



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
Programa de Doctorado de Medicina y Cirugía

**DISFUNCIÓN VASCULAR  
ASOCIADA AL DAÑO  
PULMONAR INDUCIDO POR  
LA VENTILACIÓN  
MECÁNICA: DEMOSTRACIÓN  
MEDIANTE UN BIOENSAYO**

**TESIS DOCTORAL:  
IRENE ORTIZ VALENTÍN**

**DIRECTORES:  
DRA. LETICIA MARTÍNEZ-CARO  
DR. JOSÉ ÁNGEL LORENTE BALANZA**

**Madrid, 2017**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
Programa de Doctorado de Medicina y Cirugía



**DISFUNCIÓN VASCULAR  
ASOCIADA AL DAÑO  
PULMONAR INDUCIDO POR LA  
VENTILACIÓN MECÁNICA:  
DEMOSTRACIÓN MEDIANTE  
UN BIOENSAYO**

**TESIS DOCTORAL:  
IRENE ORTIZ VALENTÍN**

**DIRECTORES:  
DRA. LETICIA MARTÍNEZ-CARO  
DR. JOSÉ ÁNGEL LORENTE BALANZA**

**MADRID, JUNIO 2017**

## **Agradecimientos**

*Cuando de pequeña me preguntaban, “¿qué quieres ser de mayor?”, yo siempre respondía: “científica”. Quizá por eso me embarqué en este proyecto, hace ya casi 5 años. A través de mi compañera Natalia Ramos, recalé en la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario de Getafe, donde me acogieron con los brazos abiertos desde el primer momento, en especial mis directores de tesis, la Dra. Martínez-Caro y el Dr. Lorente. Siempre había tenido la “espinita” de hacer un trabajo de investigación básica, así que cuando me enseñaron los modelos con los que trabajaban, me pareció apasionante. Sin embargo, un trabajo de estas características es duro y largo, ya me lo advirtió Leticia, aunque al final da sus frutos. Mi deseo, es haber aportado “mi gotita de agua” al gran océano que es el mundo de la investigación.*

*A lo largo de este camino, son muchas las personas con las que siempre estaré “eternamente” agradecida:*

*Mis directores de la tesis, José Ángel Lorente Balanza y Leticia Martínez-Caro.*

*Leticia, gracias por enseñarme pacientemente a trabajar con animales, con un inmenso respeto hacia ellos, y por transmitirme tu entusiasmo por la investigación, por tus consejos y observaciones, tu profesionalidad y tu compromiso con este trabajo.*

*José Ángel, gracias por abrirme las puertas y acogirme en Getafe. Gracias por tu profesionalidad, por el entusiasmo por tu trabajo y por la pasión por la investigación que desprendes, por tu optimismo y ánimos constantes, tus críticas (siempre constructivas), y por recibirme siempre con una sonrisa.*

*A mi tutor de la Universidad Autónoma de Madrid, el Dr. Francisco Ruza Tarrío. Para mí es un gran honor que usted, una verdadera institución en el mundo de los Cuidados Intensivos Pediátricos, haya sido el tutor de este trabajo. Gracias por su cercanía, amabilidad, sus consejos y su disposición.*

*Gracias a la Sociedad Española de Cuidados Intensivos Pediátricos (SECIP) por concedernos la Beca Ruza 2014, que ha permitido realizar este trabajo.*

## **Agradecimientos**

*A Alberto Sánchez Ferrer, por tu gran ayuda en los experimentos de función vascular, por tu asesoramiento, tu amabilidad y tu sonrisa constantes, sin ti no hubiera sido posible este trabajo.*

*A Yeny Rojas Vega, por su gran ayuda en la puesta a punto del modelo animal, por sus sugerencias, su gran capacidad de trabajo y su generosidad.*

*Gracias al resto del personal de la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario de Getafe: Antonio Ferruelo, Mariam El Assar, Raquel Herrero, Mario, el Dr. Andrés Esteban, el Dr. Nicolás Nin, gracias a todos por vuestro apoyo.*

*Gracias a mi familia. A mis hermanos, Esther y Sergio, y a mi cuñada Lourdes, por vuestro empuje constante y por estar siempre cuando os necesito. Gracias a mis padres, Venancio y Loli, que han trabajado durante toda su vida para darnos la educación que ellos no pudieron tener, es el mejor regalo que nos habéis podido hacer.*

*Gracias al resto de la familia, a mis suegros y familia política, a mis compañeros de trabajo a lo largo de todos estos años, por vuestros ánimos constantes.*

*Gracias a mis amigas y amigos, por los momentos compartidos y los que vendrán.*

*Gracias a Iván, que ha vivido desde el inicio este trabajo. Gracias por tu apoyo firme, por alentarme en mis días bajos, por no dejarme tirar la toalla, por tu generosidad y por cuidarme tanto.*

*Y gracias a Eric, tú eres mi mejor experimento! Siento el tiempo que esta tesis te haya podido robar, espero que algún día te sientas orgulloso de tu mamá. Gracias a ambos por alegrarme cada día, os quiero!*

# Índice

<b>ABREVIATURAS</b> .....	1
<b>I.RESUMEN</b> .....	7
<b>II.INTRODUCCIÓN</b> .....	13
<b>Daño pulmonar agudo y síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA)</b> .....	15
<b>Definiciones</b> .....	18
<b>Epidemiología del SDRA</b> .....	22
<b><i>Ventilator-induced lung injury (VILI)</i></b> .....	24
Factores mecánicos.....	24
Biotrauma.....	25
Papel de las citoquinas en el biotrauma.....	26
Reclutamiento de neutrófilos al pulmón.....	28
Translocación y descompartimentalización.....	29
Apoptosis.....	30
Papel del surfactante pulmonar.....	31
Alteraciones en la cascada de la coagulación.....	32
<b>Disfunción multiorgánica asociada a VILI. Estrés nitro-oxidativo</b> .....	34
Papel del endotelio en la disfunción vascular.....	34
Estrés nitro-oxidativo.....	36
Especies reactivas derivadas del oxígeno.....	36
Especies reactivas derivadas del nitrógeno.....	37
Efectos biológicos del peroxinitrito.....	38
Disfunción vascular asociada al VILI.....	42
<b>Estrategias terapéuticas en el SDRA</b> .....	44
Estrategias y modalidades de ventilación mecánica.....	44
Tratamiento farmacológico.....	46
<b>Modelos experimentales en SDRA y VILI</b> .....	50
Características a tener en cuenta en la elección del modelo animal.....	51
Tipos de modelos de VILI.....	52
Modelos que tienen como diana el endotelio capilar.....	52
Modelos que tienen como diana el epitelio alveolar.....	53
Modelos que tienen como diana el endotelio capilar y el epitelio alveolar.....	54
Características del modelo de pulmón ventilado aislado y perfundido.....	56
<b>III.JUSTIFICACIÓN</b> .....	59
<b>IV.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	63
<b>V.MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	67
<b>1. Diseño</b> .....	69
<b>2. Periodo de estudio</b> .....	69
<b>3. Animales de experimentación</b> .....	69
<b>4. Descripción de los modelos animales</b> .....	70
4.1. Fase I: modelo de daño pulmonar inducido por la ventilación mecánica (VM).....	70
4.1.1. Elementos del sistema de ventilación y perfusión <i>ex vivo</i> . ....	70

4.1.2. Preparación del experimento.....	72
4.1.3. Anestesia.....	73
4.1.4. Procedimiento quirúrgico .....	73
4.2. Fase II: modelo de disfunción vascular <i>in vitro</i> .....	77
<b>5. Protocolo experimental.....</b>	<b>80</b>
5.1. Fase I: modelo de daño pulmonar inducido por la ventilación mecánica.....	80
5.2. Fase II: modelo de disfunción vascular <i>in vitro</i> .....	81
<b>6. Tamaño de la muestra.....</b>	<b>85</b>
<b>7. Variables del estudio.....</b>	<b>87</b>
7.1. Medidas hemodinámicas y respiratorias.....	87
7.2. Análisis histológico.....	87
7.3. Parámetros del líquido de perfusión.....	88
7.4. Curva dosis-respuesta de relajación y contracción.....	88
<b>8. Análisis estadístico.....</b>	<b>89</b>
<b>9. Consideraciones éticas.....</b>	<b>90</b>
<b>10. Financiación.....</b>	<b>90</b>
<b>VI.RESULTADOS.....</b>	<b>91</b>
<b>1. Determinación del valor de presión inspiratoria pico máxima que predice el desarrollo de histológico pulmonar.....</b>	<b>93</b>
<b>Resultados del objetivo 1.....</b>	<b>95</b>
<b>1. Mecánica pulmonar.....</b>	<b>96</b>
1.1. Presión pico inspiratoria en la vía aérea.....	96
1.2. Distensibilidad dinámica.....	98
<b>2. Estudio histológico: índice de daño pulmonar.....</b>	<b>100</b>
<b>3. Composición del líquido de perfusión.....</b>	<b>103</b>
3.1. Equilibrio ácido-base y lactato.....	103
3.2. Parámetros bioquímicos.....	108
3.3. Parámetros hematológicos.....	115
<b>Resultados del objetivo 2: efecto de la VM sobre la función vascular.....</b>	<b>117</b>
<b>1. Efecto de la ventilación con <math>V_T</math> bajo y <math>V_T</math> elevado sobre la función endotelial.....</b>	<b>118</b>
1.1. Función endotelial en relación a la presencia de daño pulmonar.....	122
<b>2. Efecto de la ventilación con <math>V_T</math> bajo y <math>V_T</math> elevado sobre la función contráctil.....</b>	<b>126</b>
2.1. Función contráctil en relación a la presencia de daño pulmonar.....	129
<b>Resultados del objetivo 5: papel del estrés nitro-oxidativo.....</b>	<b>133</b>
<b>1. Efecto de los inhibidores del estrés nitro-oxidativo sobre la función endotelial.....</b>	<b>134</b>
1.1 Metaloporfirina.....	134
1.2 Tempol.....	136
1.3 SOD.....	138
<b>2. Efecto de los inhibidores del estrés nitro-oxidativo sobre la función endotelial en función del daño pulmonar.....</b>	<b>140</b>
2.1 Metaloporfirina.....	140
2.2 Tempol.....	142

2.3 SOD.....	144
<b>3. Efecto de los inhibidores del estrés nitro-oxidativo sobre la función contráctil.....</b>	<b>146</b>
3.1 Metaloporfirina.....	147
3.2 Tempol.....	149
3.4. SOD.....	151
<b>4. Efecto de los inhibidores del estrés nitro-oxidativo sobre la función contráctil en función del daño pulmonar.....</b>	<b>153</b>
4.1. Metaloporfirina.....	153
4.2. Tempol.....	155
4.3. SOD.....	157
<b>VII.DISCUSIÓN.....</b>	<b>161</b>
<b>Justificación del modelo experimental empleado.....</b>	<b>163</b>
Validez del modelo de VILI.....	165
Consideraciones sobre el modelo de pulmón aislado ventilado y perfundido.....	168
Consideraciones sobre la composición del líquido de perfusión.....	170
<b>Caracterización de 2 fenotipos en relación a la respuesta a la VM con <math>V_T</math> elevado.....</b>	<b>171</b>
<b>Mecánica pulmonar.....</b>	<b>176</b>
<b>Cambios histológicos.....</b>	<b>177</b>
<b>Cambios en el líquido de perfusión.....</b>	<b>180</b>
Equilibrio ácido-base.....	180
Daño celular: actividad de AST, ALT, LDH y CK.....	182
Otros parámetros bioquímicos.....	185
<b>VILI y disfunción vascular. Papel del estrés nitro-oxidativo.....</b>	<b>186</b>
Función endotelial.....	186
Efecto de la metaloporfirina sobre la función endotelial.....	193
Efecto del tempol sobre la función endotelial.....	195
Efecto de la SOD sobre la función endotelial.....	196
Función contráctil.....	197
Efecto de la metaloporfirina sobre la función contráctil.....	200
Efecto del tempol sobre la función contráctil.....	201
Efecto de la SOD sobre la función contráctil.....	202
<b>Limitaciones.....</b>	<b>202</b>
<b>Aportaciones más relevantes del estudio.....</b>	<b>205</b>
<b>Futuras líneas de investigación.....</b>	<b>205</b>
<b>VII.CONCLUSIONES.....</b>	<b>207</b>
<b>VIII.BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>211</b>

# Abreviaturas

### ABREVIATURAS

3-AB	3-aminobenzamida
AECC	Conferencia de consenso Americano-Europea
AC	Anticuerpos
Ach	Acetilcolina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALI	Lesión pulmonar aguda ( <i>“Acute lung injury”</i> )
ANOVA	Análisis de la variancia
ATP	Adenosín trifosfato
BH4	Tetrahidrobiopterina
CID	Coagulación intravascular diseminada
CK	Creatín kinasa
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CO <sub>3</sub> <sup>•-</sup>	Carbonato
COX	Ciclooxigenasa
CPAP	<i>“Continuous positive airway pressure”</i>
CQ	Citoquina.
CXCL8 ó IL-8	Interleuquina 8
DHE	Dihidroetidio
DPA	Daño pulmonar agudo
EB	Exceso de bases
ECA	Enzima convertidora de angiotensina
EROs	Especies reactivas del oxígeno
ERNs	Especies reactivas derivadas del nitrógeno
ET	Endotelina
FiO <sub>2</sub>	Fracción inspirada de oxígeno
FMO	Fallo multiorgánico
FR	Frecuencia respiratoria
G-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos ( <i>“Granulocyte colony-stimulating factor”</i> )
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos ( <i>“Granulocyte and macrophage colony-stimulating factor”</i> )
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico

## Abreviaturas

H <sub>2</sub> O	Agua
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HCl	Ácido clorhídrico
IC	Intervalo de confianza
ICAM	Molécula de adhesión intercelular
IL	Interleuquina
I-R	Isquemia-reperfusión
KC	Krebs control
KGF	Factor de crecimiento de queratinocitos ("Keratinocyte growth factor")
KHS	Solución de Krebs-Henseleit
KP	Krebs problema
LBA	Lavado broncoalveolar
LDH	Lactato deshidrogenasa
LPC	Ligadura y punción del ciego
LPS	Lipopolisacárido
MAPK	Proteína kinasa activada por mitógenos
MIP	Proteína inflamatoria de macrófagos ("Macrophage inflammatory protein")
MMP	Metaloproteasa de matriz ("Matrix metalloproteinase")
MnTMPyP	Manganeso tetrakis (4-N-metilpiridil) porfirina o metaloporfirina
mRNA	ácido ribonucleico mensajero
MSCs	Células madre mesenquimales ("mesenchymal stem cells")
NAC	N-acetilcisteína
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidada
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NE	Norepinefrina o noradrenalina
NF	Factor nuclear ("nuclear factor")
NO	Óxido nítrico
NO <sup>2-</sup>	Nitrito
NO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	Dióxido de nitrógeno
O <sub>2</sub>	Oxígeno
O <sub>2</sub> <sup>-•</sup>	Anión superóxido
OH <sup>•</sup>	Radical hidróxilo
OONO <sup>-</sup>	Peroxinitrito

## Abreviaturas

ONOOH	Ácido peroxinitroso
PAI	Inhibidor del activador del plasminógeno ("Plasminogen activator inhibitor")
PAM	Presión arterial media
PaO <sub>2</sub>	Presión arterial de oxígeno
PARP	Poli-adenosina difosfato (ADP)-ribosa polimerasa
PPAR-γ	Receptores activados por proliferadores de peroxisomas
P <sub>AW</sub>	Presión media en la vía aérea.
pCO <sub>2</sub>	Presión parcial de dióxido de carbono
PEEP	Presión espiratoria al final de la espiración
PGI	Prostaciclina
PGs	Prostaglandinas
PIM	Macrófagos pulmonares intra alveolares
PIP	Presión inspiratoria pico
PMN	Polimorfonuclear
pO <sub>2</sub>	Presión parcial de oxígeno
RR	Riesgo relativo
SD	Sprague-Dawley
SDRA	Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo
SFasL	Ligando soluble de Fas
-SH	Grupos sulfhidrilo
SOD	Superóxido dismutasa
TC	Tomografía computarizada
T	Tiempo
Ti	Tiempo inspiratorio.
TLR	Receptores Toll-like
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNFR	Receptores de TNF
TXA <sub>2</sub>	Tromboxano A <sub>2</sub>
VAFO	Ventilación de alta frecuencia oscilatoria
VILI	<i>"Ventilator-induced lung injury"</i>
VM	Ventilación mecánica
V <sub>T</sub>	Volumen <i>tidal</i>
VALI	<i>"Ventilator-associated lung injury"</i>
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos

# I. Resumen

**TÍTULO:** DISFUNCIÓN VASCULAR ASOCIADA AL DAÑO PULMONAR INDUCIDO POR LA VENTILACIÓN MECÁNICA: DEMOSTRACIÓN MEDIANTE UN BIOENSAYO

### INTRODUCCIÓN

La ventilación mecánica (VM) con  $V_T$  elevado se asocia con lesión pulmonar (*ventilator-induced lung injury*, VILI) y daño de órganos a distancia. La relevancia clínica de la relación del pulmón con otros órganos viene documentada, por ejemplo, por la observación de que la principal causa de mortalidad en el síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA) es el shock y el fallo multiorgánico. En modelos animales de VILI *in vivo* se ha demostrado disfunción vascular, que puede ser causada bien por mediadores producidos por el pulmón lesionado (daño no pulmonar a distancia), o bien por cambios hemodinámicos asociados al VILI (en el contexto de grandes variaciones de la presión intratorácica). Por eso, para documentar que existe un efecto del pulmón lesionado en la circulación, es importante demostrar disfunción vascular en ausencia de efectos hemodinámicos. Un bioensayo, en el cual el efluente del pulmón ventilado *ex vivo* es incubado con vasos *in vitro*, permitirá demostrar el efecto del pulmón lesionado sobre los vasos sistémicos.

### OBJETIVOS

De forma general, demostrar que el VILI se asocia con una alteración en la función vascular. Los objetivos secundarios fueron: (i) demostrar que la VM utilizando  $V_T$  elevado *ex vivo* se asocia con daño pulmonar (VILI); (ii) demostrar que el VILI se asocia con disfunción vascular *in vitro*; (iii) demostrar que existen dos fenotipos de respuesta a la VM, dependiendo de la presencia de daño alveolar difuso; (iv) demostrar que la disfunción vascular es más marcada en los casos que desarrollan daño alveolar difuso; (v) demostrar que el aumento del estrés nitro-oxidativo juega un papel en la disfunción vascular asociada al VILI.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio prospectivo experimental con 2 modelos. (i) Modelo de pulmón aislado ventilado y perfundido *ex vivo*, procedente de ratas macho Sprague-Dawley

(peso  $350 \pm 25$  g). Se extrajo *en bloc* el corazón-pulmón y se montó en una cámara para ventilación *ex vivo*, perfundido con solución Krebs-Henseleit y albúmina 4% (4 mL/min). Tras 30 minutos de estabilización con  $V_T$  bajo ( $V_T=6$  mL/kg + PEEP 5 cm H<sub>2</sub>O), los pulmones fueron ventilados durante 150 minutos con  $V_T$  bajo ( $V_T=6$  mL/kg + PEEP 5 cm H<sub>2</sub>O) o elevado ( $V_T=25$  mL/kg, PEEP=0 cm H<sub>2</sub>O). (ii) Modelo *ex vivo* de función vascular. Anillos vasculares de aorta de animales sanos se incubaron 60 minutos con el líquido de perfusión procedente de los pulmones ventilados en diferentes condiciones, y se estudió la relajación (anillos precontraídos con norepinefrina [NE]) y la contracción isométrica (anillos en reposo) mediante la administración de dosis crecientes de acetilcolina (Ach) y NE, respectivamente. Se estudiaron los efectos del tempol ( $10^{-4}$  M), neutralizador de especies reactivas del oxígeno (ERO) intracelulares, superóxido dismutasa (SOD 100 U/mL), neutralizador del radical superóxido, y metaloporfirina ( $10^{-5}$  M), neutralizador de especies reactivas del nitrógeno (ERN), sobre las respuestas a Ach y NE. Mediciones: presión pico inspiratoria (PIP), presión en arteria pulmonar (PAP), parámetros gasométricos, bioquímicos y hematológicos en el líquido de perfusión, análisis histológico (hematoxilina-eosina) y curvas dosis-respuesta a Ach y NE. Análisis estadístico: se realizó una curva ROC para determinar el valor de PIP al final del experimento que mejor predice la presencia en el estudio histológico de daño alveolar difuso (ausencia o presencia de membranas hialinas). Las variables cuantitativas se compararon mediante una prueba de la t de Student o mediante un ANOVA, y las curvas dosis-respuesta mediante un ANOVA para medidas repetidas. Las variables cualitativas se analizaron mediante la prueba de Chi cuadrado. Se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p < 0,05$ . Los procedimientos siguieron los principios del animal de laboratorio (Directiva 2010/63/UE, RD 53/2013 BOE-A-2013-1337, Ley 32/2007 BOE 7-11). El estudio fue aprobado por el Comité de Investigación de nuestra institución.

## RESULTADOS

El valor de PIP que predijo con mejor sensibilidad y especificidad la presencia de daño alveolar difuso en el examen histológico correspondió a una PIP de 15

cm H<sub>2</sub>O, por lo que se distinguieron 2 patrones que denominamos (i) V<sub>T</sub> elevado sin daño pulmonar (PIP <15 cm H<sub>2</sub>O); y (ii) V<sub>T</sub> elevado con daño pulmonar (PIP ≥ 15 cm H<sub>2</sub>O).

Los pulmones ventilados con V<sub>T</sub> elevado experimentaron un aumento progresivo de la PIP y un descenso de la distensibilidad dinámica a lo largo del experimento, significativamente mayor que en los pulmones ventilados con V<sub>T</sub> bajo. Estos cambios fueron más marcados en los pulmones ventilados con V<sub>T</sub> elevado con daño pulmonar que en los pulmones ventilados con V<sub>T</sub> elevado sin daño pulmonar. El índice de daño pulmonar histológico fue significativamente mayor en los pulmones ventilados con V<sub>T</sub> elevado, en comparación con los pulmones ventilados con V<sub>T</sub> bajo, y mayor en los pulmones ventilados con V<sub>T</sub> elevado con daño pulmonar, que en los pulmones ventilados con V<sub>T</sub> elevado sin daño pulmonar. Asimismo, los pulmones ventilados con V<sub>T</sub> elevado, en comparación con los ventilados con V<sub>T</sub> bajo, presentaron elevación de enzimas de citolisis (ALT, AST, LDH), disminución de la concentración de glucosa y elevación de la concentración de lactato en el efluente pulmonar. Estos cambios fueron siempre más marcados en los pulmones ventilados con V<sub>T</sub> elevado con daño pulmonar que en los pulmones ventilados con V<sub>T</sub> elevado sin daño pulmonar.

Los anillos aórticos incubados con el líquido de perfusión procedente de los pulmones ventilados con V<sub>T</sub> elevado, mostraron una disminución significativa de la relajación a dosis crecientes de Ach, en comparación con el grupo control. Esta alteración en la función endotelial fue significativamente más marcada en el grupo ventilado con V<sub>T</sub> elevado con daño pulmonar, en comparación con el grupo ventilado con V<sub>T</sub> elevado sin daño pulmonar, y mejoró mediante el tratamiento con tempol y con SOD *in vitro*. Los anillos aórticos incubados con el líquido de perfusión procedente de los pulmones ventilados tanto con V<sub>T</sub> bajo como con V<sub>T</sub> elevado, mostraron una disminución no significativa de la contracción en respuesta a dosis crecientes de NE, en comparación con el control, que tendió a mejorar (no significativamente) mediante el tratamiento con metaloporfirina, mientras que el tratamiento con tempol y SOD empeoraron la función contráctil.

### CONCLUSIONES

(i) La VM utilizando un  $V_T$  elevado ex vivo induce daño pulmonar (VILI). (ii) El VILI se asocia con disfunción vascular. (iii) Existen dos fenotipos de respuesta a la ventilación mecánica, caracterizados por distinto grado de deterioro de la mecánica respiratoria, daño celular pulmonar y cambios histológicos del pulmón (daño alveolar difuso). (iv) La disfunción vascular asociada al VILI se desarrolla de forma más marcada en el grupo que presenta daño alveolar difuso. (iv) La disfunción vascular asociada al VILI se debe a un aumento del estrés nitro-oxidativo. Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que el pulmón lesionado libera mediadores que inducen daño no pulmonar a distancia que explican la disfunción de otros órganos en el contexto del daño pulmonar.

## **II. Introducción**

### DAÑO PULMONAR AGUDO Y SÍNDROME DE DISTRÉS RESPIRATORIO AGUDO

El **Daño Pulmonar Agudo (DPA)** y su forma más grave el **Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo (SDRA)**, se caracterizan por la aparición de edema pulmonar por hiperpermeabilidad [1]. La ventilación mecánica (VM) se ha utilizado ampliamente en el tratamiento del paciente crítico, siendo el SDRA una de sus indicaciones. La constelación de consecuencias pulmonares de la VM en los modelos animales se denomina daño pulmonar inducido por la VM (“*ventilator induced lung injury, VILI*”).

En 1967, el término “*respirator lung*” se acuñó para describir los infiltrados alveolares difusos y las membranas hialinas encontradas en los estudios post *mortem* de pacientes que había tenido VM [2]. Más recientemente, se ha demostrado el daño que la VM puede causar en pulmones previamente normales [3]. Esta lesión se caracteriza patológicamente por infiltrados de células inflamatorias, membranas hialinas, aumento de la permeabilidad vascular y edema pulmonar.

Pero no ha sido hasta este siglo cuando se ha entendido la importancia clínica del daño pulmonar inducido por la VM en adultos, gracias a un trabajo que demostró que el uso de volúmenes *tidal* ( $V_T$ ) elevados en pacientes con SDRA es deletéreo, y que una estrategia ventilatoria diseñada para minimizar este daño disminuía la mortalidad entre pacientes con SDRA [4]. En este estudio se encontró una reducción en la mortalidad del 40% al 31% al ventilar a los pacientes del grupo de intervención con un  $V_T$  de 6 ml/kg (respecto al  $V_T$  convencional de 12 ml/kg), limitando la presión *plateau* a 30 cm H<sub>2</sub>O.

Hace tiempo que se conoce el efecto nocivo sobre el pulmón de las estrategias de ventilación con presión pico elevada, como son las alteraciones en la permeabilidad microvascular que producen edema pulmonar. Por otro lado, la VM lesiva con volúmenes corrientes elevados se asocia con una alteración del intercambio gaseoso, disminución de la distensibilidad pulmonar y formación de membranas hialinas [5]. Además, estos cambios se traducen en un aumento de la presión pico.

Diversos trabajos han demostrado que los mecanismos de la lesión pulmonar inducida por la ventilación mecánica incluyen, entre otros, la inflamación, disrupción de la

## Introducción

barrera epitelio-alveolar, edema intersticial, lesión celular, formación de membranas hialinas, pérdida de la función del surfactante, colapso alveolar y apoptosis [1].

Independientemente de la gravedad del fallo respiratorio, la principal causa de mortalidad en el SDRA es el shock y el fallo multiorgánico (FMO), más que la hipoxemia [6]. Las estrategias de ventilación protectora producen una disminución de la mortalidad, pero este descenso de la mortalidad en pacientes ventilados con  $V_T$  bajo no se acompañaba de diferencias en el intercambio gaseoso respecto a los pacientes con  $V_T$  elevado, sino por una menor duración del shock y el FMO [4].

Por tanto, existe evidencia de que la VM lesiva no sólo produce patología a nivel pulmonar, sino que genera alteraciones a distancia. En modelos animales de SDRA se ha demostrado que la VM con  $V_T$  elevado produce inflamación sistémica [7,8], alteración en la función renal [9,10], disfunción vascular [5,11–13] e hiperpermeabilidad intestinal [14]. Se conoce que en la patogénesis del SDRA están implicados un daño directo a las células pulmonares y un daño indirecto resultado de la respuesta inflamatoria sistémica. En relación a esto, un estudio realizado en pacientes con SDRA, demostró que la lesión iniciada en el pulmón puede desencadenar una serie de eventos a nivel sistémico, que desembocan finalmente en el fallo irreversible de varios órganos [15].

Por otro lado, otro ejemplo de las alteraciones a distancia observadas en modelos animales, son las modificaciones en la función vascular producidas tanto en la relajación como en la contracción en los grupos ventilados con estrategias lesivas [13,16]. La disfunción vascular asociada al daño pulmonar inducido por la VM, se caracteriza por hipotensión, hiperpermeabilidad microvascular y daño en la respuesta *ex vivo* a estímulos vasoconstrictores y vasodilatadores [5,12,13].

Existen evidencias del papel del estrés nitro-oxidativo en el SDRA y el daño pulmonar inducido por la VM, así como la influencia de la formación de peroxinitrito en la disfunción vascular [17]. Se ha sugerido que el aumento de anión superóxido y NO (óxido nítrico), con la consecuente generación de peroxinitrito, pueden estar implicados en la disfunción vascular asociada al daño pulmonar inducido por VM [16,18].

## Introducción

Como se ha comentado anteriormente, en pacientes con SDRA, la aplicación de  $V_T$  bajos ha disminuido la mortalidad [4]. Sin embargo, estas estrategias de ventilación no siempre se pueden aplicar en todos los pacientes, y se requieren otras terapias farmacológicas alternativas para mejorar la supervivencia y disminuir las complicaciones sistémicas asociadas en estos pacientes. Por otro lado, el uso de VM con  $V_T$  no dañinos se asocia a lesión pulmonar [3]. Se han ensayado múltiples terapias para intentar revertir el daño pulmonar inducido por la VM, como los corticosteroides [12,19–21] o la N-acetilcisteína (NAC), un precursor del antioxidante fisiológico glutatión [22,23], sin demostrar un beneficio claro ninguna de ellas.

En los modelos animales de VILI *in vivo*, en los que se ventila al animal completo, el aumento de la presión intratorácica al ventilar con  $V_T$  elevado produce un descenso del retorno venoso, lo que podría resultar en hipoperfusión de órganos, con la consecuente disfunción sistémica. En cambio, en los modelos *ex vivo*, en los que se extraen los pulmones en bloque para ventilar (y perfundir en su caso) el pulmón, en un sistema controlado fuera de la caja torácica, el hecho de aplicar  $V_T$  elevados no produce cambios hemodinámicos significativos, por lo que permite demostrar que la disfunción vascular asociada a VILI es producida por la ventilación mecánica con  $V_T$  elevado y no explicable sólo por alteraciones hemodinámicas [16].

Nuestro objetivo es demostrar mediante un bioensayo, con un modelo *ex vivo* de pulmón y un modelo *ex vivo* de función vascular, que el DPA induce una alteración en la función vascular, al liberarse sustancias a la circulación desde el pulmón, en cuyo mecanismo está implicado el estrés nitro-oxidativo.

En esta introducción se revisarán en primer lugar las definiciones de SDRA y VILI, los factores de riesgo asociados a esta condición y de forma breve la incidencia y mortalidad, tanto en población adulta como pediátrica. A continuación se exponen los mecanismos implicados del daño pulmonar inducido por la VM, con especial mención al biotrauma. Se discutirán igualmente los mecanismos responsables de la disfunción vascular asociada a VILI, haciendo hincapié en el papel del estrés nitro-oxidativo. Posteriormente se describirán algunos de los tratamientos experimentales y clínicos usados en el SDRA, entre los que se

## Introducción

encuentran los atrapadores de radicales libres y peroxinitrito. Finalmente, se comentarán los modelos experimentales usados para el estudio del SDRA y VILI, haciendo hincapié en el modelo del presente trabajo de pulmón ventilado aislado y perfundido, y se justificará la realización del presente trabajo de investigación básica.

## DEFINICIONES

El daño pulmonar aguda inducido por la VM en modelos animales se denomina lesión pulmonar inducida por la ventilación mecánica (“**ventilator induced lung injury**”, **VILI**). La lesión pulmonar asociada a la ventilación mecánica (“**ventilator-associated lung injury**”, **VALI**) es similar al SDRA y ocurre en pacientes sometidos a VM. Sin embargo, en este caso, no se puede asegurar una relación causal entre el daño pulmonar y la VM. VALI es el término apropiado en la mayoría de las situaciones clínicas, ya que es prácticamente imposible probar causalidad fuera del ámbito de la investigación [24].

En 1967, Ashbaug *et al.* [25] describieron el SDRA, identificando en 12 pacientes de una cohorte de 272 que recibían soporte respiratorio, hallazgos similares al síndrome de distrés respiratorio de la infancia, encontrando una mortalidad del 58%. El SDRA se caracteriza por una reacción aguda inflamatoria con daño a la barrera epitelio alveolar, que produce edema y descenso de la distensibilidad pulmonar, con aumento del *shunt* intrapulmonar e hipoxemia. Desde su descripción por Ashbaugh, el diagnóstico del SDRA se ha hecho en base a la existencia de una enfermedad predisponente, un comienzo agudo, la presencia infiltrados pulmonares bilaterales e hipoxemia grave. La última definición del SDRA se consensuó en 2012 en Berlín [29], aunque la mayoría de estudios publicados usan los criterios diagnósticos de la Conferencia de consenso Americano-Europea (AECC) de 1994 [30].

La **AECC** [30] definía el SDRA en base a los siguientes criterios: 1) Comienzo agudo; 2) Infiltrados bilaterales en radiografía de tórax; 3) Ausencia de hipertensión en la aurícula izquierda con una presión en la arteria pulmonar <18 mm Hg; 4) Hipoxemia: SDRA definido por una relación  $[PaO_2/FiO_2] \leq 200$  mm Hg y Lesión pulmonar aguda (“Acute lung injury”, ALI), definida por hipoxemia menos grave,  $[PaO_2/FiO_2] \leq 300$  mm Hg. A lo largo de los años, esta definición ha generado varias dificultades y dudas, como son [31]: la falta de una

## Introducción

definición explícita de agudo; la variabilidad interobservador en la interpretación de la radiografía; la influencia de la presión espiratoria la final de la espiración (PEEP) en la relación  $[PaO_2/FIO_2]$ ; el mayor uso de la pulsioximetría en detrimento de los gases arteriales; la influencia de las presiones en la vía aérea y del volumen intravascular en la presión arterial pulmonar, así como el hecho de que el edema cardiogénico o secundario a sobrecarga de fluidos pueda coexistir con el SDRA.

Debido a estas dificultades, en 2012 se publicó la nueva **Definición del Berlín** [29] del SDRA (**Tabla 1**).

CRITERIOS DE SDRA DE LA DEFINICIÓN DE BERLÍN			
	LEVE	MODERADO	GRAVE
Tiempo de inicio de los síntomas	Inicio de los síntomas en la semana siguiente al evento relacionado (por ejemplo, neumonía) o bien nuevos síntomas respiratorios o agravamiento de los preexistentes.		
Imagen radiológica	Opacidades pulmonares bilaterales en la radiografía pulmonar o TC (no atribuibles a derrame pleural, atelectasia o nódulos pulmonares).		
Origen del edema	Insuficiencia respiratoria no explicada completamente por enfermedad cardíaca o sobrecarga de fluidos. En ausencia de factores de riesgo de SDRA se recomienda excluir edema pulmonar hidrostático mediante ecocardiografía.		
Oxigenación	Leve	$200 \text{ mm Hg} < PaO_2/FiO_2 \leq 300 \text{ mm Hg}$ con PEEP o CPAP $\geq 5 \text{ cm H}_2\text{O}$	
	Moderado	$100 \text{ mm Hg} < PaO_2/FiO_2 \leq 200 \text{ mm Hg}$ con PEEP $\geq 5 \text{ cm H}_2\text{O}$	
	Grave	$PaO_2/FiO_2 < 100 \text{ mm Hg}$ con PEEP $\geq 5 \text{ cm H}_2\text{O}$	

**Tabla 1. Criterios de SDRA según la definición de Berlín** [29].  
TC, tomografía computarizada; CPAP, *continuous positive airway pressure*.

Según lo comentado anteriormente, las principales modificaciones fueron: **1)** Comienzo: una semana tras un evento conocido; **2)** Imagen radiológica: se incluyen una serie de ejemplos de radiografías; **3)** Origen del edema: importancia de la ecocardiografía para excluir el edema hidrostático si no hay ningún factor de riesgo conocido; **4)** Establece diferentes categorías de SDRA en función de la relación  $[PaO_2/FIO_2]$ , considerando en todos los casos una PEEP mínima de 5 cm H<sub>2</sub>O.

## Introducción

El DPA/SDRA puede ser debido bien por daño pulmonar directo, como en el caso de la neumonía, contusión pulmonar o la aspiración de contenido gástrico, o bien por daño pulmonar indirecto, como en el caso de la sepsis, el trauma grave no pulmonar o el shock [32]. Bellani *et al.* describen en un estudio multicéntrico como **factores de riesgo** más frecuentes de SDRA la neumonía, la sepsis extrapulmonar, la aspiración de contenido gástrico, el shock no cardiogénico y el trauma grave, entre otros (**Tabla 2**) [33].

Factores de riesgo	%
Neumonía	59,4%
Sepsis extrapulmonar	16%
Aspiración	14,2%
Shock no cardiogénico	7,5%
Trauma	4,2%
Transfusiones sanguíneas	3,9%
Contusión pulmonar	3,2%
Inhalación	2,3%
Sobredosis de drogas	1,9%
Vasculitis pulmonar	1,4%
Quemaduras	0,3%
Ahogamiento	0,1%
Otros factores de riesgo	2,7%
Ningún factor de riesgo	8,3%

**Tabla 2. Factores de riesgo de SDRA en adultos.** Se señala la frecuencia (%) de los diferentes factores de riesgo en la cohorte estudiada. Modificado de Bellani *et al.* [33]

La definición del SDRA se validó en población adulta, por lo que podría no ser adecuada en la infancia. En niños se realizó un estudio cuyo objetivo fue validar la definición de Berlín [34], además de establecer una lista de factores de riesgo en la población pediátrica y desarrollar un consenso sobre las herramientas clínicas y diagnósticas más usadas en la infancia. Se eligió un amplio rango de edad entre 1 mes y 18 años para asegurar la validez de esta definición en condiciones extremas. Entre las conclusiones de este trabajo, destacaba la validez de la definición de Berlín en la infancia temprana, sobre todo en relación con la introducción de la categoría de SDRA grave. En cuanto a las herramientas clínicas y diagnósticas, incidían en el uso de la ecocardiografía en estos pacientes y en la correcta interpretación de los hallazgos en la radiografía de tórax, con

## Introducción

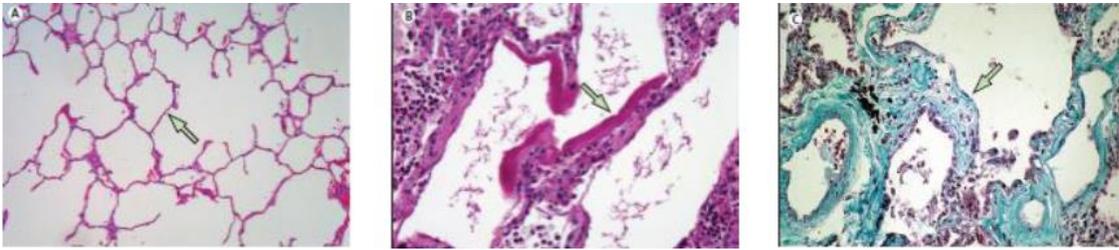
algunas particularidades en niños por la presencia de timo o los antecedentes de patología como la broncodisplasia pulmonar.

Por otro lado, en este estudio se establecía una lista de factores de riesgo en la infancia (**Tabla 3**), a los que asociaban una puntuación que indicaba la importancia de cada condición como desencadenante del SDRA.

Factores de riesgo	Puntuación
Sepsis	4.4
Casi ahogamiento	3.9
Inmunodeficiencias congénitas	3.8
Trauma torácico	3.7
Gripe	3.4
Neumonía	3.3
Bronquiolitis	3.3
Pertussis	2.9
Broncodisplasia pulmonar	2.6
Pacientes oncológicos	2.6
Aspiración de leche	2.4
Cirugía mayor	1.7
Reflujo gastroesofágico	1.7

**Tabla 3. Factores de riesgo para SDRA en la infancia temprana** [34]. Se indica para cada factor de riesgo una puntuación que señala su importancia como desencadenante de SDRA.

El hallazgo histológico característico del SDRA en humanos es **el daño alveolar difuso (DAD)** [25–27]. El DAD se caracteriza por: **i)** una fase exudativa temprana caracterizada por la acumulación de neutrófilos en los espacios alveolar, vascular e intersticial, conocida como alveolitis neutrofílica; **ii)** depósito de membranas hialinas compuestas de fibrina y otros desechos proteináceos, como evidencia de que las proteínas séricas han entrado y precipitado en los espacios aéreos, por disrupción de la membrana alveolo-capilar; **iii)** engrosamiento intersticial; y **iv)** formación de microtrombos (evidencia de daño endotelial y activación intraluminal de la cascada de coagulación). Posteriormente se produce una fase proliferativa caracterizada por hiperplasia de las células alveolares epiteliales y fibrosis intersticial [26,28] (**Figura 1**).



**Figura 1. Ejemplos de hallazgos histológicos. Modificado de Thille *et al.* [28]**

A la izquierda se muestran alveolos de apariencia normal. En el centro, un pulmón con daño alveolar difuso. Se observa la membrana basal del alveolo recubierta de membranas hialinas compuestas de fibrina y otros desechos proteináceos, así como acúmulo de neutrófilos. A la derecha, imagen de la fase proliferativa donde se observa la fibrosis en verde.

## EPIDEMIOLOGÍA DEL SDRA

El diagnóstico del SDRA se basa en una combinación de criterios clínicos, gasométricos, radiológicos y hemodinámicos. Estos criterios comprenden un grupo altamente heterogéneo de pacientes, ya que varios tipos de daño pulmonar pueden llevar a una respuesta similar. Por este motivo, los estudios de incidencia de SDRA en adultos muestran cifras dispares.

Una revisión de Villar *et al.* [35], que incluyó estudios publicados tras el año 2000 realizados en base a la definición de SDRA de la AECC y llevados a cabo con VM protectora, encontró una incidencia entre 5-7,2 casos / 100 000 habitantes/año [36–38], siendo 3 de los 4 trabajos que cumplían los criterios europeos. Entre estos trabajos destaca uno realizado en España entre Noviembre de 2008 a Octubre de 2009, donde participaron 17 hospitales de 13 áreas geográficas [37], que estima una incidencia de 7,2 casos/100 000 habitantes/año. El  $V_T$  medio usado fue  $7,2 \pm 1,1$  ml/kg en relación al peso corporal predicho. Entre los hallazgos de este trabajo destacaba la relación inversa entre la razón  $PaO_2/FiO_2$  al diagnóstico del SDRA y la mortalidad. La mortalidad global en este estudio fue del 45,4%.

Llama la atención que la incidencia reflejada en los trabajos Europeos es mucho menor que la señalada por Li *et al.* en Estados Unidos, tras realizar un estudio retrospectivo a lo largo de 8 años (2001-2008), que reflejaba una incidencia de 33,8 casos/100 000 habitantes/años en el año 2008 [39]. Otros trabajos en este país han reportado incidencias incluso mayores, hasta 58,7 casos/100 000 habitantes/año en un estudio de Rubinfeld *et al.*

## Introducción

[40]. Estas diferencias pueden ser debidas a factores demográficos, culturales, económicos, así como los distintos sistemas de salud en los distintos países.

Recientemente, en 2016, se publicó un estudio prospectivo ("*Large Observational Study to Understand the Global Impact of Severe Acute Respiratory Failure*", LUNGSAFE), en el que encontraban una prevalencia de SDRA leve del 30%, moderado del 46,6% y grave del 23,4%. El SDRA representó un 10,4% de los ingresos en Unidades de Cuidados Intensivos (UCI), y un 23,4% de los pacientes que requirieron VM. La mortalidad fue de un 34,9% en el SDRA leve, un 40,3% en el moderado y un 46,1% en el grave [33].

La incidencia del SDRA en niños es menor que en pacientes adultos, aunque los diferentes estudios muestran cifras dispares. Zimmerman *et al.* [41] estimaron en Estados Unidos una incidencia de 9,5 casos/100 000 habitantes/año y una mortalidad del 14%, aunque el 72% de los pacientes de este estudio no tenían patología previa. Un estudio prospectivo llevado a cabo en Australia y Nueva Zelanda [42], reflejaba una incidencia de 2,9 casos/100 000 pacientes/año. Hu *et al.* [43], en China, encontró que el 1,4% de los ingresos en UCI Pediátricas cumplían criterios de SDRA, con una mortalidad elevada (44,8%), a pesar de que el 79% no referían enfermedad previa.

