FeS), ácido clorhídrico (HCl) 5 M, sevoflurano (Ultano®, ABBVIE). Se utilizó los equipos vaporizador Sigma Delta, Penlon, y analizador de H₂S (MultiRAE Systems) y O₂ (MAXO₂me).

El material biológico incluyó veintidós cobayas del tipo *Cavia porcellus* de 250 ± 20 g de peso corporal y 10 semanas de edad, adquiridas del Instituto Nacional de Salud, Lima, Perú. Fueron instaladas en el Bioterio de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, aclimatándose por 5 días con libre acceso a alimentos y agua, con ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas.

Se respetó los protocolos establecidos por el Comité de Ética de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, para lograr el buen trato del animal de experimentación, además de tener en consideración la "Ley de protección a los animales domésticos y a los animales silvestres mantenidos en cautiverio" (Ley N° 27265) ⁽¹⁵⁾.

Para la obtención de H₂S, se introdujo 5 gramos de FeS y 40 mL de HCl 5 M en un matraz, se calentó ligeramente esta mezcla mediante un mechero ⁽¹⁶⁾ y el gas desprendido fue almacenado en un matraz kitazato modificado para la experimentación.

Las cobayas fueron distribuidas aleatoriamente en tres grupos de siete animales cada uno (n = 7): control (exposición a aire limpio), experimental (exposición de H₂S a 80 ppm) y fármaco referente (exposición de sevoflurano 1,5%).

Un matraz kitazato, que almacenaba H₂S, se conectó a una cámara herméticamente cerrada de 38,5 litros que contenía las 7 cobayas del grupo experimental. Una cánula conectada al analizador de gases estuvo en contacto con el medio interno de la cámara para medir la concentración de H₂S (80 ± 20 ppm). La exposición al gas fue por un tiempo de 20 minutos, el mismo tiempo de exposición a sevoflurano (1,5%). Ambas pruebas fueron realizadas a temperatura promedio (25-26°C) y en el mismo horario. Para el estudio anatomopatológico se siguió lo señalado por Devi y col. (2007) ⁽¹⁷⁾.

Los datos de las lesiones cardíacas fueron analizados mediante las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis. Los resultados se expresan en valores medios y desviación típica. Se analizó los puntajes del estudio anatomopatológico en base a las alteraciones encontradas en el tejido cardíaco. Para evaluar

la significancia estadística se consideró un valor p ≤ 0,05; el análisis estadístico se llevó a cabo mediante el software SPSS versión 21.

RESULTADOS

El tejido cardíaco de las cobayas expuestas al sulfuro de hidrógeno no presentaron alteración alguna al estudio anatomopatológico. Solo se encontró alteraciones en el grupo de cobayas expuestas al fármaco referente, sevoflurano (tabla 1 y 2). En el cuadrante A de la figura 1, se observa que el tejido presentó discreta alteración del miocardio y moderada congestión en pericardio. En el cuadrante B, otro tejido mostró moderada congestión en el pericardio. En el cuadrante C, un tercer tejido presentó leve alteración en el pericardio. Y en los cuadrantes D, E, F y G, el tejido no mostró alteración alguna.

Al análisis mediante Kruskal-Wallis, para datos no paramétricos, las medias resultantes fueron a nivel de endocardio 0,3 ± 0,8, miocardio 0,1 ± 0,4 y a nivel de pericardio 0,4 ± 0,8 (tabla 1). Los daños encontrados en el grupo del fármaco referente no fueron significativos (P > 0,05).

Tabla 1. Alteraciones encontradas en el tejido cardíaco luego de la exposición a sevoflurano.

Estructuras cardíacas	Cobaya 1	Cobaya 2	Cobaya 3
Endocardio	-	Discreta congestión (v=2)**	-
Miocardio	Leve alteración (v=1)*	-	-
Pericardio	Discreta congestión (v=2)**	Discreta congestión (v=2)**	Leve alteración (v=1)*

*Valoración igual a 1. **Valoración igual a 2.

Tabla 2. Alteraciones histológicas de las capas del corazón (VM ± DE) en cobayas.

Capas del corazón	Control (exposición a aire limpio)	Experimental (exposición de H ₂ S a 80 ppm)	Fármaco referente (exposición a sevoflurano 1,5%)	K-W	p
Endocardio	-	-	0,3 ± 0,8	2	0,37
Miocardio	-	-	0,1 ± 0,4	2	0,37
Pericardio	-	-	0,4 ± 0,8	4,2	0,12

VM±DE = Valor medio ± desviación estándar; K-W = Chi cuadrado de Kruskal-Wallis; p > 0,05.