En España [44], en un estudio prospectivo en pacientes pediátricos sometidos a VM con estrategia protectora, se estimó una incidencia de SDRA de 3,9 casos/100 000 habitantes/año. Una interesante conclusión de este estudio fue la relación entre el  $[PaO_2/FiO_2]$  basal y el pronóstico, encontrando el doble de mortalidad en los pacientes con un  $[PaO_2/FiO_2]$  basal  $\leq 100$  respecto a aquellos pacientes con  $[PaO_2/FiO_2]$  basal  $> 100$  (mortalidad del 33,7% versus 16,7% respectivamente). La mortalidad global en este estudio fue del 27,4%, mayor que en otros trabajos, aunque los autores destacan que un mayor porcentaje de los pacientes incluidos (65%), presentaban patología previa. Los autores también destacan que el uso de  $V_T$  bajo se asoció con mejor pronóstico.

En una revisión sistemática en pacientes pediátricos con SDRA publicada recientemente, se encontró una tasa de mortalidad del 24%, con un descenso de la misma a lo largo de los últimos 20 años [45].

## Introducción

Por tanto, aunque la incidencia es ampliamente variable entre los diferentes trabajos e indudablemente mayor en adultos, el SDRA constituye un importante problema en la práctica clínica actual, con una mortalidad nada desdeñable, sobre todo teniendo en cuenta el uso generalizado de la VM y la complejidad creciente de los pacientes que atendemos.

## MECANISMOS DEL DAÑO PULMONAR INDUCIDO POR LA VENTILACIÓN MECÁNICA

Desde que se acuñó en 1967 el término “*respirator lung*”, diversas teorías ha surgido para explicar los mecanismos causantes del daño pulmonar asociado a la VM. Inicialmente, el daño inducido por la VM se relacionaba únicamente con **factores mecánicos** como el trauma por la presión aplicada (**barotrauma**) o bien con la sobredistensión alveolar (**volutrauma**)(Figura 1). Sin embargo, en los últimos años ha surgido un tercer mecanismo, el **biotrauma**, que se relaciona con la capacidad del pulmón de producir mediadores pro-inflamatorios capaces de propagar a distancia la lesión pulmonar (Figura 2).

### Factores mecánicos

El primer factor mecánico implicado en el daño pulmonar asociado a la VM fue el trauma por presión pico inspiratoria elevada, también denominado “**barotrauma**”, que se refiere a la fuga aérea debida a la diferencia de presión entre el alveolo y la vaina broncovascular adyacente [46,47]. En un trabajo de Dreyfuss *et al.*, se demostró un aumento de la permeabilidad capilar y edema pulmonar en ratones sanos ventilados con una presión de 45 cm H<sub>2</sub>O [48].

Posteriormente, se demostró que el factor determinante en el daño pulmonar inducido por la VM es la sobredistensión pulmonar [49], que se relaciona con el uso de volúmenes pulmonares elevados más que con el empleo de presiones pico altas. En este sentido, Dreyfuss *et al.* [50], objetivaron que las ratas sometidas a ventilación con presiones pico elevadas pero limitando el V<sub>T</sub> aplicado por medio de unas cinchas en su pecho y abdomen, no desarrollaban edema pulmonar, respecto a animales ventilados sin restringir el volumen pulmonar. Así, sus experimentos demostraron que es el volumen (y en consecuencia el estiramiento pulmonar), el factor clave en el daño pulmonar, acuñando el término de “**volutrauma**” [51,52]. Diversos trabajos han objetivado que el uso de V<sub>T</sub> elevados se

## Introducción

relaciona con edema pulmonar, daño alveolar difuso, aumento de la permeabilidad epitelial y microvascular [46,53]. Además, la ventilación con  $V_T$  bajo también produce daño pulmonar por múltiples mecanismos, incluyendo apertura y cierre repetitivo de unidades pulmonares, alteración en la función del surfactante e hipoxia regional [49].

Por otro lado, se conoce el papel protector de la PEEP en la ventilación mecánica. Webb & Tierney [53], observaron que las ratas ventiladas con presiones pico elevadas y PEEP de cero, desarrollaban hipoxemia, y el examen post *mortem* reveló edema perivascular y alveolar, hecho que no se produjo en los animales en los que se aplicaba una PEEP de 10 cm H<sub>2</sub>O.

El daño pulmonar en el SDRA no es homogéneo, existiendo áreas dañadas que se encuentran colapsadas de manera irreversible, áreas colapsadas que pueden ser reclutadas mediante VM, y áreas sanas, por lo que se produce una reducción de los volúmenes pulmonares, que se ha denominado “*baby lung*” [54]. Las atelectasias cíclicas, también llamadas “**atelectrauma**”, se refieren al daño derivado del colapso y posterior reexpansión pulmonar [52]. Este tipo de daño, se caracteriza por desprendimiento epitelial, membranas hialinas y edema pulmonar [52]. En un estudio clásico, Mead *et al.* [55] observaron que las fuerzas de estiramiento en los márgenes entre regiones aireadas y atelectasiadas del parénquima pulmonar eran hasta 4-5 veces mayores que en otras regiones pulmonares. Por tanto, los alveolos sanos son los más vulnerables a la sobredistensión, debido al fenómeno de **interdependencia**, que se refiere a las fuerzas ejercidas en una región alveolar debido al colapso de regiones adyacentes [47].

### Biotrauma

Las consecuencias adversas de la VM se deben a los factores mecánicos comentados (volutrauma, barotrauma y atelectrauma), pero además, las fuerzas físicas descritas anteriormente pueden causar daño alveolar difuso y disregulación de la respuesta inflamatoria, a través de la liberación de mediadores intracelulares [7], bien directamente (por daño celular), o indirectamente (por activación de vías de señalización de células epiteliales, endoteliales o inflamatorias). Este tipo de daño se conoce como “**biotrauma**”, que sería por tanto una respuesta al estrés mecánico caracterizada por la liberación de

## Introducción

mediadores inflamatorios que son capaces de causar daño al tejido pulmonar y otros órganos [46] (**Figura 2**).

Este concepto explicaría el por qué la mayoría de los pacientes que fallecen en el contexto de un SDRA no lo hacen a consecuencia del fallo pulmonar sino por el desarrollo de FMO [6,56].

Se han descrito diversos mediadores que podrían ser responsables del inicio y propagación del daño pulmonar y sistémico, como las citoquinas (CQs), además de otros mecanismos implicados en la propagación del daño, como el reclutamiento de células inflamatorias hacia el pulmón, la descompartmentalización de la respuesta inflamatoria, alteraciones en la apoptosis o en la cascada de la coagulación.

### ***Papel de las citoquinas en el biotrauma***

Las CQs son proteínas solubles de bajo peso molecular que transmiten señales entre células implicadas en la respuesta inflamatoria. En el pulmón son producidas por células bronquiales, del epitelio alveolar, macrófagos o neutrófilos, entre otras. El balance entre CQs proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleuquina (IL)-1, IL-6, IL-8 y CQs antiinflamatorias, como IL-10, es esencial en la respuesta inmune. TNF- $\alpha$  e IL-1 inducen la activación del factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), que es importante en la transcripción de genes implicados en la respuesta inmune innata y está implicado en la activación de polimorfonucleares (PMNs) y otras células del sistema inmune [57].

Existen trabajos que demuestran que el sobreestiramiento de las células pulmonares y/o el reclutamiento/desreclutamiento del pulmón aumenta la concentración de citoquinas pulmonares [57]. Pugin *et al.* identificaron en experimentos *in vitro* que los macrófagos pulmonares actuaban como un mecanosensor, ya que al someterlos a un estiramiento cíclico (un aumento del diámetro hasta el 7%), se producía la liberación de mediadores inflamatorios como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 y metaloproteasa de matriz (MMP)-9 [58]. Las metaloproteasas de matriz son enzimas que degradan componentes de la matriz extracelular y membranas basales. MMP-9 es una colagenasa tipo IV producida principalmente por neutrófilos, macrófagos y células epiteliales. Estas proteasas juegan un papel importante en

## Introducción

el remodelamiento pulmonar y están aumentadas en pacientes con SDRA. Pugin también encontró activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (implicado en la activación de genes de mediadores inflamatorios como IL-8 y MMP-9) [58], y que la dexametasona disminuía la secreción de TNF- $\alpha$  e IL-8 por los macrófagos y bloqueaba la activación de NF- $\kappa$ B [19,58].

Varios modelos animales de daño pulmonar inducido por la VM tanto *in vivo* como *ex vivo* encuentran aumento de CQs como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$  [5,7,8,12,19,59–61]. Diversos trabajos han estudiado el papel de estas CQs. Por ejemplo, el tratamiento en conejos con un antagonista recombinante del receptor de IL-1 disminuye los neutrófilos aislados en lavado broncoalveolar (LBA) [62]. Respecto al papel del TNF- $\alpha$  en VILI, la instilación endotraqueal de anticuerpos (AC) anti-TNF- $\alpha$  en conejos produce un menor recuento de neutrófilos en el LBA, mejora la oxigenación y la complianza pulmonar y produce menos daño pulmonar histológico en el grupo tratado [63]. Por otro lado, en ratones *knock out* para el receptor de TNF- $\alpha$ , el reclutamiento de PMNs en respuesta a la ventilación dañina está atenuado [61]. Otra de las CQs que aumenta en respuesta al estiramiento cíclico es IL-8, o bien de su equivalente en roedores, la proteína inflamatoria de macrófagos (MIP)-2. MIP-2 actúa como factor quimiotáctico de leucocitos y juega un importante papel en la patogénesis de VILI [57].

La VM dañina también puede aumentar la concentración de CQs en pulmones previamente sanos. En un modelo *ex vivo* de pulmón ventilado no perfundido, la ventilación con  $V_T$  elevado (15 ml/kg), produjo un aumento entre 3 (con PEEP de 10 cm H<sub>2</sub>O) y 6 veces (con PEEP de 0 cm H<sub>2</sub>O) de la concentración de TNF- $\alpha$  en el LBA. Cuando se combinaba un  $V_T$  de 40 ml/kg con la ausencia de PEEP, se observó un efecto sinérgico, con un aumento de la concentración de TNF- $\alpha$  de 50-60 veces en el LBA. El aumento de CQs se asoció con aumento del ácido ribonucleico mensajero (mRNA) de c-fos [7]. En la elección de c-fos se tuvo en consideración: i) es inducido de forma temprana en muchos tipos celulares tras una gran variedad de estímulos; ii) presenta un promotor que responde al estiramiento, que se ha usado como un marcador de transcripción de mecano-transducción; iii) juega un papel importante en la transcripción de genes relacionados con la síntesis de CQs. La activación de c-fos también está implicada en la producción de ciclooxigenasa y expresión de la molécula de adhesión intercelular (ICAM)-1 [57]. ICAM-1 es una molécula de

## Introducción

adhesión intercelular presente en las membranas de las células endoteliales, cuya expresión es inducida por varias CQs, tras lo cual se une a receptores presentes en los leucocitos permitiendo su migración a través del endotelio.

El trabajo de Tremblay *et al.* apoya el concepto de **mecanotransducción**, la conversión de una señal mecánica en una célula o receptor en una respuesta bioquímica o molecular que estimularía la transcripción génica. Se han propuesto diferentes teorías para explicar los mecanismos de mecanotransducción: i) cambios de conformación en moléculas de la membrana celular que actuarían como mecanosensores y activarían cascadas de sistemas mensajeros; ii) activación o inactivación de canales iónicos sensibles al estiramiento; iii) liberación de factores paracrinos o autocrinos [7]. En este proceso se ha implicado la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), una ruta de transducción de señales celulares de varios receptores de CQs [57].

En cuanto al papel de las CQs en estudios con pacientes, varios trabajos han encontrado un aumento de CQs tanto en pacientes sanos sometidos a VM [64], como en pacientes con SDRA, sobre todo en aquéllos sometidos a VM dañina. Entre las CQs aumentadas se encuentran TNF- $\alpha$ , IL- $\gamma$ , IL-6, IL-8, IL-1-RA [15]. Este aumento de CQs proinflamatorias se asocia con mayor gravedad del daño pulmonar y peor pronóstico [56].

### ***Reclutamiento de neutrófilos al pulmón***

El reclutamiento de neutrófilos hacia el pulmón se ha implicado en la fisiopatología del daño pulmonar. La VM en un modelo de ratón de daño pulmonar ocasionó un aumento en los neutrófilos en el espacio alveolar [61]. Esto contrasta con los resultados obtenidos de animales deplecionados de neutrófilos, que presentaban mayor PaO<sub>2</sub> y mostraban un menor aumento de IL-8, sugiriendo que los mediadores liberados por los neutrófilos son claves el daño inducido por la VM [65]. La activación de los neutrófilos ocurre generalmente en el espacio alveolar después de la migración, y esta mediada por la interacción del ligando del receptor de quimioquinas CXCL2 en tejido pulmonar y su receptor en neutrófilos [66].

### ***Translocación y descompartimentalización***

Uno de los mecanismos implicados en la propagación del daño consecuencia de la VM dañina, es que las CQs encontradas en el LBA no se restringen al pulmón y pueden alcanzar la circulación sistémica. Por ejemplo, en un modelo de ratón aislado perfundido y ventilado, sometido a hiperventilación, se producía un aumento de CQs en el líquido de perfusión pulmonar [67]. Otro grupo encontró que aplicando una PEEP de 0 cm H<sub>2</sub>O con un V<sub>T</sub> moderado (16 ml/kg) en un modelo de daño pulmonar de aspiración de ácido en rata, se producía un aumento en suero de TNF- $\alpha$  y MIP-2. Cuando usando el mismo V<sub>T</sub> se añadía una PEEP de 5 cm H<sub>2</sub>O, no había aumento significativo de TNF- $\alpha$  [8]. Haitsma *et al.* demostraron en animales sanos ventilados sin PEEP, que la instilación endotraqueal de lipopolisacárido (LPS) para inducir la producción de TNF- $\alpha$  a nivel local, elevaba las concentraciones séricas de TNF- $\alpha$  y de forma contraria, la administración intraperitoneal de LPS, producía un aumento de TNF- $\alpha$  a nivel pulmonar en LBA [60]. Se piensa que la liberación de CQs a la circulación sistémica se debe a la pérdida de integridad de la membrana plasmática de las células alveolares y el aumento de la permeabilidad alveolo-capilar debida a la VM [51].

Otro mecanismo por el cual la VM podría producir consecuencias sistémicas sería por medio de la translocación de bacterias o endotoxinas de los pulmones a la circulación sistémica. En este sentido, un trabajo demostró que la VM con presión pico inspiratoria (PIP) de 30 cm H<sub>2</sub>O sin PEEP (30/0) en ratas a las que se había instilado bacterias vía intratraqueal, producía más bacteriemia en este grupo respecto a los grupos ventilados con PIP/PEEP de 13/0, 13/3 y 30/10 [68], por lo que la adicción de PEEP se asociaba con descenso de la incidencia de bacteriemia. De manera similar, en otro trabajo, una estrategia protectora de VM minimizaba la translocación de endotoxina a la circulación sistémica en un modelo de conejo al que se instilaba endotoxina vía intratraqueal [69].

Estos datos sugieren un mecanismo (liberación de CQs y/o mediadores inflamatorios a la circulación sistémica) por el cual la VM podría tener consecuencias sistémicas y llevar al desarrollo de FMO.

### **Apoptosis**

La apoptosis o muerte programada celular también juega un importante papel en el daño pulmonar y sistémico asociado a la VM. En un modelo de daño pulmonar mediante aspiración de ácido clorhídrico en conejos, se demostraba que una estrategia de VM dañina inducía la apoptosis de células epiteliales renales. En este mismo trabajo, células renales cultivadas incubadas con plasma procedente de los animales del grupo ventilado con parámetros dañinos, sufrían más apoptosis respecto a los controles. El tratamiento con Fas:Ig, una proteína que bloquea el ligando soluble de Fas (sFas-L), atenuaba dicha inducción de la apoptosis *in vitro*. Finalmente, para demostrar la implicación clínica de estos hallazgos, analizaron los niveles de sFas-L en pacientes con SDRA ventilados con una estrategia protectora respecto a una convencional, objetivando menores niveles de sFas-L en aquellos pacientes ventilados con una estrategia estándar ( $V_T$  11 ml/kg y PEEP 6,5 cm H<sub>2</sub>O). Además, encontraron correlación entre los cambios en los niveles de sFas-L y los cambios en la creatinina plasmática [10].

El sistema Fas-ligando de Fas se compone del receptor de membrana Fas (CD95), que pertenece a la familiar de proteínas del TNF- $\alpha$ , y su ligando Fas. El ligando de Fas puede estar unido a la membrana o soluble en plasma (sFas-L). Este sistema está implicado en la apoptosis de las células epiteliales renales, células epiteliales pulmonares, endotoxemia y coagulación intravascular diseminada (CID) [10].

Por otro lado, parece que la apoptosis de los leucocitos está disminuida en la lesión pulmonar aguda, al contrario de lo que ocurre en las células pulmonares epiteliales y otros órganos donde como se ha comentado está aumentada [57]. La incubación de PMNs en LBA procedente de pulmones de pacientes con SDRA induce un retraso en la apoptosis de los mismos. Esta inhibición parece estar mediada por CQs proinflamatorias como IL-8 e IL-2 y factor estimulante de colonias de granulocitos y granulocitos-macrófagos (G-CSF y GM-CSF). Además, los niveles de sFas-L están más elevados en el LBA de pacientes que fallecieron tras un SDRA respecto a los pacientes que sobrevivieron [70]. En relación a esto, Fas, el ligando de Fas y la caspasa-3 están aumentados en la pared alveolar de pacientes

que fallecen tras SDRA, y la infusión de sFas-L recombinante en estudios experimentales produce daño alveolar y apoptosis [71].

### ***Papel del surfactante pulmonar***

La función del surfactante pulmonar también es clave en la fisiopatología del daño pulmonar inducido por la VM. El surfactante pulmonar está compuesto principalmente de lípidos (90%) y proteínas (10%). Su función es proporcionar una tensión de superficie entre la interfaz líquido-aire de los alveolos y contribuir a la inmunidad innata actuando como colectinas, sustancias que aglutinan microorganismos y facilitan su fagocitosis. Además, es importante en la remodelación pulmonar tras una infección y contribuye al aclaramiento mucociliar [1]. También está implicado en la regulación de la apoptosis de los fibroblastos pulmonares y las células epiteliales tipo II [72].

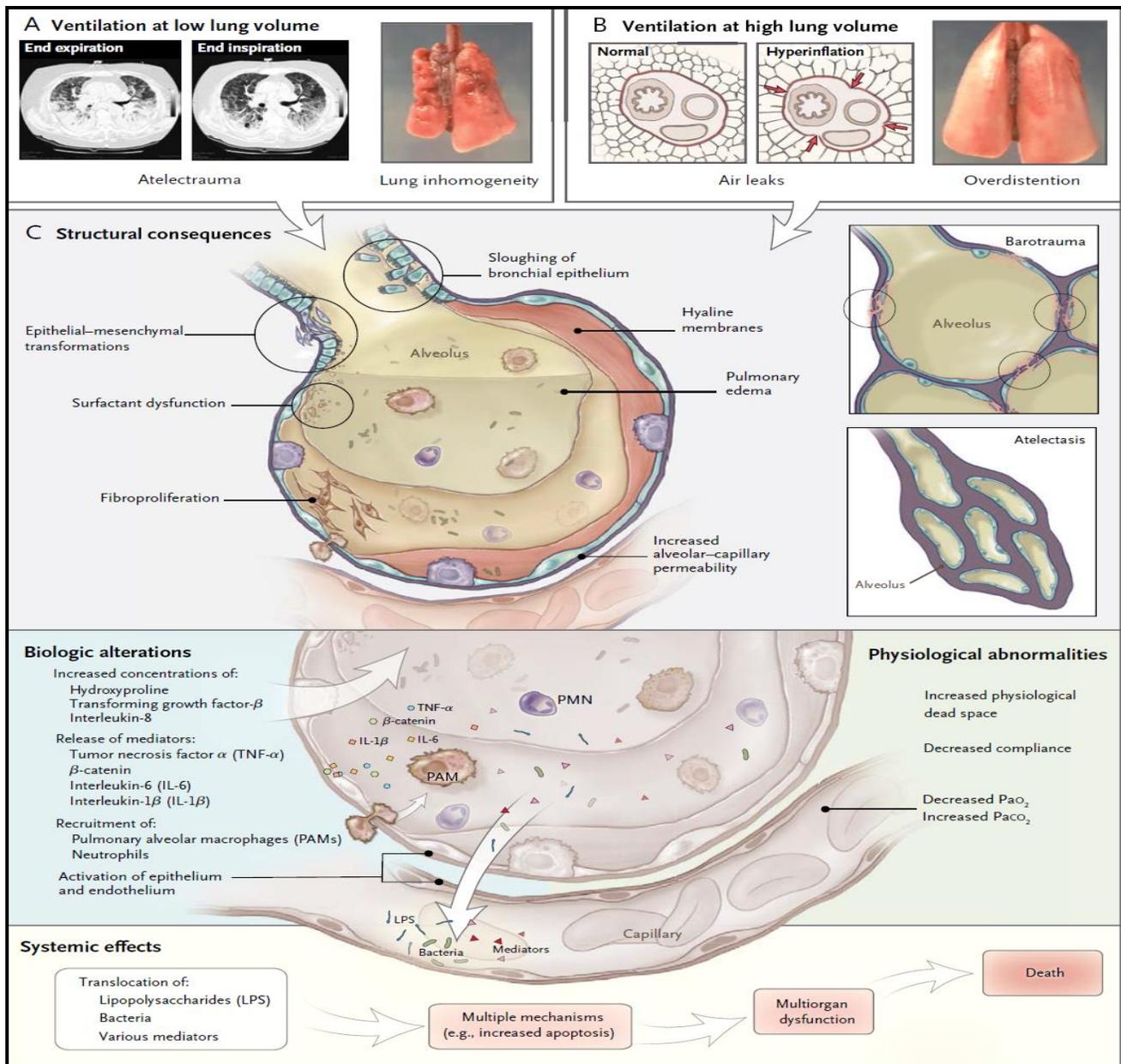
Entre los mecanismos de disfunción del surfactante en el contexto del daño pulmonar inducido por la VM están: i) la dilución del surfactante por el edema; ii) el daño a las células epiteliales tipo II; iii) la fuga de surfactante del compartimento alveolar al vascular; iv) el cambio de la composición del surfactante con la consiguiente disfunción del mismo en respuesta a la inflamación, mediado por CQs como TNF- $\alpha$  o IL-1; v) la nitración de componentes del surfactante como la proteína A. Pero a su vez, el surfactante puede modular la secreción de CQs y la actividad de células implicadas en la cascada inflamatoria [1].

Además, el LBA obtenido de pacientes adultos con SDRA tiene menos lípidos y proteínas y está alterada su capacidad de proporcionar una tensión superficial adecuada en comparación con pacientes sanos [1].

En cuanto al uso terapéutico del surfactante, el tratamiento con surfactante exógeno en adultos no reduce la mortalidad o los días de VM aunque mejora la oxigenación [73]. Al contrario que en adultos, el tratamiento con surfactante exógeno en niños con SDRA mejora la oxigenación y reduce la mortalidad [74].

### ***Alteraciones en la cascada de la coagulación***

Existe evidencia de que la VM puede causar y/o empeorar la coagulopatía pulmonar. Las CQs proinflamatorias pueden activar la coagulación a través del factor tisular e inhibir el sistema fibrinolítico estimulando la liberación de inhibidores del activador del plasminógeno (PAI). En un estudio, la VM con  $V_T$  elevado atenuó la actividad fibrinolítica en ratas a las que se les instiló fibrinógeno y trombina en los pulmones, debido a la producción local de PAI-1 [75]. En un estudio en pacientes con ALI, se observaron que los niveles bajos de proteína C y niveles de PAI-1 aumentados eran factores de riesgo independientes para eventos adversos y mortalidad [76]. Sin embargo, en otro estudio, el tratamiento con proteína C activada no mejoraba el pronóstico de los pacientes con ALI [77]. Además, el aumento de PAI-1 en plasma en adultos y niños con SDRA se ha asociado con una mayor mortalidad y menos días libres de VM [1].



**Figura 2. Mecanismos implicados en el daño pulmonar y sistémico inducido por la VM.** Modificado de Slutsky *et al.*[49]

En la parte superior izquierda (A), se muestra una imagen de una TC y de un pulmón con áreas de colapso alveolar donde se aprecia la heterogeneidad pulmonar cuando se ventila con  $V_T$  bajo y/o sin PEEP (atelectrauma). En la parte superior derecha (B), se observa la sobredistensión pulmonar, consecuencia de la VM con  $V_T$  elevado, que puede ocasionar fugas aéreas. En la parte central de la imagen (C), se muestran las consecuencias estructurales de estos factores mecánicos, como son el desprendimiento del epitelio alveolar y el depósito de detritus celulares y material proteináceo con la formación de membranas hialinas, el aumento de la permeabilidad alveolo-capilar, el edema pulmonar y las alteraciones en el surfactante. Más abajo, se observan las consecuencias biológicas derivadas del daño mecánico, como la liberación de mediadores inflamatorios y el reclutamiento de células inflamatorias. Finalmente, por el aumento de la permeabilidad alveolo-capilar, se produce la translocación de mediadores, endotoxinas y bacterias a la circulación sistémica, lo que puede derivar en FMO y muerte.

# DISFUNCIÓN MULTIORGÁNICA ASOCIADA AL DAÑO PULMONAR INDUCIDO POR LA VENTILACIÓN MECÁNICA. PAPEL DEL ESTRÉS NITROOXIDATIVO

La ventilación mecánica dañina no sólo produce daño pulmonar, sino que también tiene consecuencias sistémicas, y puede producir disfunción vascular. En el estudio realizado por “*The Acute Respiratory Distress Syndrome Network*”, se vio que los pacientes ventilados con a estrategia protectora tenían una menor duración del shock y el FMO [4].

Entre los mecanismos implicados en el FMO inducido por VILI, se han propuesto varias hipótesis. Una de ellas es la alteración de la barrera alveolo- capilar y descompartmentalización de la respuesta inflamatoria. En el trabajo de Guery *et al.*, se observó un aumento de la permeabilidad intestinal ocasionado por la VM con  $V_T$  elevado, con un aumento sérico de TNF- $\alpha$  [14]. Otro mecanismo implicado es la apoptosis / necrosis. En un modelo de VILI por aspiración ácida (*vide supra*), se objetivó un aumento de la apoptosis en riñones, intestino e hígado, en los animales ventilados con la estrategia dañina [10]. Otra hipótesis que ha sido explorada previamente en varios trabajos es la alteración vascular asociada a VILI [5,11–13].

Nuestra hipótesis principal es que el daño pulmonar asociado a la VM se asocia a una alteración en la función vascular que puede tener como consecuencia el FMO.

A continuación se comentan algunos aspectos relativos a la disfunción vascular, como son el papel que juega en su fisiopatología el endotelio, y la importancia del estrés nitro-oxidativo en el daño sistémico asociado a VILI.

### **Papel del endotelio en la disfunción vascular**

El endotelio es la capa interna que recubre los vasos sanguíneos, compuesta de una capa simple de células escamosas. Las células endoteliales son fundamentales en la regulación del tono vasomotor. Por otro lado, el endotelio tiene una función trombomoduladora, antiagregante plaquetaria, sintetiza moléculas importantes en la adhesión y permeabilidad del endotelio a las células infamatorias, y la síntesis de moléculas proinflamatorias como diversas CQs [78].

## Introducción

El endotelio regula el tono vasomotor a través de la producción de mediadores como el óxido nítrico, prostanoïdes y endotelina.

El **óxido nítrico** es un gas capaz de difundir fácilmente a través de membranas biológicas. Se forma por la conversión enzimática del aminoácido L-arginina en L-citrulina mediante la acción de las sintasas de óxido nítrico (NOS), proceso en el cual actúa como cofactor nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). La producción de NO en células endoteliales ocurre de manera constitutiva en respuesta a estímulos físicos, tales como la tensión que ejerce el flujo sanguíneo sobre la pared vascular (tensión de fricción o "*shear stress*"), esencial para la regulación del flujo y la presión sanguínea, y de manera inducible por estímulos inflamatorios. Por tanto, existen tres isoformas de NOS, dos constitutivas, una descubierta en endotelio vascular (eNOS) y la isoforma neuronal (nNOS), y una inducible por estímulos inmunológicos, infecciosos, inflamatorios o LPS, conocida como iNOS. La iNOS es inhibida por glucocorticoides [79].

El NO producido por el endotelio o las plaquetas actúa como antiagregante plaquetario, inhibe la adhesión de los leucocitos y modula la proliferación de células musculares lisas. La función vasodilatadora y antiagregante plaquetaria del NO se lleva a cabo mediante la activación de la guanilato ciclasa que produce una elevación de guanósín monofosfato cíclico (GMPc). El NO sintetizado en neuronas del sistema nervioso central puede ser liberado por el sistema nervioso periférico donde tiene un papel en la vasodilatación neurogénica. Además, el NO está implicado en las reacciones inmunológicas, siendo tóxico para los microorganismos tras ser liberado por macrófagos activados. Las acciones citostáticas/citotóxicas del NO se deben a la inhibición de enzimas llave de la cadena respiratoria y de la síntesis del ácido desoxirribonucleico (ADN) en las células diana [79]. Finalmente, el NO puede reaccionar con radicales libres derivados del oxígeno como el anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) para formar sustancias tóxicas como el peroxinitrito ( $OONO^-$ ), el cual nitrifica residuos de tirosina de las proteínas formando nitrotirosina [80].

Por otro lado, como se ha comentado, el endotelio también sintetiza **endotelina**, cuya forma más estudiada, la endotelina 1 (ET-1), es un potente vasoconstrictor, con acción proinflamatoria y estimulante del crecimiento del músculo liso, mediante su unión al receptor

## Introducción

ET-A. El receptor de endotelina ET-B produce liberación de óxido nítrico y prostaciclina [78,81].

Finalmente, el endotelio también produce **prostanoides**, como las prostaglandinas (PGs), sustancias que se sintetizan a partir de los fosfolípidos de la membrana celular por acción de la ciclooxigenasa (COX). Entre las más importantes destacan las prostaciclina (PGI), que producen vasodilatación e inhibición de la agregación plaquetaria, y el tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), que actúa como vasoconstrictor y facilita la agregación plaquetaria. Existen 2 formas de COX, la constitutiva (COX-1) y la inducible por estímulos inflamatorios (COX-2). La expresión de COX-2 es inhibida por los glucocorticoides [78,81].

La **disfunción endotelial** se define como la pérdida de la función reguladora del endotelio. Entre los mecanismos implicados, estaría una reducción del NO endotelial, lo cual lleva a una menor vasodilatación dependiente del endotelio. Esta disminución del NO se produce por una menor expresión de la eNOS o por alteración en los sustratos o cofactores de la NOS como L-arginina o tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>). Sin embargo, el mecanismo predominante en la disfunción endotelial es el aumento de especies reactivas del oxígeno, como el anión superóxido, y su interacción con el NO, con la formación de peroxinitrito y otras especies reactivas del oxígeno, lo que se conoce como estrés nitro-oxidativo [80,81].

### **Estrés nitro-oxidativo**

Los radicales libres son moléculas inestables y altamente reactivas al poseer un electrón impar, ya que tratan de completar sus electrones tomándolos de moléculas estables, que al perder uno de sus electrones se vuelven radicales libres.

Los oxidantes y radicales libres pertenecen a 2 familias llamadas especies reactivas del oxígeno (ERO), cuyo origen es el anión superóxido, y especies reactivas derivadas del nitrógeno (ERN), formadas a partir del NO.

### **Especies reactivas derivadas del oxígeno**

Las especies reactivas del oxígeno, el **peróxido de hidrógeno** (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), y el **anión superóxido** son generadas por el metabolismo celular. El O<sub>2</sub><sup>•-</sup> se forma a partir del oxígeno (O<sub>2</sub>) por la reducción de un electrón en la cadena respiratoria mitocondrial, así como por la

## Introducción

actividad enzimática de la NADPH oxidasa y xantina oxidasa. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  se forma a partir del  $\text{O}_2^{\bullet}$  por la enzima superóxido dismutasa (SOD), tras lo cual puede ser detoxificado a agua ( $\text{H}_2\text{O}$ ) por la enzima catalasa, o bien dar lugar al potente oxidante radical hidróxilo ( $\text{OH}^{\bullet}$ ) [Figura 2] [80]. El estrés oxidativo ocurre cuando la capacidad de defensa, consistente en pequeñas moléculas de antioxidantes y enzimas cooperadoras redox, se ve superada debido a la producción excesiva de EROs. Las ERO no neutralizadas por las defensas antioxidantes actúan como segundos mensajeros capaces de modular señales de transducción y transcripción de genes, alterando el metabolismo celular y produciendo disfunción mitocondrial que conducen a un fallo energético celular. Existe evidencia de la estimulación por EROs de vías de señalización donde están implicadas la activación de factores reguladores de la transcripción como NF- $\kappa$ B [82].

### ***Especies reactivas derivadas del nitrógeno***

El **peroxinitrito** se forma mediante la reacción de 2 radicales libres, el  $\text{O}_2^{\bullet}$  y el  $\text{NO}^{\bullet}$ , lo cual es relevante en situaciones con exceso de NO debido a la inducción de la iNOS, como por ejemplo la sepsis. El  $\text{ONOO}^-$  está en equilibrio con el ácido peroxinitroso (ONOOH). En condiciones normales, el peroxinitrito puede ser detoxificado a nitrito ( $\text{NO}^{2-}$ ) mediante la actividad de enzimas antioxidantes como glutatión peroxidasa y algunas selenoproteínas. Cuando existe una mayor formación de peroxinitrito en condiciones patológicas, el  $\text{ONOO}^-$  y el ONOOH pueden activar directamente reacciones de oxidación en metaloproteínas y grupos sulfhidrilo (-SH) de proteínas como el glutatión. Además, el  $\text{ONOO}^-$  y el ONOOH pueden formar radicales libres secundarios, mediante la reacción del  $\text{ONOO}^-$  con dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), formando radicales carbonato ( $\text{CO}_3^{\bullet-}$ ) y dióxido de nitrógeno ( $\text{NO}_2^{\bullet}$ ), o mediante la fisión del ONOOH que genera  $\text{OH}^{\bullet}$  y  $\text{NO}_2^{\bullet}$  (**Figura 2**) [80].

Estos radicales median las reacciones indirectas del peroxinitrito, que incluyen la oxidación de grupos sulfhidrilo, peroxidación lipídica, oxidación de ácidos nucleicos y nitración de residuos de tirosina. Las reacciones directas e indirectas iniciadas por  $\text{ONOO}^-$  /ONOOH producen: activación/inactivación de diversas enzimas, inhibición de bombas de membrana, alteración en la estructura proteica, depleción de glutatión, alteración de la

señalización tisular, roturas de la cadena del ADN y activación de poli-adenosina difosfato (ADP)-ribosa polimerasa (PARP) [80].

### ***Efectos biológicos del peroxinitrito***

La formación de peroxinitrito está implicada en múltiples procesos patológicos [83]: enfermedades cardiovasculares, como el infarto de miocardio, aterosclerosis, hipertensión, el shock cardiogénico o la insuficiencia cardiaca crónica; isquemia cerebral, esclerosis múltiple y enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer; enfermedades inflamatorias como la artritis o la enfermedad inflamatoria intestinal; diabetes tipo I; enfermedades pulmonares como el SDRA [84]. A continuación se describen los mecanismos relacionados con los efectos patológicos del peroxinitrito [80].

#### Nitración de residuos de tirosina

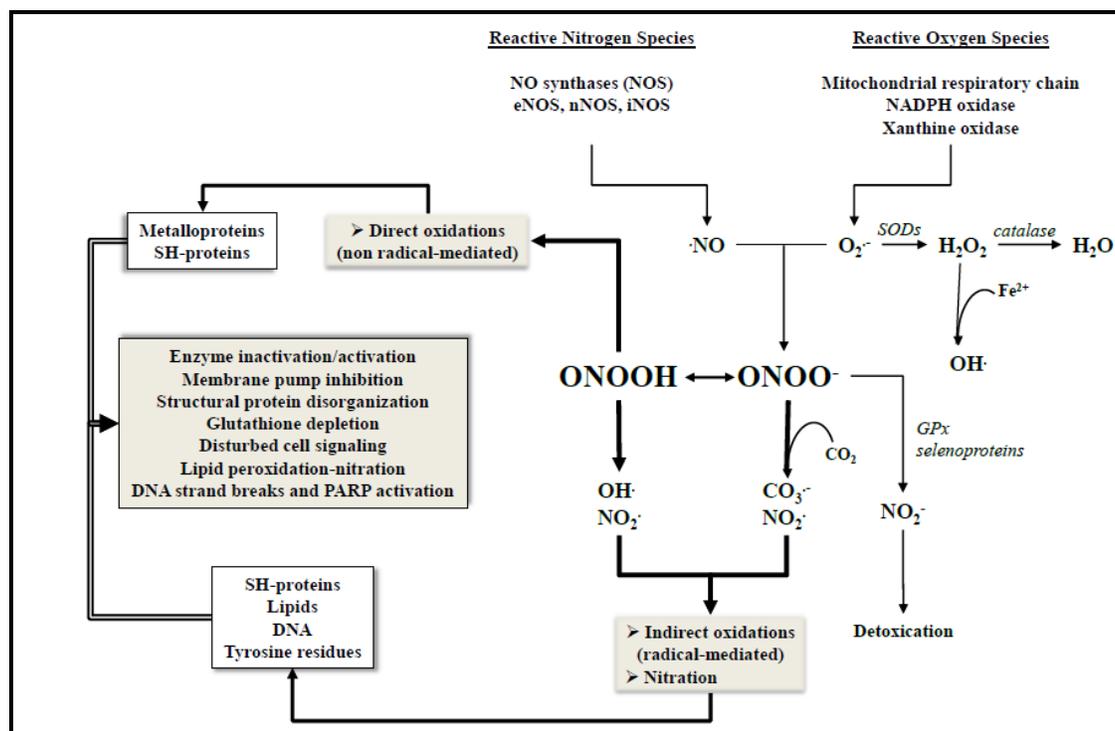
La nitración de residuos de tirosina en proteínas es un aspecto esencial de los efectos del peroxinitrito con múltiples consecuencias biológicas. Ocurre mediante la interacción del radical  $\text{NO}_2^\bullet$  con el radical tirosilo, para producir 3-nitrotirosina, que se usa como marcador de la generación de peroxinitrito. La nitración de residuos de tirosina se ve facilitada en ambiente hidrofóbico, por lo que suele afectar a membranas celulares. Los efectos biológicos que produce la nitración de residuos de tirosina son la pérdida de función de las proteínas, alteraciones en las cascadas de transducción celular y la formación de nuevos epítomos antigénicos que pueden conducir a procesos autoinmunes [80,85].

#### Nitración y oxidación de lípidos y ácidos nucleicos

La peroxidación lipídica ocurre mediante la acción de los radicales libres  $\text{OH}^\bullet$  y  $\text{NO}_2^\bullet$ , produciendo una alteración en la integridad y permeabilidad de membranas celulares. La nitración de lípidos los convierte en moléculas que activan vías de señalización antiinflamatoria mediante la infrarregulación de NF- $\kappa$ B y la estimulación de genes regulados por receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR- $\gamma$ ) [80].

Los ácidos nucleicos, sobre todo el nucleótido guanina, son vulnerables a la oxidación y nitración por los radicales libres  $\text{NO}_2^\bullet$  y  $\text{CO}_3^\bullet$ , lo que conlleva la escisión del ADN, que

provoca la activación de PARP y la consecuente alteración del metabolismo energético con efecto citotóxico [80,83].



**Figura 3. Mecanismos de citotoxicidad derivados del peroxinitrito. Modificado de Liaudet *et al.* [80].** El NO y el  $O_2^{\bullet-}$  pueden reaccionar formando peroxinitrito ( $ONOO^{\bullet}$ ). En condiciones de exceso de producción EROs y ERNs, el aumento en la producción de  $ONOO^{\bullet}$  excede la capacidad detoxificadora, y se producen diversos efectos patológicos, bien de forma directa por oxidación de distintas proteínas, o bien de forma indirecta, por la generación de otros radicales libres que producen reacciones de oxidación y nitración de proteínas. Esto conlleva la activación/inactivación de diversas enzimas, inhibición de bombas de membrana, alteración en la estructura proteica, depleción de glutatión, alteración de la señalización tisular, roturas de la cadena del ADN y activación de PARP.

### Disfunción mitocondrial, del metabolismo energético e inducción de la muerte celular

La mitocondria genera tanto  $O_2^{\bullet-}$  como  $NO^{\bullet}$ , lo que favorece la formación de peroxinitrito, lo que genera el estrés nitro-oxidativo. El peroxinitrito inactiva enzimas antioxidantes como manganeso SOD (MnSOD), o enzimas llave en el metabolismo como la creatín kinasa y complejos enzimáticos de la cadena respiratoria, produciendo un fallo del metabolismo energético. Además, el peroxinitrito activa la peroxidación de fosfolípidos mitocondriales, induce la sobrecarga de calcio intramitocondrial y modifica componentes proteicos de la membrana mitocondrial que inducen la apoptosis y/o necrosis celular por aumento de la permeabilidad [80,86].

## Introducción

El daño del ADN también está implicado en el fallo energético mediante la activación de PARP-1, una enzima que se activa en respuesta a la rotura de la cadena de ADN. Esta enzima escinde nicotinamida adenina dinucleótido oxidada ( $\text{NAD}^+$ ), lo que favorece la reparación del ADN. Sin embargo, en situaciones de daño extenso del ADN, la sobre activación de PARP-1 produce depleción de  $\text{NAD}^+$  y depósitos de adenosín trifosfato (ATP), lo que conlleva necrosis celular [83].

### Modulación del proceso de señalización celular

El peroxinitrito puede producir cambios en el proceso de transducción celular por varios mecanismos. Por un lado, como se ha comentado anteriormente, mediante la nitración de residuos de tirosina con activación o inhibición de vías de señalización celular. Por otro lado, el peroxinitrito puede interferir en varias vías de señalización implicadas en el proceso inflamatorio, mediante la modulación del NF- $\kappa$ B, que regula la transcripción de genes implicados en la producción de diversas CQs y moléculas de adhesión fundamentales en la inflamación. Además, el peroxinitrito, mediante sus efectos sobre PARP-1, puede activar varias vías de señalización proinflamatorias [80,85].

### Efectos del peroxinitrito en la disfunción vascular y sistémica

Se ha detectado nitrotirosina en hígado, pulmón, riñón e intestino de varios modelos animales de sepsis. Entre los mecanismos implicados en la **disfunción contráctil** durante el shock séptico, el papel del peroxinitrito es crucial [80]. En relación a esto, en un modelo de sepsis en ratas la disfunción contráctil observada *ex vivo* en vasos aórticos y mesentéricos se atenuaba mediante el catalizador de la descomposición del peroxinitrito, manganeso tetrakis (4-N-metilpiridil) porfirina (MnTMPyP). Además, en los vasos estudiados estaba aumentada la expresión de iNOS, la formación de ERO y se detectó nitrotirosina [87].

La principal característica de la **disfunción endotelial** es el aumento de EROs, como el  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , y su interacción con el NO, con la formación de peroxinitrito. Además, el peroxinitrito puede alterar la función endotelial mediante la nitración e inactivación de la enzima PGI2 sintasa, que conlleva la reducción de prostaciclina y activación del receptor del TXA2 que produce vasoconstricción. Finalmente, la activación de PARP por el peroxinitrito interviene

## Introducción

en dicha disfunción, ya que en modelos *in vivo* de shock la disfunción endotelial se corrige con inhibidores farmacológicos de PARP o su delección genética [80].

En relación al papel de la formación de peroxinitrito en el **SDRA**, se han encontrado niveles elevados de nitrotirosina en suero, LBA y tejido pulmonar en pacientes con SDRA, así como productos derivados del NO en LBA, lo que indica que el estrés nitro-oxidativo es un factor importante en la patogénesis de la lesión pulmonar [83,84].

Para terminar, el peroxinitrito tiene un papel importante en la fisiopatología del **fallo multiorgánico**, lo cual se ha evidenciado mediante: 1) La activación de la MAP quinasa JNK en modelos de shock séptico; 2) El uso de inhibidores de iNOS, SOD miméticos o inhibidores de NADPH oxidasa que protegen frente al FMO; 3) La inhibición de PARP mejora la disfunción orgánica durante el shock; 4) Los catalizadores de la descomposición del peroxinitrito son útiles en el FMO [80,83]. En este sentido, en un modelo de shock inducido por LPS, la administración de catalizadores de la descomposición de peroxinitrito, disminuyó el daño renal y hepático, así como la disfunción endotelial y contráctil asociadas al shock [88]. En otro modelo que estudiaba el daño intestinal asociado al shock séptico, se observó una atenuación del aumento de permeabilidad vascular, daño epitelial intestinal e infiltración de neutrófilos, en los animales tratados con catalizadores del peroxinitrito [89]. En un modelo de VILI y administración de LPS en ratas, el uso de un catalizador del peroxinitrito redujo el daño pulmonar y renal, así como la disfunción endotelial en arterias renales [90].

Uno de los objetivos de este trabajo, fue valorar si la disfunción vascular asociada al daño pulmonar inducido por la VM se debía a un aumento del estrés-nitrooxidativo, mediante la valoración del efecto de los inhibidores del estrés nitro-oxidativo y catalizadores de la descomposición del peroxinitrito sobre las alteraciones en la función vascular.

### **Disfunción vascular asociada al daño pulmonar inducido por la ventilación mecánica**

La disfunción vascular asociada al daño pulmonar inducido por la VM, se caracteriza por hipotensión, hiperpermeabilidad vascular y alteración en la respuesta a sustancias vasoconstrictoras y vasodilatadoras [5,11–13].

En relación a esto, Nin *et al.* [13], en un modelo murino de daño pulmonar inducido por la VM, demostró disfunción vascular en la aorta torácica *in vivo*, ya que las ratas del grupo ventilado con  $V_T$  elevado presentaron un descenso no significativo en la presión arterial media, peor oxigenación y mayor acidosis metabólica que el grupo control, y *ex vivo*, en los anillos de aorta torácica, se objetivó disminución de la respuesta contráctil a norepinefrina (NE), así como disfunción en la relajación en respuesta acetilcolina (Ach) y nitroprusiato sódico. En los pulmones del grupo ventilado con  $V_T$  elevado se objetivó daño alveolar difuso. Estos autores resaltan el hecho de que el daño pulmonar y vascular en los animales sometidos a ventilación mecánica con  $V_T$  elevado se asocia a pequeños cambios en las presiones en la vía aérea y en la mecánica respiratoria. Las hipótesis que proponen sobre el mecanismo responsable de la disfunción vascular, son la disfunción del músculo liso, o bien una menor disponibilidad de NO debida a una disminución de su vida media en un ambiente oxidativo.

En otro trabajo de los mismos autores [5] con un modelo similar, encontraron que las ratas que fueron sometidas a parámetros dañinos sufrían hipotensión, y *ex vivo*, disfunción en la relajación y la contracción en respuesta a Ach y NE respectivamente, tanto en vasos pulmonares como aórticos. Además, encontraron una correlación entre la presión arterial media (PAM) y los niveles de IL-6 en el LBA, lo que sugiere un papel de las CQs en el daño vascular en este modelo. Otro hallazgo importante en este trabajo, es que la disfunción vascular se revirtió en los anillos aórticos al cabo de 168 horas y 72 horas en los vasos pulmonares.

Entre los mecanismos que se han implicado en la disfunción vascular inducida por la VM, juega un importante papel el aumento en el estrés nitro-oxidativo.

## Introducción

En este sentido, Martínez-Caro *et al.* [16], han estudiado los mecanismos de la disfunción vascular asociada al daño pulmonar inducido por la VM. Se ventilaron ratas con  $V_T$  bajo (9 ml/kg con PEEP de 5 cm  $H_2O$ ) o elevado (35 ml/kg sin PEEP) durante 60 minutos, y posteriormente se estudió *ex vivo* la función vascular en anillos de aorta obtenidos de los animales ventilados. Tras incubar los anillos con diferentes atrapadores de radicales libres y peroxinitrito, como superóxido dismutasa, el tempol y metaloporfirina, se analizaba la curva dosis-respuesta de relajación y contracción, con Ach y NE respectivamente. Los principales hallazgos de este trabajo fueron que la alteración en la respuesta vasoconstrictora y vasodilatadora inducida por la ventilación con  $V_T$  elevado se corrigió mediante la administración de atrapadores de radicales superóxido y peroxinitrito (tempol y metaloporfirina). Además, los anillos vasculares de animales ventilados con  $V_T$  elevado, mostraron fluorescencia positiva para anión superóxido y peroxinitrito, lo que sugiere la importancia de estos radicales en la fisiopatología de la disfunción vascular inducida por la ventilación mecánica con  $V_T$  elevado.

En otro trabajo de esta autora [18], se estudia el papel del peroxinitrito en la disfunción vascular y pulmonar inducida por la VM. En un modelo *in vivo* de daño pulmonar se estudió el efecto de administrar 3-aminobenzamida (3-AB) un inhibidor de la PARP, una enzima activada por peroxinitrito, y metaloporfirina, un catalizador de la descomposición del peroxinitrito. En VILI, la inhibición de PARP se ha asociado con menor inflamación pulmonar y mejoría de la función pulmonar en animales sometidos a ventilación dañina. Sin embargo, estos estudios no evidencian el papel del aumento de formación de peroxinitrito en la patogénesis de VILI, ni estudian el efecto de inhibir la acción del peroxinitrito.

Los principales hallazgos de este trabajo fueron que el tratamiento con un inhibidor de PARP (3AB), o un catalizador de la descomposición del peroxinitrito (MnTMPyP), atenuaron la disfunción pulmonar y cardiovascular inducida por la VM dañina, disminuyendo el estrés oxidativo tisular y la nitración de proteínas. El estrés oxidativo se evidenció mediante la reactividad a dihidroetidio (DHE) y la nitración de proteínas por la detección de 3 nitrotirosina en pulmón y tejido aórtico. Además, el tratamiento disminuyó la expresión de NOS1, NOS2 y NOS3 en pulmón y NOS1 en tejido vascular, y atenuó los cambios histológicos en el grupo

## Introducción

ventilado con  $V_T$  elevado. Todo ello indica que el aumento en la formación de peroxinitrito está implicado en el daño pulmonar inducido por la VM y en la disfunción vascular [18].

En resumen, existe evidencia del papel del estrés nitro-oxidativo en la fisiopatología del daño pulmonar y sistémico inducido por la VM. Además, el tratamiento con atrapadores de radicales libres y peroxinitrito, mejoran tanto el daño pulmonar, como las alteraciones a distancia, en concreto el daño vascular asociado a VILI [16,18,84,90–92]. Sin embargo, no se ha demostrado que el estrés oxidativo pulmonar y el daño sistémico estén relacionados.

El objetivo principal de este trabajo, mediante la realización de un bioensayo, fue demostrar que el daño pulmonar inducido por la VM se asoció con una alteración en la función vascular. Por otro lado, mediante el efecto de los fármacos inhibidores del estrés nitro-oxidativo sobre la función vascular, se estudió el papel del estrés nitro-oxidativo en la fisiopatología del daño vascular inducido por la VM.

## ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS EN EL SÍNDROME DE DISTRÉS RESPIRATORIO AGUDO

En los últimos años se ha avanzado mucho en el conocimiento de la fisiopatología del SDRA y se han ensayado diversos tratamientos experimentales que han mostrado mejoría significativa en los parámetros respiratorios, de oxigenación o escalas histológicas de daño pulmonar. Sin embargo, hasta la fecha el único tratamiento que ha demostrado disminuir la mortalidad en estos pacientes, es el uso de  $V_T$  bajos durante la VM [93].

### Estrategias y modalidades de ventilación mecánica

El estudio de la *ARDS Network* publicado en el año 2000 supuso un punto y aparte en el tratamiento de los pacientes con SDRA. Se compararon 2 estrategias de VM:  $V_T$  de 12 ml/kg y  $V_T$  de 6 ml/kg, objetivándose un descenso de la mortalidad del 39,8% en el grupo ventilado con  $V_T$  elevado, al 31% en el grupo ventilado con  $V_T$  bajo. Además, la duración de la VM y el FMO fue significativamente menor en los pacientes del grupo tratado con  $V_T$  bajo. En este grupo de pacientes se observó una menor concentración de IL-6 plasmática al tercer día de estudio [4].

## Introducción

Una revisión de la *Cochrane* en 2013 alcanza la misma conclusión: la ventilación protectora reduce la mortalidad a los 28 días, con un riesgo relativo (RR) de 0,74 (Intervalo de confianza [IC] del 95% 0,61 to 0,88) [93].

El uso de la **PEEP** se basa en el hecho de que mantener un cierto nivel de presión positiva en el alveolo durante el ciclo respiratorio impide su colapso durante la fase espiratoria, evitando la aparición de atelectasias y la hipoxemia debida a la hipoventilación alveolar. Los efectos beneficiosos de la PEEP se relacionan con un aumento en la capacidad residual funcional, el reclutamiento alveolar, la redistribución del agua pulmonar extravascular, y la mejoría de la relación ventilación- perfusión. Pero el uso de la PEEP también produce efectos adversos, como el riesgo de barotrauma, el descenso del gasto cardiaco o la translocación bacteriana. En el contexto del SDRA, el beneficio de la PEEP estaría relacionado con el reclutamiento alveolar que evitaría el daño por el colapso y reapertura cíclico de los alveolos.

En cuanto a los trabajos que comparan el uso de PEEP elevada *versus* baja en el SDRA, la revisión sistemática de Briel *et al.* en 2010 encontró que la VM con PEEP elevada se asoció con una reducción absoluta del 5% en la mortalidad en pacientes con una relación  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$  menor de 200 mm Hg [94]. Sin embargo, otra revisión sistemática que analiza diversos estudios que combinan el uso de  $V_T$  bajo con PEEP elevada, no observa una reducción en la mortalidad de los pacientes con SDRA en el grupo tratado con PEEP elevada, aunque sí refiere una mejoría en la oxigenación en estos pacientes. Los autores destacan que las conclusiones pueden estar influenciadas por la heterogeneidad existente entre los distintos trabajos en cuanto a la elección del nivel de PEEP óptimo en el grupo de intervención [95].

En el momento actual, ninguna de las **modalidades** habituales de **VM** (ventilación controlada por volumen o por presión), ha demostrado un beneficio adicional en los pacientes con SDRA [96]. Respecto a la **ventilación de alta frecuencia oscilatoria** (VAFO), que consiste en el uso de volúmenes corrientes muy bajos con frecuencias respiratorias suprafisiológicas, una revisión sistemática objetivó en los pacientes que recibieron VAFO, un aumento en la relación  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$  y una reducción significativa en la mortalidad con un RR

## Introducción

del 0,77 (IC 95% 0,61 a 0,98,  $p= 0,03$ ); sin embargo, estos hallazgos se basaban en trabajos con escaso número de pacientes y los intervalos de confianza eran amplios. Posteriormente, dos ensayos clínicos multicéntricos no han encontrado beneficio en la mortalidad con el uso de VAFO [97,98].

En cuanto a la **VM en posición en prono**, su uso optimiza la relación ventilación-perfusión con mejoría de la oxigenación y menor hiperinsuflación al conseguir una distribución más homogénea de las presiones. Estos beneficios se han corroborado en ensayos clínicos, como el metaanálisis de Hu *et al.*, en el que la posición en prono produjo un descenso en la mortalidad en pacientes con relación  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 100$  mmHg, con un RR de 0,71 (IC 95% 0,57 a 0,89;  $p = 0.003$ ) [99].

Finalmente, respecto a las **técnicas de oxigenación por membrana extracorpórea**, su uso actualmente se limita al SDRA grave potencialmente reversible que no responde al tratamiento convencional [100].

Sin embargo, estas estrategias de ventilación no siempre se pueden aplicar en todos los pacientes, y se requieren otras terapias farmacológicas alternativas para mejorar la supervivencia y disminuir las complicaciones sistémicas asociadas en estos pacientes.

### Tratamiento farmacológico

Los **bloqueantes neuromusculares** se usan habitualmente para facilitar la sincronía paciente-respirador, sobre todo en el caso de presiones elevadas en la vía aérea o posición en prono. Además, tienen un efecto antiinflamatorio a través de la interacción con receptores nicotínicos de Ach [101]. Una revisión sistemática encontró que la administración precoz de cisatracurio mejora la supervivencia en pacientes con SDRA grave [102].

El tratamiento con **surfactante pulmonar** se basa en la disfunción del surfactante endógeno que tiene lugar en el SDRA. Sin embargo, la mayoría de ensayos clínicos en adultos no han encontrado una disminución en la mortalidad [103], aunque en algunos mejora la oxigenación, y en un subgrupo de pacientes con SDRA secundario a neumonía o aspiración, el tratamiento con surfactante podría ser beneficioso [104]. En niños y

## Introducción

adolescentes, hay datos de que este tratamiento mejora la oxigenación y disminuye la mortalidad y los días de VM comparado con placebo [105].

Se han estudiado una amplia variedad de **antiinflamatorios** como terapia en el SDRA. Se han realizado múltiples estudios experimentales para estudiar el papel de los **corticoides** en el SDRA. Los corticoides poseen múltiples propiedades farmacológicas en relación con la modulación del sistema inmune, como la inhibición de la transcripción génica de CQs proinflamatorias o la supresión de la activación de neutrófilos. En este sentido, Nin *et al.* [12], estudiaron el papel de la dexametasona intraperitoneal en un modelo *in vivo* de VILI, encontrando menor aumento de la PIP, un menor descenso del ratio  $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2$  y de la PAM, menor daño histológico pulmonar y una menor elevación de AST, IL-6, nitritos y nitratos. Resultados similares a estos fueron encontrados por Held *et al.* [19], en un modelo *ex vivo* de daño pulmonar inducido por sobredistensión y LPS, demostrando que el pretratamiento con dexametasona disminuía el aumento de diversas CQs e inhibía la activación del NF- $\kappa$ B. Sin embargo, los estudios clínicos no han demostrado un beneficio terapéutico concluyente [20,106], aunque hay datos a favor de que dosis bajas de corticoides reducen la mortalidad en pacientes adultos [21,107]

Por otro lado, se ha estudiado el tratamiento con **vasodilatadores inhalados** como el **NO**, que mejora la perfusión regional y por tanto la relación ventilación-perfusión. El uso clínico de NO mejora transitoriamente la oxigenación en pacientes con SDRA, pero los ensayos clínicos no encuentran una disminución de la mortalidad [108].

Otros agentes inhalados como la **prostaciclina**, mejora la oxigenación mediante una redistribución del flujo sanguíneo pulmonar a áreas mejor ventiladas y atenúa la respuesta inflamatoria pulmonar. Sin embargo, no hay ensayos clínicos potentes que validen su uso en pacientes [104].

Otra posibilidad terapéutica son las **terapias biológicas**, como los tratamientos que inhiben CQs proinflamatorias. IL-8 es una CQ proinflamatoria que juega un importante papel en el reclutamiento y activación de neutrófilos hacia el alveolo. En modelos animales de SDRA inducido por LPS, los **AC monoclonales anti-IL-8** administrados vía intravenosa disminuyen la infiltración de neutrófilos y mejoran los hallazgos histológicos de DPA [109]. El

## Introducción

TNF- $\alpha$  interviene en el reclutamiento y activación de neutrófilos, a través de dos receptores de TNF (TNFR), TNFR-1, con un papel proinflamatorio, y TNFR-2, con un efecto protector. Los **agentes anti-TNF- $\alpha$**  disminuyen la migración de PMNs, mejoran la mecánica pulmonar y el intercambio gaseoso en modelos animales de VILI, pero en pacientes con sepsis no han mostrado beneficio. Los **AC monoclonales anti TNFR-1** en un modelo animal de SDRA mejoran la función respiratoria y reducen la permeabilidad alveolo-capilar [109]. Los **AC monoclonales anti-CD14**, un receptor de superficie de macrófagos y neutrófilos, que estimula la producción de CQs proinflamatorias, reduce el edema pulmonar, la migración de neutrófilos y la producción de TNF- $\alpha$  por los macrófagos [109].

La enzima convertidora de angiotensina (ECA) es un vasopresor que promueve la inflamación y aumenta la permeabilidad vascular, mientras que la ECA tipo 2 tiene un efecto protector. La adrenomedulina es una molécula producida en respuesta a LPS y CQs que disminuye la permeabilidad alveolar. En modelos experimentales, tanto la administración de **ECA 2 recombinante** humana y **adrenomedulina** mejoran la lesión pulmonar [109].

El **factor de crecimiento de queratinocitos** (KGF) activa la proliferación de células alveolares tipo II y los mecanismos de reparación alveolar. Un modelo *ex vivo* de SDRA mostró que el tratamiento con KGF mejoraba la función pulmonar y aumentaba el aclaramiento de fluido alveolar [110].

Las **células madre mesenquimales** (MSCs), tienen propiedades antiinflamatorias, además de secretar KGF y participar en el proceso de reparación alveolar. Varios modelos humanos *ex vivo* han mostrado que las MSCs pueden restaurar el aclaramiento del fluido alveolar. Existen actualmente en marcha ensayos clínicos para valorar su papel en pacientes [111].

Finalmente, puesto que existe evidencia del papel del estrés nitro-oxidativo en la fisiopatología del daño pulmonar y sistémico inducido por la VM, se han ensayado diversos **atrapadores de radicales libres y peroxinitrito**, en el tratamiento del SDRA [16,18,84,90–92]. Estas sustancias son una prometedora diana terapéutica, puesto que a pesar de los múltiples tratamientos farmacológicos ensayados en el tratamiento del SDRA, ninguno ha mostrado un beneficio clínico relevante.

## Introducción

Por tanto, uno de los objetivos de este trabajo fue estudiar el efecto sobre la disfunción vascular, de diferentes atrapadores de radicales libres y peroxinitrito: SOD, un atrapador de radicales libres extracelular; el tempol, un atrapador de radicales libres y peroxinitrito intracelular; y metaloporfirina, un catalizador de la descomposición del peroxinitrito y SOD mimético intracelular.

El **tempol** es un SOD mimético, de menor poder antioxidante que la SOD endógena, y un atrapador de varios radicales libres ( $O_2^{\bullet-}$ ,  $OH^{\bullet}$ , radicales peroxilo [ $RO_2^{\bullet}$ ], dinitrógeno [ $NO_2^{\bullet}$ ],  $CO_3^{\bullet-}$  y radicales tiol [ $RS^{\bullet}$ ]). Su capacidad de atrapar radicales libres contribuye a la mayor biodisponibilidad de NO, restaurando la vasodilatación mediada por NO. La infusión de tempol reduce la presión arterial, la resistencia vascular periférica y frecuencia cardíaca en ratas [112].

La **metaloporfirina** [Mn(III)tetrakis(1-metil-4-piridil) porfirina], es una porfirina que contiene como metal manganeso, con una potente actividad SOD mimética y atrapadora de peroxinitrito. Se especula que su mecanismo de acción está relacionado con la inhibición de la transcripción del NF- $\kappa$ B [113]. En un estudio en el que se usaba MnTMPyP para aumentar la biodisponibilidad de NO en aortas de conejos sometidos a estrés oxidativo, la metaloporfirina restauró la relajación dependiente de NO en el contexto de estrés oxidativo intra y extracelular [114].

La enzima **superóxido dismutasa** (SOD), cataliza la dismutación del anión superóxido en  $O_2$  y  $H_2O_2$ . Debido a esto es una importante defensa antioxidante en la mayoría de las células expuestas al oxígeno. La Zn-Mn-SOD es una enzima extracelular sin capacidad de penetrar en el interior celular [115].

## MODELOS EXPERIMENTALES DE DAÑO PULMONAR INDUCIDO POR VENTILACIÓN MECÁNICA

Los estudios en humanos sobre ALI proporcionan información descriptiva sobre el comienzo y evolución de los cambios fisiológicos e inflamatorios del pulmón. Esta información permite generar hipótesis sobre el mecanismo del daño, pero en su mayoría, estas teorías son difíciles de probar en humanos porque muchas variables clínicas son difíciles de controlar en pacientes críticos. Por tanto, los modelos animales proporcionan un puente entre los pacientes y el laboratorio, y las hipótesis generadas en estudios clínicos pueden ser testadas en modelos animales para asegurar su relevancia.

Idealmente un modelo animal de ALI debería reproducir los mecanismos y consecuencias de ALI en humanos, incluyendo los cambios fisiológicos y patológicos (**Tabla 4**).

Hallazgos clínicos	Comienzo agudo Daño alveolar bilateral difuso Fase exudativa aguda Reparación con fibrosis
Cambios fisiológicos	Anomalías ventilación-perfusión Hipoxemia grave Descenso de la complianza Alteración del aclaramiento del fluido alveolar
Cambios biológicos	Aumento de la permeabilidad endotelial y epitelial Aumento de las concentraciones de CQs en los pulmones Activación de proteasas Alteración de la coagulación
Cambios patológicos	Infiltración alveolar de neutrófilos Coagulación intra-alveolar y depósitos de fibrina Daño en el epitelio alveolar con denudación de la membrana basal

**Tabla 4. Características de la lesión pulmonar en humanos [116].**

Se sabe que la respuesta del pulmón al daño producido por la VM no es estática, sino que varía con el tiempo, caracterizándose por una respuesta inflamatoria pulmonar seguida de una fase crónica linfoproliferativa. Los modelos animales usados deberían reproducir la lesión aguda en la barrera epitelial y endotelial y la respuesta inflamatoria aguda en los espacios aéreos, e idealmente el daño debería ser evolutivo.

## **Introducción**

Otra característica importante de la lesión pulmonar aguda en humanos, es que ésta se ve afectada por los mecanismos implicados en la enfermedad primaria (por ejemplo, la sepsis), y las diferentes modalidades o parámetros usados en la VM. Por este motivo, ningún modelo animal reproduce todas las características del SDRA en humanos. Sin embargo, si los resultados obtenidos se interpretan en base a las características del modelo, los modelos animales pueden proporcionar datos clave para entender la fisiopatología de la lesión pulmonar aguda en humanos y son una herramienta fundamental para testar nuevos tratamientos e investigar nuevas dianas terapéuticas.

### **Características a tener en cuenta en la elección del modelo animal**

Debido a la importancia de la respuesta inflamatoria en la fisiopatología del daño pulmonar inducido por la VM, se deben tener en cuenta algunas peculiaridades en el sistema inmune a la hora de elegir la especie animal.

En primer lugar, un aspecto importante son las diferencias entre especies en los receptores Toll-like (TLR), localizados en la superficie de varios tipos celulares como leucocitos, cuya función es reconocer patrones moleculares asociados a patógenos como por ejemplo LPS, por lo que los TLRs de diferentes especies pueden reconocen patrones diferentes a los humanos [32,117].

En segundo lugar, la distribución de macrófagos intravasculares varía entre especies: en algunas se encuentran en hígado y bazo, mientras que en otras se localizan también en los pulmones (macrófagos pulmonares intra alveolares, PIM). Los humanos, conejos, ratones y ratas entre otros, tienen escasos macrófagos intra alveolares pulmonares. Este es un aspecto a considerar, ya que la presencia de PIM aumenta la susceptibilidad de las especies al daño pulmonar [32,117].

Como se ha comentado anteriormente, diversos estudios en animales y humanos han corroborado la importancia del NO en la patogénesis del daño pulmonar. Este es otro punto a tener en cuenta, ya que varios trabajos han objetivado diferencias en humanos y roedores en cuanto a su capacidad de producir NO, mayor en roedores [32,117].

## Introducción

Finalmente, existen diferencias en las citoquinas y receptores de CQs entre humanos y roedores. Por ejemplo, las ratas y ratones carecen del gen de CXCL8, pero producen MIP-2, que se considera homóloga a CXCL8, con un importante papel en el reclutamiento de neutrófilos a los pulmones [118].

Otra consideración a tener en cuenta en la elección de la especie es el tamaño del animal, sobre todo en función de los parámetros que sea necesario monitorizar y las muestras sanguíneas que haya que obtener [116].

En cuanto a la elección de la especie, en nuestro caso la rata, se hace en base al coste, la disponibilidad y la experiencia del personal investigador en su manejo. Además, es el animal para el que está diseñado el sistema *ex vivo* de ventilación-perfusión de pulmones y contamos con experiencia en el modelo vascular *ex vivo*. Por otro lado, se conoce ampliamente la fisiopatología del modelo de DPA en rata y estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que los pulmones muestran daño alveolar difuso, *gold standard* del modelo de DPA [5,13].

### **Tipos de modelos de daño pulmonar inducido por la ventilación mecánica**

La mayoría de los modelos animales de ALI se basan en factores de riesgo asociados al ALI/SDRA en humanos, como la sepsis, transfusión masiva, traumatismos, aspiración de contenido gástrico y reperfusión de tejidos isquémicos. Los distintos agentes utilizados para provocar el daño pueden tener como diana en endotelio capilar, el epitelio alveolar, o ambos.

#### ***Modelos que tienen como diana el endotelio capilar***

Entre los modelos que tienen como diana el endotelio capilar, está el modelo de lesión pulmonar aguda secundaria a la administración de **ácido oleico**, que reproduce el embolismo graso en humanos. Sus ventajas son su reproductibilidad, y entre sus desventajas se encuentra que los casos de embolismo graso en la práctica clínica son limitados y no es adecuado para estudiar el SDRA producido por otras patologías [116].

### ***Modelos que tienen como diana el epitelio alveolar***

Entre los modelos que actúan sobre el epitelio alveolar, se encuentra el **modelo de aspiración de ácido**, que imita la aspiración de contenido gástrico, factor de riesgo de SDRA, mediante la administración intratraqueal de ácido clorhídrico. Produce lesión pulmonar aguda con daño en la vía aérea y el epitelio alveolar, dependiente de neutrófilos, así como daño al endotelio alveolar. Su principal ventaja es la reproductibilidad. Sin embargo, en la aspiración gástrica en pacientes no sólo se aspira ácido, sino otros componentes como restos de comida, bacterias, por lo que el modelo no reproduce exactamente la situación clínica [116].

Otro modelo que actúa sobre el epitelio alveolar es el **modelo de depleción de surfactante pulmonar**, puesto que en el SDRA existe déficit del mismo. Se realiza instilando y aspirando en varias ocasiones suero salino isotónico vía intratraqueal, con la consiguiente eliminación del surfactante. Este procedimiento por sí solo no produce cambios inflamatorios o en la permeabilidad epitelial, por lo que se combina con parámetros de VM dañina [116].

Finalmente, el **modelo de daño pulmonar inducido por la ventilación mecánica**, se basa en la aplicación de parámetros agresivos de VM en animales anestesiados y monitorizados, bien mediante traqueostomía o intubación endotraqueal (lo cual evita la respuesta inflamatoria asociada a traqueostomía). La gravedad del daño pulmonar depende de la estrategia de VM, en particular del  $V_T$  y la presencia o ausencia de PEEP. La combinación con otros modelos como la administración de LPS o ácido clorhídrico produce un efecto sinérgico con la VM [116].

La ventaja fundamental del modelo de VM es su relevancia clínica, ya que es el único modelo que ha llevado a cambios en la práctica clínica: en base a trabajos de investigación básica que relacionaban el volutrauma con el daño pulmonar, se llevó a cabo un estudio que demostró que el uso de  $V_T$  elevados en pacientes con SDRA era deletéreo, y que una estrategia de VM protectora con  $V_T$  de 6 ml/kg disminuía la mortalidad en pacientes con SDRA [4].

## Introducción

La principal desventaja del modelo de VILI es que los cambios hemodinámicos generados al ventilar con  $V_T$  elevado, como el descenso del retorno venoso secundario al aumento de la presión intratorácica, pueden influir en el daño a nivel sistémico [13]. Por tanto, para el estudio de la disfunción vascular en nuestro trabajo utilizamos un modelo *ex vivo* de VILI. Otra desventaja es que en este modelo los animales son ventilados durante periodos cortos de tiempo, mientras que los pacientes requieren VM durante días o semanas.

### ***Modelos que tienen como diana el epitelio alveolar y el endotelio capilar***

El **modelo de isquemia-reperfusión** reproduce la respuesta inflamatoria caracterizada por edema pulmonar no cardiogénico, que ocurre tras el trasplante pulmonar, no relacionada con el rechazo. También ocurre en otras situaciones como la isquemia secundaria a cirugía de aneurismas aórticos. Existen dos tipos de modelos de isquemia-reperfusión (I-R): 1) I-R pulmonar, bien mediante la compresión de la arteria pulmonar o el hilio pulmonar; 2) I-R no pulmonar, por ejemplo comprimiendo la arteria mesentérica superior o la aorta supraceliaca, o bien mediante torniquetes en las extremidades. Entre las ventajas del modelo es que reproduce una situación clínica frecuente; sin embargo, en la I-R no pulmonar el daño pulmonar es moderado y la cirugía en sí produce una respuesta inflamatoria sistémica [116].

Otro modelo que afecta tanto al epitelio alveolar como al endotelio capilar, es el **modelo de daño pulmonar debido a sepsis**. Este tipo de modelo se pueden realizar mediante [116]:

**i)** La administración de bacterias vivas vía intravenosa o intratraqueal. Es importante el tamaño del inóculo, el tipo de especie bacteriana y la especie animal utilizada. Entre las desventajas del modelo está la amplia variabilidad biológica y que no induce la formación de membranas hialinas.

**ii)** La producción de una infección endógena, mediante ligadura y punción del ciego (LPC), produce una lesión pulmonar moderada similar al SDRA, pero con mínima formación de

membranas hialinas. Entre sus desventajas están la necesidad de cirugía y la variabilidad biológica.

iii) La administración de productos bacterianos como LPS, vía intraveosa o intratraqueal. Las respuestas de las diferentes especies a LPS son variables: por ejemplo, los animales con PIM desarrollan manifestaciones de sepsis y daño pulmonar con pequeñas dosis de LPS, al contrario que los animales sin PIM. Sus principales ventajas son la facilidad de administración y reproductibilidad, pero el daño ocasionado a nivel pulmonar es moderado [116].

En **conclusión**, los estudios en modelos animales son esenciales para nuestro entendimiento de la fisiopatología de ALI y el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en ALI/SDRA, aunque ninguno de los modelos disponibles reproduzca por completo los hallazgos en el SDRA humano. Esto se debe a que la mayoría de los modelos están basados en uno o dos métodos para causar daño. Sin embargo, en los pacientes el SDRA rara vez se debe a un evento aislado, asociando a menudo varios factores de riesgo como sepsis o aspiración de contenido gástrico, distintas comorbilidades y factores inherentes al huésped como determinantes genéticos.

Las diferencias anteriormente comentadas entre las especies animales y los humanos, y el hecho de que los distintos modelos animales tengan diferentes dianas (endotelio o epitelio alveolar), justifican el hecho de que dichos modelos hayan proporcionado resultados diferentes o incluso contradictorios, y que las aproximaciones terapéuticas efectivas en animales no lo sean siempre en humanos. Por este motivo, la extrapolación de los resultados de estudios animales a pacientes debe realizarse con cautela.

Sin embargo, a pesar de estas limitaciones, los modelos animales de ALI/SDRA son esenciales, ya que por el momento no hay otra herramienta para generar información sobre la fisiopatología del daño pulmonar y para testar nuevas intervenciones terapéuticas en sistemas biológicos complejos.

### **Características del modelo de pulmón ventilado aislado y perfundido.**

Los modelos de pulmón aislado ventilado y perfundido permiten evaluar el efecto de diferentes estrategias de VM sobre la lesión pulmonar, independientemente de la influencia de otras variables fisiológicas confundidoras. Además, este modelo permite la administración de tratamientos vía intratraqueal o administrados en el líquido de perfusión [119].

En este tipo de modelos es importante la composición y características del líquido de perfusión, teniendo en cuenta la presión oncótica, la temperatura, los gases inspiratorios administrados y la presión en la arteria pulmonar [119–121].

La ventaja de este modelo en animales de pequeño tamaño como roedores, es su menor coste y mayor disponibilidad, lo que permite aumentar el tamaño de la muestra en los experimentos, siendo habitual un número de 5-8 animales por grupo. Además, en roedores, el tiempo de ejecución de los experimentos es menor y una vez adquirida una cierta experiencia en la cirugía el modelo es altamente reproducible [119]. Por otro lado, es importante estandarizar los protocolos de experimentación, así como el líquido de perfusión empleado, para hacer más comparables los diferentes trabajos [121].

Entre las dificultades del modelo en roedores, destaca que estos animales son proclives a sufrir atelectasias, por lo que se debe minimizar el tiempo hasta la conexión a la VM para evitar dañar el pulmón. Respecto al modelo en ratas, una limitación sería la menor disposición anticuerpos (específicos, sondas moleculares o líneas modificadas genéticamente, respecto a ratones [119].

La ventaja fundamental del modelo de pulmón aislado ventilado y perfundido radica en que permite contrastar la hipótesis de que es la respuesta inflamatoria pulmonar secundaria a la VM con  $V_T$  elevado la responsable del daño sistémico. Así lo corroboró el trabajo de Jaecklin *et al.*, en el que en un modelo *ex vivo* se perfundieron pulmones ventilados con  $V_T$  bajo con líquido de perfusión procedente de pulmones previamente ventilados con  $V_T$  elevado, produciéndose un descenso de la distensibilidad y un aumento de la concentración de proteínas en el LBA, respecto a los pulmones perfundidos con el líquido de perfusión control que no había pasado por el pulmón. Por tanto, se demostró que el

## Introducción

líquido de perfusión procedente de pulmones dañados puede transferir el daño a pulmones ventilados con estrategia protectora [122].

En este proyecto se pretende demostrar mediante dos modelos *ex vivo*, uno de pulmón y otro de vasos, que la lesión pulmonar aguda induce daño en órganos a distancia, en concreto disfunción vascular. Para ello es necesario un modelo de pulmón aislado ventilado y perfundido, cuyo líquido de perfusión tras ser ventilado el pulmón en condiciones dañinas, se usa para realizar un bioensayo e incubar en otro modelo *ex vivo* vasos aórticos de ratas sanas, para evaluar la disfunción vascular y demostrar la transferencia del daño. Además se estudiarán los mecanismos fisiopatológicos implicados en el daño y posibles tratamientos farmacológicos.

## **III. Justificación**

### JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

Existe evidencia de que la VM dañina no sólo produce lesión pulmonar, sino que puede ocasionar daño sistémico [7–10,14]. En modelos *in vivo*, se ha demostrado que la VM con  $V_T$  elevado produce disfunción vascular [5,11,13], pero no se puede descartar que las alteraciones en la función vascular sean debidas a los cambios hemodinámicos (derivados del aumento de la presión intratorácica) ocasionados por la ventilación con  $V_T$  elevado.

En base a esto, nuestro objetivo principal fue demostrar que la VM con  $V_T$  elevado *ex vivo* se asociaba con disfunción vascular, caracterizada por una alteración en la relajación y la contracción vascular. Para demostrarlo, se realizó un bioensayo, utilizando dos modelos, un modelo *ex vivo* de pulmón y otro modelo de estudio de la función vascular *ex vivo*, donde se incubaron las aortas de animales sanos con el efluente procedente del pulmón ventilado. Nuestra hipótesis fue que el pulmón perfundido y ventilado *ex vivo*, liberaría a la circulación sistémica mediadores capaces de alterar la respuesta vascular, en respuesta a la VM dañina. Por tanto, nuestro primer objetivo fue demostrar que la VM con  $V_T$  elevado producía daño pulmonar, en un modelo de pulmón *ex vivo*, para evitar las alteraciones hemodinámicas que se producen al ventilar con  $V_T$  elevado en los modelos *in vivo*.

En modelos *in vivo* previos de nuestro grupo, habíamos observado que al ventilar animales de las mismas características con parámetros similares de VM dañina, algunos animales desarrollaban un menor daño tanto en el pulmón como a nivel hemodinámico, y eso se correlacionaba con menor daño histológico. En base a estas observaciones, nuestro tercer objetivo fue demostrar la existencia de dos fenotipos de respuesta a la VM, caracterizados por la presencia o ausencia de daño alveolar difuso. En la misma línea, nuestro cuarto objetivo fue valorar si la disfunción vascular asociada al VILI, se desarrollaba de forma más marcada en el grupo que presentaba daño alveolar difuso.

Existen numerosos trabajos que relacionan el aumento del estrés nitro-oxidativo con la fisiopatología del SDRA [83,84]. Un trabajo previo de nuestro grupo en un modelo *in vivo*, encontró que la disfunción vascular asociada a la

## Justificación

ventilación con  $V_T$  elevado se corregía con la administración de inhibidores del estrés nitro-oxidativo [16]. Por esto, nuestro quinto objetivo fue evaluar si las alteraciones en la función vascular asociadas al VILI, se debían a un aumento del estrés nitro-oxidativo. Se valoró el efecto de la metaloporfirina, el tempol y la SOD sobre la disfunción vascular.

Por tanto, el presente trabajo pretende demostrar mediante un bioensayo, una hipótesis no probada con anterioridad, la asociación entre el VILI y la disfunción vascular. Además, la hipótesis de que las alteraciones vasculares asociadas a la VM con  $V_T$  elevado en nuestro modelo *ex vivo*, se producen de forma más marcada en los pulmones que presentan daño alveolar difuso, tiene una clara aplicación traslacional, pues sus resultados pueden contribuir a la identificación de biomarcadores útiles en tanto en el diagnóstico como en el pronóstico del SDRA. Finalmente, consideramos que el estudio de los mecanismos fisiopatológicos del daño pulmonar y sistémico asociados a la VM es fundamental, así como la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas, puesto que los tratamientos farmacológicos ensayados hasta el momento no han modificado la práctica clínica.

## **IV. Hipótesis y Objetivos**

### HIPÓTESIS PRINCIPAL

- El daño pulmonar inducido por la ventilación mecánica (“*ventilator-induced lung injury*”, VILI) se asocia con disfunción vascular.

### HIPÓTESIS SECUNDARIAS

1. La ventilación mecánica con volumen corriente elevado *ex vivo* induce VILI.
2. El VILI se asocia con disfunción vascular.
3. Existen dos fenotipos de respuesta a la ventilación mecánica, determinados por la presencia de daño alveolar difuso.
4. La disfunción vascular asociada al VILI se desarrolla de forma más marcada en el grupo que presenta daño alveolar difuso.
5. Las alteraciones en la función vascular asociadas al VILI son debidas a un aumento del estrés nitro-oxidativo.

### OBJETIVO PRINCIPAL

- Demostrar que el daño pulmonar inducido por la ventilación mecánica (“*ventilator-induced lung injury*”, VILI) se asocia con disfunción vascular.

### OBJETIVOS SECUNDARIOS

1. Demostrar que la ventilación mecánica utilizando un volumen corriente elevado *ex vivo* se asocia con VILI.
2. Evaluar si el VILI se asocia con disfunción vascular.
3. Demostrar la existencia de dos fenotipos de respuesta a la ventilación mecánica, caracterizados por la presencia o ausencia de daño alveolar difuso.
4. Valorar si la disfunción vascular asociada al VILI se desarrolla de forma más marcada en el grupo que presenta daño alveolar difuso.
5. Evaluar si las alteraciones en la función vascular asociadas al VILI se deben a un aumento del estrés nitro-oxidativo.

## **V. Material y métodos**

### 1. DISEÑO

Se trata de un estudio prospectivo de naturaleza experimental realizado en la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Getafe.

El proyecto consistió en la realización de un bioensayo para demostrar que la liberación de sustancias desde los pulmones dañados induce daño en órganos a distancia, en concreto en el sistema vascular. Para ello se utilizaron un modelo animal *ex vivo* de VILI (*ventilator induced lung injury*) y un modelo *ex vivo* de función vascular. El proyecto se dividió en dos fases:

- i) Fase de demostración de **daño pulmonar inducido por la ventilación mecánica**, en un modelo *ex vivo* de pulmón aislado, ventilado y perfundido.
- ii) Fase de estudio de la **disfunción vascular ex vivo**, en la que se incubaron anillos de aorta de animales sanos con el líquido de perfusión de los pulmones dañados, para estudiar cómo afectan las sustancias liberadas por los pulmones a la función vascular y el efecto de sustancias atraparoras de radicales libres de oxígeno y nitrógeno.

### 2. PERIODO DE ESTUDIO

Los experimentos se llevaron a cabo entre septiembre del 2013 y julio de 2015. El estudio anatomopatológico se ejecutó entre febrero y junio de 2016.

### 3. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley (SD), con origen en el fondo genético de Harlan (Barcelona, España), criadas y estabuladas en el animalario de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Getafe (Madrid, España), en condiciones ambientales controladas (temperatura 20-22°C, humedad relativa 40-60%, ciclo luz-oscuridad de 12 h-12 h), con acceso *ad libitum* a comida y agua. La edad aproximada de los animales usados fue de 12 semanas (peso 325-375 g) para los experimentos de ventilación mecánica y 12-16 semanas (peso 400-500 g) para los experimentos de función vascular.

La elección de la especie se hizo en base que se conoce ampliamente la fisiopatología del modelo de DPA (daño pulmonar agudo) en rata y estudios previos de nuestro grupo han demostrado que sus pulmones muestran daño alveolar difuso, patrón oro del modelo de DPA [5]. Por otro lado, nuestro equipo cuenta con experiencia en el modelo vascular *ex vivo* en ratas [16].

#### 4. DESCRIPCIÓN DE LOS MODELOS ANIMALES

El proyecto consta de dos fases: **i)** daño pulmonar inducido por VM, en un modelo *ex vivo* de pulmón ventilado con  $V_T$  bajo y elevado; **ii)** estudio de la función vascular *ex vivo*, incubando anillos aórticos de animales sanos con el líquido de perfusión de los pulmones.

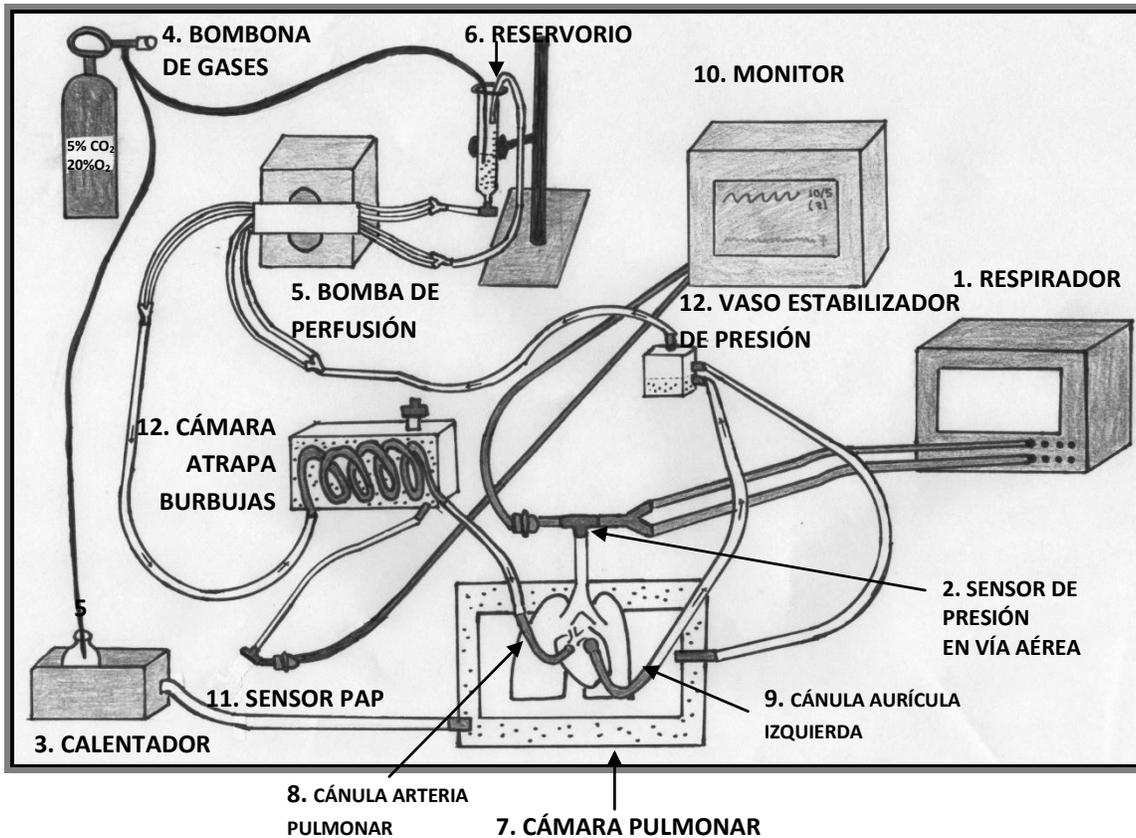
##### 4.1. FASE I: MODELO DE DAÑO PULMONAR INDUCIDO POR LA VENTILACIÓN MECÁNICA

En la **primera fase**, se llevó a cabo un modelo de VILI que consistía en la ventilación y perfusión de los pulmones en un sistema *ex vivo*, que se describe a continuación. Para inducir el daño se ventiló con  $V_T$  elevado sin PEEP, mientras que el grupo control fue ventilado con  $V_T$  bajo.