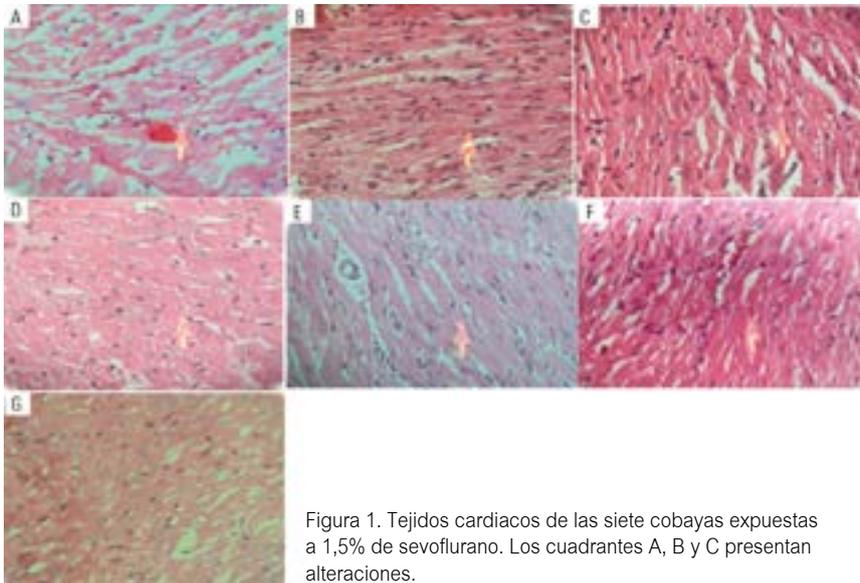


Figura 1. Tejidos cardiacos de las siete cobayas expuestas a 1,5% de sevoflurano. Los cuadrantes A, B y C presentan alteraciones.

DISCUSIÓN

De acuerdo al estudio anatomopatológico, se estaría demostrando la inocuidad del H_2S a 80 ± 20 ppm en tejido cardiaco de cobayas, resultados previsibles por ser cardioprotector, tal como lo afirman Sun y col. (2015)⁽¹²⁾. El H_2S y el sevoflurano tienen básicamente el mismo mecanismo de acción, deprimen la función mitocondrial⁽⁶⁾, pero el último produce el 'síndrome de robo coronario'. Esto podría haber contribuido a que presentase las leves alteraciones observadas al estudio anatomopatológico en tres muestras de tejido.

Una meta importante es encontrar hasta qué nivel de concentración de H_2S resultase inocuo o no produjera daños en el tejido cardiaco. Los estudios piloto de nuestro trabajo han determinado que este gas es mortal a 300 ppm en cobayas.

Durante la exposición a H_2S y sevoflurano, las cobayas respondían a estímulos audiovisuales, pero aminoraban la locomoción, contrario a lo experimentado por Volpato y col. (2008)⁽¹⁹⁾ en ratones, donde sí mantenían locomoción espontánea a la exposición de H_2S a 80 ppm. El sevoflurano a 1,5%, una de las concentraciones utilizadas por Li y col. (2012)⁽⁶⁾, no causaba depresión de la vigilia en cobayas, al igual

que no había locomoción espontánea. Durante el ensayo con sevoflurano se establecieron hasta tres rangos de concentración en una cámara de 38,5 litros: 1%, 1,5% y 2%. Las cobayas expuestas a 1% de sevoflurano conservaban la misma locomoción, no aparentaban depresión muscular ni de los sentidos; a 2% de sevoflurano presentaban sedación manifestada por el cierre total de sus párpados y la inclinación total de sus cuerpos hacia la base de la cámara; a 1,5% de sevoflurano, las cobayas permanecían despiertas, sin locomoción, pero mostraban reflejos ante estímulos sonoros.

De acuerdo a estudios primigenios que realizaron Blackstone y col. (2007)⁽¹⁸⁾, en ratones, se estableció un tiempo de exposición de H_2S de 20 minutos para el presente trabajo. La exposición a 80 ppm fue igual al trabajo realizado por Volpato y col. (2008)⁽¹⁹⁾. Las concentraciones a 80 ppm en otros estudios realizados tuvieron variaciones de tan solo $\pm 2,5$ ppm de H_2S ; nuestras variaciones fueron de ± 20 ppm. Se podría mejorar este aspecto para futuros experimentos.