##### 4.1.1. Elementos del sistema de ventilación y perfusión *ex vivo*

El sistema de ventilación y perfusión de pulmón *ex vivo* consta de varios elementos (Los números resaltados corresponden a los diferentes elementos del sistema que se muestran en la **Figura 4**):

- Un respirador (1) específico para roedores (Harvard Apparatus, Inspira ASV®, Holliston, Massachusetts, Estados Unidos), conectado con la cánula de traqueostomía. Entre la conexión a la traqueostomía y las tubuladuras se colocó un sensor de presión (2) para monitorizar la presión en la vía aérea.
- Un calentador (3. Ultraterm®, Barcelona, España), que mantenía la temperatura y humedad necesarias en la cámara pulmonar.
- Una bombona de gases (4), para burbujear el líquido de perfusión.



**Figura 4. Esquema general del sistema de ventilación y perfusión de pulmón ex vivo, con cada uno de sus componentes.**

El circuito comienza en el reservorio (6), desde donde circula el líquido de perfusión gracias a la bomba de perfusión (5) hasta la cámara atrapa burbujas (12) para entrar en la cánula de la arteria pulmonar (8). De la cámara atrapa burbujas sale otra conexión que monitoriza la presión en la arteria pulmonar (11). Tras circular por los pulmones, el líquido de perfusión regresa por las venas pulmonares a la cánula de la aurícula izquierda (9), y de ahí, tras atravesar el vaso estabilizador de presión (12), acaba de nuevo en el reservorio para continuar recirculando.

- Una bomba de perfusión (5. ISMATEC®, Wertheim, Alemania), para recircular el líquido de perfusión.
- Plataforma con un reservorio que contiene el líquido de perfusión (6).
- Circuito de perfusión, montado en una plataforma de Plexiglass® (Isolated Perfused Lung apparatus size 2, Type 829/2, Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus®, March, Alemania).
- Cámara pulmonar (7), donde se situaba el bloque pulmón-corazón. Esta cámara tiene una doble pared por la que circula agua estéril que se mantiene a 37°C. En la parte superior tiene una conexión a la traqueostomía y al respirador. En el interior tiene 2

tubos, uno proximal, que se conectaba a la cánula de la arteria pulmonar (8), y uno distal, que se conectaba a la cánula de la aurícula izquierda (9).

- Monitor (10. Hewlett Packard® Modelo 66S), en el que se registraba la presión en la vía aérea (2) y la presión en la arteria pulmonar (11).

### 4.1.2. Preparación del experimento

En el modelo *ex vivo* de pulmón aislado ventilado y perfundido, se requería conectar el animal al respirador con la mayor rapidez posible una vez iniciada la cirugía. Por lo tanto, se purgaba el sistema de perfusión previamente, además de preparar el respirador, la anestesia y el material de cirugía con anterioridad.

En primer lugar, se preparaba la solución de Krebs-Henseleit (KHS) y se filtraba con un filtro de 45 micras (Sarstedt®). Una vez filtrada, se añadían 2 ml de *antifoam* (*Antifoam SE-15*, Sigma® diluido 1/10), una sustancia inerte para evitar la formación de espuma. Para evitar que la solución del Krebs-Henseleit se acidificara, se mantenía a 37°C burbujeándose con CO<sub>2</sub>. Para ello, la solución de Krebs se introducía en un baño a 37°C y se burbujeaba con un gas que contenía una mezcla de 20% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>, con balance de nitrógeno. La composición de la solución de Krebs-Henseleit era la siguiente: 25 ml de NaCl, KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub> y CaCl<sub>2</sub>; 0,25 g de glucosa, 0,75 g de HEPES, 10 g de albúmina bovina al 4%; agua estéril hasta 250 ml.

En segundo lugar, se procedía a la limpieza con agua estéril del sistema de perfusión y su posterior purga con la solución de Krebs, con especial atención a que no quedaran burbujas en el sistema. Una vez purgado, se recirculaba el líquido de perfusión, dejando 40 ml de solución de Krebs en el reservorio.

El respirador usado para la ventilación fue el modelo Inspira ASV de Harvard Apparatus®. Se programaba, en función del peso del animal, la frecuencia respiratoria, el volumen corriente, la PEEP y el tiempo inspiratorio. La presión en la vía aérea y la presión en la arteria pulmonar se registraron en un monitor (Hewlett Packard®, modelo 66S), mediante los correspondientes sensores de presión. Una vez terminada la cirugía y colocado

el pulmón en la cámara, se realizaba el cero de la presión en la vía aérea y la arteria pulmonar para el registro de los datos.

### 4.1.3. Anestesia

Los animales fueron anestesiados vía intraperitoneal mediante punción en el cuadrante inferior derecho del abdomen, aspirando previamente para evitar la inyección intravascular, con ketamina 90 mg/kg (Ketolar® 50 mg/ml), diazepam 5 mg/kg (Valium® 10 mg/2ml) y fentanilo 0,01 mg (Fentanest® 0,15 mg/3ml).

Según la necesidad individual de cada animal, durante los procedimientos quirúrgicos se administraron dosis adicionales de anestesia intraperitoneal ( $1/2$  ó  $1/4$  de la dosis inicial). Una vez alcanzados el nivel de anestesia y analgesia adecuado, que se comprobó mediante el reflejo de retirada, se comenzaron los procedimientos quirúrgicos.

### 4.1.4. Procedimiento quirúrgico

En primer lugar se colocó al animal en decúbito supino sobre la placa quirúrgica y se limpió la cara ventral con povidona yodada.

- **Canulación de la arteria carótida y traqueostomía (Figuras 5 y 6):** mediante una incisión longitudinal en línea media ventral del cuello, se disecaron las glándulas salivares y los músculos que cubren la tráquea, bajo los cuales se encuentra el paquete vasculo-nervioso con la arteria carótida y el nervio vago. Se aisló la arteria carótida para introducir un angiocatéter de 22 G, inyectando heparina sódica al 5% (500UI por cada 100 g de peso). Seguidamente se separó la tráquea y se realizó una traqueostomía con un angiocatéter de 14 G. Finalmente se exanguinó al animal a través del catéter carotídeo.

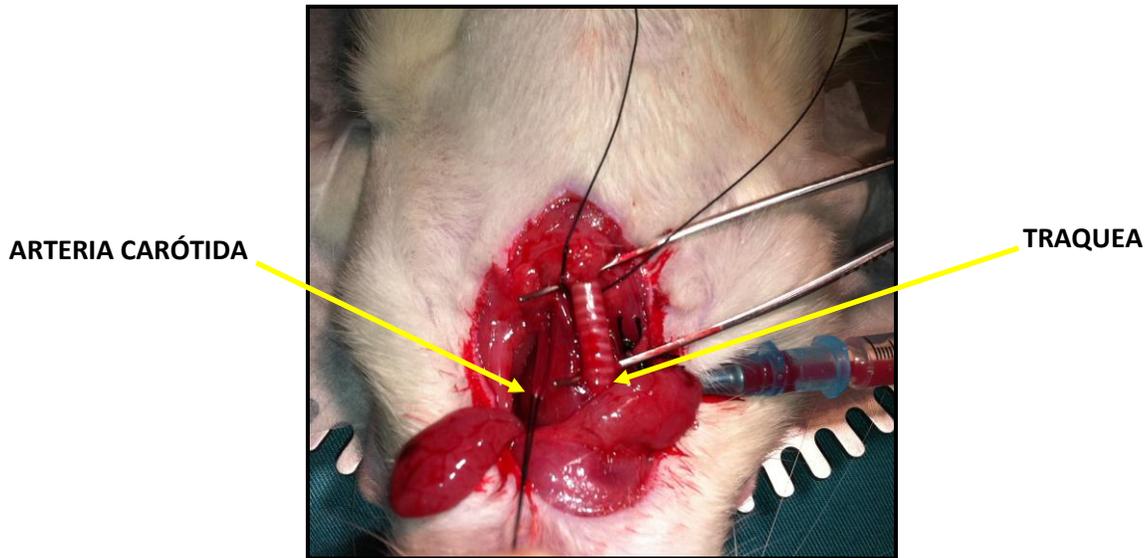


Figura 5. Aislamiento de la arteria carótida y la tráquea.



Figura 6. Canulación de la arteria carótida y traqueostomía.

- **Canulación de la circulación pulmonar (Figura 7):** apertura del peritoneo mediante una incisión longitudinal en la línea media ventral. Una vez localizado el diafragma, se realizó una incisión para separarlo de su unión con la caja torácica. Seguidamente, se realizó una esternotomía y se expuso el contenido de la caja torácica con ayuda de los separadores. En este momento, se conectó la traqueostomía al respirador con los

parámetros previamente fijados. Posteriormente, se disecó el timo y el tejido graso anterior al corazón y los grandes vasos. Se separaron con una seda la aorta y el tronco pulmonar y se pasó otra seda alrededor de los ventrículos cardiacos dejando un nudo sin apretar. Después, se realizaron dos incisiones: una en el tronco pulmonar y otra en el ápex del ventrículo izquierdo. Se conectó la cánula de la arteria pulmonar a la parte proximal del sistema de perfusión, y una vez purgada, se introdujo en el tronco de la arteria pulmonar. Se desechó el líquido de perfusión durante unos minutos para limpiar los restos sanguíneos de la circulación pulmonar. A continuación, se conectó la parte distal del sistema de perfusión a la cánula de la aurícula izquierda, y se introdujo a través de la incisión realizada en el ápex del ventrículo izquierdo atravesando la válvula mitral, de manera cuidadosa para no lesionar la aurícula, tensando después la seda alrededor de los ventrículos. Una vez canulada la circulación pulmonar, el líquido de perfusión se recirculó por el sistema a una velocidad de 4 ml/minuto, dejando 40 ml de la solución de Krebs en el reservorio. Durante el experimento, se añadió *ad libitum antifoam* al reservorio para evitar la formación de espuma.

- **Aislamiento del bloque pulmón-corazón (Figura 8):** una vez conectado el sistema de perfusión, se procedió a la separación de los pulmones y el corazón en bloque. Se liberaron las adherencias del tejido conectivo pleuro-pulmonar, y mediante la tracción de la aorta, se levantaron los pulmones y el corazón, disecando con las tijeras curvas el mediastino posterior, y cortando finalmente la tráquea y el esófago. Una vez aislado el bloque corazón-pulmón, se colocó en la cámara de ventilación. La cirugía se realizó con extremo cuidado para evitar lesionar los pulmones.

CÁNULA  
ARTERIA  
PULMONAR

CÁNULA  
AURÍCULA  
IZQUIERDA

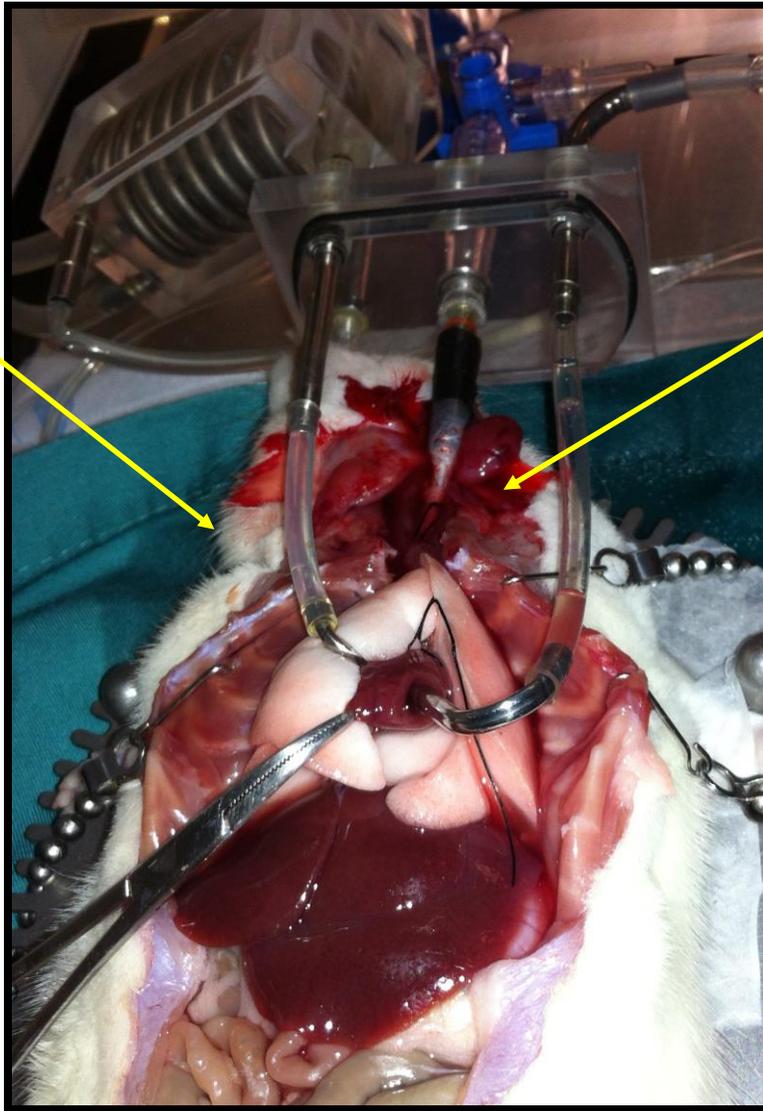
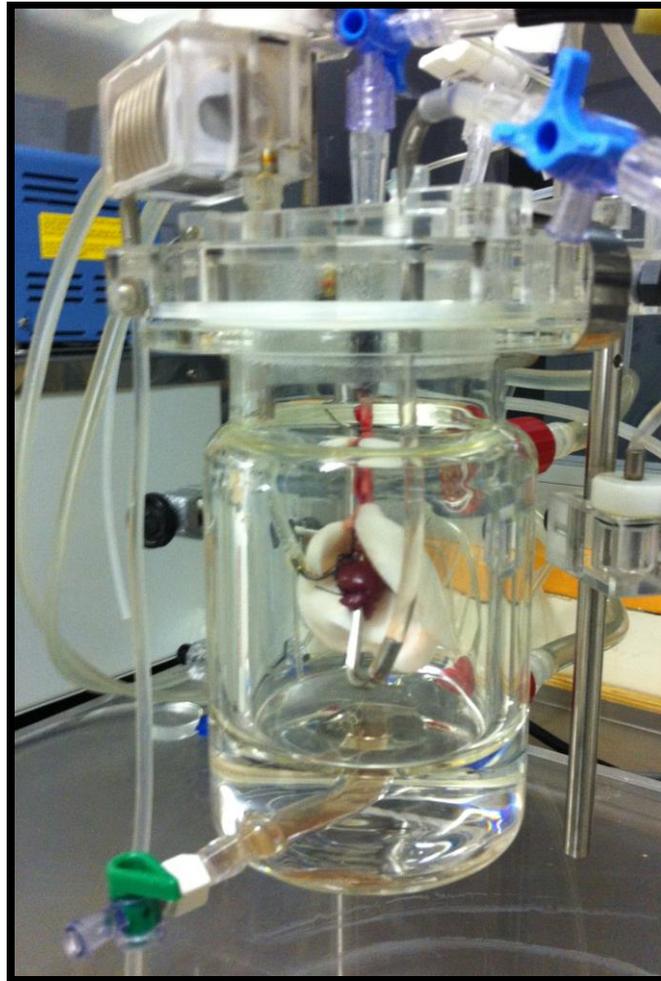


Figura 7. Canulación de la arteria pulmonar y la aurícula izquierda.



**Figura 8. Aspecto final del pulmón ventilado y perfundido.**

### **4.2. FASE II: MODELO DE DISFUNCIÓN VASCULAR *EX VIVO***

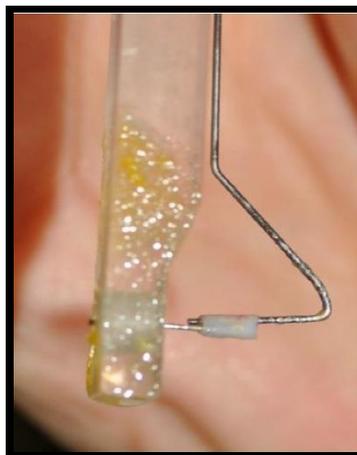
En la **segunda fase** se realizó un bioensayo en un modelo *ex vivo* de función vascular.

Para los experimentos se utilizaron ratas sanas SD de 12-16 semanas de edad, que se anestesiaron vía intraperitoneal con ketamina 90 mg/kg y diacepam 5 mg/kg. Mediante toracotomía se identificaron las estructuras vasculares torácicas y se extrajo la aorta torácica, que fue recogida en un recipiente con solución de Krebs a 4°C. A continuación se cortó en 8 anillos de 3-5 mm de longitud.



**Figura 9. Detalle de la limpieza y corte de la aorta torácica de la rata para el estudio de la función vascular *ex vivo*.**

Los 8 anillos se montaron en 8 diferentes baños de órganos, sujetos entre dos soportes de acero inoxidable, conectados a un transductor de tensión, para el estudio de la función vasodilatadora y vasoconstrictora. La señales del transductor se amplificaron (BIOPAC® Systems, Inc, Santa Bárbara, California, Estados Unidos) y se grabaron en un ordenador usando el software Acqknowledge®. El baño contenía 5 ml de solución de Krebs a 37°C, burbujeada con 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub> (pH 7,40).



**Figura 10. Anillo montado en el baño de órganos. Se observa el anillo de aorta montado entre los 2 alambres de acero inoxidable.**

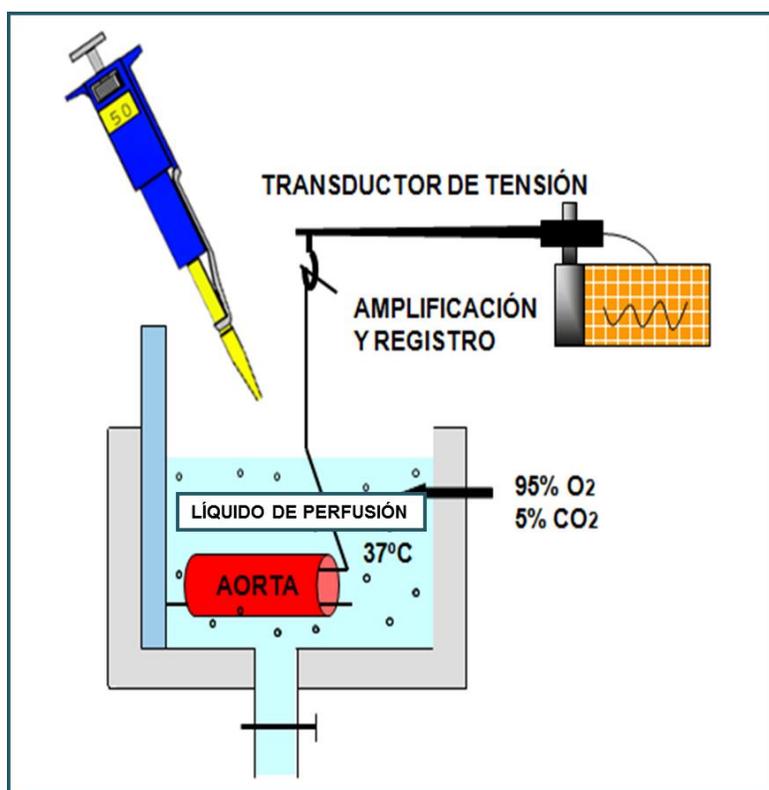


Figura 11. Esquema del sistema de registro de la reactividad vascular.

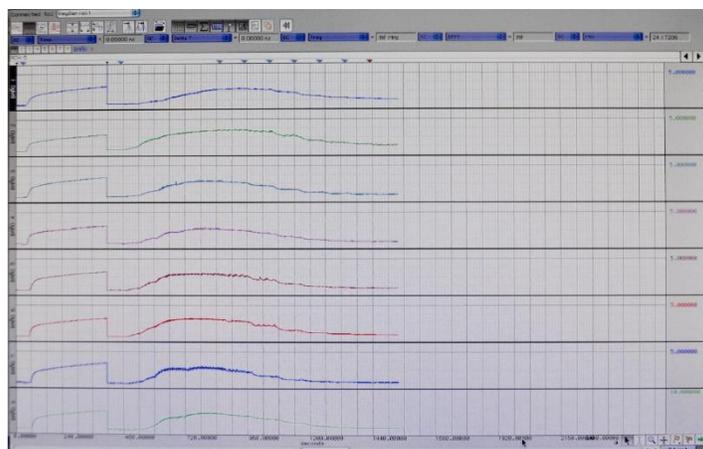


Figura 12. Registro Acqknowledge®.

### 5. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

#### 5.1. FASE I: MODELO DE DAÑO PULMONAR INDUCIDO POR LA VENTILACIÓN MECÁNICA

En la **primera fase**, los animales fueron asignados a 2 grupos de ventilación:

- **Grupo control**, ventilado con la estrategia protectora ( $V_T$  bajo de 6ml/kg y PEEP= 5 cmH<sub>2</sub>O).
- **Grupo de daño pulmonar** ( $V_T$  elevado de 25ml/kg y PEEP= 0 cmH<sub>2</sub>O).

Los primeros 30 minutos (periodo de estabilización), ambos grupos se ventilaron con la estrategia protectora. Posteriormente, según su asignación, se ventilaron durante 150 minutos con  $V_T$  bajo o  $V_T$  elevado. En ambos grupos la frecuencia respiratoria (FR) fue de 60 respiraciones por minuto (rpm), el tiempo inspiratorio ( $T_i$ ) 0,5 segundos y se ventilaron con aire ambiente ( $FiO_2$  21%). El espacio muerto, ya calculado en experimentos previos [5], se aumentó en los animales ventilados con  $V_T$  elevado para lograr valores de  $pCO_2$  comparables en ambos grupos.



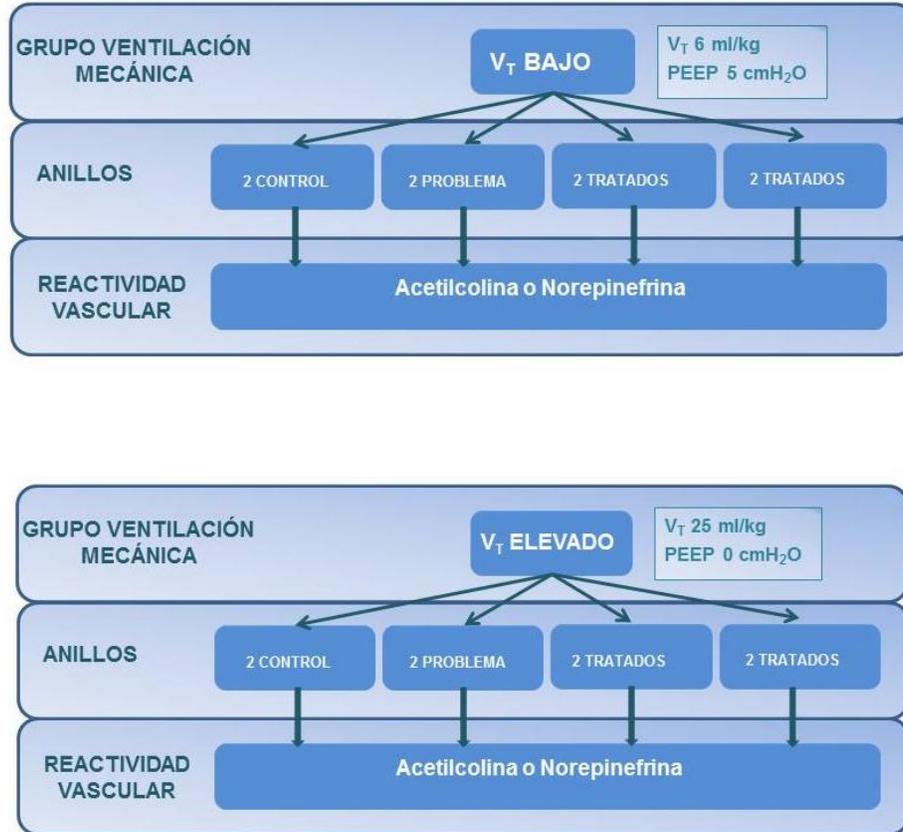
Figura 13. Diagrama del protocolo experimental de la Fase I.

Una vez finalizado el experimento de VM, se conservaron los fragmentos de pulmón derecho congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$ , y el pulmón izquierdo se fijó en formaldehído al 10%.

### 5.2. FASE II: MODELO DE DISFUNCIÓN VASCULAR *EX VIVO*

En la **segunda fase**, tras finalizar el periodo de ventilación, se recolectó el líquido de perfusión que había circulado por los pulmones. Se procedió a la incubación de los anillos de aorta extraídos de una rata sana, diferente a la utilizada en el modelo de ventilación mecánica, para el estudio de la función vasodilatadora y vasoconstrictora (**Figura 11**). Se compararon las respuestas entre los anillos incubados con el líquido de perfusión procedente de los grupos ventilados con  $V_T$  bajo o  $V_T$  elevado, con/sin atrapador y líquido de perfusión que no había pasado por el pulmón. En cada experimento de función vascular se testaron ocho anillos (**Figura 14**):

- Dos anillos **controles** (para comprobar el funcionamiento de cada arteria), incubados con líquido de perfusión no utilizado en el experimento que no había pasado por el pulmón.
- Dos anillos **problema**, incubados con el líquido de perfusión (**Krebs problema**) procedente del experimento de ventilación mecánica ( $V_T$  bajo o elevado), sin añadir tratamiento.
- 2 parejas de anillos **tratados**, incubados con el líquido de perfusión procedente del experimento, preincubados con los fármacos estudiados.



**Figura 14. Esquema del protocolo experimental.**

Una vez colocados los anillos en los soportes metálicos (**Figura 10**), se dejaron estabilizar durante 60 minutos, con una tensión en el caso de la aorta de 1,5 gramos. Después, los segmentos arteriales fueron contraídos con potasio (K<sup>+</sup>) 75 mM, durante 2 minutos, para comprobar la viabilidad del vaso. A continuación, los anillos arteriales se lavaron tres o cuatro veces con solución de Krebs para eliminar el efecto del K<sup>+</sup>, dejando luego en reposo a los segmentos durante 30 minutos antes de comenzar el experimento.

Para examinar la implicación de las especies reactivas del oxígeno (ERO) y del nitrógeno (ERN) en la disfunción vascular asociada al daño pulmonar inducido por ventilación mecánica, se analizó la respuesta de los anillos al tratamiento con distintos atrapadores de radicales libres. Se testaron los efectos de:

## Material y métodos

- Zn-Mn Superóxido dismutasa (SOD), un atrapador de radicales libres extracelular.
- Tempol (un radical libre permeable a membranas celulares y atrapador de peroxinitrito).
- Mn (III) tetrakis 1-metil-4—4piridil porfirina (MnTMPyP), un SOD mimético permeable a membranas celulares y catalizador de la descomposición del peroxinitrito.

Los tres atrapadores a testar (SOD, tempol y MnTMPyP), se probaron de 2 en 2 en cada experimento, en cada uno de los grupos de ventilación mecánica, de la siguiente forma: SOD-tempol; SOD- MnTMPyP; tempol- MnTMPyP (**Figura 14**).

Una vez estabilizados tras el periodo de reposo, los diferentes anillos vasculares se trataron o no incubándolos durante 15 minutos con SOD (100 U/ml), tempol ( $10^{-4}$  M) o MnTMPyP ( $10^{-5}$  M).

Transcurridos los 15 minutos de preincubación con los fármacos, se procedió a cambiar el líquido de perfusión del baño por el líquido de perfusión problema que había pasado por el pulmón, salvo en el caso de los 2 controles. Los anillos se dejaron incubar con este líquido de perfusión durante 60 minutos (**Figura 15**).

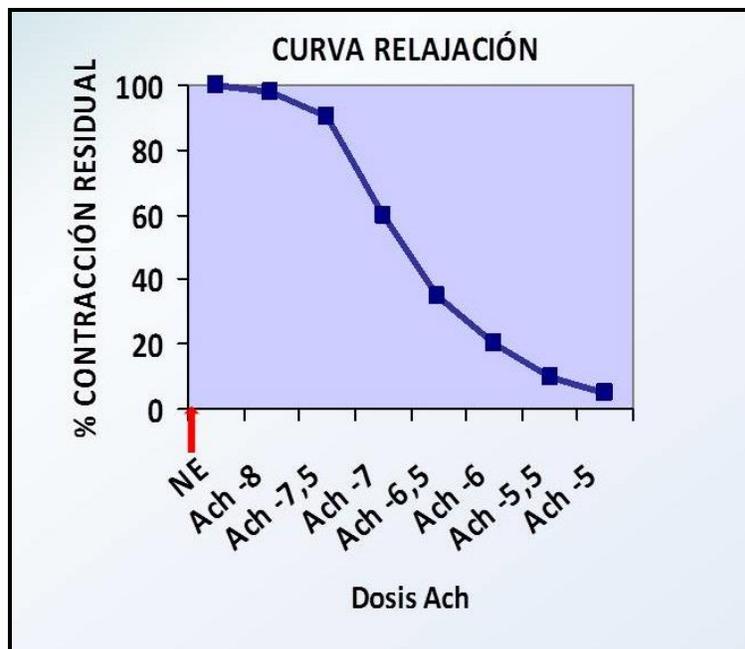


**Figura 15.** Esquema del protocolo experimental de los experimentos de función vascular.

Tras el periodo de incubación con el Krebs problema (KP) o Krebs control (KC), se realizó la curva de función vascular. La acetilcolina (Ach, un vasodilatador dependiente de óxido nítrico) y la norepinefrina (NE, un vasoconstrictor alfa adrenérgico) se eligieron como sustancias vasoactivas, para testar, respectivamente, la función endotelial y la función vascular del músculo liso.

Las curvas de función vascular se realizaron de la siguiente manera:

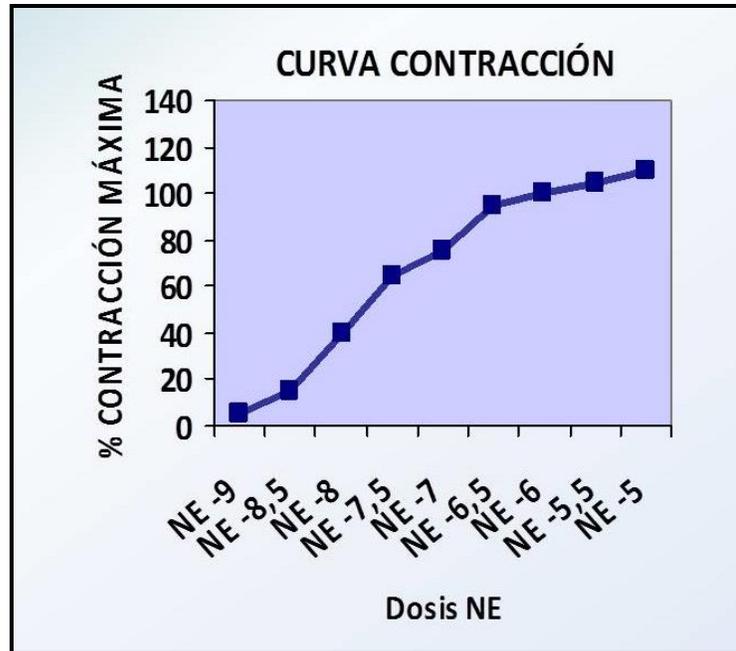
- **Curvas de relajación (Figura 16):** se administró para contraer los anillos NE (dosis de NE  $10^{-8}$  M ó  $3 \times 10^{-8}$  M). Esto se hizo con el fin de obtener una respuesta contráctil que fuera, al menos, el 80% de la obtenida con el  $K^{+}$  (75 mM). Cuando se estabilizó la contracción, se relajó con dosis crecientes y acumulativas de Ach ( $10^{-8}$  M a  $10^{-5}$  M), y se realizó una curva concentración-respuesta a Ach. La curva de relajación se compone de las siguientes dosis de Ach:  $10^{-8}$  M,  $3 \times 10^{-8}$  M,  $10^{-7}$  M,  $3 \times 10^{-7}$  M,  $10^{-6}$  M,  $3 \times 10^{-6}$  M y  $10^{-5}$  M. Los datos se presentan como el porcentaje de la contracción residual en relación con la máxima contracción alcanzada con NE.



**Figura 16. Ejemplo de curva dosis-respuesta de relajación.**

En el eje de ordenadas se representa el tanto por ciento de contracción residual en relación con la máxima contracción alcanzada con NE, y en el eje de abscisas las dosis crecientes de Ach.

- **Curvas de contracción (Figura 17):** en otros anillos vasculares se estudió la respuesta a concentraciones crecientes de norepinefrina ( $10^{-9}$  M a  $10^{-5}$  M), con el fin de estudiar la respuesta contráctil de estos vasos, realizando una curva dosis-respuesta. Los datos se presentan como el porcentaje de contracción en relación a la máxima contracción alcanzada con potasio.



**Figura 17. Ejemplo de curva dosis-respuesta de contracción**

En el eje de ordenadas se representa el porcentaje de contracción en relación a la máxima contracción alcanzada con potasio y en el eje de abscisas las dosis crecientes de NE administradas.

Las dosis y tiempos de incubación de estas drogas se eligieron basándose en estudios previos de sus efectos en diferentes modelos [123,124].

## 6. TAMAÑO DE LA MUESTRA

El tamaño de la muestra se estimó en base a: i) estudios previos experimentales en modelos *ex vivo* [22], en los que se demostró que un tamaño de la muestra de 6-8 animales por grupo es adecuado, y ii) a nuestra experiencia previa con el modelo, en el que se demostró la existencia de un fenómeno con relevancia clínica [125], consistente en que aplicando los mismos parámetros en animales con características similares ( $V_T$  elevado en

## Material y métodos

animales sanos), aproximadamente la mitad mostraban daño pulmonar, mientras que la otra mitad se comportaba como el grupo ventilado con  $V_T$  bajo, sin presentar daño pulmonar, por lo que el número de animales utilizados en los experimentos de  $V_T$  elevado es aproximadamente el doble. De esta manera se analizaron las respuestas de dos subgrupos con relevancia clínica y se compararon los experimentos de los pulmones que mostraban daño pulmonar con los que no lo presentaban.

En cada experimento se utilizó un animal para el modelo *ex vivo* de VM y otro animal para el modelo de reactividad vascular. Se realizaron 4 experimentos de reactividad vascular por cada una de las sustancias probadas (SOD, tempol y MnTMPyP), en el caso de los experimentos realizados con  $V_T$  bajo. Se calcularon 12 experimentos por fármaco en el caso de los experimentos realizados con  $V_T$  elevado, por los motivos mencionados anteriormente. Este esquema fue similar tanto en los experimentos de contracción, como de relajación vascular. Dado que por cada experimento se probaron 2 fármacos, el número de animales necesario se dividió entre 2.

Por lo tanto, el tamaño de la muestra calculado fue de 96 animales (**Tabla 5**):

- 48 animales para los experimentos de ventilación mecánica: 12 para  $V_T$  bajo y 36 para  $V_T$  elevado.

- 48 animales para los experimentos de función vascular: 24 para vasoconstricción y 24 para vasodilatación.

	VASODILATACIÓN		VASOCONSTRICCIÓN		TOTAL
	$V_T$ bajo	$V_T$ elevado	$V_T$ bajo	$V_T$ elevado	
SOD	4	12	4	12	
TEMPOL	4	12	4	12	
MnTMPyP	4	12	4	12	
VM	12/2=6 animales	36/2=18 animales	12/2=6 animales	36/2=18 animales	48 animales
FUNCIÓN VASCULAR	12/2=6 animales	36/2=18 animales	12/2=6 animales	36/2=18 animales	48 animales

**Tabla 5. Esquema del tamaño de la muestra (Fase 1 y 2).**

Asumiendo un porcentaje pérdidas del 10% debido a experimentos fallidos por muerte prematura del animal o problemas técnicos en el modelo (embolia gaseosa, problemas en la cirugía, etc), el número total de animales calculado fue de 106.

### 7. VARIABLES DE ESTUDIO

#### 7.1. Medidas hemodinámicas y respiratorias

Para valorar el daño pulmonar y monitorizar los parámetros de VM, se registraron la presión pico inspiratoria (PIP), además de la presión media en la vía aérea ( $P_{AW}$ ) y la PEEP, a través de un transductor de presión conectado a la traqueostomía. Por otro lado, se midió la presión en la arteria pulmonar mediante un catéter conectado a la cánula de la arteria pulmonar y un transductor de presión. Estas medidas se registraron cada 30 minutos desde el inicio del periodo de estabilización (T= -30 minutos) hasta el final del experimento (T=150 minutos).

#### 7.2. Análisis histológico

El daño pulmonar se corroboró mediante la presencia de membranas hialinas en el análisis histológico (patrón oro del modelo de daño pulmonar agudo). Se tomaron tres porciones del pulmón izquierdo para su análisis histológico: la zona correspondiente al hilio, una inmediatamente por encima y otra por debajo. Cada una de ellas fue cortada en secciones de 5  $\mu\text{m}$  y teñida con hematoxilina-eosina. Se eligieron diez campos de cada sección, que fueron analizados mediante microscopio óptico. Para cuantificar el daño pulmonar se empleó un índice basado en el trabajo de Matute-Bello *et al.* [126]. Este *score* evalúa la presencia de neutrófilos en el espacio alveolar e intersticial, membranas hialinas, residuos proteináceos en los espacios aéreos y engrosamiento septal (**Figura 18**).

Este análisis fue realizado por la Dra. Aida Ballén Barragán, del servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Getafe, de manera ciega para el grupo al que correspondían las muestras.

	SCORE POR CAMPO		
	0	1	2
A. Neutrófilos en el espacio alveolar	Ninguno	1-5	>5
B. Neutrófilos en el espacio intersticial	Ninguno	1-5	>5
C. Membranas hialinas	Ninguna	1	>1
D. Material proteináceo en los espacios alveolares	Ninguno	1	>1
E. Engrosamiento septos alveolares	<2x	2x-4x	>4x

$SCORE = [(20 \times A) + (14 \times B) + (7 \times C) + (7 \times D) + (2 \times E)] / (\text{número de campos} \times 100)$

**Figura 18. “Lung injury scoring system”. Modificado de Matute-Bello *et al.* [126].** Este score evalúa asigna una puntuación de 0, 1 ó 2 puntos según la presencia de un número determinado de elementos por campo: neutrófilos en el espacio alveolar e intersticial, membranas hialinas, residuos proteináceos en los espacios aéreos y engrosamiento septal. Finalmente, cada puntuación se multiplica por un coeficiente, y el sumatorio total se divide entre el número de campos estudiados por 100, obteniendo la puntuación total del score.

### 7.3. Medidas en el líquido de perfusión

Con el objeto de evaluar indirectamente el daño celular producido por la VM lesiva, y para comparar las características basales de los diferentes grupos, se realizó en el líquido de perfusión una gasometría, hemograma, medición de lactato, glucosa, creatinina, lactato deshidrogenasa (LDH), creatin kinasa (CK), sodio, potasio, cloro, calcio, proteínas totales y osmolalidad. Se analizaron las muestras antes de T=0 y al final del experimento en T=150.

### 7.4. Curva dosis-respuesta de relajación y contracción

Se realizaron 2 curvas dosis-respuesta: 1) relajación (dosis crecientes Ach) y ii) contracción (dosis crecientes NE), para cada una de las 3 sustancias testadas (*vide supra*). Éstas se compararon con la curva dosis-respuesta de los anillos incubados con el líquido de perfusión control y problema, con el objeto de valorar el efecto de los inhibidores del estrés nitro-oxidativo sobre la disfunción vascular asociada al daño pulmonar inducido por la ventilación mecánica.

### 8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para demostrar nuestro tercer objetivo, la existencia de dos fenotipos de respuesta a la VM, caracterizados por la presencia o ausencia de daño alveolar difuso, se realizó una **curva ROC** (*Receiver Operating Characteristic*), que relacionaba el valor de PIP máxima alcanzado durante el experimento, con la presencia o ausencia de membranas hialinas, puesto que no disponíamos de muestras histológicas de todos los pulmones. Se determinó el valor de **PIP máxima** con mejor sensibilidad y especificidad. De esta manera, se utilizó el valor de PIP máxima, como un subrogado de la presencia/ausencia de membranas hialinas, y por consiguiente de la presencia/ausencia de probable daño alveolar difuso.

En base a este análisis, en los resultados se realizan comparaciones entre los 2 grupos de VM (**V<sub>T</sub> bajo** y **V<sub>T</sub> elevado**), y posteriormente se analizan **en función del V<sub>T</sub> aplicado** y el **punto de corte de PIP máxima** obtenido.

En aquellas variables en los que el valor basal de los parámetros era diferente en los grupos analizados, se realizaron las comparaciones utilizando el **delta** (valor final – valor basal). Un ejemplo de estos parámetros son la PIP y la distensibilidad, ya que el V<sub>T</sub> aplicado influye en ambos valores, por lo que su valor basal y final no son comparables en los diferentes grupos de VM. De la misma forma, también se analizó la diferencia entre los valores basales y finales de los parámetros analíticos en los diferentes grupos.

Los **parámetros basales y finales** en los diferentes grupos, así como el **delta** entre los parámetros basales y finales, se analizaron mediante:

- **Prueba T de Student**, en el caso de comparaciones entre **2 grupos**.
- Análisis de la variancia (**ANOVA**), en el caso de las comparaciones entre **3 grupos**. Las **comparaciones múltiples**, se realizaron mediante la **corrección de Bonferroni**, cuando el ANOVA de la comparación global resultó significativo.

La evolución de los diferentes parámetros desde el inicio del experimento (basal) al final del mismo, en cada grupo, se analizó mediante:

- **Prueba T de Student para muestras pareadas**.

En el caso de las **variables cualitativas**, se compararon mediante el la prueba de **Chi cuadrado**.

En el análisis de las **curvas dosis-respuesta** de los anillos aórticos, se realizó un **ANOVA para medidas repetidas** de los valores de la curva, comparando los anillos **control** y **problema**, en cada uno de los grupos de ventilación.

Para evaluar si los fármacos inhibidores del estrés nitro-oxidativo, modificaban la alteración en la función vascular asociada con la VM, se analizó con un **ANOVA para medidas repetidas** los valores de la curva dosis-respuesta de los anillos, comparando los anillos **control**, **problema** y **tratado**, en cada uno de los grupos de ventilación.

Los valores de los diferentes parámetros se representan como media  $\pm$  error estándar de la media (EEM).

En todos los análisis se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p$  menor de 0,05. El análisis estadístico se ha realizado con el programa SPSS versión 19.0.

### 9. CONSIDERACIONES ÉTICAS

El proyecto ha sido aprobado por el Comité de Investigación del Hospital Universitario de Getafe. Los procedimientos con los animales se realizaron siguiendo los principios de laboratorio animal (Directiva 2010/63/UE, RD 53/2013 BOE-A-2013-1337, Ley 32/2007 BOE 7-11) y las guías del Hospital Universitario de Getafe, garantizando el confort de los animales durante todas las fases de los experimentos.

Los experimentos han sido realizados por una investigadora con Categoría B y C de Experimentación con animales.

### 10. FINANCIACIÓN

El proyecto ha sido financiado por la Beca Ruza 2014, concedida por la Sociedad Española de Cuidados Intensivos Pediátricos (SECIP).

## **VI. Resultados**

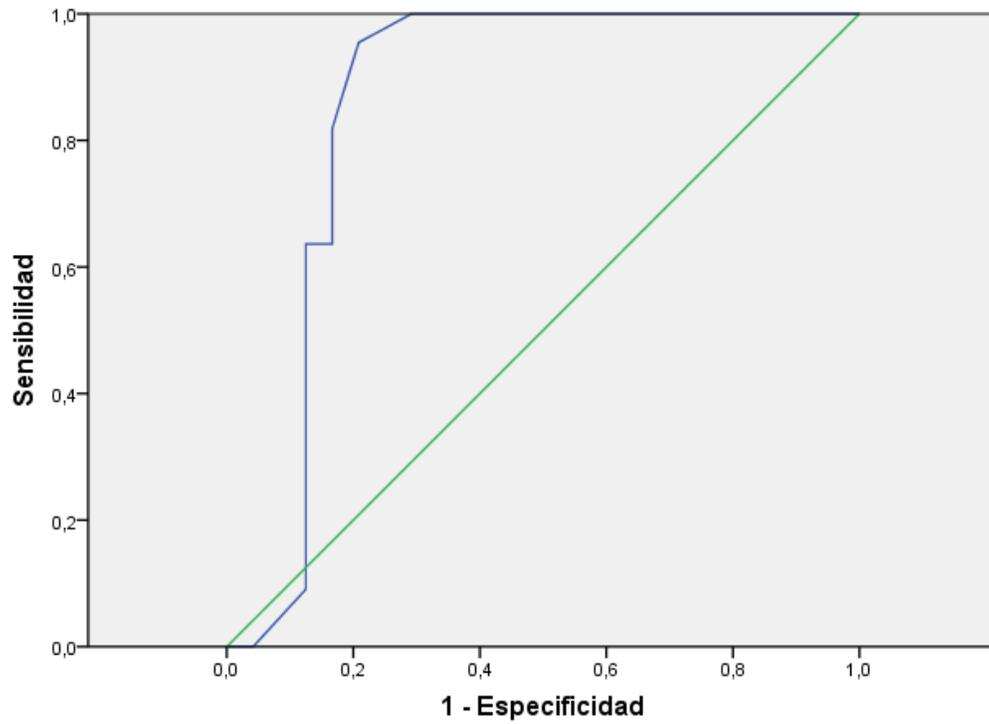
### 1. DETERMINACIÓN DEL VALOR DE PRESIÓN INSPIRATORIA PICO MÁXIMA QUE PREDICE EL DESARROLLO DE DAÑO HISTOLÓGICO PULMONAR

Para demostrar los objetivos 3 y 4, se realizó un análisis estadístico para determinar si los pulmones que presentaban daño alveolar difuso (DAD) mostraban una mayor alteración tanto a nivel pulmonar como sistémico, respecto a los pulmones sin DAD.

Para ello, se determinó el punto de corte del valor de PIP máxima en relación al grado de daño histológico mediante una curva ROC. En cuanto al daño histológico, se clasificó en base a la presencia o no de membranas hialinas (variable binaria: membranas hialinas 0 vs. 1 ó 2; ningún pulmón presentó más de 2 membranas hialinas), ya que este hallazgo es considerado el más característico en el SDRA [127,128]. El área bajo la curva calculada fue de 0,857 (IC 95% 0,727 a 0,987,  $p < 0,01$ , **Figura 19**). A continuación, se identificó el punto de corte del valor de PIP máxima en relación a la presencia o ausencia de membranas hialinas en el análisis histológico. El valor de PIP máxima con mejor sensibilidad y especificidad correspondió a una PIP máxima mayor o igual de 15 cm H<sub>2</sub>O (sensibilidad 95,5% y especificidad 79,2%, Youden 74,6%). Con este punto de corte, el valor predictivo positivo era de un 80,8% y el valor predictivo negativo de un 95%.

En base a estos resultados, se analizó el efecto de la VM sobre el pulmón y la función vascular, en primer lugar entre los 2 grupos de VM ( $V_T$  bajo y  $V_T$  elevado), y posteriormente en los pulmones ventilados con  $V_T$  elevado en función de la PIP máxima alcanzada durante el experimento, distinguiendo 2 fenotipos, que hemos denominado:

- **$V_T$  elevado sin daño pulmonar (PIP máxima  $< 15$  cm H<sub>2</sub>O).**
- **$V_T$  elevado con daño pulmonar (PIP máxima  $\geq 15$  cm H<sub>2</sub>O).**



**Figura 19. Curva ROC que relaciona el valor de PIP máxima en relación a presencia o no de membranas hialinas. Área bajo la curva=0,857 (IC 95% 0,727 a 0,987,  $p<0,01$ ).**

### RESULTADOS DEL OBJETIVO 1: DEMOSTRAR QUE LA VENTILACIÓN MECÁNICA UTILIZANDO UN VOLUMEN TIDAL ELEVADO *EX VIVO* SE ASOCIA CON VILI

**Resumen de los resultados del objetivo 1:** demostrar que la ventilación mecánica utilizando un volumen *tidal* elevado *ex vivo* se asocia con VILI

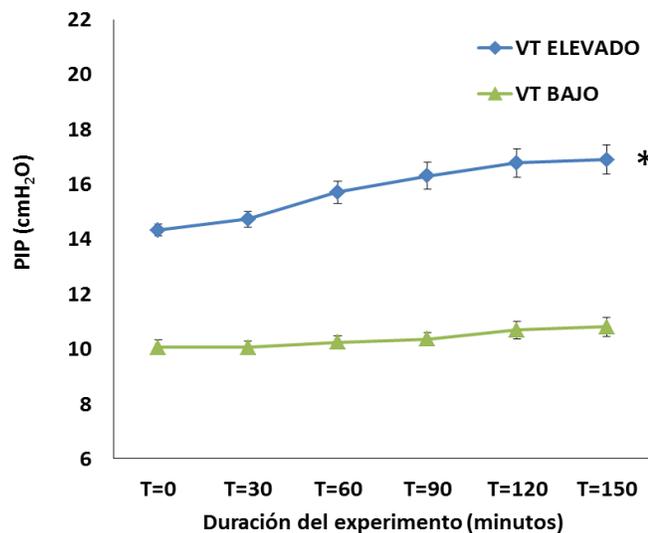
- Los pulmones ventilados con  $V_T$  elevado experimentaron un aumento progresivo de la PIP y un descenso de la distensibilidad dinámica a lo largo del tiempo de observación de 150 minutos, significativamente mayor respecto a los pulmones ventilados con  $V_T$  bajo.
- Los pulmones ventilados con  $V_T$  elevado con daño pulmonar presentaron un mayor aumento de la PIP y un descenso de la distensibilidad dinámica, significativo en relación a los pulmones ventilados con  $V_T$  elevado sin daño pulmonar.
- La puntuación total del índice de daño pulmonar fue significativamente mayor en los pulmones ventilados con  $V_T$  elevado, respecto a los pulmones ventilados con  $V_T$  bajo. Las membranas hialinas fueron más frecuentes en los pulmones ventilados con  $V_T$  elevado con daño pulmonar, siendo la diferencia significativa. La puntuación total del índice de daño pulmonar fue mayor en los pulmones ventilados con  $V_T$  elevado con daño pulmonar, pero las diferencias no fueron significativas respecto al grupo de  $V_T$  elevado sin daño pulmonar.
- Respecto a las características del líquido de perfusión, en el grupo ventilado con  $V_T$  elevado, se observó de forma significativa en relación al grupo ventilado con  $V_T$  bajo: un aumento en los valores finales de lactato, LDH y CK, y aumento de la diferencia entre los valores de proteínas basales menos finales, así como un descenso en los valores finales de glucosa y calcio.
- En el grupo ventilado con  $V_T$  elevado con daño pulmonar, se observó de forma significativa en relación al resto de grupos: un aumento en los valores finales de lactato, LDH, CK y AST, así como un descenso en los valores finales de glucosa.

## 1. MECÁNICA PULMONAR

### 1.1. Presiones pico inspiratorias en la vía aérea

En los pulmones ventilados *ex vivo* con 2 estrategias de VM ( $V_T$  **bajo** de 6 ml/kg y PEEP de 5 cm H<sub>2</sub>O o  $V_T$  **elevado** de 25 ml/kg y PEEP de 0 cm H<sub>2</sub>O), se monitorizó la PIP, antes de comenzar el experimento, y cada 30 minutos durante los 150 minutos de duración del mismo. Para comparar ambos grupos, se calculó el **delta de PIP** (diferencia entre los valores de PIP máxima y los valores de PIP en T=0).

En el grupo ventilado con  $V_T$  **bajo**, la PIP no se modificó de forma significativa a lo largo del experimento (delta de PIP  $0,76 \pm 0,18$  cm H<sub>2</sub>O). Sin embargo, en el grupo ventilado con  $V_T$  **elevado**, la PIP aumentó de forma significativa durante el experimento (delta de PIP  $3,52 \pm 0,44$  cm H<sub>2</sub>O), siendo el delta del PIP significativamente mayor en este grupo ( $p=0,000$ ) (**Figura 20 y Tabla 6**).

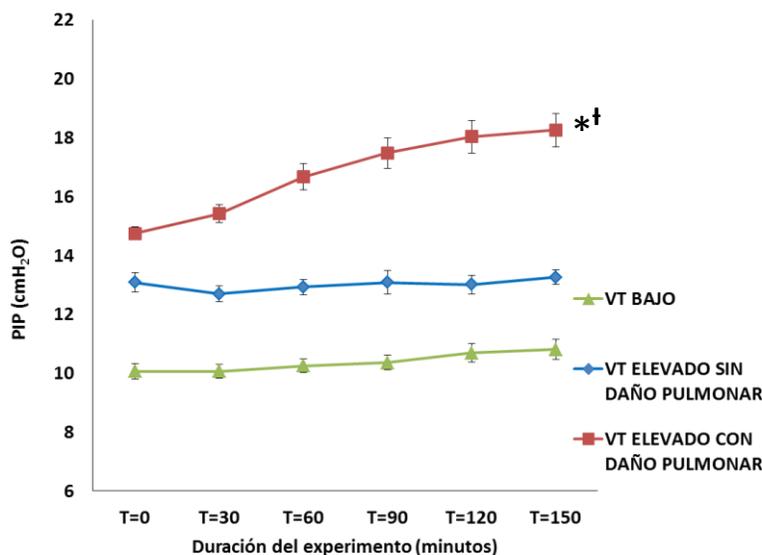


**Figura 20. Valores de la PIP a lo largo del experimento.** Los valores son media  $\pm$  EEM. Se señala la significación estadística (\*) del efecto de la VM respecto al grupo ventilado con  $V_T$  bajo ( $p<=0,000$ ) (Prueba T).

GRUPO	n	PIP basal	PIP T=0	PIP máxima	Delta PIP
V <sub>T</sub> bajo	17	10,35 ± 0,28	10,06 ± 0,26	10,82 ± 0,31	0,76 ± 0,18
V <sub>T</sub> elevado	52	10,29 ± 0,13	14,33 ± 0,21	17,85 ± 0,49	3,52 ± 0,44 *

**Tabla 6. Valores de PIP basal, al inicio del experimento (T=0), PIP máxima y delta de PIP en los 2 grupos de VM.** Los valores son media ± EEM. Se señala la significación estadística (\*) del efecto de la VM respecto al grupo ventilado con V<sub>T</sub> bajo (p=0,000) (Prueba T).

En el análisis en función de la PIP máxima alcanzada durante el experimento, en el grupo ventilado con **V<sub>T</sub> elevado sin daño pulmonar**, la PIP no aumentó de forma significativa durante el experimento, mientras que en el grupo ventilado con **V<sub>T</sub> elevado con daño pulmonar**, la PIP aumentó significativamente durante los 150 minutos (delta de PIP de 4,43 ± 0,49 cm H<sub>2</sub>O). El delta de PIP fue significativamente mayor en este grupo, respecto a los pulmones ventilados con **V<sub>T</sub> elevado sin daño pulmonar** (delta de PIP 0,5 ± 0,26 cm H<sub>2</sub>O, p=0,000) y los pulmones ventilados con **V<sub>T</sub> bajo** (p=0,000) (**Figura 21 y Tabla 7**).



**Figura 21. Valores de la PIP a lo largo del experimento en función de la PIP máxima.** Los valores son media ± EEM. Se señala la significación estadística (p<0,01) del efecto de la VM respecto al grupo ventilado con V<sub>T</sub> bajo (\*) y el grupo ventilado con V<sub>T</sub> elevado sin daño pulmonar (†) (ANOVA).

GRUPO	n	PIP basal	PIP T=0	PIP máxima	Delta PIP
V <sub>T</sub> elevado sin daño pulmonar	12	9,75 ± 0,25	12,92 ± 0,31	13,42 ± 0,19	0,50 ± 0,26
V <sub>T</sub> elevado con daño pulmonar	40	10,45 ± 0,14	14,75 ± 0,21	19,18 ± 0,46	4,43 ± 0,49 *†

**Tabla 7. Valores de PIP basal, al inicio del experimento (T=0), PIP máxima y delta de PIP en función de la PIP máxima.** Los valores son media ± EEM. Se señala la significación estadística (p<0,01) del efecto de la VM respecto al grupo ventilado con V<sub>T</sub> bajo (\*) y el grupo ventilado con V<sub>T</sub> elevado sin daño pulmonar (†) (ANOVA).

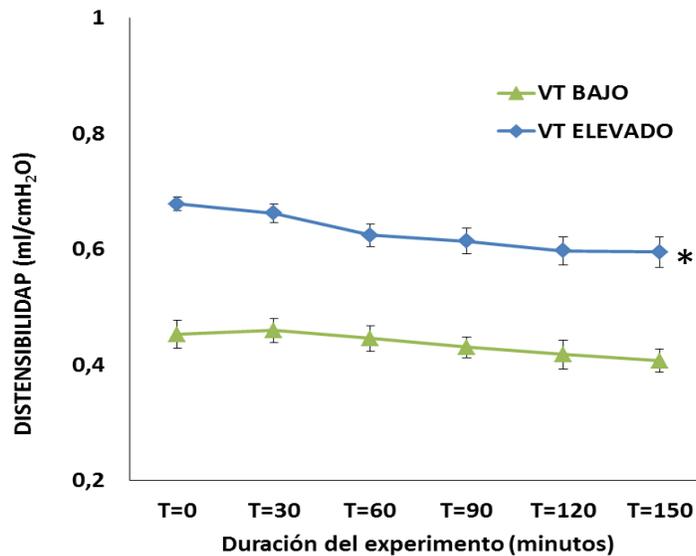
### 1.2. Distensibilidad dinámica

Se valoró la distensibilidad dinámica (C<sub>DYN</sub>) del sistema respiratorio (*dynamic compliance*), calculada como el volumen corriente dividido entre la diferencia entre la PIP y PEEP (C<sub>DYN</sub>= V<sub>T</sub>/[PIP-PEEP]). Para las comparaciones entre los 2 grupos de VM se calculó el **delta de distensibilidad** (diferencia entre el valor de distensibilidad en T=0 y el valor mínimo de distensibilidad).

En el grupo ventilado con **V<sub>T</sub> bajo**, la distensibilidad no se modificó de forma significativa a lo largo del experimento (delta de C<sub>DYN</sub> 0,05 ± 0,02 ml/cm H<sub>2</sub>O). Sin embargo, en el grupo ventilado con **V<sub>T</sub> elevado**, la distensibilidad disminuyó de forma significativa a lo largo del experimento (delta de C<sub>DYN</sub> 0,13 ± 0,02 ml/cm H<sub>2</sub>O), siendo el delta de C<sub>DYN</sub> significativamente menor en este grupo (p=0,003) (**Figura 22 y Tabla 8**).

GRUPO	N	C <sub>DYN</sub> basal	C <sub>DYN</sub> T=0	C <sub>DYN</sub> mínima	Delta C <sub>DYN</sub>
V <sub>T</sub> bajo	17	0,41 ± 0,02	0,45 ± 0,02	0,40 ± 0,02	0,05 ± 0,02
V <sub>T</sub> elevado	52	0,43 ± 0,01	0,68 ± 0,01	0,55 ± 0,02	0,13 ± 0,02 *

**Tabla 8. Valores de distensibilidad dinámica basales, al inicio del experimento (T=0), C<sub>DYN</sub> máxima y delta C<sub>DYN</sub> en los 2 grupos de VM.** Los valores son media ± EEM. Se señala la significación estadística (\*) del efecto de la VM respecto al grupo ventilado con V<sub>T</sub> bajo (p=0,003) (Prueba T).



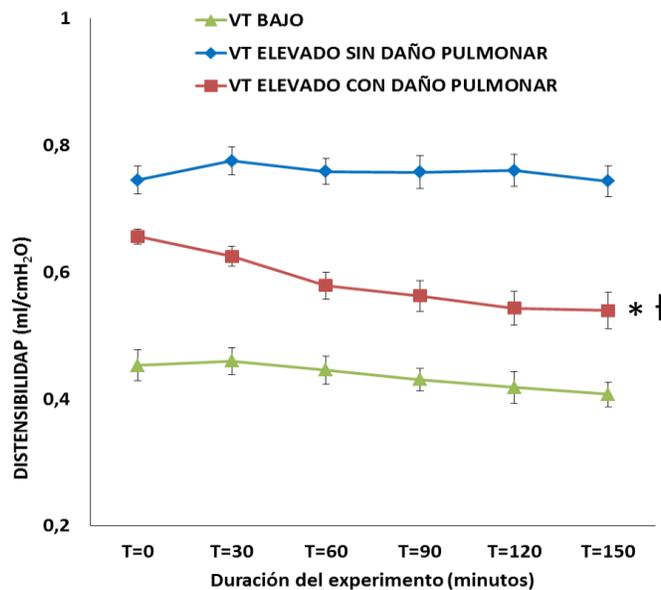
**Figura 22. Valores de la distensibilidad a lo largo del experimento.** Los valores son media  $\pm$  EEM. Se señala la significación estadística (\*) del efecto de la VM respecto al grupo de  $V_T$  bajo ( $p=0,003$ ) (Prueba T).

En el análisis en función de la PIP máxima alcanzada durante el experimento, en el grupo ventilado con  **$V_T$  elevado sin daño pulmonar**, la distensibilidad no se modificó de forma significativa a lo largo del experimento, mientras que en el grupo ventilado con  **$V_T$  elevado con daño pulmonar**, la distensibilidad disminuyó de forma significativa a lo largo del experimento (delta de  $C_{DYN}$   $0,16 \pm 0,02$  ml/cmH<sub>2</sub>O). El delta de  $C_{DYN}$  fue significativamente mayor en este grupo, respecto a los pulmones ventilados con  **$V_T$  elevado sin daño pulmonar** (delta de  $C_{DYN}$   $0,02 \pm 0,02$  ml/cmH<sub>2</sub>O,  $p=0,000$ ), y los pulmones ventilados con  **$V_T$  bajo** ( $p=0,0001$ ) (**Figura 23 y Tabla 9**).

En **resumen**, los pulmones ventilados con  $V_T$  elevado, mostraron un aumento significativo de la PIP y un descenso significativo de la  $C_{DYN}$ , en relación con los pulmones ventilados con  $V_T$  bajo. Además, en los pulmones ventilados con  $V_T$  elevado con daño pulmonar, aumentó la PIP y descendió la  $C_{DYN}$ , de forma significativa, en comparación a los pulmones ventilados con  $V_T$  bajo y  $V_T$  elevado sin daño pulmonar.

GRUPO	n	C <sub>DYN</sub> basal	C <sub>DYN</sub> T=0	C <sub>DYN</sub> T=150	Delta C <sub>DYN</sub>
V <sub>T</sub> elevado sin daño pulmonar	12	0,45 ± 0,10	0,75 ± 0,02	0,73 ± 0,02	0,02 ± 0,02
V <sub>T</sub> elevado con daño pulmonar	40	0,43 ± 0,13	0,66 ± 0,01	0,49 ± 0,02	0,16 ± 0,02*†

**Tabla 9. Valores de distensibilidad dinámica basales, al inicio del experimento (T=0), C<sub>DYN</sub> máxima y delta C<sub>DYN</sub> en función de la PIP máxima.** Los valores son media ± EEM. Se señala la significación estadística (p<0,01) del efecto de la VM respecto al grupo ventilado con V<sub>T</sub> bajo (\*) y el grupo ventilado con V<sub>T</sub> elevado sin daño pulmonar (†) (ANOVA).



**Figura 23. Valores de la distensibilidad a lo largo del experimento en función de la PIP máxima.** Los valores son media ± EEM. Se señala la significación estadística (p<0,01) del efecto de la VM respecto al grupo ventilado con V<sub>T</sub> bajo (\*) y el grupo ventilado con V<sub>T</sub> elevado sin daño pulmonar (†) (ANOVA).

## 2. ESTUDIO HISTOLÓGICO: ÍNDICE DE DAÑO PULMONAR

Se realizó el estudio histológico en 46 pulmones (un 67% de un total de 69 pulmones). De los 46 pulmones estudiados, 13 habían sido ventilados con V<sub>T</sub> bajo y 33 con V<sub>T</sub> elevado.

## Resultados

En los pulmones ventilados con  $V_T$  bajo se observaron de forma ocasional neutrófilos intra alveolares e intersticiales, material proteináceo y engrosamiento de los septos alveolares. No se visualizó ninguna membrana hialina en los cortes de tejido pulmonar de los pulmones ventilados con  $V_T$  bajo (**Tabla 10**).

En los pulmones ventilados con  $V_T$  elevado, el hallazgo histológico más frecuente fue la presencia de membranas hialinas, presentes en 22 de los 33 pulmones pertenecientes a este grupo. El segundo hallazgo más frecuente fue la presencia de neutrófilos intersticiales (14/33), seguido de los neutrófilos intra alveolares (10/33), material proteináceo (6/33), hemorragia (3/2633) y engrosamiento de los septos alveolares (2/33) (**Tabla 10**).

En relación a la **puntuación total del score**, en los pulmones ventilados con  $V_T$  bajo fue de  $6,54 \pm 3,41$  mientras que en los pulmones ventilados con  $V_T$  elevado fue de  $22,85 \pm 4,16$ , siendo las diferencias estadísticamente significativas entre los 2 grupos ( $p=0,004$ ) (**Tabla 10**).

ÍNDICE DE DAÑO PULMONAR	$V_T$ bajo	$V_T$ elevado	Valor de $p$
Neutrófilos espacio intersticial	3/13	14/33	0,315
Neutrófilos intra alveolares	1/13	10/33	0,141
Membranas hialinas	0/13	22/33 *	<0,001
Material proteináceo	3/13	6/33	0,689
Septos alveolares	1/13	2/33	1,00
Hemorragia	0/13	3/33	0,548
Score	$6,54 \pm 3,41$	$22,85 \pm 4,16$ *	0,004

**Tabla 10. Índice de daño pulmonar en los 2 grupos de VM.** De cada componente del *score* se especifica en cada grupo cuántos pulmones del total de pulmones estudiados en ese grupo presentaron dicho hallazgo histológico. En la última columna se muestra la significación estadística ( $p<0,01$ ) respecto a los pulmones ventilados con  $V_T$  bajo (\*) ( $\chi^2$  para variables cualitativas y Prueba t para variables cuantitativas).

## Resultados

En el análisis en función de la PIP máxima alcanzada durante el experimento, en los pulmones ventilados con  $V_T$  **elevado sin daño pulmonar**, se encontraron de forma ocasional neutrófilos intra alveolares e intersticiales, material proteináceo y membranas hialinas (estas últimas sólo en un pulmón). En los pulmones ventilados con  $V_T$  **elevado con daño pulmonar**, el hallazgo histológico más frecuente fue la presencia de membranas hialinas, presentes en 21 de los 26 pulmones pertenecientes a este grupo. El segundo hallazgo más frecuente fue la presencia de neutrófilos intersticiales (11/26), seguido de los neutrófilos intra alveolares (9/26), material proteináceo (5/26), hemorragia (3/26) y engrosamiento de los septos alveolares (2/26) (**Tabla 11**).

ÍNDICE DE DAÑO PULMONAR	$V_T$ bajo	$V_T$ elevado sin daño pulmonar	$V_T$ elevado con daño pulmonar	Valor de $p$
Neutrófilos espacio intersticial	3/13	3/7	11/26	0,432
Neutrófilos intra alveolares	1/13	1/7	9/26	0,185
Membranas hialinas	0/13	1/7	21/26 * †	<0,001
Material proteináceo	3/13	1/7	5/26	0,926
Septos alveolares	1/13	0/7	2/26	0,786
Hemorragia	0/13	0/7	3/26	0,323
<b>Score</b>	6,54 ± 3,41	11,50 ± 6,53	25,37 ± 4,94,78 *	<b>0,029</b>

**Tabla 11. Índice de daño pulmonar en función de la PIP máxima.** De cada componente del score se especifica en cada grupo cuántos pulmones del total de pulmones estudiados en ese grupo presentaron dicho hallazgo histológico. En la última columna se muestra la significación estadística ( $p < 0,01$ ) respecto a los pulmones ventilados con  $V_T$  bajo (\*) y los pulmones ventilados con  $V_T$  elevado sin daño pulmonar (†) ( $\chi^2$  para variables cualitativas y Kruskal-Wallis para variables cuantitativas).

En relación a la **puntuación total del score**, en los pulmones ventilados con  $V_T$  elevado sin daño pulmonar fue de  $11,5 \pm 6,53$  y en los pulmones ventilados con  $V_T$  elevado con daño pulmonar fue de  $25,37 \pm 4,78$ . Las diferencias entre las puntuaciones de los 3 grupos fueron estadísticamente significativas ( $p = 0,029$ ). Al comparar los grupos 2 a 2, las diferencias entre la puntuación del score de los pulmones ventilados con  $V_T$  bajo y los

pulmones ventilados con  $V_T$  elevado que presentaron daño pulmonar fueron estadísticamente significativas ( $p=0,034$ ), pero no se encontraron diferencias entre las puntuaciones del *score* de los pulmones ventilados con  $V_T$  elevado con y sin daño pulmonar ( $p=0,46$ ) (**Tabla 11**).

En **resumen**, los pulmones ventilados con  $V_T$  elevado, sobre todo aquellos con daño pulmonar, presentaron con mayor frecuencia presencia de membranas hialinas, siendo las diferencias estadísticamente significativas respecto a los pulmones ventilados con  $V_T$  bajo y los pulmones ventilados con  $V_T$  elevado sin daño pulmonar. En relación al índice de daño pulmonar, fue significativamente mayor en los pulmones ventilados con  $V_T$  elevado (respecto al grupo de  $V_T$  bajo), y en los pulmones ventilados con  $V_T$  elevado con daño pulmonar (respecto al grupo de  $V_T$  bajo; diferencias no significativas respecto al grupo de  $V_T$  elevado sin daño pulmonar).

### 3. COMPOSICIÓN DEL LÍQUIDO DE PERFUSIÓN

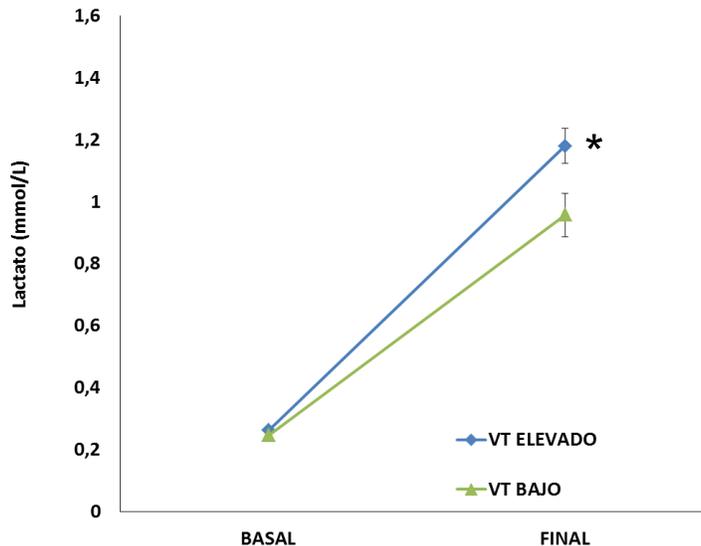
#### 3.1. Equilibrio ácido-base y lactato en el líquido de perfusión

Se midieron los parámetros del equilibrio ácido-base y lactato en el líquido de perfusión del reservorio, procedente de los pulmones ventilados con  $V_T$  bajo y con  $V_T$  elevado, antes de comenzar el experimento (basal) y al final del mismo ( $T=150$ ).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en las determinaciones **basales** (**Tabla 12**). En relación a las determinaciones **finales**, el lactato fue significativamente mayor en el grupo ventilado con  $V_T$  elevado, en comparación con el grupo ventilado con  $V_T$  bajo ( $p=0,048$ ), sin encontrar diferencias significativas en el resto de parámetros entre los 2 grupos de VM (**Figura 24** y **Tabla 12**).

En el líquido de perfusión proveniente tanto de los pulmones ventilados con  **$V_T$  bajo** como con  **$V_T$  elevado**, se observó a lo largo del experimento, un descenso estadísticamente significativo del pH y el bicarbonato, así como un incremento estadísticamente significativo del exceso de bases y el lactato. No se encontraron cambios en las cifras de  $pO_2$  entre los valores basales y finales en ambos grupos. En el grupo ventilado con  **$V_T$  elevado** se observó

un descenso estadísticamente significativo en los valores de  $p\text{CO}_2$ , pero no en el grupo ventilado con  $V_T$  bajo (Tabla 12).

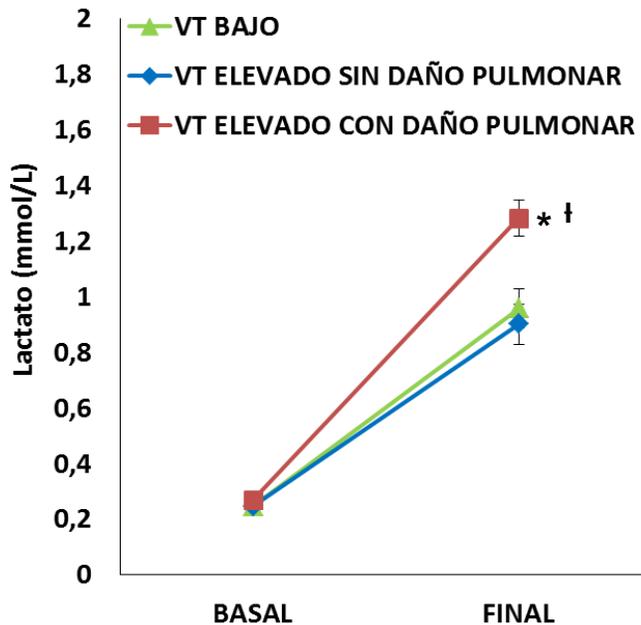


**Figura 24. Valores de lactato medidos en el líquido de perfusión procedente de los pulmones ventilados con  $V_T$  bajo y  $V_T$  elevado, antes de comenzar el experimento (basal) y al final del mismo ( $T=150$ ).** Los valores son media  $\pm$  EEM. Se señala la significación estadística (\*) vs.  $V_T$  bajo ( $p=0,048$ ) (Prueba T).

Se compararon las **diferencias entre los valores basales y finales** de los diferentes parámetros (pH basal-final; bicarbonato basal-final; exceso de bases final-basal;  $p\text{O}_2$  basal-final;  $p\text{CO}_2$  basal-final; lactato final-basal), entre los 2 grupos de VM, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas (Tabla 12).

En el análisis en función de la PIP máxima alcanzada durante el experimento, el **lactato** fue significativamente mayor en el líquido de perfusión proveniente de los pulmones ventilados con  **$V_T$  elevado con daño pulmonar**, en comparación con los grupos de  $V_T$  bajo ( $p=0,016$ ) y  $V_T$  elevado sin daño pulmonar ( $p=0,01$ ). La **diferencia entre el lactato al final del experimento y el basal**, fue significativamente mayor en el líquido de perfusión proveniente de los pulmones ventilados con  **$V_T$  elevado con daño pulmonar**, en

comparación con los grupos de  $V_T$  bajo ( $p=0,022$ ) y  $V_T$  elevado sin daño pulmonar ( $p=0,012$ ) (Figura 25 y Tabla 13).



**Figura 25. Valores de lactato medidos en el líquido de perfusión procedente de los pulmones ventilados con  $V_T$  bajo y  $V_T$  elevado, antes de comenzar el experimento (basal) y al final del mismo ( $T=150$ ), en función de la PIP máxima.** Los valores son media  $\pm$  EEM. Se señala la significación estadística ( $p<0,05$ ) vs.  $V_T$  bajo (\*) y  $V_T$  elevado sin daño pulmonar (†) (ANOVA).

En **resumen**, a lo largo del experimento, en el líquido de perfusión se observó un descenso del pH y el bicarbonato, así como un incremento del exceso de bases y el lactato, en todos los grupos de ventilación. El lactato fue significativamente mayor en el líquido de perfusión proveniente de los pulmones ventilados con  $V_T$  elevado, en comparación con el líquido de perfusión proveniente de los pulmones ventilados con  $V_T$  bajo. Además, el lactato aumentó en mayor medida en el líquido de perfusión proveniente de los pulmones ventilados con  $V_T$  elevado con daño pulmonar, en comparación con los grupos de  $V_T$  bajo y  $V_T$  elevado sin daño pulmonar, siendo las diferencias estadísticamente significativas.

		V <sub>T</sub> bajo	V <sub>T</sub> elevado
pH	Basal	7,5 ± 0,01	7,51 ± 0,01
	Final	7,42 ± 0,01*	7,45 ± 0,02*
pH basal – final		0,08 ± 0,02	0,06 ± 0,02
Bicarbonato (mmol/L)	Basal	17,14 ± 0,46	16,91 ± 0,25
	Final	14,59 ± 0,64*	13,55 ± 0,23*
Bicarbonato basal – final		2,29 ± 0,52	3,32 ± 0,24
Exceso de bases (mmol)	Basal	-6,01 ± 0,56	-6,09 ± 0,27
	Final	-9,85 ± 0,79*	-10,55 ± 0,35*
Exceso de bases final-basal		-3,63 ± 0,70	-4,36 ± 0,30
pCO <sub>2</sub> (mmHg)	Basal	21,94 ± 0,82	21,51 ± 0,64
	Final	22,27 ± 0,83	19,98 ± 0,74*
pCO <sub>2</sub> final – basal		0,79 ± 1,21	-1,67 ± 0,75
pO <sub>2</sub> (mmHg)	Basal	171,1 ± 2,03	169,0 ± 1,16
	Final	168,07 ± 1,43	170,7 ± 1,27
pO <sub>2</sub> final – basal		2,07 ± 2,43	-0,53 ± 1,73
Lactato (mmol/L)	Basal	0,25 ± 0,01	0,26 ± 0,01
	Final	0,96 ± 0,07*	1,18 ± 0,06*†
Lactato final – basal		0,70 ± 0,07	0,93 ± 0,06

**Tabla 12. Parámetros del equilibrio ácido-base y lactato medidos en el líquido de perfusión antes de comenzar el experimento (basal) y al final (T=150), y diferencia de los valores basales y finales, en los 2 grupos de VM. Los valores son media ± EEM. Se señala la significación estadística (p<0,05) del cambio entre los valores basales y finales (\*) (Prueba T) y del efecto de la VM: (†) vs. V<sub>T</sub> bajo (Prueba T).**

## Resultados

		V <sub>T</sub> bajo	V <sub>T</sub> elevado sin daño pulmonar	V <sub>T</sub> elevado con daño pulmonar
pH	Basal	7,5 ± 0,01	7,51 ± 0,02	7,51 ± 0,01
	Final	7,42 ± 0,01*	7,46 ± 0,03*	7,45 ± 0,02*
pH basal - final		0,08 ± 0,02	0,06 ± 0,04	0,06 ± 0,02
Bicarbonato (mmol/L)	Basal	17,14 ± 0,46	16,53 ± 0,61	17,04 ± 0,27
	Final	14,59 ± 0,64*	13,65 ± 0,51*	13,52 ± 0,26*
Bicarbonato basal - final		2,29 ± 0,52	2,75 ± 0,55	3,5 ± 0,26
Exceso de bases (mmol)	Basal	-6,01 ± 0,56	-6,45 ± 0,63	-5,97 ± 0,29
	Final	-9,85 ± 0,79*	-10,16 ± 0,76*	-10,67 ± 0,39*
Exceso de bases final - basal		-3,63 ± 0,70	-3,71 ± 0,59	-4,57 ± 0,34
pCO <sub>2</sub> (mmHg)	Basal	21,94 ± 0,82	20,92 ± 1,37	21,70 ± 0,73
	Final	22,27 ± 0,83	19,45 ± 1,33*	20,14 ± 0,88
pCO <sub>2</sub> final - basal		0,79 ± 1,21	-0,91 ± 1,97	-1,91 ± 0,78
pO <sub>2</sub> (mmHg)	Basal	171,1 ± 2,03	168,9 ± 2,36	169,0 ± 1,35
	Final	168,07 ± 1,43	174,3 ± 2,22	169,6 ± 1,5
pO <sub>2</sub> basal - final		2,07 ± 2,43	-3,36 ± 2,93	0,38 ± 2,08
Lactato (mmol/L)	Basal	0,25 ± 0,01	0,25 ± 0,02	0,27 ± 0,01
	Final	0,96 ± 0,07*	0,91 ± 0,08*	1,26 ± 0,06*†‡
Lactato final - basal		0,7 ± 0,07	0,66 ± 0,09	1,02 ± 0,07 †‡

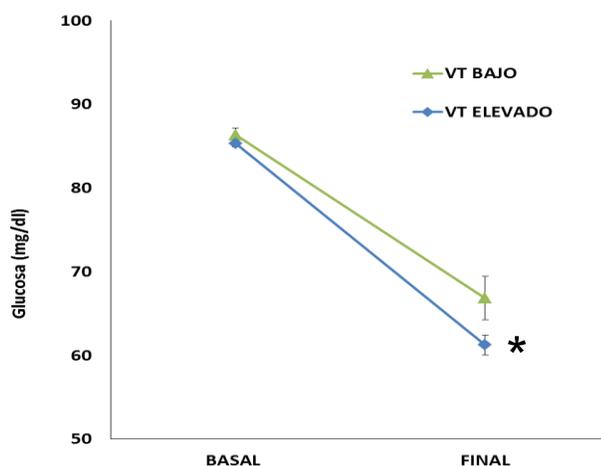
**Tabla 13. Parámetros del equilibrio ácido-base y lactato medidos en el líquido de perfusión antes de comenzar el experimento (basal) y al final (T=150), y diferencia de los valores basales y finales, en función de la PIP máxima.** Los valores son media ± EEM. Se señala la significación estadística (p<0,05) del cambio entre los valores basales y finales (\*) (Prueba T) y del efecto de la VM: (†) vs. V<sub>T</sub> bajo y (‡) vs. V<sub>T</sub> elevado sin daño pulmonar (ANOVA).

### 3.2. Parámetros bioquímicos en el líquido de perfusión

Se midieron los valores de glucosa, proteínas totales, iones (sodio, potasio, cloro y calcio) y enzimas intracelulares (LDH, CK, AST y ALT), en el líquido de perfusión procedente de los pulmones ventilados con  $V_T$  bajo y  $V_T$  elevado, antes de comenzar el experimento (basal) y al final del mismo (T=150).

#### Glucosa

No se observaron diferencias en los valores de **glucosa basales** en el líquido de perfusión entre los 2 grupos de VM. Los valores de **glucosa** en el líquido de perfusión **al final del experimento** fueron menores en el grupo ventilado con  $V_T$  elevado, respecto al grupo ventilado con  $V_T$  bajo, siendo la diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,04$ ) (Figura 26 y Tabla 14).



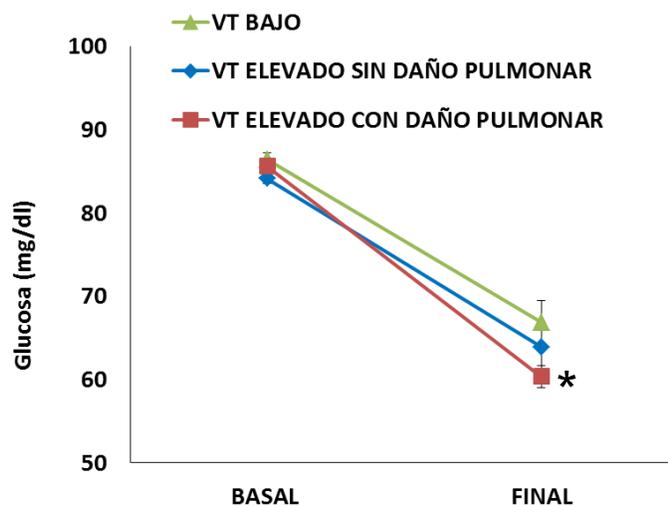
**Figura 26. Valores de glucosa medidos en el líquido de perfusión procedente de los pulmones ventilados con  $V_T$  bajo y  $V_T$  elevado, antes de comenzar el experimento (basal) y al final del mismo.** Los valores son media  $\pm$  EEM. Se señala la significación estadística (\*) vs.  $V_T$  bajo ( $p<0,05$ ) (Prueba T).

En el líquido de perfusión procedente de los pulmones ventilados tanto con  $V_T$  bajo como con  $V_T$  elevado, se produjo un descenso estadísticamente significativo de la glucosa a lo largo del experimento (Tabla 14).

La **diferencia entre los valores de glucosa basal menos final** en el líquido de perfusión fue significativamente mayor ( $p=0,021$ ) en el grupo ventilado con  $V_T$  elevado

(diferencia glucosa basal menos final de  $24,81 \pm 1,20$  mg/dL) respecto al grupo de  $V_T$  bajo (diferencia glucosa basal menos final de  $18,77 \pm 2,42$  mg/dL). (**Figura 26 y Tabla 14**).

En el análisis en función de la PIP máxima alcanzada durante el experimento, los valores de **glucosa final** en el líquido de perfusión, fueron significativamente menores en el grupo ventilado con  $V_T$  elevado con daño pulmonar, siendo la diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo ventilado con  $V_T$  bajo ( $p=0,041$ ), pero no respecto al grupo ventilado con  $V_T$  elevado sin daño pulmonar ( $p=0,185$ ) (**Figura 27 y Tabla 15**). En relación a la **diferencia entre los valores de glucosa basal menos final** en el líquido de perfusión, este valor fue significativamente mayor en el grupo ventilado con  $V_T$  elevado con daño pulmonar, respecto al grupo de  $V_T$  bajo ( $p=0,029$ ), pero no difirió significativamente del grupo ventilado con  $V_T$  elevado sin daño pulmonar ( $p=0,379$ ) (**Tabla 15**).



**Figura 27. Valores de glucosa medidos en el líquido de perfusión procedente de los pulmones ventilados con  $V_T$  bajo y  $V_T$  elevado, antes de comenzar el experimento (basal) y al final del mismo, en función de la PIP máxima.** Los valores son media  $\pm$  EEM. Se señala la significación estadística (\*) vs.  $V_T$  bajo ( $p<0,05$ ) (ANOVA).

### Proteínas totales

No se observaron diferencias en los valores de **proteínas totales basales** ni **finales** en el líquido de perfusión entre los distintos grupos de VM. Las proteínas totales descendieron significativamente en todos grupos de VM a lo largo del experimento (**Tabla 14 y Tabla 15**).

## Resultados

La **diferencia entre los valores de proteínas totales basales menos finales** en el líquido de perfusión, fue significativamente mayor en el grupo ventilado con  $V_T$  elevado (diferencia de proteínas basales menos finales de  $0,51 \pm 0,05$  g/dL) respecto al grupo de  $V_T$  bajo (diferencia de proteínas basales menos finales de  $0,29 \pm 0,1$  g/dL) ( $p=0,043$ ) (**Tabla 14**).

		$V_T$ bajo	$V_T$ elevado
Glucosa (mg/dl)	Basal	$86,35 \pm 0,82$	$85,33 \pm 0,43$
	Final	$66,85 \pm 2,60^*$	$61,23 \pm 1,20^* \dagger$
Glucosa basal-final		$18,77 \pm 2,42$	$24,81 \pm 1,20 \dagger$
Proteínas totales (g/dl)	Basal	$3,89 \pm 0,02$	$3,94 \pm 0,02$
	Final	$3,60 \pm 0,11^*$	$3,47 \pm 0,05^*$
Proteínas totales basal-final		$0,29 \pm 0,10$	$0,51 \pm 0,05 \dagger$

**Tabla 14. Parámetros bioquímicos medidos en el líquido de perfusión procedente de los pulmones ventilados con  $V_T$  bajo y  $V_T$  elevado, antes de comenzar el experimento (basal) y a los 150 minutos (final).** Los valores son media  $\pm$  EEM. Se señala la significación estadística ( $p < 0,05$ ) del cambio entre los valores basales y finales en cada grupo (\*) (Prueba T) y del efecto de la VM ( $\dagger$ ) vs.  $V_T$  bajo (Prueba T).

		$V_T$ bajo	$V_T$ elevado sin daño pulmonar	$V_T$ elevado con daño pulmonar
Glucosa (mg/dl)	Basal	$86,35 \pm 0,82$	$84,43 \pm 0,57$	$85,50 \pm 0,49$
	Final	$66,85 \pm 2,60^*$	$65,45 \pm 2,45^*$	$59,97 \pm 1,33^* \dagger$
Glucosa basal-final		$18,77 \pm 2,42$	$20,57 \pm 3,24$	$25,66 \pm 1,26 \dagger$
Proteínas totales (g/dl)	Basal	$3,89 \pm 0,02$	$3,98 \pm 0,07$	$3,94 \pm 0,02$
	Final	$3,60 \pm 0,11^*$	$3,53 \pm 0,121^*$	$3,45 \pm 0,06^*$
Proteínas totales basal-final		$0,29 \pm 0,10$	$0,52 \pm 0,17$	$0,51 \pm 0,05$

**Tabla 15. Parámetros bioquímicos medidos en el líquido de perfusión, antes de comenzar el experimento (basal) y a los 150 minutos (final), en función de la PIP máxima.** Los valores son media  $\pm$  EEM. Se señala la significación estadística ( $p < 0,05$ ) del cambio entre los valores basales y finales (\*) (Prueba T) y del efecto de la VM: ( $\dagger$ ) vs.  $V_T$  bajo (ANOVA).