Estudios realizados a concentraciones de 10% de O_2 y 60 ppm de H_2S presentaron menores lesiones en comparación a los realizados con 20,9% de

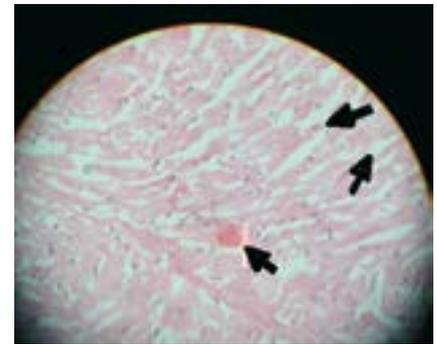


Figura 2. Miocardio. Las flechas en orden descendente indican pérdida de núcleos, separación excesiva de haces musculares y congestión.



Figura 3. Pericardio. La flecha negra señala discreta congestión.

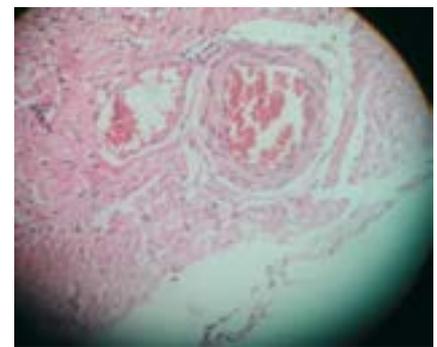


Figura 4. Pericardio. Leve alteración con gran aumento de linfocitos.

O_2 a la misma concentración de H_2S . Estas lesiones se presentaron en bronquios de ratones y consistían en descamaciones⁽²⁰⁾. Durante el estudio anatomopatológico, los tejidos cardiacos que fueron expuestos a H_2S no mostraban el más mínimo daño. Esto es similar al modelo de isquemia/reperusión realizada por Elrod y col. (2007), en el que se establece que el H_2S , administrado

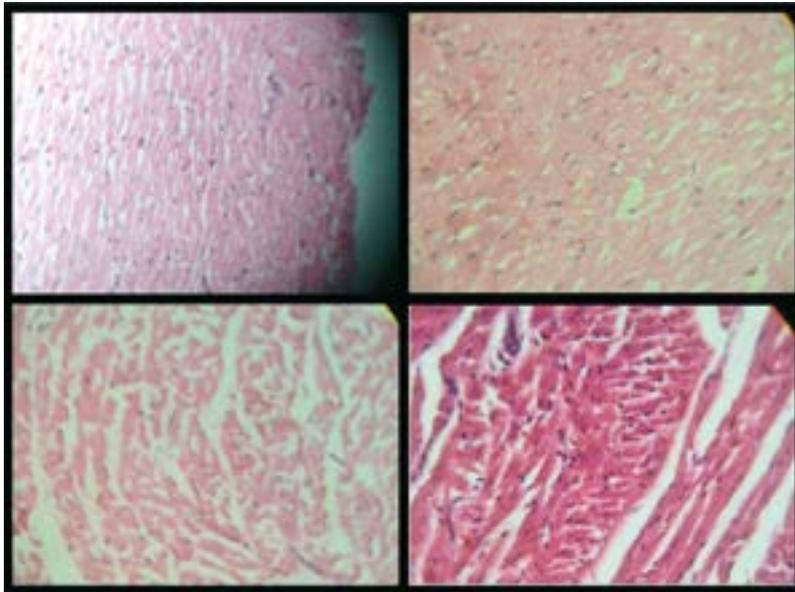


Figura 5. Tejidos cardiacos del grupo control. Las imágenes no muestran alteración alguna.

en el momento del evento limita el grado de infarto demostrado por la disminución sustancial en la hemorragia y necrosis, así como una disminución de leucocitos dentro de la zona isquémica.

El sevoflurano a 1,5 % causó cierta congestión en tejido celular del pericardio en tres cobayas (ver figuras 2 y 3). Sería interesante un estudio previo tratamiento con H₂S antes de exponer a algún animal de experimentación al sevoflurano.