**Iones y osmolalidad**

No se observaron diferencias en los valores **de iones** ni **osmolalidad basales** y **finales** en el líquido de perfusión entre los distintos grupos de VM, salvo el **calcio final**, que fue significativamente menor en el grupo ventilado con  $V_T$  elevado ( $p=0,022$ ) (**Tablas 16 y 17**).

En el líquido de perfusión procedente de los pulmones ventilados tanto con  $V_T$  bajo, como con  $V_T$  elevado, se produjo un descenso del potasio y el calcio a lo largo de los 150 minutos, y un ascenso del sodio, el cloro y la osmolalidad (**Tablas 16 y 17**).

		$V_T$ bajo	$V_T$ elevado
Sodio (mEq/L)	Basal	145,94 ± 0,80	147,09 ± 0,42
	Final	151,71 ± 0,84*	152,80 ± 0,63*
Cloro (mEq/L)	Basal	115,88 ± 0,57	116,26 ± 0,50
	Final	123,14 ± 1,19*	124,35 ± 0,76*
Potasio (mEq/L)	Basal	5,68 ± 0,03	5,64 ± 0,03
	Final	5,46 ± 0,14	5,34 ± 0,07*
Calcio (mg/dl)	Basal	8,31 ± 0,12	8,09 ± 0,08
	Final	7,68 ± 0,25*	7,04 ± 0,14*†
Osmolalidad (mOsm/Kg)	Basal	293,13 ± 1,79	294,83 ± 1,39
	Final	301,47 ± 1,66*	301,98 ± 1,21*

**Tabla 16. Valores de sodio, cloro, potasio, calcio y osmolalidad medidos en el líquido de perfusión procedente de los pulmones ventilados con  $V_T$  bajo y  $V_T$  elevado, antes de comenzar el experimento (basal) y a los 150 minutos (final).** Los valores son media ± EEM. Se señala la significación estadística ( $p<0,05$ ) del cambio entre los valores basales y finales (\*) (Prueba T) y del efecto de la VM (†) vs.  $V_T$  bajo (Prueba T).

La **diferencia entre los valores basales y finales** de potasio y calcio, y la diferencia entre los valores finales y basales de sodio, cloro y osmolalidad, en el líquido de perfusión, no presentó diferencias significativas entre los distintos grupos de ventilación (**Tablas 16 y 17**).

		V <sub>T</sub> bajo	V <sub>T</sub> elevado sin daño pulmonar	V <sub>T</sub> elevado con daño pulmonar
Sodio (mEq/L)	Basal	145,94 ± 0,80	148,33 ± 0,80	146,89 ± 0,46
	Final	151,71 ± 0,84*	151,73 ± 1,56*	153,11 ± 0,67*
Cloro (mEq/L)	Basal	115,88 ± 0,57	117,75 ± 0,48	116,06 ± 0,55
	Final	123,14 ± 1,19*	122,60 ± 1,83*	124,83 ± 0,82*
Potasio (mEq/L)	Basal	5,68 ± 0,03	5,70 ± 0,06	5,64 ± 0,04
	Final	5,46 ± 0,14	5,37 ± 0,16*	5,34 ± 0,09*
Calcio (mg/dl)	Basal	8,31 ± 0,12	7,95 ± 0,14	8,11 ± 0,08
	Final	7,68 ± 0,25*	7,13 ± 0,32*	7,01 ± 0,15*
Osmolalidad (mOsm/Kg)	Basal	293,13 ± 1,79	293,5 ± 2,67	295,1 ± 1,59
	Final	301,47 ± 1,66*	301,09 ± 2,56*	302,29 ± 1,38*

**Tabla 17. Valores de sodio, cloro, potasio, calcio y osmolalidad medidos en el líquido de perfusión, antes de comenzar el experimento (basal) y a los 150 minutos (final), en función de la PIP máxima.** Los valores son media ± EEM. Se señala la significación estadística (p<0,05) del cambio entre los valores basales y finales (\*) (Prueba T).

### Enzimas intracelulares

No se observaron diferencias en los valores de **LDH, CK, AST** y **ALT basales** en el líquido de perfusión entre los distintos grupos de VM (**Tablas 18** y **19**). El valor de **LDH** al **final** del experimento fue significativamente mayor en el líquido de perfusión procedente de los pulmones ventilados con V<sub>T</sub> elevado, respecto a los pulmones ventilados con V<sub>T</sub> bajo (p=0,032). Los valores finales de CK, AST y ALT no mostraron diferencias significativas entre los pulmones ventilados con V<sub>T</sub> bajo y elevado (**Tabla 18**).

Los valores  **finales** de **LDH** y **AST** fueron significativamente mayores en el líquido de perfusión procedente de los pulmones ventilados con V<sub>T</sub> elevado con daño pulmonar, respecto a los pulmones ventilados con V<sub>T</sub> bajo (p=0,007 y p=0,088, respectivamente) y con V<sub>T</sub> elevado sin daño pulmonar (p=0,018 y p=0,014, respectivamente) (**Tabla 19**).

Se produjo un incremento estadísticamente significativo de la **LDH** y la **CK** durante el experimento en el líquido de perfusión en todos los grupos de VM. La **AST** sólo aumentó de significativamente en el grupo ventilado con  $V_T$  elevado, sobre todo en los pulmones ventilados con  $V_T$  elevado con daño pulmonar. La **ALT** no sufrió cambios significativos en ninguno de los grupos de ventilación durante el experimento (**Tablas 18 y 19**).

La **diferencia entre los valores de basales y finales de CK** en el líquido de perfusión, fue significativamente mayor en el grupo ventilado con  $V_T$  elevado ( $p=0,021$ ). Las diferencias entre los valores basales y finales de LDH, AST y ALT, no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los 2 grupos de ventilación (**Tabla 18**).

		$V_T$ bajo	$V_T$ elevado
LDH (U/L)	Basal	12,67 ± 1,52	19,18 ± 2,03
	Final	44,58 ± 3,78*	86,63 ± 16,39* †
LDH basal-final		30,70 ± 3,28	71,5 ± 17,74
CK (U/L)	Basal	41,88 ± 6,66	47,97 ± 4,78
	Final	86,79 ± 8,24*	138,15 ± 29,53 *
CK basal-final		45,50 ± 4,32	106,43 ± 35,76 †
AST (U/L)	Basal	4,6 ± 0,4	4,67 ± 0,33
	Final	8,33 ± 1,45	25,79 ± 8,32 *
AST final- basal		3,50 ± 2,50	13,71 ± 4,15
ALT (U/L)	Basal	5,12 ± 0,08	5,19 ± 0,07
	Final	5,07 ± 0,07	5,60 ± 0,19
ALT final – basal		-0,07 ± 0,07	0,31 ± 0,22

LDH: lactato deshidrogenasa; CK: creatin kinasa; AST (GOT): aspartato aminotransferasa; ALT (GPT): alanina aminotransferasa.

**Tabla 18. Enzimas intracelulares medidas en el líquido de perfusión procedente de los pulmones ventilados con  $V_T$  bajo y  $V_T$  elevado, antes de comenzar el experimento (basal) y a los 150 minutos (final). Valores finales menos basales de LDH, CK, AST y ALT.** Los valores son media ± EEM. Se señala la significación estadística ( $p<0,05$ ) del cambio entre los valores basales y finales (\*) (Prueba T) y del efecto de la VM (†) vs.  $V_T$  bajo (Prueba T).

## Resultados

En el análisis en función de la PIP máxima, se observó que la **diferencia entre los valores de basales y finales de LDH y CK** fue significativamente mayor en el grupo ventilado con  $V_T$  elevado con daño pulmonar, en relación al grupo ventilado con  $V_T$  bajo ( $p=0,041$  y  $p=0,014$ , respectivamente), aunque no hubo diferencias significativas respecto al grupo ventilado con  $V_T$  elevado sin daño pulmonar (**Tabla 19**).

		$V_T$ bajo	$V_T$ elevado sin daño pulmonar	$V_T$ elevado con daño pulmonar
LDH (U/L)	Basal	12,67 ± 1,52	17,86 ± 2,30	19,43 ± 2,39
	Final	44,58 ± 3,78*	46,50 ± 4,71*	99,65 ± 21,28*†‡
LDH final – basal		30,70 ± 3,28	31,57 ± 6,18	79,49 ± 21,04 †
CK (U/L)	Basal	41,88 ± 6,66	39,50 ± 4,49	49,56 ± 5,59
	Final	86,79 ± 8,24*	85,73 ± 7,15*	154,63 ± 38,45 *
CK final – basal		45,50 ± 4,32*	50,50 ± 7,13	118,00 ± 42,94 †
AST (U/L)	Basal	4,6 ± 0,4	5,00 ± 0,00	4,61 ± 0,39
	Final	8,33 ± 1,45	8,63 ± 1,31	32,33 ± 11,21 * †
AST final – basal		3,50 ± 2,50	3,00 ± 3,00	15,50 ± 4,65*
ALT (U/L)	Basal	5,12 ± 0,08	5,00 ± 0,00	5,22 ± 0,08
	Final	5,07 ± 0,07	5,17 ± 0,11	5,75 ± 0,25

LDH: lactato deshidrogenasa; CK: creatin kinasa; AST (GOT): aspartato aminotransferasa; ALT (GPT): alanina aminotransferasa.

**Tabla 19. Enzimas intracelulares (LDH, CK, AST y ALT) medidas en el líquido de perfusión, antes de comenzar el experimento (basal) y a los 150 minutos (final), en función de la PIP máxima. Valores finales menos basales de LDH, CK y AST.** Los valores son media ± EEM. Se señala la significación estadística ( $p<0,05$ ) del cambio entre los valores basales y finales (\*) (Prueba T) y del efecto de la VM: (†) vs.  $V_T$  bajo y (‡) vs.  $V_T$  elevado sin daño pulmonar (ANOVA).

En **resumen**, en el grupo ventilado con  $V_T$  elevado se observó, respecto al grupo ventilado con  $V_T$  bajo, de manera significativa: un valor de **glucosa final** menor, una **diferencia entre los valores de proteínas totales basales menos finales** mayor, un

**calcio final** menor y unos valores de **LDH** y **CK** aumentados. En el análisis en función de la PIP, el grupo ventilado con **V<sub>T</sub> elevado con daño pulmonar**, presentó un valor de **glucosa final** menor (respecto al grupo de V<sub>T</sub> bajo) y un aumento de los valores  **finales** de **LDH** y **AST** (respecto al grupo de V<sub>T</sub> bajo y al grupo de V<sub>T</sub> elevado sin daño pulmonar).

**3.3. Parámetros hematológicos en el líquido de perfusión**

Se midieron los valores hematológicos (hemoglobina, hematocrito, hematíes, leucocitos, neutrófilos y plaquetas) en el líquido de perfusión procedente de los pulmones ventilados con V<sub>T</sub> bajo y V<sub>T</sub> elevado, antes de comenzar el experimento (basal) y al final del mismo (T=150) para comprobar que las preparaciones estaban correctamente exanguinadas.

No se observaron diferencias en los parámetros hematológicos basales y finales entre los distintos grupos de VM, ni cambios en su valores a lo largo del experimento excepto en el caso de los neutrófilos, que aumentaron de forma significativa en el líquido de perfusión a lo largo del experimento (**Tablas 20 y 21**).

		V <sub>T</sub> bajo	V <sub>T</sub> elevado
<b>Leucocitos (10<sup>3</sup>/μL)</b>	Basal	0,25 ± 0,03	0,24 ± 0,01
	Final	0,25 ± 0,03	0,25 ± 0,02
<b>Neutrófilos (10<sup>3</sup>/μL)</b>	Basal	0,05 ± 0,008	0,05 ± 0,005
	Final	0,08 ± 0,01*	0,08 ± 0,01*
<b>Plaquetas (10<sup>3</sup>/μL)</b>	Basal	4,71 ± 0,64	4,68 ± 0,33
	Final	3,71 ± 0,54	4,47 ± 0,28
<b>Hematíes (10<sup>6</sup>/μL)</b>	Basal	0,007 ± 0,001	0,008 ± 0,001
	Final	0,008 ± 0,002	0,009 ± 0,002
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	Basal	0,06 ± 0,006	0,00 ± 0,00
	Final	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,02

**Tabla 20. Parámetros hematológicos medidos en el líquido de perfusión, antes de comenzar el experimento (basal) y a los 150 minutos (final).** Los valores son media ± EEM. Se señala la significación estadística (p<0,05) del cambio entre los valores basales y finales (\*) (Prueba T).

## Resultados

		V <sub>T</sub> bajo	V <sub>T</sub> elevado sin daño pulmonar	V <sub>T</sub> elevado con daño pulmonar
Leucocitos (10 <sup>3</sup> /μL)	Basal	0,25 ± 0,03	0,26 ± 0,02	0,23 ± 0,02
	Final	0,25 ± 0,03	0,24 ± 0,03	0,25 ± 0,02
Neutrófilos (10 <sup>3</sup> /μL)	Basal	0,05 ± 0,008	0,07 ± 0,01	0,05 ± 0,005
	Final	0,08 ± 0,01*	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,009*
Plaquetas (10 <sup>3</sup> /μL)	Basal	4,71 ± 0,64	5,73 ± 0,94	4,38 ± 0,33
	Final	3,71 ± 0,54	4,64 ± 0,58	4,41 ± 0,32
Hematíes (10 <sup>6</sup> /μL)	Basal	0,007 ± 0,001	0,007 ± 0,001	0,009 ± 0,001
	Final	0,008 ± 0,002	0,007 ± 0,001	0,01 ± 0,003
Hemoglobina (g/dL)	Basal	0,06 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

**Tabla 21. Parámetros** hematológicos medidos en el líquido de perfusión, antes de comenzar el experimento (basal) y a los 150 minutos (final), en función de la PIP máxima. Los valores son media ± EEM. Se señala la significación estadística ( $p < 0,05$ ) del cambio entre los valores basales y finales (\*) (Prueba T).

### RESULTADOS DEL OBJETIVO 2: EVALUAR SI EL VILI SE ASOCIA CON DISFUNCIÓN VASCULAR

El objetivo 2 consistió en evaluar si el VILI se asociaba con disfunción vascular. Para ello, se incubaron anillos de aorta torácica procedentes de ratas sanas con el líquido de perfusión procedente de los pulmones ventilados con  $V_T$  bajo o con  $V_T$  elevado, y se analizó la respuesta vascular a dosis crecientes de acetilcolina y norepinefrina, con el fin de evaluar la función del endotelio vascular y el músculo liso, respectivamente.

**Resumen de los resultados del objetivo 2:** Evaluar si el VILI se asocia con disfunción vascular.

- Los anillos aórticos incubados con el líquido de perfusión procedente de los pulmones ventilados con  **$V_T$  elevado**, mostraron una **disminución significativa de la relajación** en respuesta a dosis crecientes de Ach, respecto al control. Esta alteración en la función endotelial se produjo de forma más marcada en el grupo ventilado con  **$V_T$  elevado con daño pulmonar**.
- Los anillos aórticos incubados con el líquido de perfusión procedente de los pulmones ventilados tanto con  **$V_T$  bajo** como con  **$V_T$  elevado**, mostraron una **disminución no significativa de la contracción** en respuesta a dosis crecientes de NE, en relación al control. La disfunción contráctil fue más llamativa en el grupo ventilado con  **$V_T$  elevado sin daño pulmonar**.

### 1. EFECTO DE LA VENTILACIÓN CON $V_T$ BAJO Y ELEVADO SOBRE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL

Para estudiar la función endotelial, los anillos de aorta de animales sanos se incubaron durante 60 minutos, con el líquido de perfusión procedente de los pulmones ventilados con  $V_T$  bajo y  $V_T$  elevado, así como el líquido de perfusión control que no había circulado por el pulmón (Ver **Material y métodos**).

En el eje de ordenadas de las curvas dosis-respuesta de relajación se representa el tanto por ciento de contracción residual en relación a la máxima contracción alcanzada con una sola dosis de NE, y en el eje de abscisas, las dosis crecientes de Ach. Los valores de las curvas son media  $\pm$  error estándar de la media.

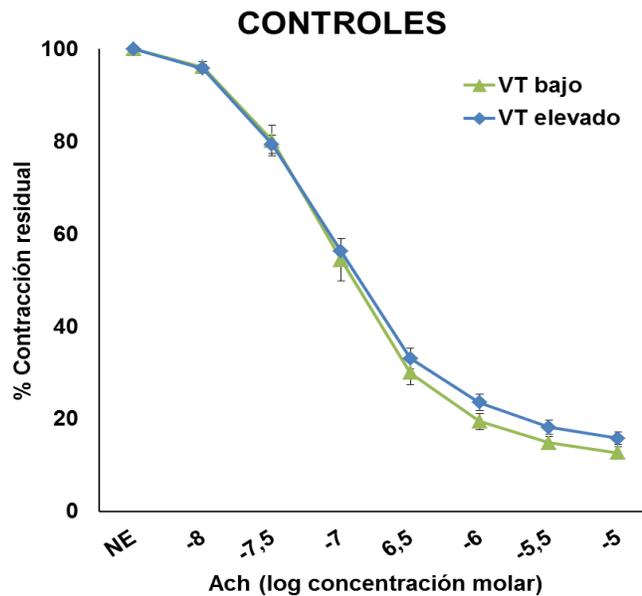
Como grupo **control** en el modelo de función vascular, se incubaron en cada experimento dos anillos aórticos con el líquido de perfusión que no había sido utilizado en el experimento de VM *ex vivo*. No hubo diferencias estadísticamente significativas en las respuestas endoteliales de los anillos incubados con el líquido de perfusión entre los 2 grupos de VM ( $V_T$  bajo vs.  $V_T$  elevado) en las curvas control ( $p=0,294$ ). Se muestra un ejemplo en la **Figura 28**.

Se compararon las curvas dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **Ach** entre los anillos incubados con el **Krebs problema** (el líquido de perfusión) procedente de los 2 grupos de VM,  $V_T$  bajo y  $V_T$  elevado. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las curvas de relajación de los anillos incubados con el **Krebs problema** procedente de pulmones ventilados con  $V_T$  bajo vs.  $V_T$  elevado ( $p=0,255$ ) (**Figura 29**).

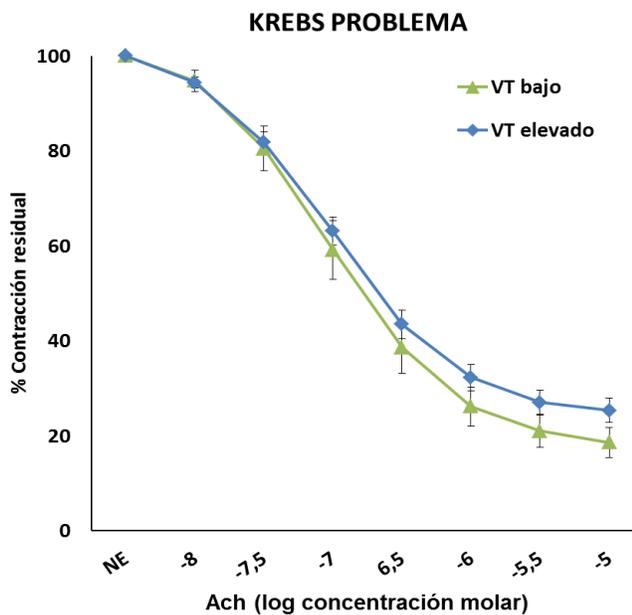
Se compararon las curvas dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **Ach** entre los anillos aórticos incubados con el líquido de perfusión **control**, que no había pasado por el pulmón, y los anillos de aorta incubados con el líquido de **Krebs problema**, procedente de los pulmones ventilados con  **$V_T$  bajo o  $V_T$  elevado**. En el caso de los anillos incubados con el **Krebs problema** procedente de pulmones ventilados con  **$V_T$  bajo**, no se observaron diferencias estadísticamente significativas comparado con el **control** ( $p=0,103$ ) (**Figura 30**).

Sin embargo, los anillos incubados con el **Krebs problema** procedente de los pulmones ventilados con  **$V_T$  elevado**, mostraron una disminución en la relajación estadísticamente significativa, respecto a los anillos incubados con el líquido de perfusión **control** ( $p=0,000$ ) (**Figura 31**).

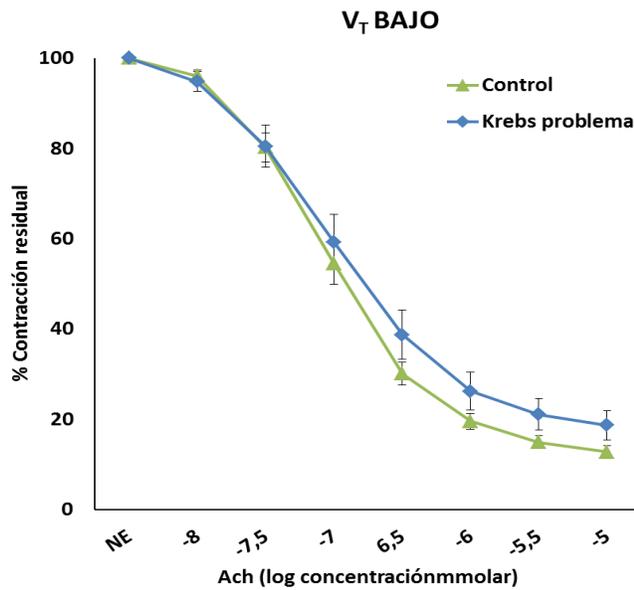
En **resumen**, el líquido de perfusión procedente de pulmones ventilados con  $V_T$  bajo no modificó de forma significativa la relajación en respuesta a Ach en los anillos de aorta torácica. Sin embargo, los anillos aórticos incubados con el líquido de Krebs procedente de pulmones ventilados con  $V_T$  elevado, mostraron una disminución de la relajación en respuesta a Ach respecto al control.



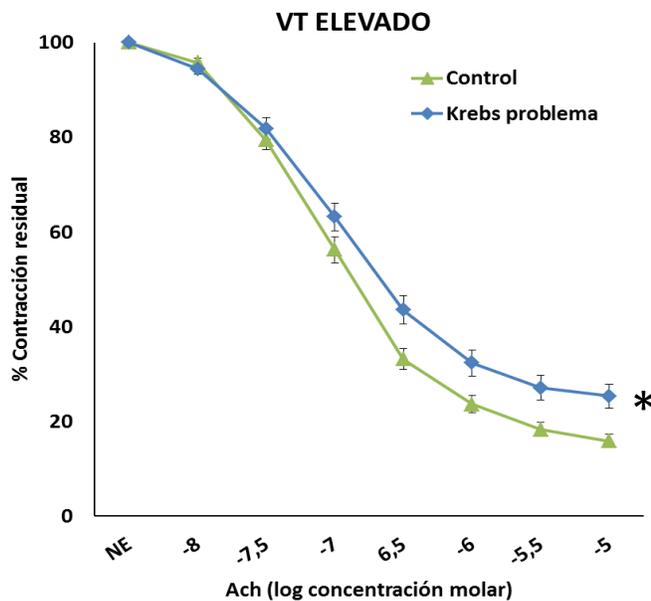
**Figura 28.** Curva dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **Ach** en anillos de aorta torácica incubados con líquido de perfusión **control** (que no ha pasado por el pulmón) en los 2 grupos de ventilación ( $V_T$  bajo y  $V_T$  elevado) ( $p=0,294$ ).



**Figura 29.** Curva dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **Ach** en anillos de aorta torácica incubados con líquido de perfusión **problema** procedente de los 2 grupos de VM ( $V_T$  bajo y  $V_T$  elevado) ( $p=0,255$ ).



**Figura 30.** Curva dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **Ach** en anillos de aorta torácica incubados con líquido de perfusión **control** y líquido de perfusión **problema** procedente de los pulmones ventilados con **V<sub>T</sub> bajo** ( $p=0,103$ ).



**Figura 31.** Curva dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **Ach** en anillos de aorta torácica incubados con líquido de perfusión **control** y líquido de perfusión **problema** procedente de los pulmones ventilados con **V<sub>T</sub> elevado**. Se señala la significación estadística (\*) para la interacción dosis\*grupo VM ( $p=0,000$ ).

### 1.1. FUNCIÓN ENDOTELIAL EN RELACIÓN A LA PRESENCIA DE DAÑO PULMONAR

En este apartado se describen los resultados en función del  $V_T$  utilizado y si se ha producido o no daño pulmonar al ventilar con  $V_T$  elevado ( $V_T$  elevado sin daño pulmonar y  $V_T$  elevado con daño pulmonar). Nuestro objetivo fue comprobar si el líquido de perfusión procedente de los pulmones que habían sufrido daño pulmonar tras ser ventilados con  $V_T$  elevado, inducía una alteración en la función endotelial en los anillos aórticos.

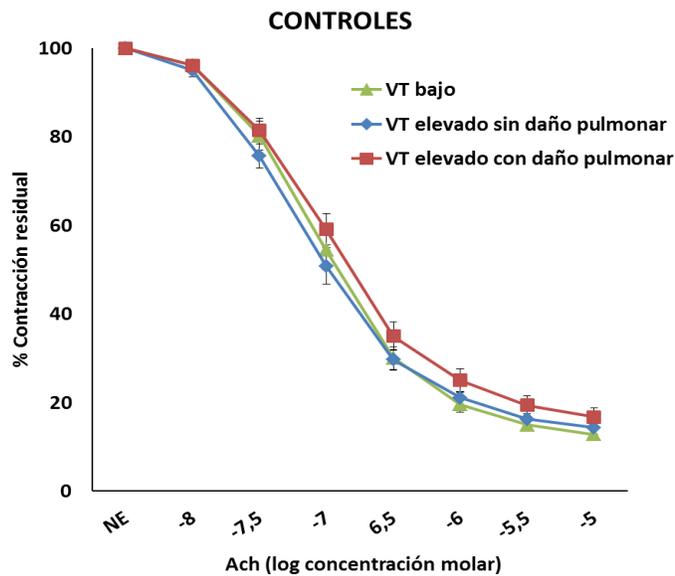
No hubo diferencias estadísticamente significativas en las respuestas endoteliales de los anillos incubados con el líquido de perfusión de los 3 grupos de VM ( $V_T$  bajo,  $V_T$  elevado sin daño pulmonar y  $V_T$  elevado con daño pulmonar) en las curvas control ( $p=0,203$ ) (**Figura 32**).

Se compararon las curvas dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **Ach** entre los anillos incubados con el **Krebs problema** procedente de los 3 grupos de VM ( $V_T$  bajo,  $V_T$  elevado sin daño pulmonar y  $V_T$  elevado con daño pulmonar). El resultado de la interacción dosis-grupo de VM fue estadísticamente significativo entre los 3 grupos ( $p=0,047$ ). Sin embargo, al comparar los grupos 2 a 2, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $V_T$  bajo vs.  $V_T$  elevado sin daño pulmonar,  $p=0,285$ ;  $V_T$  bajo vs.  $V_T$  elevado con daño pulmonar,  $p=0,107$  y  $V_T$  elevado sin daño pulmonar vs.  $V_T$  elevado con daño pulmonar,  $p=0,05$ ) (**Figura 33**).

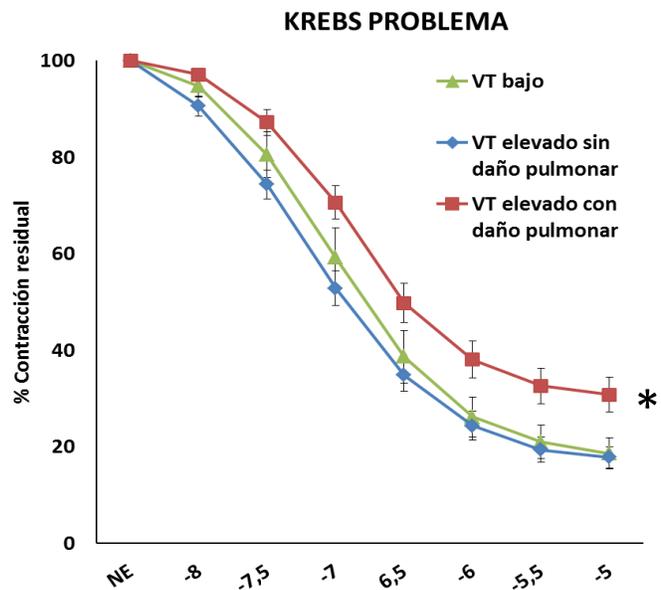
Se compararon las curvas dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **Ach** entre los anillos aórticos incubados con el líquido de perfusión **control**, que no había pasado por el pulmón, y los anillos de aorta incubados con el líquido de **Krebs problema**, procedente de los pulmones ventilados con  **$V_T$  elevado** en función de si presentaban o no **daño pulmonar**. En el caso de los anillos incubados con el **Krebs problema** procedente de pulmones ventilados con  **$V_T$  elevado sin daño pulmonar**, no se observaron diferencias estadísticamente significativas comparado con el **control** ( $p=0,052$ ) (**Figura 34**).

Sin embargo, los anillos incubados con el **Krebs problema** procedente de los pulmones ventilados con  **$V_T$  elevado con daño pulmonar**, mostraron una disminución en la relajación estadísticamente significativa, respecto a los anillos incubados con el líquido de perfusión **control** ( $p=0,001$ ) (**Figura 35**).

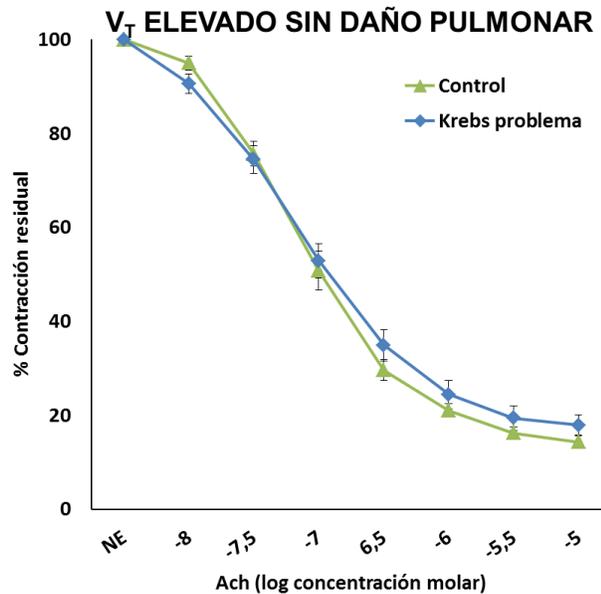
En **resumen**, el líquido de perfusión procedente de pulmones ventilados con  $V_T$  bajo o  $V_T$  elevado sin daño pulmonar no modificó de forma significativa la relajación en respuesta a Ach en los anillos de aorta torácica. Sin embargo, los anillos aórticos incubados con el líquido de Krebs procedente de pulmones ventilados con  $V_T$  elevado con daño pulmonar, mostraron una disminución de la relajación en respuesta a dosis crecientes de Ach respecto al control.



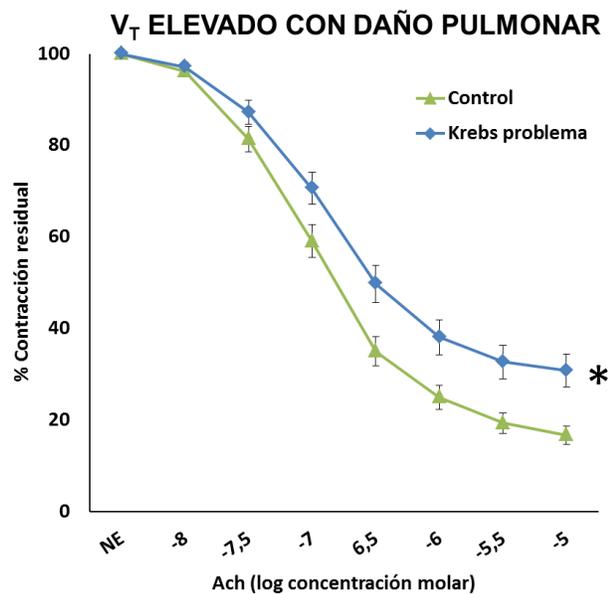
**Figura 32.** Curva dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **Ach** en anillos de aorta torácica incubados con líquido de perfusión **control** en los tres grupos de ventilación ( $V_T$  bajo,  $V_T$  elevado sin daño pulmonar y  $V_T$  elevado con daño pulmonar) ( $p=0,203$ ).



**Figura 33.** Curva dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **Ach** en anillos de aorta torácica incubados con líquido de perfusión **problema** procedente de los 3 grupos de VM. Se señala la significación estadística (\*) de la interacción dosis\*grupo ( $p=0,047$ ).



**Figura 34.** Curva dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **Ach** en anillos de aorta torácica incubados con líquido de perfusión **control** y líquido de perfusión **problema** procedente de los pulmones ventilados con **V<sub>T</sub> elevado sin daño pulmonar** ( $p=0,052$ ).



**Figura 35.** Curva dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **Ach** en anillos de aorta torácica incubados con líquido de perfusión **control** y líquido de perfusión **problema** procedente de los pulmones ventilados con **V<sub>T</sub> elevado con daño pulmonar**. Se señala la significación estadística (\*) de la interacción dosis\*grupo ( $p=0,001$ ).

### 2. EFECTO DE LA VENTILACIÓN CON $V_T$ BAJO Y ELEVADO SOBRE LA FUNCIÓN CONTRÁCTIL

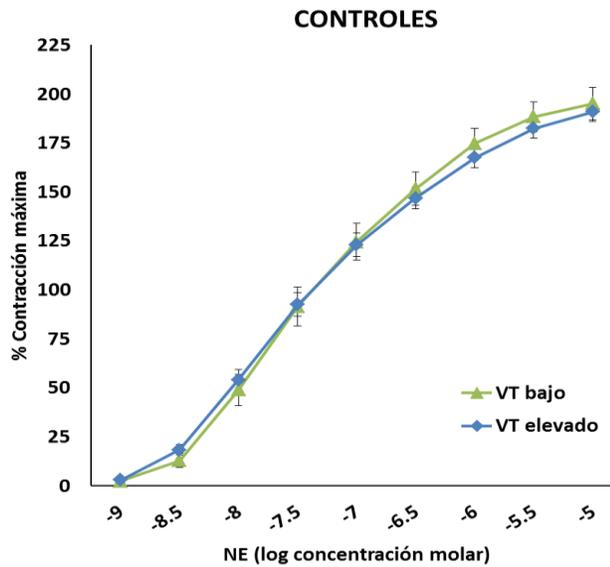
Para estudiar la función contráctil, los anillos de aorta de animales sanos se incubaron durante 60 minutos con el líquido de perfusión procedente de los pulmones ventilados con  $V_T$  bajo y  $V_T$  elevado, así como el líquido de perfusión control que no había circulado por el pulmón (Ver **Material y métodos**). En el eje de ordenadas de las curvas dosis-respuesta de contracción se representa el porcentaje de contracción en relación con la máxima contracción alcanzada con potasio, y en el eje de abscisas, las dosis crecientes de NE. Los valores de las curvas son media  $\pm$  error estándar de la media.

Como grupo **control** en el modelo de función vascular, se incubaron en cada experimento dos anillos aórticos con el líquido de perfusión que no había sido utilizado en el experimento de VM *ex vivo*. No hubo diferencias estadísticamente significativas en las respuestas contráctiles de los anillos incubados con el líquido de perfusión entre los 2 grupos de VM ( $V_T$  bajo vs.  $V_T$  elevado) en las curvas control ( $p=0,415$ ). Se muestra un ejemplo en la **Figura 36**.

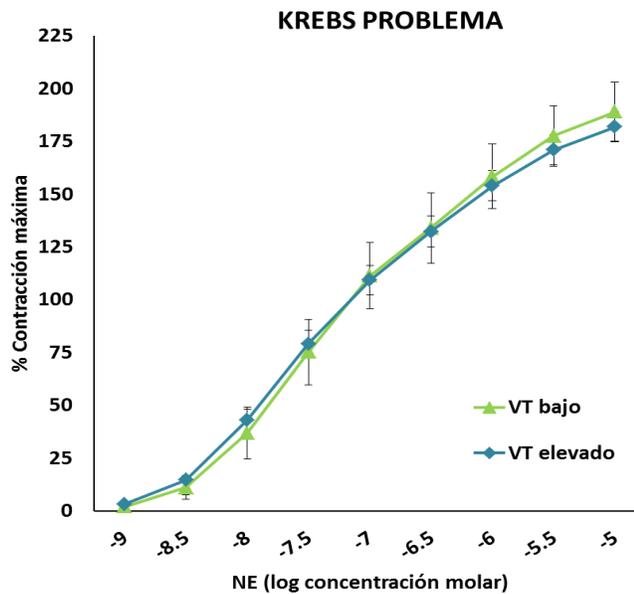
Se compararon las curvas dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **NE** entre los anillos incubados con el **Krebs problema** procedente de los 2 grupos de VM,  $V_T$  bajo y  $V_T$  elevado. No se encontraron diferencias significativas en la función contráctil de los anillos incubados con el **Krebs problema** de los pulmones ventilados con  $V_T$  bajo vs.  $V_T$  elevado ( $p=0,577$ ) (**Figura 37**).

Se compararon las curvas dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **NE** entre los anillos aórticos incubados con el líquido de perfusión **control**, que no había pasado por el pulmón, y los anillos de aorta incubados con el líquido de **Krebs problema**, procedente de los pulmones ventilados con  **$V_T$  bajo o  $V_T$  elevado**, sin observarse diferencias estadísticamente significativas en relación al **control** ( $p=0,473$  y  $p=0,093$  respectivamente) (**Figura 38 y 39**).

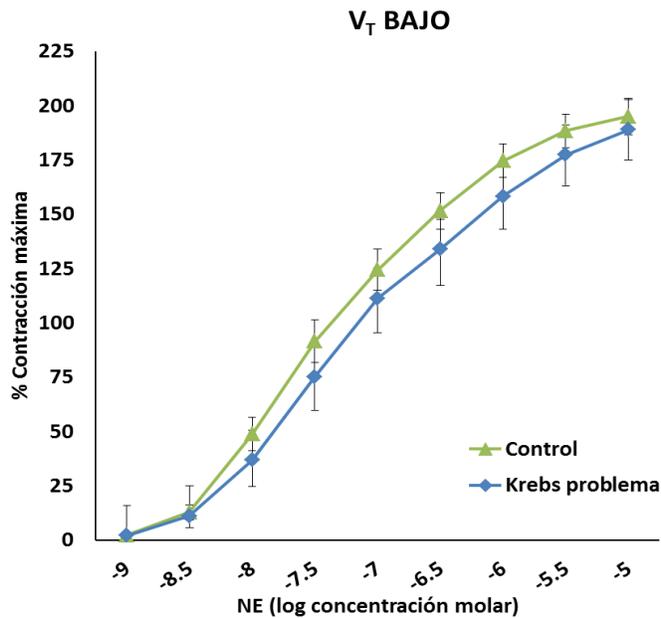
En **resumen**, el líquido de perfusión procedente de pulmones ventilados con  $V_T$  bajo y  $V_T$  elevado, indujo un déficit no significativo en la respuesta contráctil de los anillos aórticos.



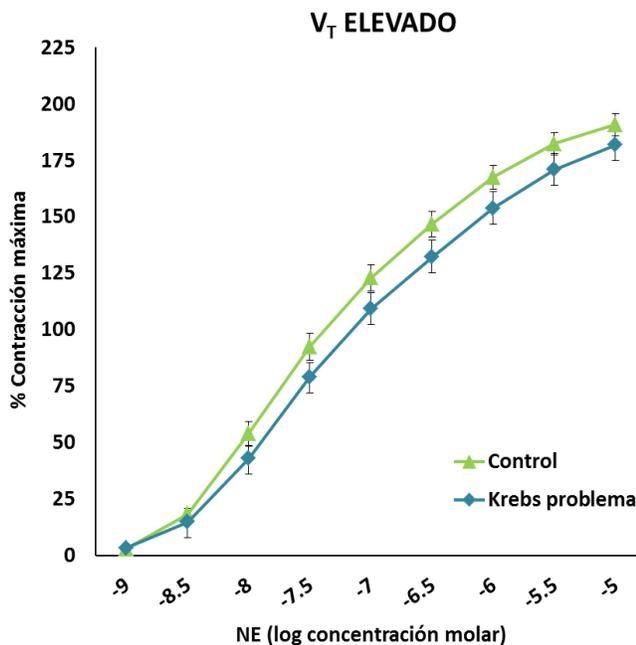
**Figura 36.** Curva dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **NE** en anillos de aorta torácica incubados con líquido de perfusión **control** en los 2 grupos de ventilación ( $V_T$  bajo y  $V_T$  elevado) ( $p=0,415$ ).



**Figura 37.** Curva dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **NE** en anillos de aorta torácica incubados con líquido de perfusión **problema** procedente de los 2 grupos de VM ( $p=0,577$ ).



**Figura 38.** Curva dosis-respuesta a concentraciones crecientes de NE en anillos de aorta torácica incubados con líquido de perfusión **control** y líquido de perfusión **problema** procedente de los pulmones ventilados con **V<sub>T</sub> bajo** ( $p=0,473$ ).



**Figura 39.** Curva dosis-respuesta a concentraciones crecientes de NE en anillos de aorta torácica incubados con líquido de perfusión **control** y líquido de perfusión **problema** procedente de los pulmones ventilados con **V<sub>T</sub> elevado** ( $p=0,093$ ).

### 2.1. FUNCIÓN CONTRÁCTIL EN RELACIÓN A LA PRESENCIA DE DAÑO PULMONAR

En este apartado se describen los resultados en función del  $V_T$  utilizado y si se ha producido o no daño pulmonar al ventilar con  $V_T$  elevado ( $V_T$  elevado sin daño pulmonar y  $V_T$  elevado con daño pulmonar). Nuestro objetivo fue comprobar si el líquido de perfusión procedente de los pulmones que habían sufrido daño pulmonar tras ser ventilados con  $V_T$  elevado, inducía una alteración en la función contráctil en los anillos aórticos.

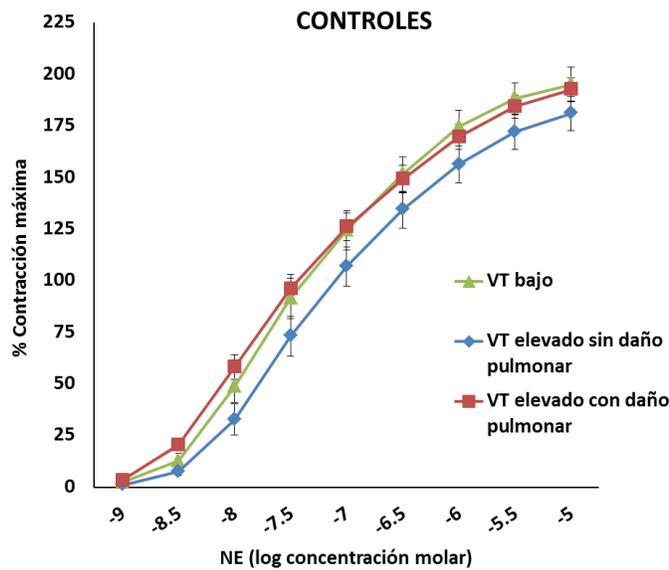
No hubo diferencias estadísticamente significativas en las respuestas contráctiles de los anillos incubados con el líquido de perfusión de los 3 grupos de VM ( $V_T$  bajo,  $V_T$  elevado sin daño pulmonar y  $V_T$  elevado con daño pulmonar) en las curvas control ( $p=0,297$ ) (**Figura 40**).

Se compararon las curvas dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **NE** entre los anillos incubados con el **Krebs problema** procedente de los 3 grupos de VM ( $V_T$  bajo,  $V_T$  elevado sin daño pulmonar y  $V_T$  elevado con daño pulmonar). El resultado de la interacción dosis-grupo de VM fue estadísticamente significativo entre los 3 grupos ( $p=0,029$ ). Al comparar los grupos 2 a 2, en los anillos incubados con líquido de perfusión procedente de pulmones ventilados con  $V_T$  elevado sin daño pulmonar, la respuesta contráctil fue significativamente peor respecto al grupo de  $V_T$  bajo ( $p=0,018$ ) y al grupo de  $V_T$  elevado con daño pulmonar ( $p=0,009$ ) (**Figura 41**).

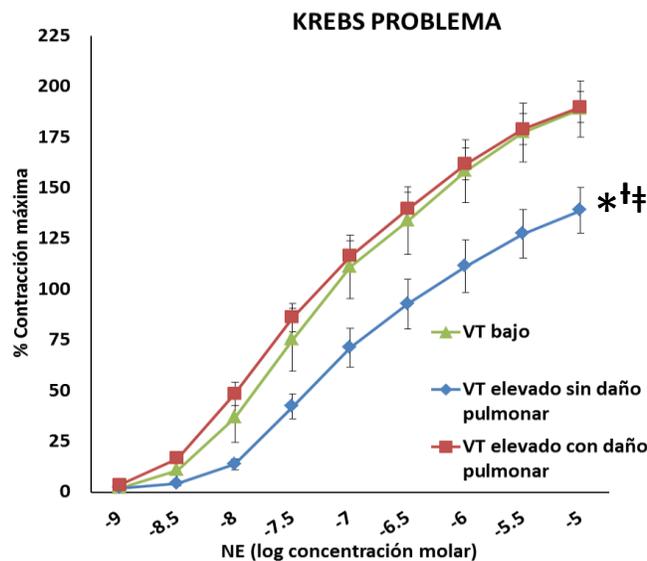
Se compararon las curvas dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **NE** entre los anillos aórticos incubados con el líquido de perfusión **control**, que no había pasado por el pulmón, y los anillos de aorta incubados con el líquido de **Krebs problema**, procedente de los pulmones ventilados con  **$V_T$  elevado** en función de si presentaban o no **daño pulmonar**. En el caso de los anillos incubados con el **Krebs problema** procedente de pulmones ventilados con  **$V_T$  elevado sin daño pulmonar**, mostraron una disminución estadísticamente significativa en la contracción en relación al control ( $p=0,003$ ) (**Figura 42**).

Sin embargo, los anillos incubados con el **Krebs problema** procedente de los pulmones ventilados con  **$V_T$  elevado con daño pulmonar**, no mostraron alteraciones significativas en la contracción respecto al control ( $p=0,256$ ) (**Figura 43**).

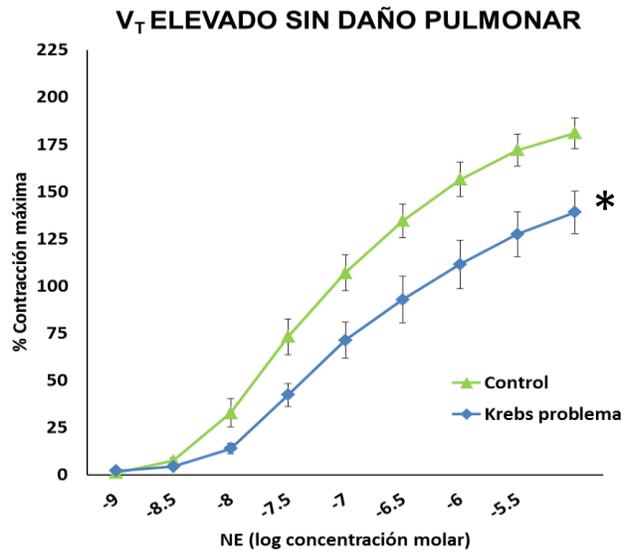
En **resumen**, el líquido de perfusión procedente de pulmones ventilados con  $V_T$  elevado sin daño pulmonar, indujo un déficit en la respuesta contráctil de los anillos aórticos, estadísticamente significativa respecto a los controles. En el caso de los anillos aórticos incubados con el líquido de perfusión procedente de pulmones ventilados con  $V_T$  bajo y  $V_T$  elevado con daño pulmonar, mostraron una disminución no significativa de la contracción en respuesta a dosis crecientes de NE.



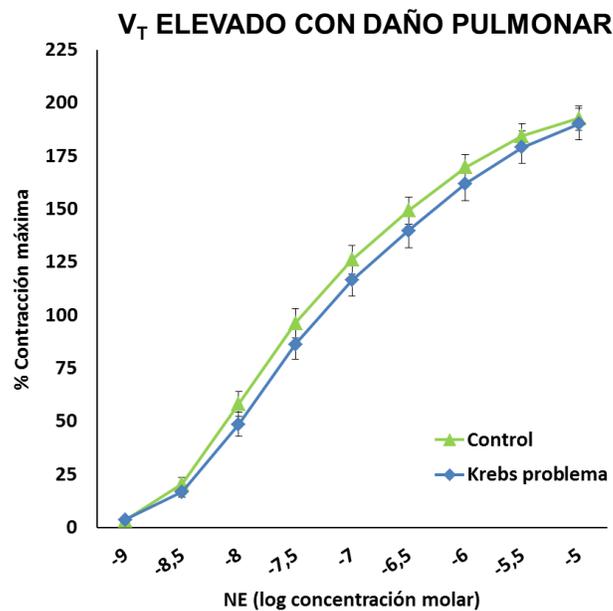
**Figura 40.** Curva dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **NE** en anillos de aorta torácica incubados con líquido de perfusión **control** en los tres grupos de ventilación ( $V_T$  bajo,  $V_T$  elevado sin daño pulmonar y  $V_T$  elevado con daño pulmonar) ( $p=0,297$ ).



**Figura 41.** Curva dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **NE** en anillos de aorta torácica incubados con líquido de perfusión **problema** procedente de los 3 grupos de VM. Se señala la significación estadística ( $p=0,029$ ) de la interacción dosis\*grupo (\*) y para las comparaciones entre el grupo de  $V_T$  elevado sin daño pulmonar vs.  $V_T$  elevado con daño pulmonar ( $\dagger$ ,  $p=0,009$ ) y  $V_T$  bajo ( $\ddagger$ ,  $p=0,018$ ).



**Figura 42.** Curva dosis-respuesta a concentraciones crecientes de NE en anillos de aorta torácica incubados con líquido de perfusión **control** y líquido de perfusión **problema** procedente de los pulmones ventilados con **V<sub>T</sub> elevado sin daño pulmonar**. Se señala la significación estadística (\*) de la interacción dosis\*grupo (p=0,003).



**Figura 43.** Curva dosis-respuesta a concentraciones crecientes de NE en anillos de aorta torácica incubados con líquido de perfusión **control** y líquido de perfusión **problema** procedente de los pulmones ventilados con **V<sub>T</sub> elevado con daño pulmonar** (p=0,256).

### OBJETIVO 5: VALORAR SI LAS ALTERACIONES EN LA FUNCIÓN VASCULAR ASOCIADAS AL VILI SE DEBEN A UN AUMENTO DEL ESTRÉS NITRO-OXIDATIVO

El **objetivo 5** consistió en valorar si las alteraciones en la función vascular asociadas al VILI eran debidas a un aumento del estrés nitro-oxidativo. Para ello, se analizó la respuesta vascular a dosis crecientes de Ach y NE en los anillos aórticos preincubados con atrapadores de radicales libres y peroxinitrito (metaloporfirina, tempol y SOD), e incubados posteriormente con el líquido de perfusión de los pulmones ventilados con  $V_T$  bajo o con  $V_T$  elevado (Ver **Figura 15**).

**Resumen de los resultados del objetivo 5 (función endotelial):** valorar si las alteraciones en la función vascular asociadas al VILI eran debidas a un aumento del estrés nitro-oxidativo.

- En los anillos aórticos preincubados con **metaloporfirina**, se encontró una **mejoría no significativa** de la relajación en ambos grupos de VM, sobre todo en los pulmones ventilados con  **$V_T$  elevado sin daño pulmonar**.
- En los anillos de aorta preincubados con **tempol**, se observó una **mejoría estadísticamente significativa** de la relajación en el grupo de  **$V_T$  elevado con daño pulmonar**. Sin embargo, en el grupo de  **$V_T$  bajo**, se produjo un **empeoramiento no significativo** de la relajación.
- Los anillos de aorta preincubados con **SOD**, mostraron una **mejoría significativa** de la relajación en el grupo de  **$V_T$  elevado**, sobre todo en los pulmones ventilados con  **$V_T$  elevado con daño pulmonar**. Sin embargo, en el grupo ventilado con  **$V_T$  bajo**, se produjo un empeoramiento no significativo de la relajación.

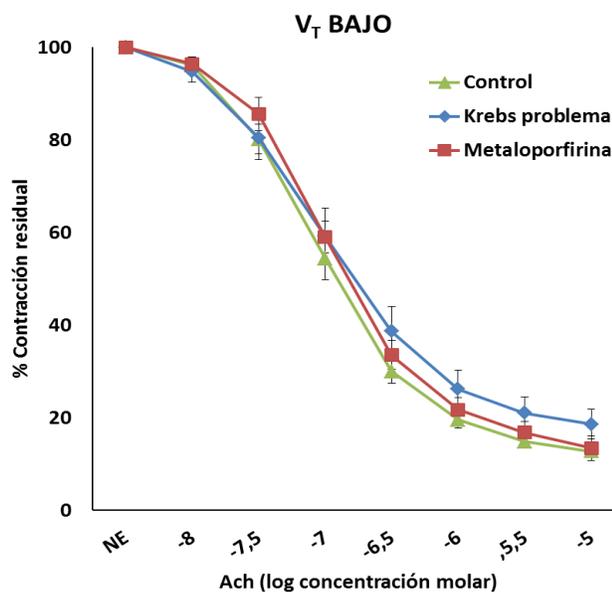
## 1. EFECTO DE LOS FÁRMACOS INHIBIDORES DEL ESTRÉS NITRO-OXIDATIVO SOBRE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL

Se exponen las curvas dosis-respuesta a concentraciones crecientes de Ach para cada fármaco estudiado (metaloporfirina, tempol y SOD) en cada grupo de ventilación ( $V_T$  bajo y  $V_T$  elevado). Los valores de las curvas son media  $\pm$  error estándar de la media.

### 1.1. Metaloporfirina

#### 1.1.1. $V_T$ bajo

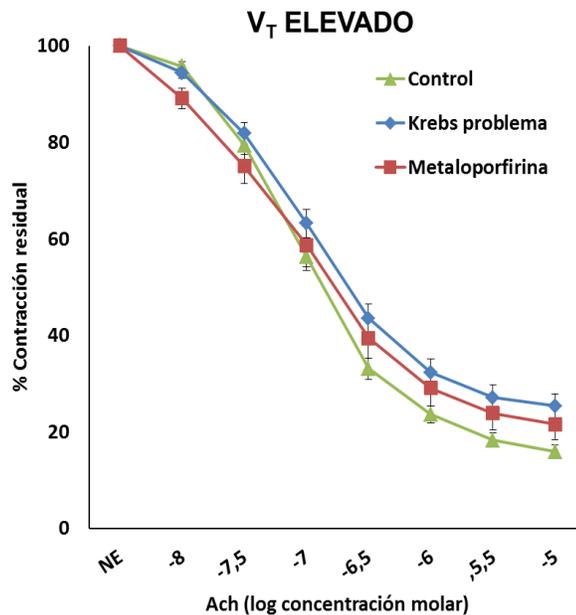
Se compararon las curvas dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **Ach** entre: i) anillos de aorta incubados con el líquido de perfusión control ii) anillos de aorta incubados con el líquido de perfusión problema procedente de los pulmones ventilados con  **$V_T$  bajo**; iii) anillos aórticos incubados con el Krebs problema del  $V_T$  bajo y preincubados con **metaloporfirina**. No existieron diferencias estadísticamente significativas entre las 3 curvas ( $p=0,138$ ) (**Figura 44**).



**Figura 44.** Curva dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **Ach** en anillos de aorta torácica incubados con líquido de perfusión **control**, líquido de perfusión **problema** procedente de los pulmones ventilados con  **$V_T$  bajo** y anillos aórticos preincubados con **metaloporfirina** (Interacción dosis\*grupo VM,  $p=0,138$ ).

### 1.1.2. $V_T$ elevado

Se compararon las curvas dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **Ach** entre: i) anillos de aorta incubados con el líquido de perfusión control, que no había pasado por el pulmón; ii) anillos de aorta incubados con el líquido de perfusión problema procedente de los pulmones ventilados con  $V_T$  **elevado**; iii) anillos aórticos incubados con el Krebs problema del  $V_T$  elevado y preincubados con **metaloporfirina**. No se encontraron diferencias significativas entre los anillos preincubados con el fármaco, respecto a los anillos incubados con líquido de Krebs problema sin fármaco ( $p=0,339$ ) (**Figura 45**).



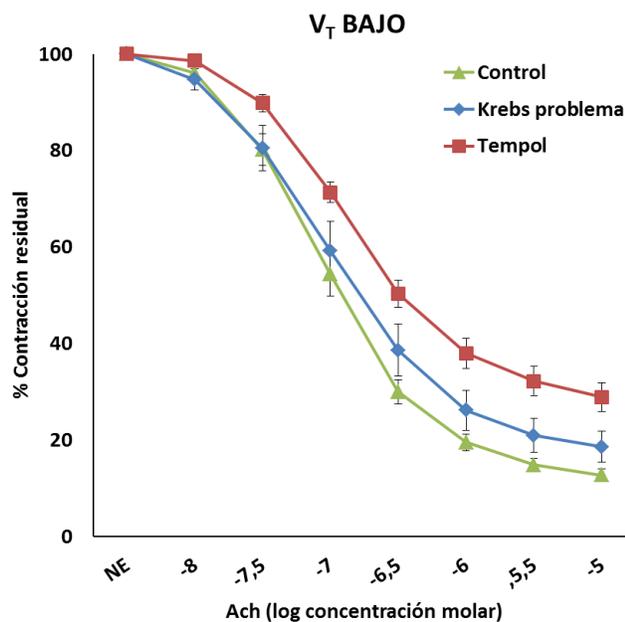
**Figura 45.** Curva dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **Ach** en anillos de aorta torácica incubados con líquido de perfusión **control**, líquido de perfusión **problema** procedente de los pulmones ventilados con  $V_T$  **elevado** y anillos aórticos preincubados con **metaloporfirina** ( $p=0,339$ , metaloporfirina vs. Krebs problema).

Por tanto, al preincubar los anillos de aorta con **metaloporfirina**, mejoró aunque no de forma significativa la alteración en la relajación inducida por la VM en los grupos ventilados con  $V_T$  bajo y  $V_T$  elevado.

## 1.2. Tempol

### 1.2.1. $V_T$ bajo

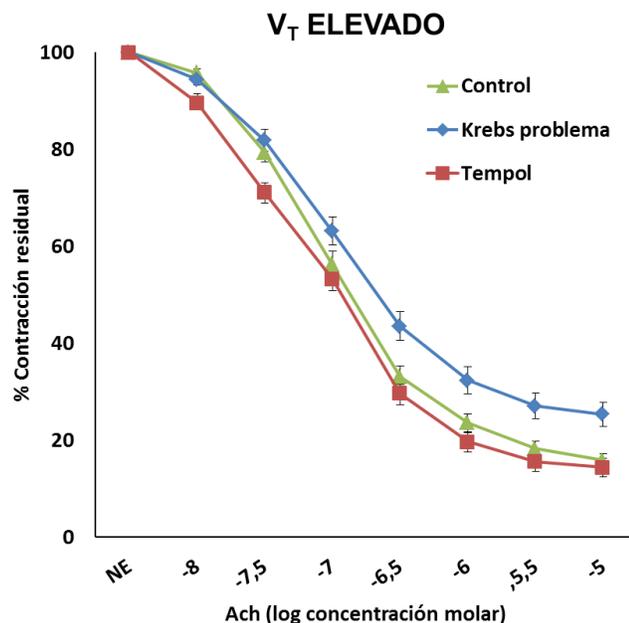
Se compararon las curvas dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **Ach** entre: i) anillos de aorta incubados con el líquido de perfusión control, que no había pasado por el pulmón; ii) anillos de aorta incubados con el líquido de perfusión problema procedente de los pulmones ventilados con  $V_T$  bajo; iii) anillos aórticos incubados con el Krebs problema del  $V_T$  bajo y preincubados con **tempol**. Los anillos preincubados con tempol mostraron un empeoramiento no significativo en la relajación, respecto a los anillos incubados con líquido de Krebs sin fármaco ( $p=0,214$ ) (**Figura 46**).



**Figura 46.** Curva dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **Ach** en anillos de aorta torácica incubados con líquido de perfusión **control**, líquido de perfusión **problema** procedente de los pulmones ventilados con  $V_T$  bajo y anillos aórticos preincubados con **tempol** ( $p=0,214$ , tempol vs. Krebs problema).

### 1.2.2. $V_T$ elevado

Se compararon las curvas dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **Ach** entre: i) anillos de aorta incubados con el líquido de perfusión control, que no había pasado por el pulmón; ii) anillos de aorta incubados con el líquido de perfusión problema procedente de los pulmones ventilados con  $V_T$  **elevado**; iii) anillos aórticos incubados con el Krebs problema del  $V_T$  elevado y preincubados con **tempol**. Los anillos de aorta preincubados con tempol, mostraron una mejoría en la relajación, aunque no fue significativa ( $p=0,052$ ), en relación con los anillos de aorta incubados con el líquido de Krebs sin fármaco (**Figura 47**).



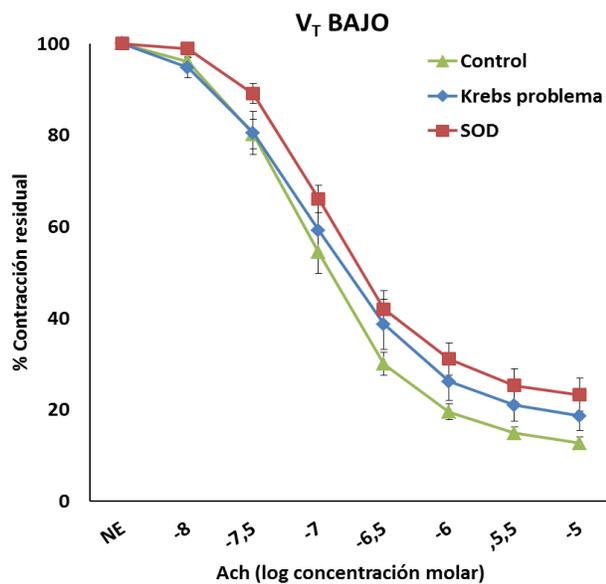
**Figura 47.** Curva dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **Ach** en anillos de aorta torácica incubados con líquido de perfusión **control**, líquido de perfusión **problema** procedente de los pulmones ventilados con  $V_T$  **elevado** y anillos aórticos preincubados con **tempol** ( $p=0,052$ , tempol vs. Krebs problema).

En resumen, al preincubar los anillos de aorta con **tempol**, se encontró una disminución no significativa del déficit de relajación inducido por la VM con  $V_T$  elevado, y un empeoramiento en la relajación en el grupo ventilado con  $V_T$  bajo.

### 1.3. Superóxido dismutasa

#### 1.3.1. $V_T$ bajo

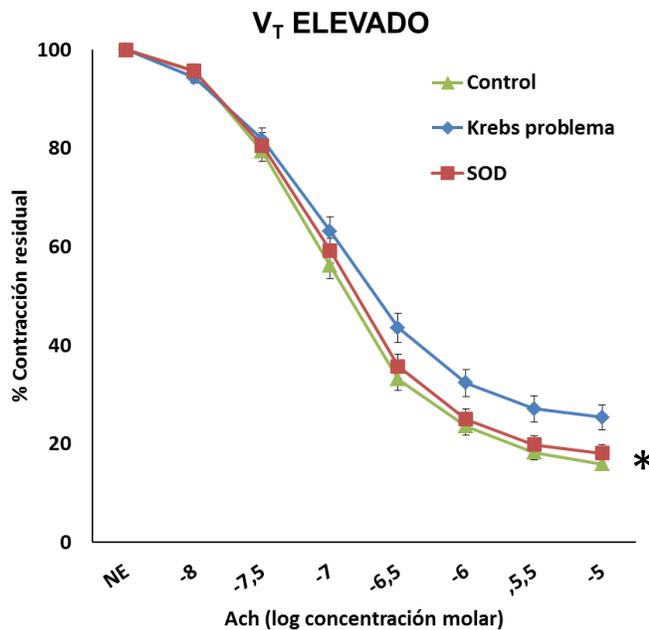
Se compararon las curvas dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **Ach** entre: i) anillos de aorta incubados con el líquido de perfusión control, que no había pasado por el pulmón; ii) anillos de aorta incubados con el líquido de perfusión problema procedente de los pulmones ventilados con  $V_T$  bajo; iii) anillos aórticos incubados con el Krebs problema del  $V_T$  bajo y preincubados con **SOD**. No existieron diferencias estadísticamente significativas entre los 3 grupos ( $p=0,138$ ) (**Figura 48**).



**Figura 48.** Curva dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **Ach** en anillos de aorta torácica incubados con líquido de perfusión **control**, líquido de perfusión **problema** procedente de los pulmones ventilados con  $V_T$  bajo y anillos aórticos preincubados con **SOD** (Interacción dosis\*grupo VM,  $p=0,138$ ).

1.3.2.  $V_T$  elevado

Se compararon las curvas dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **Ach** entre: i) anillos de aorta incubados con el líquido de perfusión control, que no había pasado por el pulmón; ii) anillos de aorta incubados con el líquido de perfusión problema procedente de los pulmones ventilados **con  $V_T$  elevado**; iii) anillos aórticos incubados con el Krebs problema del  $V_T$  elevado y preincubados con **SOD**. Los anillos preincubados con SOD mostraron una mejoría significativa en la relajación, respecto a los anillos incubados con líquido de Krebs sin fármaco ( $p=0,007$ ) (**Figura 49**).



**Figura 49.** Curva dosis-respuesta a concentraciones crecientes de Ach en anillos de aorta torácica incubados con líquido de perfusión control, líquido de perfusión problema procedente de los pulmones ventilados con  $V_T$  elevado y anillos aórticos preincubados con **SOD**. Se señala la significación estadística (\*) de la comparación entre el Krebs problema vs. SOD ( $p=0,007$ ).

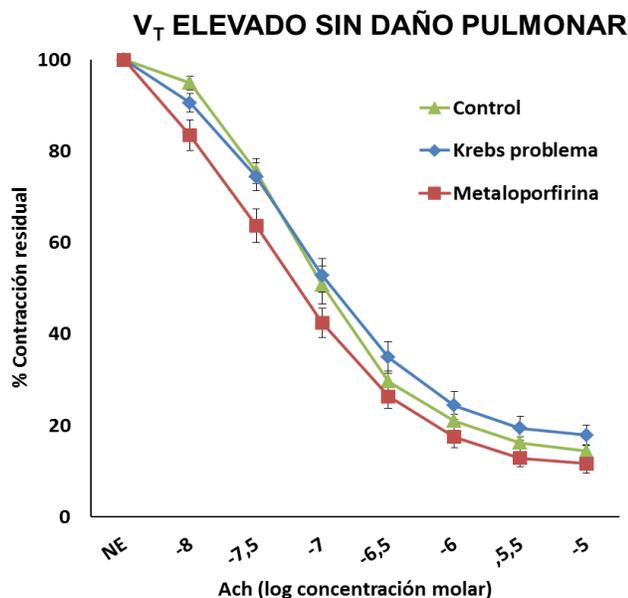
En resumen, los anillos de aorta preincubados con **SOD** y el líquido de perfusión procedente de los pulmones ventilados con  $V_T$  elevado, mostraron una mejoría significativa en la relajación.

## 2. EFECTO DE LOS FÁRMACOS INHIBIDORES DEL ESTRÉS NITRO-OXIDATIVO SOBRE LA RELAJACIÓN EN FUNCIÓN DEL DAÑO PULMONAR

### 2.1. Metaloporfirina

#### 2.1.1. $V_T$ elevado sin daño pulmonar

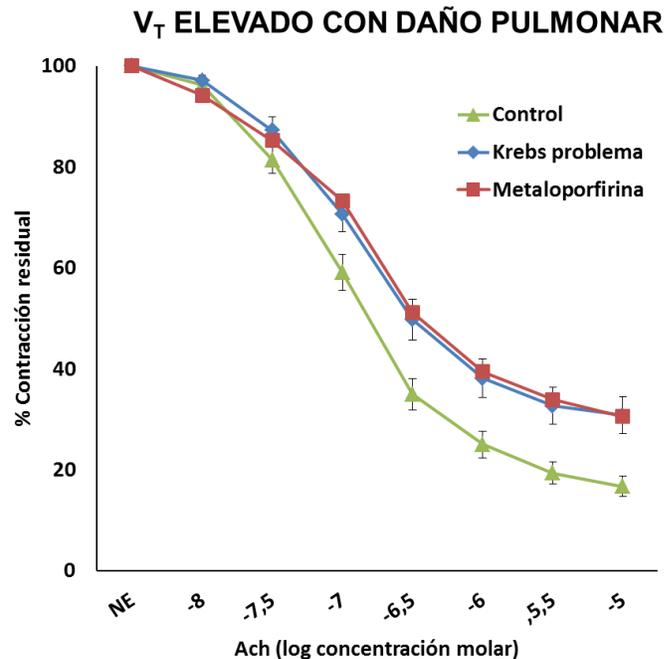
Se compararon las curvas dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **Ach** entre: i) anillos de aorta incubados con el líquido de perfusión control, que no había pasado por el pulmón; ii) anillos de aorta incubados con el líquido de perfusión problema procedente de los pulmones ventilados con  **$V_T$  elevado sin daño pulmonar**; iii) anillos aórticos incubados con el Krebs problema del  $V_T$  elevado sin daño pulmonar y preincubados con **metaloporfirina**. Los anillos preincubados con metaloporfirina, mostraron una mejoría no significativa en la relajación ( $p=0,319$ ), respecto a los anillos incubados con líquido de Krebs problema sin fármaco (**Figura 50**).



**Figura 50.** Curva dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **Ach** en anillos de aorta torácica incubados con líquido de perfusión **control**, líquido de perfusión **problema** procedente de los pulmones ventilados con  **$V_T$  elevado sin daño pulmonar** y anillos aórticos preincubados con **metaloporfirina**. ( $p=0,319$ , metaloporfirina vs. Krebs problema).

### 2.1.2. $V_T$ elevado con daño pulmonar

Se compararon las curvas dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **Ach** entre: i) anillos de aorta incubados con el líquido de perfusión control, que no había pasado por el pulmón; ii) anillos de aorta incubados con el líquido de perfusión problema procedente de los pulmones ventilados con  **$V_T$  elevado con daño pulmonar**; iii) anillos aórticos incubados con el Krebs problema del  $V_T$  elevado con daño pulmonar y preincubados con **metaloporfirina**. Los anillos preincubados con metaloporfirina, no mostraron una mejoría en la relajación en relación a los anillos incubados con el líquido de Krebs problema sin fármaco ( $p=0,479$ ) (**Figura 51**).



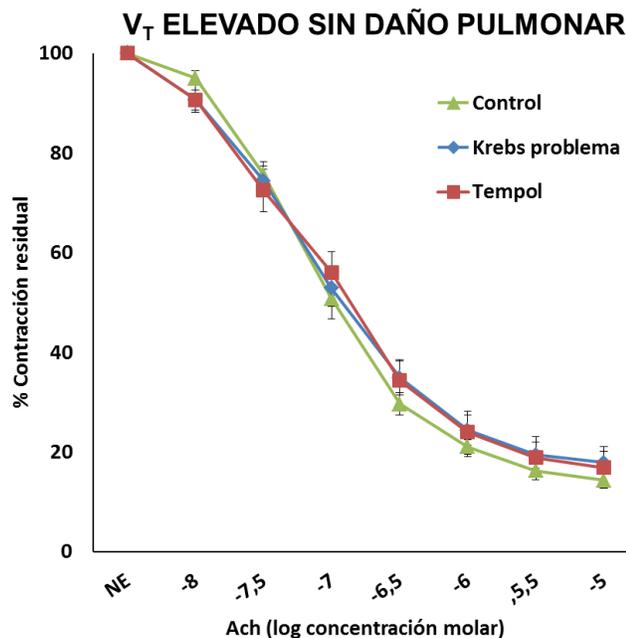
**Figura 51.** Curva dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **Ach** en anillos de aorta torácica incubados con líquido de perfusión **control**, líquido de perfusión **problema** procedente de los pulmones ventilados con  **$V_T$  elevado con daño pulmonar** y anillos aórticos preincubados con **metaloporfirina** (metaloporfirina vs. KP,  $p=0,479$ ).

Por tanto, al preincubar los anillos de aorta con **metaloporfirina**, mejoró aunque no de forma significativa la alteración en la relajación inducida por la VM con  $V_T$  elevado en el grupo que no presentaba daño pulmonar.

## 2.2. Tempol

### 2.2.1. $V_T$ elevado sin daño pulmonar

Se compararon las curvas dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **Ach** entre: i) anillos de aorta incubados con el líquido de perfusión control, que no había pasado por el pulmón; ii) anillos de aorta incubados con el líquido de perfusión problema procedente de los pulmones ventilados con  **$V_T$  elevado sin daño pulmonar**; iii) anillos aórticos incubados con el Krebs problema del  $V_T$  elevado sin daño pulmonar y preincubados con **tempol**. No existieron diferencias estadísticamente significativas entre los 3 grupos ( $p=0,051$ ) (**Figura 52**).

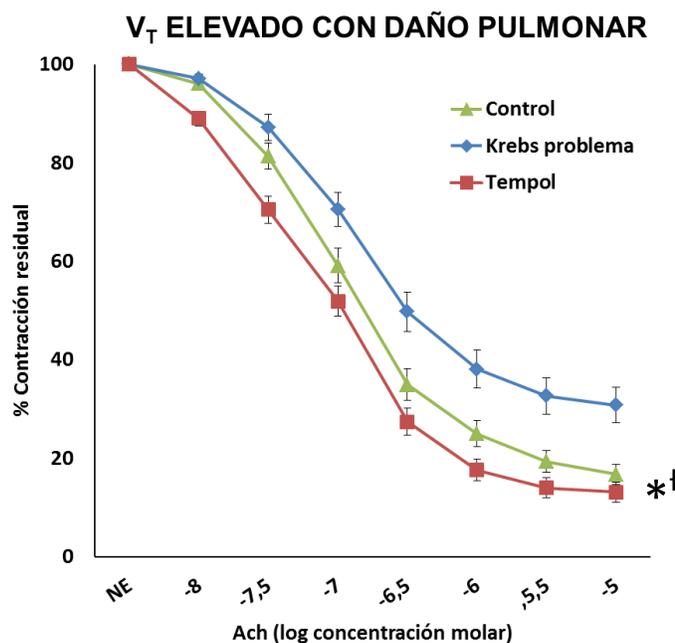


**Figura 52.** Curva dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **Ach** en anillos de aorta torácica incubados con líquido de perfusión **control**, líquido de perfusión **problema** procedente de los pulmones ventilados con  **$V_T$  elevado sin daño pulmonar** y anillos aórticos preincubados con **tempol** (Interacción dosis\*grupo VM,  $p=0,051$ ).

### 2.2.2. $V_T$ elevado con daño pulmonar

Se compararon las curvas dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **Ach** entre: i) anillos de aorta incubados con el líquido de perfusión control, que no había pasado

por el pulmón; ii) anillos de aorta incubados con el líquido de perfusión problema procedente de los pulmones ventilados con  $V_T$  **elevado con daño pulmonar**; iii) anillos aórticos incubados con el Krebs problema del  $V_T$  elevado con daño pulmonar y preincubados con **tempol**. Los anillos de aorta preincubados con tempol, mostraron una mejoría significativa en la relajación en respuesta a concentraciones crecientes de Ach ( $p=0,017$ ) en relación con los anillos de aorta incubados con el líquido de Krebs sin fármaco (**Figura 53**).



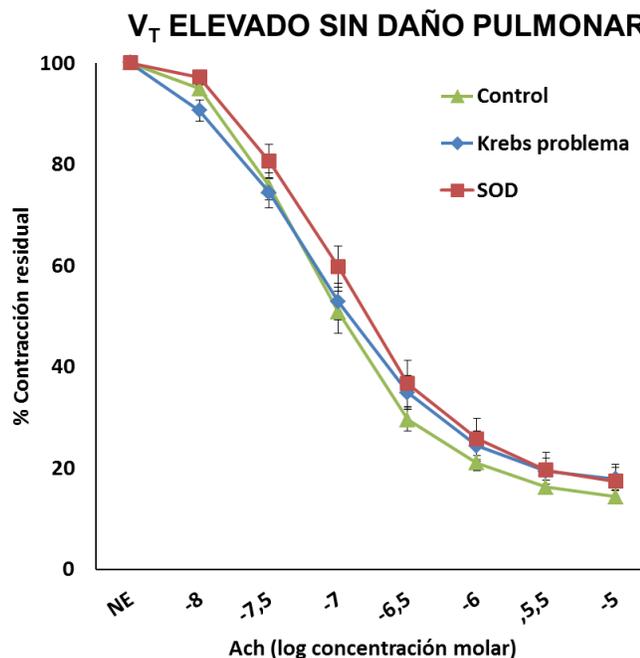
**Figura 53.** Curva dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **Ach** en anillos de aorta torácica incubados con líquido de perfusión **control**, líquido de perfusión **problema** procedente de los pulmones ventilados con  $V_T$  elevado con daño pulmonar y anillos aórticos preincubados con **tempol**. Se señala la significación estadística ( $p=0,000$ ) para la interacción dosis\*grupo VM (\*) entre las 3 curvas y la comparación Krebs problema vs. Tempol ( $\dagger$ ,  $p=0,017$ ).

En resumen, al preincubar los anillos de aorta con **tempol**, se encontró una disminución del déficit de relajación inducido por la ventilación mecánica con  $V_T$  elevado asociada a daño pulmonar.

## 2.3. Superóxido dismutasa

### 2.3.1. $V_T$ elevado sin daño pulmonar

Se compararon las curvas dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **Ach** entre: i) anillos de aorta incubados con el líquido de perfusión control, que no había pasado por el pulmón; ii) anillos de aorta incubados con el líquido de perfusión problema procedente de los pulmones ventilados **con  $V_T$  elevado sin daño pulmonar**; iii) anillos aórticos incubados con el Krebs problema del  $V_T$  elevado sin daño pulmonar y preincubados con **SOD**. No existieron diferencias estadísticamente significativas entre los 3 grupos ( $p=0,056$ ) (**Figura 54**).

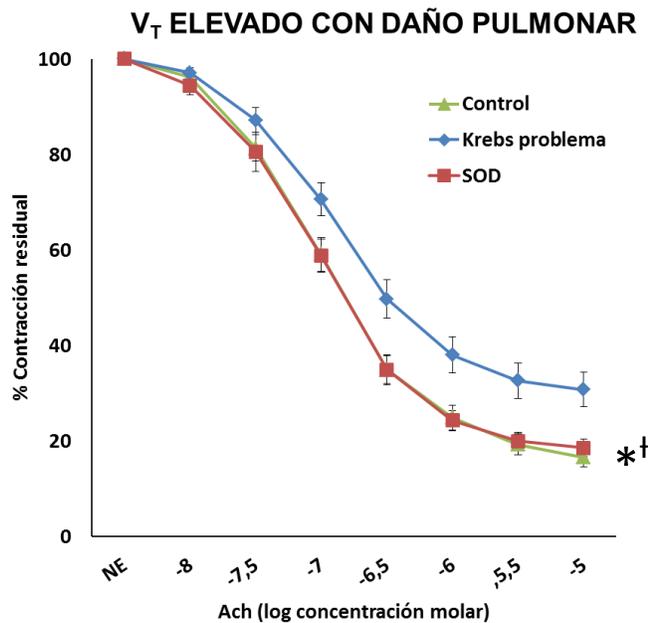


**Figura 54.** Curva dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **Ach** en anillos de aorta torácica incubados con líquido de perfusión **control**, líquido de perfusión **problema** procedente de los pulmones ventilados con  **$V_T$  elevado sin daño pulmonar** y anillos aórticos preincubados con **SOD** (Interacción dosis\*grupo VM,  $p=0,056$ ).

### 2.3.2. $V_T$ elevado con daño pulmonar

Se compararon las curvas dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **Ach** entre: i) anillos de aorta incubados con el líquido de perfusión control, que no había pasado

por el pulmón; ii) anillos de aorta incubados con el líquido de perfusión problema procedente de los pulmones ventilados con  $V_T$  **elevado con daño pulmonar**; iii) anillos aórticos incubados con el Krebs problema del  $V_T$  elevado sin daño pulmonar y preincubados con **SOD**. Los anillos preincubados con SOD, mostraron una mejoría significativa en la relajación en relación a los anillos incubados con el líquido de Krebs problema sin fármaco ( $p=0,034$ ) (**Figura 55**).



**Figura 55.** Curva dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **ACh** en anillos de aorta torácica incubados con líquido de perfusión **control**, líquido de perfusión **problema** procedente de los pulmones ventilados con  $V_T$  **elevado con daño pulmonar** y anillos aórticos preincubados con **SOD**. Se señala la significación estadística ( $p=0,001$ ) para la interacción dosis\*grupo VM (\*) entre las 3 curvas y la comparación Krebs problema vs. SOD (†,  $p=0,034$ ).

En resumen, los anillos de aorta preincubados con **SOD** y el líquido de perfusión procedente de los pulmones ventilados con  $V_T$  elevado con daño pulmonar, mostraron una mejoría no significativa en la relajación.

### 3. EFECTO DE LOS FÁRMACOS INHIBIDORES DEL ESTRÉS NITRO-OXIDATIVO SOBRE LA FUNCIÓN CONTRÁCTIL

Se exponen las curvas dosis-respuesta a concentraciones crecientes de NE para cada fármaco estudiado (metaloporfirina, tempol y SOD) en cada grupo de ventilación ( $V_T$  bajo y  $V_T$  elevado). Los valores de las curvas son media  $\pm$  EEM.

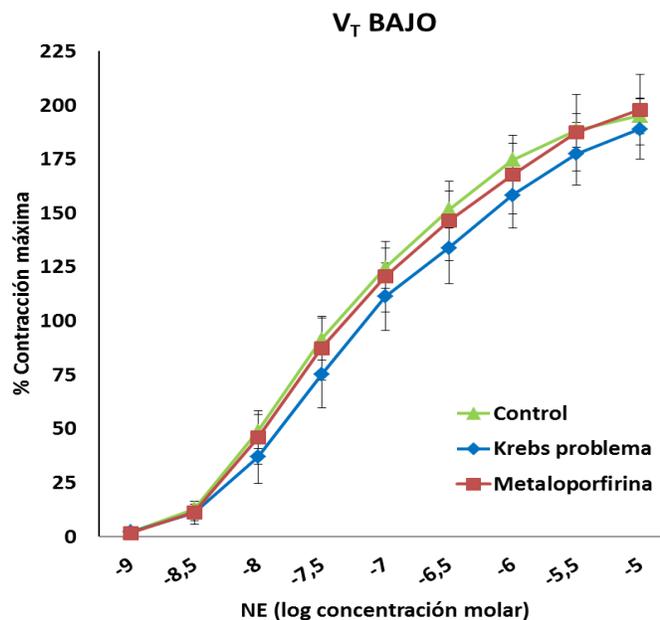
**Resumen de los resultados del objetivo 5 (función contráctil):** valorar si las alteraciones en la función vascular asociadas al VILI eran debidas a un aumento del estrés nitro-oxidativo.

- En los anillos aórticos preincubados con **metaloporfirina**, se encontró una **mejoría no significativa** de la contracción en todos los grupos de VM, sobre todo en el grupo de  $V_T$  elevado sin daño pulmonar.
- En los anillos de aorta preincubados con **tempol**, se observó un **empeoramiento** de la alteración en la contracción inducida por la VM con  **$V_T$  elevado**, sobre todo en los pulmones ventilados con  **$V_T$  elevado con daño pulmonar**, y una **mejoría** en la contracción en el grupo de  **$V_T$  bajo**.
- Los anillos de aorta preincubados con **SOD**, mostraron un **empeoramiento significativo** de la contracción en los pulmones ventilados con  **$V_T$  bajo** y los pulmones ventilados con  **$V_T$  elevado con daño pulmonar**.

### 3.1. Metaloporfirina

#### 3.1.1. $V_T$ bajo

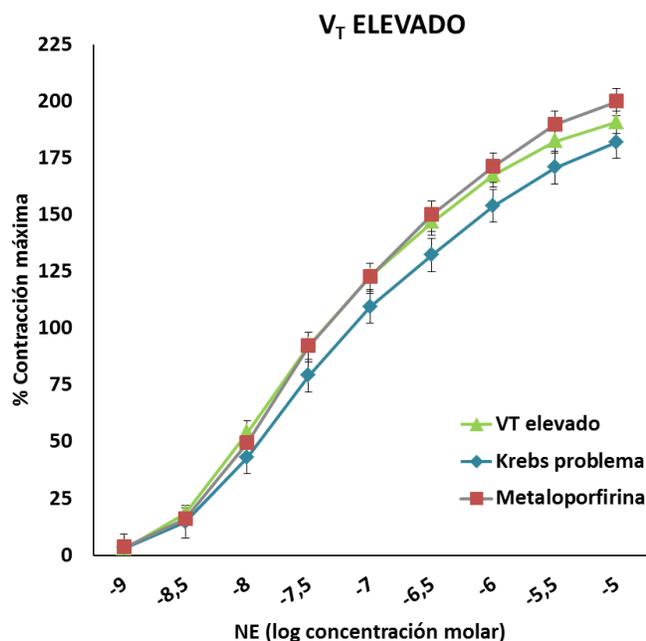
Se compararon las curvas dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **NE** entre: i) anillos de aorta incubados con el líquido de perfusión control, que no había pasado por el pulmón; ii) anillos de aorta incubados con el líquido de perfusión problema procedente de los pulmones ventilados con  **$V_T$  bajo**; iii) anillos aórticos incubados con el Krebs problema del  $V_T$  bajo y preincubados con **metaloporfirina**. No existieron diferencias estadísticamente significativas entre los 3 grupos ( $p=0,814$ ) (**Figura 56**).



**Figura 56.** Curva dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **NE** en anillos de aorta torácica incubados con líquido de perfusión **control**, líquido de perfusión **problema** procedente de los pulmones ventilados con  **$V_T$  bajo** y anillos aórticos preincubados con **metaloporfirina** (Interacción dosis\*grupo VM,  $p=0,814$ ).

### 3.1.2. $V_T$ elevado

Se compararon las curvas dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **NE** entre: i) anillos de aorta incubados con el líquido de perfusión control, que no había pasado por el pulmón; ii) anillos de aorta incubados con el líquido de perfusión problema procedente de los pulmones ventilados con  **$V_T$  elevado**; iii) anillos aórticos incubados con el Krebs problema del  $V_T$  elevado y preincubados con **metaloporfirina**. Los anillos preincubados con metaloporfirina mostraron una mejoría no significativa en la relajación, respecto a los anillos incubados con líquido de Krebs sin fármaco ( $p=0,065$ ) (**Figura 57**).



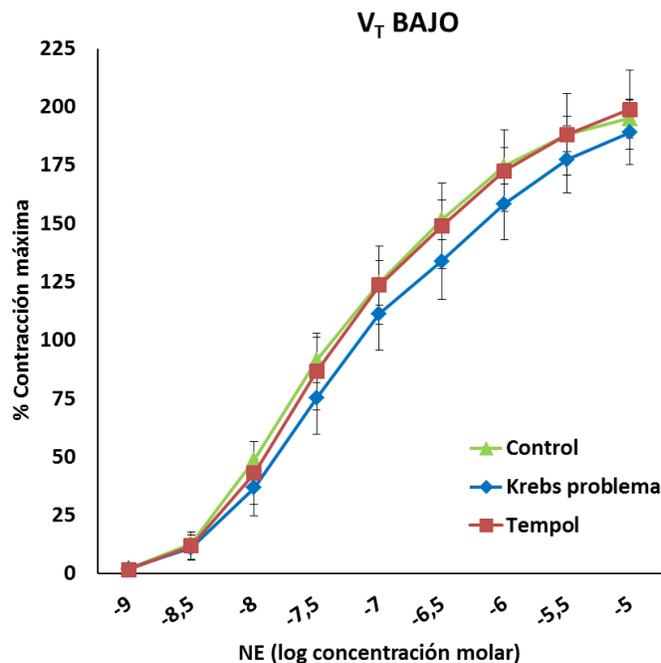
**Figura 57.** Curva dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **NE** en anillos de aorta torácica incubados con líquido de perfusión **control**, líquido de perfusión **problema** procedente de los pulmones ventilados con  **$V_T$  elevado** y anillos aórticos preincubados con **metaloporfirina** ( $p=0,065$ , metaloporfirina vs. Krebs problema).