El H₂S a 80 ± 20 ppm logró un inmejorable aspecto del tejido cardíaco en el grupo experimental de acuerdo al estudio anatomopatológico, lo cual estaría demostrando inocuidad en su uso a nivel de ese tejido en *Cavia porcellus* de la línea peruana. El sevoflurano produjo cierto daño en tejido cardíaco a las concentraciones de la experimentación, aunque para el resultado estadístico no existen diferencias entre los tres grupos.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Ernesto Ráez Gonzales, médico patólogo, profesor principal de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tamizhselvi R, Moore PK, Bhatia M. Hydrogen sulfide acts as a mediator of inflammation in acute pancreatitis: in vitro studies using isolated mouse pancreatic acinar cells. *J Cell Mol Med.* 2007;2:315-26. doi:10.1111/j.1582-4934.2007.00024.x.
2. Elrod J, Calvert J, Morrison J, Doeller J, Kraus D, Tao L, Jiao X, et al. Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. *PNAS.* 2007;104(39):15560-5.
3. Zhenga D, Donga S, Lia T, Yanga F, Yub X, Wua J, et al. Exogenous hydrogen sulfide attenuates cardiac fibrosis through reactive oxygen species signal pathways in experimental diabetes mellitus models. *Cell Physiol Biochem.* 2015;36:917-29. doi:10.1159/000430266.
4. Kolluru G, Shen X, Bir S, Kevil C. Hydrogen sulfide chemical biology: Pathophysiological roles and detection. *Nitric Oxide.* 2013;35:5-20. doi:10.1016/j.niox.2013.07.002.
5. Perry M, Hui C, Whiteman M, Wood M, Adcock I, Kirkham P, et al. Hydrogen sulfide inhibits proliferation and release of IL-8 from human airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.*

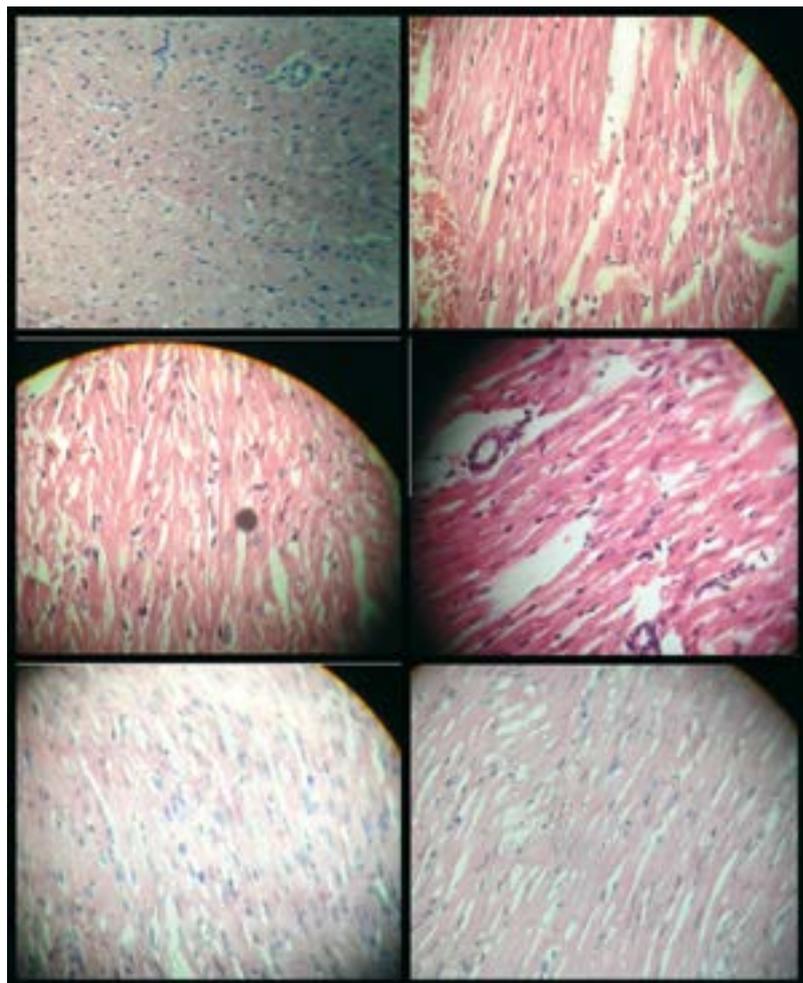


Figura 6. Tejido cardíaco del grupo experimental. Ninguno de los tejidos muestra alteración alguna.

- 2011;45(4):746–52. doi: 10.1165/rcmb.2010-0304OC.
6. Huang S, Li H, Ge J. A cardioprotective insight of the cystathionine γ -lyase/hydrogen sulfide pathway. *IJC Heart Vasculature*. 2015;7:51–7. doi:10.1016/j.ijcha.2015.01.010.
 7. Li R, McKinstry A, Moore J, Caltagarone B, Eckenhoff M, Eckenhoff R, Kelz M. Is hydrogen sulfide-induced suspended animation general anesthesia? *JPET*. 2012;341:735–42. doi: 10.1124/jpet.111.187237.
 8. Bos E, Goor H, Joles J, Whiteman M, Leuvenink H. Hydrogen sulfide: physiological properties and therapeutic potential in ischaemia. *Brit J Pharmacol*. 2014;172:1479–93. doi: 10.1111/bph.
 9. Bibli S, Yang G, Zhou Z, Wang R, Topouzis S, Papapetropoulos A. Role of cGMP in hydrogen sulfide signaling. *Nitric Oxide*. 2015;46:7–13. doi: 10.1016/j.niox.
 10. Jin Z, Chan H, Ning J, Lu K, Ma D. The role of hydrogen sulfide in pathologies of the vital organs and its clinical application. *J Physiol Pharmacol*. 2015;66(2):169–79.
 11. Bos E, Goor H, Joles J, Whiteman M, Leuvenink H. Hydrogen sulfide: physiological properties and therapeutic potential in ischaemia. *Brit J Pharmacol*. 2014;172:1479–93. doi: 10.1111/bph.
 12. Sun Y, Wang X, Chen X, Shen C, Li Y. Hydrogen sulfide improves cardiomyocytes electrical remodeling post ischemia/reperfusion injury in rats. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(1):474–81.
 13. Tomasova L, Pavlovicova M, Malekova L, Misak A, Kristek F, Grman M. Effects of AP39, a novel triphenylphosphonium derivatised anethole dithiolethione hydrogen sulfide donor, on rat haemodynamic parameters and chloride and calcium Cav3 and RyR2 channels. *Nitric Oxide*. 2015;46:131–44. doi: 10.1016/j.niox.
 14. Lambert J, Nicholson C, Amin H, Amin S, Calvert J. Hydrogen sulfide provides cardioprotection against myocardial/ischemia reperfusion injury in the diabetic state through the activation of the RISK pathway. *Med Gas Res*. 2014;4:20. doi: 10.1186/s13618-014-0020-0.
 15. Perú. Congreso de la República. Ley N° 27265: Ley de protección a los animales domésticos y a los animales silvestres mantenidos en cautiverio. Lima: Congreso de la República; 2000. Disponible en: <http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/2/jer/cia/Peru%20Ley%20protecc%20animales%20cautiverio%2027265%20del%202000.pdf>.
 16. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ingeniería. Guía de prácticas número 6. [Actualizado 2012-13; citada 2015 Agosto 18]. Disponible desde: <http://materias.fi.uba.ar/6303/TPN6.pdf>
 17. Devi R, Narayan S, Vani G, Shyamala C. Gastroprotective effect of Terminalia arjuna bark on diclofenac sodium induced gastric ulcer. *Chem Biol Interact*. 2007;167(1):71–83.
 18. Blackstone E, Roth, M. Suspended animation-like state protects mice from lethal hypoxia. *Shock*. 2007; 27(4):370–2.
 19. Volpato G, Searles R, Yu B, Scherrer-Crosbie, M., Bloch K, Ichinose F, et al. Inhaled hydrogen sulfide: a rapidly reversible inhibitor of cardiac and metabolic function in the mouse. *Anesthesiol*. 2008;108(4):659–68. doi: 10.1097/ALN.0b013e318167af0d.
 20. Stein A, Mao Z, Morrison J, Fanucchi M, Post-lethwait E, Patel R, Kraus D. Metabolic and cardiac signaling effects of inhaled hydrogen sulfide and low oxygen in male rats. *J Appl Physiol*. 2012;112:1659–69. doi: 10.1152/japphysiol.01598.2011.

Artículo recibido el 30 de octubre de 2015 y aceptado para publicación el 20 de marzo de 2016.

El presente artículo se presenta de manera exclusiva, no se envió a otra revista científica.

El costo del presente artículo fue asumido en su totalidad por los autores y colaboradores.

El presente artículo no presenta conflicto de intereses, es enviado con aprobación de los autores y colaboradores.

Correspondencia:
Q.F. César Gonzalo Gómez Herreros
Dirección: Laboratorio de Farmacología y Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
Teléfono: 947 766 011
Correo electrónico: cg_gh@hotmail.com