Por tanto, al preincubar los anillos de aorta con **metaloporfirina**, mejoró de manera no significativa la alteración en la contracción inducida por la VM en ambos grupos de ventilación.

### 3.2. Tempol

#### 3.2.1. $V_T$ bajo

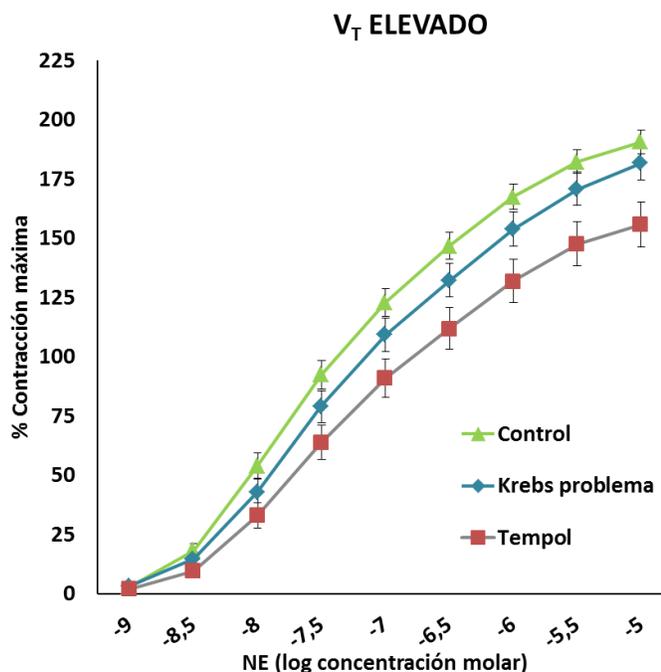
Se compararon las curvas dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **NE** entre: i) anillos de aorta incubados con el líquido de perfusión control, que no había pasado por el pulmón; ii) anillos de aorta incubados con el líquido de perfusión problema procedente de los pulmones ventilados con  **$V_T$  bajo**; iii) anillos aórticos incubados con el Krebs problema del  $V_T$  bajo y preincubados con **tempol**. No existieron diferencias estadísticamente significativas entre los 3 grupos, aunque los anillos preincubados con tempol mostraron una mejoría no significativa en la contracción ( $p=0,651$ ) (**Figura 58**).



**Figura 58.** Curva dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **NE** en anillos de aorta torácica incubados con líquido de perfusión **control**, líquido de perfusión **problema** procedente de los pulmones ventilados con  **$V_T$  bajo** y anillos aórticos preincubados con **tempol** ( $p=0,651$ , tempol vs. Krebs problema).

### 3.2.2. $V_T$ elevado

Se compararon las curvas dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **NE** entre: i) anillos de aorta incubados con el líquido de perfusión control, que no había pasado por el pulmón; ii) anillos de aorta incubados con el líquido de perfusión problema procedente de los pulmones ventilados con  $V_T$  **elevado**; iii) anillos aórticos incubados con el Krebs problema del  $V_T$  elevado y preincubados con **tempol**. Los anillos de aorta preincubados con tempol, mostraron un empeoramiento en la contracción aunque no fue significativo ( $p=0,052$ ) (**Figura 59**).



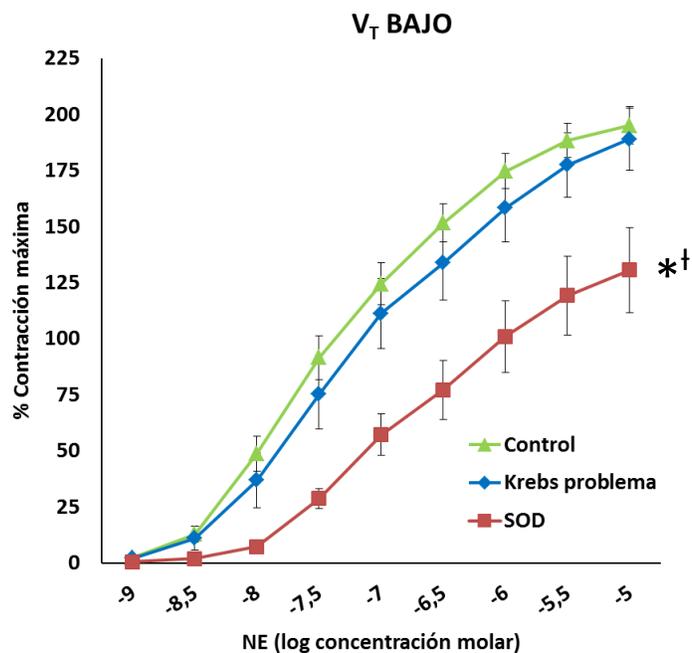
**Figura 59.** Curva dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **NE** en anillos de aorta torácica incubados con líquido de perfusión **control**, líquido de perfusión **problema** procedente de los pulmones ventilados con  $V_T$  **elevado** y anillos aórticos preincubados con **tempol** ( $p=0,052$ , tempol vs. Krebs problema).

En resumen, al preincubar los anillos de aorta con **tempol**, se observó un empeoramiento de la alteración en la contracción inducida por la VM con  $V_T$  elevado, y una mejoría en la contracción en el grupo de  $V_T$  bajo.

### 3.3. Superóxido dismutasa

#### 3.3.1. $V_T$ bajo

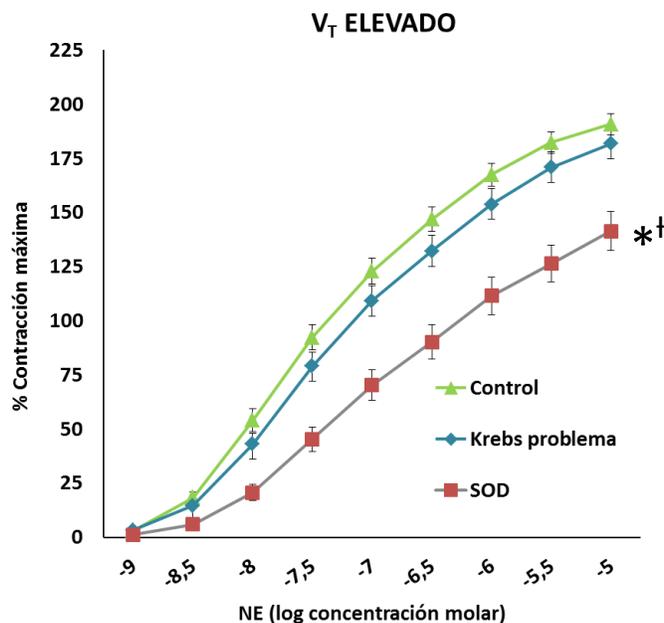
Se compararon las curvas dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **NE** entre: i) anillos de aorta incubados con el líquido de perfusión control, que no había pasado por el pulmón; ii) anillos de aorta incubados con el líquido de perfusión problema procedente de los pulmones ventilados con  $V_T$  bajo; iii) anillos aórticos incubados con el Krebs problema del  $V_T$  bajo y preincubados con **SOD**. Al preincubar los anillos de aorta con SOD se encontró un empeoramiento significativo en la función contráctil ( $p=0,015$ ) (**Figura 60**).



**Figura 60.** Curva dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **NE** en anillos de aorta torácica incubados con líquido de perfusión **control**, líquido de perfusión **problema** procedente de los pulmones ventilados con  $V_T$  bajo y anillos aórticos preincubados con **SOD**. Se señala la significación estadística ( $p=0,000$ ) para la interacción dosis\*grupo (\*) entre las 3 curvas y de la comparación entre el Krebs problema vs. SOD (†,  $p=0,015$ ).

### 3.3.2. $V_T$ elevado.

Se compararon las curvas dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **NE** entre: i) anillos de aorta incubados con el líquido de perfusión control, que no había pasado por el pulmón; ii) anillos de aorta incubados con el líquido de perfusión problema procedente de los pulmones ventilados con  $V_T$  **elevado**; iii) anillos aórticos incubados con el Krebs problema del  $V_T$  elevado y preincubados con **SOD**. Al preincubar los anillos de aorta con SOD se encontró un empeoramiento significativo en la función contráctil ( $p=0,003$ ) (**Figura 61**).



**Figura 61.** Curva dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **NE** en anillos de aorta torácica incubados con líquido de perfusión **control**, líquido de perfusión **problema** procedente de los pulmones ventilados con  $V_T$  **elevado** y anillos aórticos preincubados con **SOD**. Se señala la significación estadística ( $p=0,000$ ) para la interacción dosis\*grupo (\*) entre las 3 curvas y de la comparación entre el Krebs problema vs. SOD (†,  $p=0,003$ ).

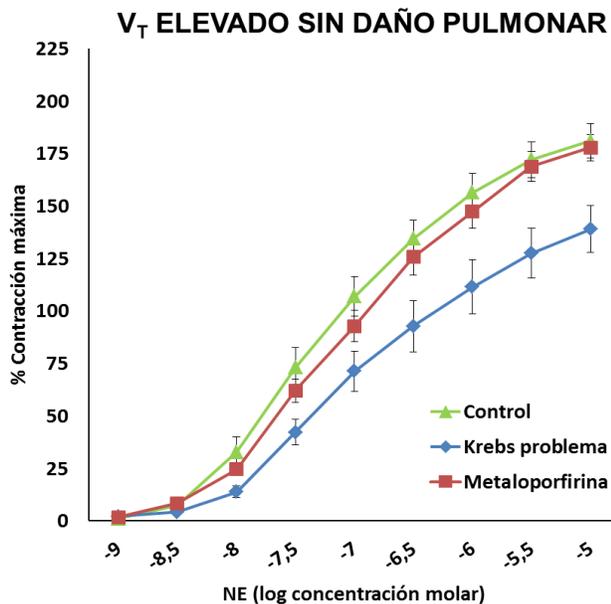
En resumen, al preincubar los anillos de aorta con **SOD**, se observó un empeoramiento de la alteración en la contracción inducida por la VM en ambos grupos de ventilación.

#### 4. EFECTO DE LOS FÁRMACOS INHIBIDORES DEL ESTRÉS NITRO-OXIDATIVO SOBRE LA CONTRACCIÓN EN FUNCIÓN DEL DAÑO PULMONAR

##### 4.1. Metaloporfirina

##### 4.1.1. $V_T$ elevado sin daño pulmonar

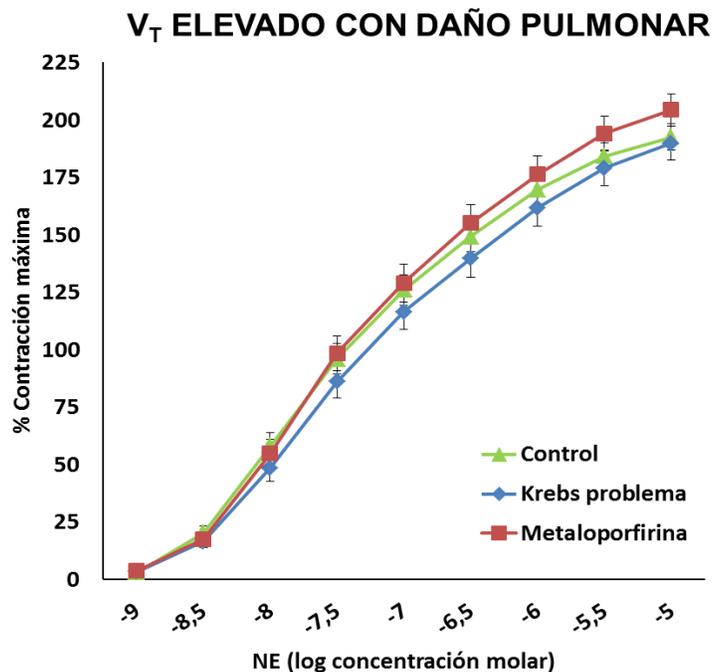
Se compararon las curvas dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **NE** entre: i) anillos de aorta incubados con el líquido de perfusión control, que no había pasado por el pulmón; ii) anillos de aorta incubados con el líquido de perfusión problema procedente de los pulmones ventilados con  **$V_T$  elevado sin daño pulmonar**; iii) anillos aórticos incubados con el Krebs problema del  $V_T$  elevado sin daño pulmonar y preincubados con **metaloporfirina**. La metaloporfirina mejoró la contracción en relación a los anillos incubados con el Krebs problema, aunque las diferencias no fueron significativas ( $p=0,339$ ) (**Figura 62**).



**Figura 62.** Curva dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **NE** en anillos de aorta torácica incubados con líquido de perfusión **control**, líquido de perfusión **problema** procedente de los pulmones ventilados con  **$V_T$  elevado sin daño pulmonar** y anillos aórticos preincubados con **metaloporfirina** ( $p=0,339$ , metaloporfirina vs. Krebs problema).

#### 4.1.2. $V_T$ elevado con daño pulmonar

Se compararon las curvas dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **NE** entre: i) anillos de aorta incubados con el líquido de perfusión control, que no había pasado por el pulmón; ii) anillos de aorta incubados con el líquido de perfusión problema procedente de los pulmones ventilados con  **$V_T$  elevado con daño pulmonar**; iii) anillos aórticos incubados con el Krebs problema del  $V_T$  elevado con daño pulmonar y preincubados con **metaloporfirina**. La metaloporfirina no mejoró de forma significativa la contracción en relación al control ( $p=0,189$ ) (**Figura 63**).



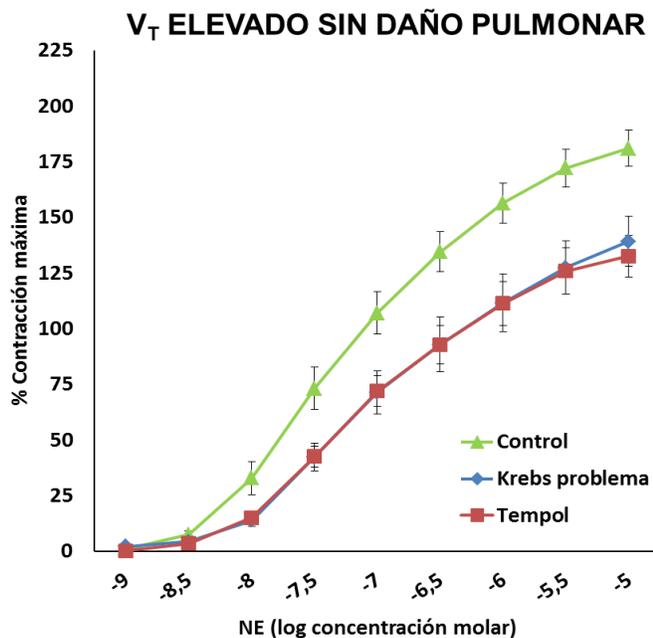
**Figura 63.** Curva dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **NE** en anillos de aorta torácica incubados con líquido de perfusión **control**, líquido de perfusión **problema** procedente de los pulmones ventilados con  **$V_T$  elevado con daño pulmonar** y anillos aórticos preincubados con **metaloporfirina** ( $p=0,189$ , metaloporfirina vs. Krebs problema).

Por tanto, al preincubar los anillos de aorta con **metaloporfirina**, mejoró de forma no significativa la alteración en la contracción inducida por la VM.

## 4.2. Tempol

### 4.2.1. $V_T$ elevado sin daño pulmonar

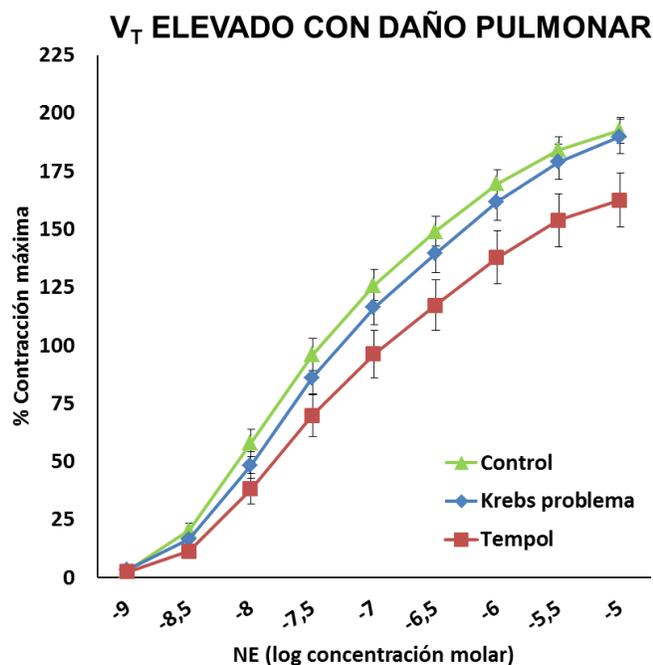
Se compararon las curvas dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **NE** entre: i) anillos de aorta incubados con el líquido de perfusión control, que no había pasado por el pulmón; ii) anillos de aorta incubados con el líquido de perfusión problema procedente de los pulmones ventilados con  **$V_T$  elevado sin daño pulmonar**; iii) anillos aórticos incubados con el Krebs problema del  $V_T$  elevado sin daño pulmonar y preincubados con **tempol**. El tempol no modificó la respuesta contráctil de los anillos incubados con el Krebs problema ( $p=0,782$ ) (**Figura 64**).



**Figura 64.** Curva dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **NE** en anillos de aorta torácica incubados con líquido de perfusión **control**, líquido de perfusión **problema** procedente de los pulmones ventilados con  **$V_T$  elevado sin daño pulmonar** y anillos aórticos preincubados con **tempol** ( $p=0,782$ , tempol vs. Krebs problema).

#### 4.2.2. $V_T$ elevado con daño pulmonar

Se compararon las curvas dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **NE** entre: i) anillos de aorta incubados con el líquido de perfusión control, que no había pasado por el pulmón; ii) anillos de aorta incubados con el líquido de perfusión problema procedente de los pulmones ventilados con  **$V_T$  elevado con daño pulmonar**; iii) anillos aórticos incubados con el Krebs problema del  $V_T$  elevado con daño pulmonar y preincubados con **tempol**. Los anillos de aorta preincubados con tempol, mostraron un empeoramiento no significativo en la contracción en relación a los anillos incubados con el Krebs problema ( $p=0,068$ ) (**Figura 65**).



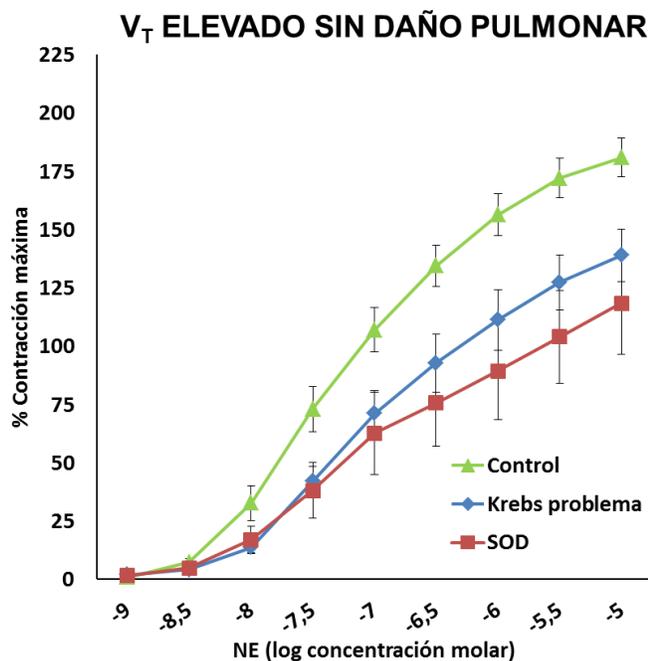
**Figura 65.** Curva dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **NE** en anillos de aorta torácica incubados con líquido de perfusión **control**, líquido de perfusión **problema** procedente de los pulmones ventilados con  **$V_T$  elevado con daño pulmonar** y anillos aórticos preincubados con **tempol** ( $p=0,068$ , tempol vs. Krebs problema).

En resumen, al preincubar los anillos de aorta con **tempol**, se observó un empeoramiento no significativo de la contracción en el grupo de  $V_T$  elevado con daño pulmonar.

### 4.3. Superóxido dismutasa

#### 4.3.1. $V_T$ elevado sin daño pulmonar

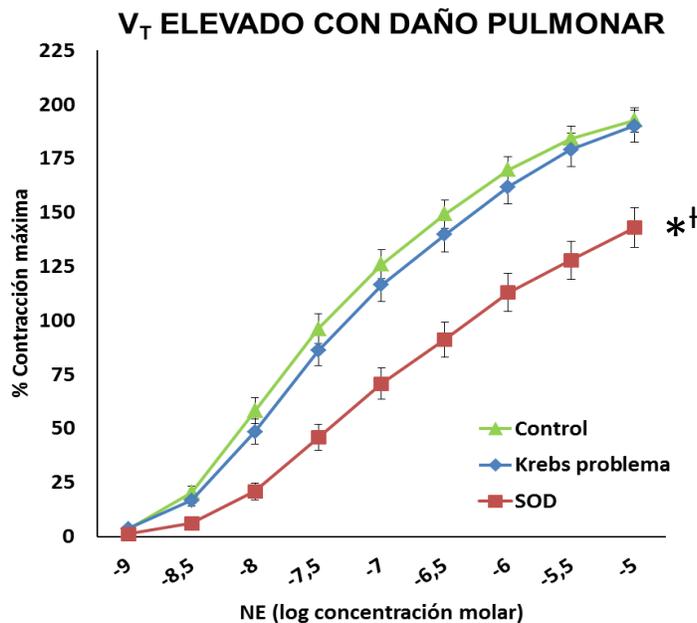
Se compararon las curvas dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **NE** entre: i) anillos de aorta incubados con el líquido de perfusión control, que no había pasado por el pulmón; ii) anillos de aorta incubados con el líquido de perfusión problema procedente de los pulmones ventilados con  **$V_T$  elevado sin daño pulmonar**; iii) anillos aórticos incubados con el Krebs problema del  $V_T$  elevado sin daño pulmonar y preincubados con **SOD**. Al preincubar los anillos de aorta con SOD se encontró un empeoramiento no significativo en la función contráctil ( $p=0,445$ ) (**Figura 66**).



**Figura 66.** Curva dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **NE** en anillos de aorta torácica incubados con líquido de perfusión **control**, líquido de perfusión **problema** procedente de los pulmones ventilados con  **$V_T$  elevado sin daño pulmonar** y anillos aórticos preincubados con **SOD** ( $p=0,445$ , SOD vs. Krebs problema).

**4.3.2.  $V_T$  elevado con daño pulmonar**

Se compararon las curvas dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **NE** entre: i) anillos de aorta incubados con el líquido de perfusión control, que no había pasado por el pulmón; ii) anillos de aorta incubados con el líquido de perfusión problema procedente de los pulmones ventilados con  **$V_T$  elevado con daño pulmonar**; iii) anillos aórticos incubados con el Krebs problema del  $V_T$  elevado con daño pulmonar y preincubados con **SOD**. Al preincubar los anillos de aorta con SOD, se produjo un empeoramiento significativo en la función contráctil en relación a los anillos incubados líquido de Krebs problema sin fármacos ( $p=0,000$ ) (**Figura 67**).



**Figura 67.** Curva dosis-respuesta a concentraciones crecientes de **NE** en anillos de aorta torácica incubados con líquido de perfusión **control**, líquido de perfusión **problema** procedente de los pulmones ventilados con  **$V_T$  elevado con daño pulmonar** y anillos aórticos preincubados con **SOD**. Se señala la significación estadística ( $p=0,000$ ) para la interacción dosis\*grupo (\*) entre las 3 curvas y de la comparación entre el Krebs problema vs. SOD (†,  $p=0,000$ ).

En resumen, los anillos preincubados con **SOD** y posteriormente con líquido de Krebs problema procedente de pulmones ventilados con  $V_T$  elevado con daño pulmonar, mostraron un empeoramiento significativo de la función contráctil.

## **VII. Discusión**

### JUSTIFICACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL EMPLEADO

La hipótesis principal de este trabajo es que el daño pulmonar inducido por la ventilación mecánica (“*ventilator-induced lung injury*”, VILI) se asocia con alteración en la función vascular.

Para corroborar esta hipótesis hemos desarrollado dos modelos *ex vivo*, uno de VILI y otro de disfunción vascular. Nuestro objetivo es contestar a las siguientes preguntas: ¿Es válido y relevante clínicamente nuestro modelo de VILI? ¿Este modelo asocia daño pulmonar y de órganos a distancia (sistema cardiovascular)?

Para contestar a estas preguntas se discuten a continuación las características del modelo experimental utilizado y su validez como modelo de VILI.

El modelo animal utilizado consiste en un modelo murino de pulmón aislado, ventilado y perfundido *ex vivo*. Para inducir daño pulmonar se usan parámetros lesivos de ventilación mecánica, con un volumen *tidal* ( $V_T$ ) de 25 ml/kg y una presión espiratoria la final de la espiración (PEEP) de 0 cm H<sub>2</sub>O. Se trata de un modelo de VILI conocido, en el cual nuestro grupo tiene una amplia experiencia, tanto *in vivo* [12,13,16,91] como *ex vivo* [129].

El primer objetivo que se plantea en el presente proyecto es que la VM con volumen corriente elevado induce lesión pulmonar. Se sabe que el factor clave en el daño pulmonar inducido por la VM es la sobredistensión pulmonar, que se relaciona con el uso de volúmenes pulmonares elevados más que con el empleo presiones pico altas, lo que se conoce como “*volutrauma*” [49–51]. Diversos trabajos han objetivado que el uso de  $V_T$  elevado se relaciona con edema pulmonar, daño alveolar difuso, aumento de la permeabilidad epitelial y microvascular [46,53]

El  $V_T$  utilizado en nuestro modelo se encuentra en el rango usado en otros trabajos con ratas (entre 20 y 42 ml/kg) [5,7,9,13,50]. Es cierto que el volumen corriente empleado es muy superior al utilizado en pacientes, donde no se recomienda rebasar los 8 ml/kg [4]. Sin embargo, esto no es una limitación, dado que la finalidad del modelo es usar parámetros agresivos de VM para inducir un biotrauma y así reproducir los hallazgos que presentan los

## Discusión

pacientes afectos de síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA). De esta forma, se pueden analizar los mecanismos del daño pulmonar inducido por la VM e investigar estrategias preventivas y terapéuticas. Además, para inducir daño pulmonar en ratas, se precisan volúmenes corrientes más elevados de los utilizados en pacientes [32,130]. Los cálculos basados en modelos animales sugieren que si el volumen pulmonar se incrementa de un 40% a un 100% de la capacidad pulmonar total, el área de la superficie basal de las células epiteliales alveolares aumenta un 35% [130]. Por otro lado, los animales son ventilados durante periodos cortos de tiempo, mientras que los pacientes requieren VM durante días o semanas.

En nuestro modelo el grupo control se ventiló con un volumen corriente de 6 ml/kg y una PEEP de 5 cm H<sub>2</sub>O, parámetros que no producen sobredistensión pulmonar y son considerados “protectores” en pacientes [4]. El volumen corriente utilizado en el grupo control está dentro del rango de  $V_T$  utilizados en otros trabajos, que oscilan entre 5-9 ml/kg [5,9,10,13,16,18,22]. Aunque este volumen *tidal* se considera “protector” en pacientes, existen trabajos en animales donde se ha demostrado que incluso usando un  $V_T$  bajo en animales sanos se producen cambios histológicos y aumento de mediadores inflamatorios. En un modelo de VILI en ratones previamente sanos, que compara el uso de  $V_T$  de 15 ml/kg,  $V_T$  de 7,5 ml/kg y un grupo control de animales no ventilados, se objetivaron alteraciones histológicas en el grupo ventilado con  $V_T$  bajo en comparación con el grupo no ventilado, aunque en menor medida que en el grupo de  $V_T$  elevado [3]. Estos autores especulan que una posible explicación del daño pulmonar en el caso de los animales ventilados con  $V_T$  bajo sería el desarrollo de atelectasias. Dadas las características del modelo, en nuestro caso, la inclusión de un grupo de referencia no ventilado no es posible, por lo que aunque se produzca un cierto grado de sobredistensión y daño pulmonar al ventilar con  $V_T$  bajo, consideramos que nuestro grupo control es válido.

En nuestro modelo, al igual que en trabajos similares, se aplicó una PEEP de 5 cm H<sub>2</sub>O, dado que existen evidencias del efecto protector al añadir una presión positiva al final de la espiración [7,53]. El efecto protector de la PEEP ha sido corroborado también en estudios en pacientes [94,95].

## Discusión

En cuanto a la frecuencia respiratoria, algunos autores han sugerido que la utilización de frecuencias elevadas contribuiría al desarrollo de edema pulmonar y la producción de citoquinas inflamatorias [131]. La frecuencia respiratoria tiene además una repercusión sobre los niveles de CO<sub>2</sub>. Rich *et al.* evaluaron el efecto de la frecuencia respiratoria en un modelo de VILI en ratas [131]. Durante la ventilación con V<sub>T</sub> bajo (7 ml/kg), el hecho de aumentar la frecuencia respiratoria no influyó en el desarrollo de edema pulmonar ni indujo un aumento de citoquinas (CQs). Sin embargo, al ventilar con V<sub>T</sub> elevado (40 ml/kg), los animales sometidos a frecuencias respiratorias de 40 respiraciones por minuto (rpm), mostraban más edema pulmonar, aumento de LDH en el lavado broncoalveolar (LBA) y niveles más elevados de CQs, respecto a los ventilados con frecuencias de 20 rpm. Una menor frecuencia respiratoria, limita el colapso y expansión cíclicos de los alveolos, y disminuye la presión media en la vía aérea, reduciendo la sobredistensión alveolar. En nuestro caso, se programó una frecuencia respiratoria de 60 respiraciones por minuto, adecuada a la especie animal utilizada.

### Validez del modelo animal de VILI

Dada la cantidad de publicaciones existente en relación al daño pulmonar en animales, se podría pensar que la respuesta a la pregunta: ¿Qué es el daño pulmonar agudo en un animal?, es fácil, pero no es así. No existe un acuerdo universal en cuanto a la definición de la lesión pulmonar aguda (“*acute lung injury*”, ALI) en modelos animales. Algunos autores se basan en parámetros de inflamación, como la concentración de citoquinas en tejido pulmonar o de células inflamatorias en el intersticio o los alveolos; otros en los cambios en la permeabilidad alveolo-capilar. Ningún marcador o parámetro tiene la suficiente sensibilidad y especificidad por sí solo para identificar todas las formas y espectro de gravedad de la lesión pulmonar aguda. Esto es importante a la hora de definir en un modelo animal, si con una determinada intervención, se puede prevenir o tratar el daño pulmonar agudo. Por otro lado, una definición precisa de ALI en los modelos animales, ayudaría a la comparación entre diversos trabajos.

## Discusión

En humanos, la definición de ALI se basa en criterios clínicos, radiológicos y gasométricos [29,30]. Sin embargo, no es sencillo aplicar dichos criterios a los animales de experimentación. Por ejemplo, aunque la realización de gasometrías arteriales, radiografías o ecocardiografías es posible en animales pequeños, su complejidad técnica y escasa disponibilidad (el equipo requerido para su realización no está disponible en todos los laboratorios), limitan su uso. Por otro lado, algunos modelos experimentales son incompatibles con la realización de algunas de estas técnicas, por ejemplo, el modelo de pulmón aislado ventilado y perfundido. Una posibilidad, sería definir el daño pulmonar en los animales en base a criterios histológicos. En humanos, el correlato patológico de la lesión pulmonar aguda es el daño alveolar difuso (DAD), caracterizado por infiltrados inflamatorios, engrosamiento de los septos alveolares y depósito de membranas hialinas. Sin embargo, ninguno de los modelos de ALI reproduce todas las características histológicas del DAD.

En base a estas reflexiones, Matute-Bello *et al.* publicaron un consenso realizado mediante el método Delphi, para definir las características que debe reunir un modelo animal de ALI, así como una discusión sobre los diferentes métodos de evaluación de daño pulmonar [126].

Estos autores consideran que un modelo de VILI debe tener al menos 3 de estas 4 características: evidencia histológica de daño tisular, alteración de la membrana alveolo-capilar, presencia de respuesta inflamatoria y evidencia de disfunción fisiológica.

En nuestro modelo animal se objetivó la presencia de daño alveolar difuso en el análisis anatomopatológico, considerado el *gold standard* en el diagnóstico de SDRA en pacientes (*vide infra*).

La disfunción fisiológica se evidenció de forma indirecta por los cambios en la mecánica pulmonar, caracterizados por un aumento del delta de PIP y un descenso de la distensibilidad dinámica en el los pulmones ventilados con  $V_T$  elevado. Sin embargo, en nuestro modelo de VILI, objetivamos que no todos los pulmones ventilados con  $V_T$  elevado presentaban estos cambios en la mecánica pulmonar. Con parámetros similares de VM, algunos pulmones experimentaron un aumento progresivo de la PIP, disminución de la distensibilidad, edema macroscópico y datos histológicos de DAD, mientras que en otros pulmones, la PIP permaneció estable a lo largo del experimento, la distensibilidad dinámica

## Discusión

no se modificó sustancialmente, no mostraban alteraciones macroscópicas, y en el estudio histológico presentaban menos daño histológico.

Por otro lado, en nuestro modelo se evidenció una alteración de la permeabilidad de la membrana alveolo-capilar, caracterizada por la formación de edema no cardiogénico, apreciado por el investigador durante la realización de los experimentos, en el caso de los pulmones ventilados con  $V_T$  elevado, aunque no fue cuantificado. Como se ha comentado en la introducción, la disrupción de la barrera alveolo-capilar juega un papel crucial en el desarrollo del daño pulmonar inducido por la ventilación mecánica. Esta barrera está formada por células epiteliales alveolares y endoteliales. El daño mecánico producido por la ventilación, lesiona dichas células y produce un aumento de permeabilidad hacia el espacio alveolar. Esto se traduce en una fuga de fluido rico en proteínas del espacio vascular al espacio intersticial y/o alveolar. Para objetivar este aumento de la permeabilidad alveolo-capilar existen varios métodos [126]. Una manera sería la cuantificación de las proteínas en el LBA y su *ratio* respecto a la concentración en suero. La determinación de albúmina, o en modelos *in vivo* de IgM, en el fluido broncoalveolar, es indicativa de un aumento de la permeabilidad alveolo-capilar, puesto que su procedencia es exclusivamente intravascular. La medición de la concentración total de proteínas en el LBA puede estar artefactada por la presencia de proteínas derivadas de las células epiteliales o inflamatorias en los espacios alveolares. También se puede determinar la presencia de albúmina marcada con isótopos radioactivos. Otro método es cálculo del *ratio* entre el peso del pulmón húmedo *versus* seco. Otra forma, sería la recolección del edema pulmonar y medición de la concentración de proteínas en el fluido en relación al plasma. En un trabajo previo de nuestro grupo en un modelo similar [129], se objetivó hiperpermeabilidad alveolo-capilar, con un aumento de la concentración de las proteínas totales en el LBA. En este caso, no se determinó la concentración de albúmina en el LBA, pero el marcado aumento de la concentración proteica es poco probable que sea en relación con un aumento de células en el espacio alveolar. De la misma forma, otros trabajos en modelos *ex vivo* de VILI han demostrado daño en la barrera alveolo-capilar [7,132,133]. Dado que nuestro grupo había demostrado un aumento de la permeabilidad alveolo-capilar en un modelo previo similar al de esta tesis, en nuestro

## Discusión

trabajo no se llevó a cabo ningún método para objetivar la alteración de la membrana alveolo-capilar.

Finalmente, en nuestro trabajo no se estudió la respuesta inflamatoria pulmonar. En un modelo similar previo de nuestro grupo, se analizó la concentración de diversas citoquinas en tejido pulmonar, encontrando un aumento de las citoquinas de perfil anti-inflamatorio. Sin embargo, al estudiar la expresión génica, el patrón de genes indicaba una respuesta pro-inflamatoria.

Numerosos trabajos, tanto *in vivo* [5,12] como *ex vivo* [7,19,67], han documentado la respuesta inflamatoria asociada a VILI. Nin *et al.*, en un modelo *in vivo* de VILI, encontró una elevación de IL-6 y MIP-2, además de una correlación entre los niveles séricos de IL-6 y el score de daño pulmonar [5]. En otro trabajo de los mismos autores, usando el mismo modelo animal, se demostró que este aumento de IL-6 era atenuado con la administración de dexametasona [12]. Tremblay *et al.*, en un modelo de pulmón aislado no perfundido de rata, sanas o expuestas a LPS, sometidas a diferentes estrategias ventilatorias, concluyeron que la VM producía un aumento de citoquinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-6 y MIP-2), tanto en el pulmón sano como en el expuesto previamente a LPS, jugando un papel fundamental tanto en el inicio como en la propagación de la respuesta inflamatoria sistémica [7].

Esta disparidad de resultados, podría deberse a diversos factores, entre los que se encuentran las características del modelo (modelos *in vivo* o *ex vivo*, perfundidos o no), insulto único o doble (por ejemplo, LPS y VM), muestra utilizada para las determinaciones (mediciones realizadas en tejido pulmonar o en LBA), o al patrón temporal de la respuesta inflamatoria (al tratarse en la mayoría de los casos de modelos de corta duración).

### **Consideraciones sobre el modelo de pulmón aislado ventilado y perfundido**

Para contestar a la pregunta: ¿Nuestro modelo de VILI se asocia a daño de órganos a distancia, en concreto disfunción vascular?, desarrollamos un modelo *ex vivo* de pulmón y vasos. La ventaja fundamental del modelo de pulmón aislado ventilado y perfundido radica en que permite demostrar que es la respuesta inflamatoria pulmonar secundaria a la VM con

## Discusión

$V_T$  elevado la responsable del daño sistémico, en nuestro caso alteración en la función vascular en anillos aórticos procedentes de animales sanos distintos a los empleados para el experimento de ventilación mecánica. La referencia fundamental para nuestro modelo es el trabajo de Jaecklin *et al.*, en el que en un modelo *ex vivo* se perfundieron pulmones ventilados con  $V_T$  bajo con líquido de perfusión procedente de pulmones previamente ventilados con  $V_T$  elevado, produciéndose un descenso de la distensibilidad y un aumento de la concentración de proteínas en el LBA, respecto a los pulmones perfundidos con el líquido de perfusión control, que no había pasado por el pulmón. Por tanto, se demostró que el líquido de perfusión procedente de pulmones dañados, puede transferir el daño a otros pulmones ventilados con estrategia protectora [122].

Este concepto justifica la relevancia clínica de nuestro modelo, ya que explicaría por qué la mayoría de los pacientes que fallecen en el contexto de un SDRA, no lo hacen a consecuencia del fallo pulmonar, sino por el desarrollo de un fallo multiorgánico (FMO) [6,56].

En nuestro caso, el líquido de perfusión procedente de los pulmones ventilados, produjo una alteración en la función vascular, modificando la función endotelial y la respuesta contráctil de los anillos aórticos (*vide infra*).

Por otro lado, los modelos de pulmón aislado ventilado y perfundido, permiten evaluar el efecto de diferentes estrategias de VM sobre la lesión pulmonar, independientemente de la influencia de otras variables fisiológicas confundidoras. Por ejemplo, en los modelos *ex vivo*, no se produce un descenso del retorno venoso por aumento de la presión intratorácica al ventilar con  $V_T$  elevado, por lo que las alteraciones encontradas a distancia no son fruto de las alteraciones hemodinámicas. Además, al aislar los pulmones del resto del organismo, se salva la posible interferencia de la respuesta inflamatoria sistémica sobre los mecanismos de daño pulmonar. Finalmente, este modelo permite la administración de tratamientos vía intratraqueal o administrados en el líquido de perfusión [119].

La ventaja de este modelo en animales de pequeño tamaño como roedores, es su menor coste y mayor disponibilidad, lo que permite aumentar el tamaño de la muestra en los experimentos. Además, en roedores, el tiempo de ejecución de los experimentos es menor y

## Discusión

una vez adquirida una cierta experiencia en la cirugía el modelo es altamente reproducible [119]. Por otro lado, es importante estandarizar los protocolos de experimentación, así como el líquido de perfusión empleado, para hacer más comparables los diferentes trabajos [121].

### Consideraciones sobre la composición del líquido de perfusión

En este tipo de modelos es importante la composición y características del líquido de perfusión, siendo de especial importancia la presión oncótica, la temperatura, los gases inspiratorios administrados y la presión en la arteria pulmonar [119–121]. La composición del líquido de perfusión puede modificar la respuesta inflamatoria y la permeabilidad alveolo-capilar en el modelo experimental. La composición del líquido de perfusión utilizado en el presente modelo (solución de Krebs-Henseleit, KHS) se detalla en el apartado de Material y métodos.

El líquido de perfusión debe mantener una presión osmótica y oncótica similar a la sangre. Este aspecto es fundamental para no influir sobre la permeabilidad alveolo-capilar. La solución de Krebs-Henseleit usada en los experimentos contiene un 4% de albúmina sérica bovina. Varios trabajos han demostrado el papel beneficioso de la albúmina en el líquido de perfusión, ya que protege de la formación de edema. El efecto beneficioso de la albúmina se debe a la modulación de la permeabilidad a proteínas en el lecho vascular pulmonar [120,134,135].

Por otro lado, el líquido de perfusión debe proporcionar glucosa como fuente de energía del metabolismo energético y debe contener una composición electrolítica similar al contenido intravascular.

Otro aspecto importante es el mantenimiento de un pH constante durante el experimento, que se logra mediante la adición de carbógeno (20% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, con balance de nitrógeno) a la solución de Krebs y el mantenimiento de la temperatura a 37°C [120,136]. Este dato es importante pues el equilibrio ácido-base interviene en la regulación de numerosos procesos fisiológicos. Además, el burbujeo evita la precipitación de calcio.

En cuanto a la utilización de un líquido de perfusión sin elementos sanguíneos, esta decisión se tomó en base a evitar la interferencia de las células sanguíneas en el desarrollo

## Discusión

del daño pulmonar, ya que es conocido el papel de los neutrófilos en la lesión pulmonar [65]. Además, en un trabajo previo de nuestro grupo en este mismo modelo, se valoró el efecto de la composición del líquido de perfusión (con y sin sangre autóloga) sobre el desarrollo de daño pulmonar inducido por la ventilación mecánica [129].

En **resumen**, la relevancia clínica de nuestro modelo radica en que reproduce una condición patológica (el SDRA), producido exclusivamente por el daño mecánico secundario a la ventilación, y mediante la realización de un bioensayo, se demuestra la disfunción sistémica (en este caso del sistema cardiovascular), asociada al daño pulmonar inducido por la VM, que es la causante del FMO que sufren los pacientes en el seno de un SDRA.

### CARACTERIZACIÓN DE 2 FENOTIPOS EN RELACIÓN A LA RESPUESTA A LA VENTILACIÓN MECÁNICA CON VOLUMEN *TIDAL* ELEVADO

En nuestro modelo *ex vivo* de VILI, la ventilación con  $V_T$  elevado de 25 ml/kg, produjo una alteración en la mecánica respiratoria, como fue el aumento progresivo de la presión inspiratoria pico (PIP), aunque este hecho no ocurrió en todos los pulmones sometidos a esa estrategia ventilatoria. Como se ha explicado anteriormente, nuestro grupo había objetivado previamente este suceso, en un modelo *in vivo* [137]. Dado que en dicho trabajo el daño histológico se correlacionaba con el valor de PIP, se decidió realizar una curva ROC para encontrar el punto de corte de PIP máxima con una mejor sensibilidad y especificidad en relación a la presencia de membranas hialinas en el análisis histológico, ya que no disponíamos de muestras de pulmón de todos los experimentos realizados para clasificar los experimentos en base al daño pulmonar (Ver **Figura 19**). Aunque esta es una limitación importante, realizamos el estudio histológico en el 67% de los experimentos, y la sensibilidad alcanzada con el punto de PIP establecido fue de un 95,5%, por lo que consideramos que nuestra aproximación para establecer los diferentes grupos en nuestro trabajo es válida.

Una vez obtenido el punto de corte de PIP, en nuestro caso mayor o igual de 15 cm  $H_2O$ , se establecieron 2 patrones en los pulmones ventilados con  $V_T$  elevado, denominados

## Discusión

$V_T$  elevado sin daño pulmonar (equivalente a los experimentos con PIP máxima  $<15$  cm H<sub>2</sub>O) y  $V_T$  elevado con daño pulmonar (experimentos con PIP máxima  $\geq 15$  cm H<sub>2</sub>O).

Puesto que preveíamos que al ventilar con  $V_T$  elevado no todos los animales sufrirían daño pulmonar, esta consideración se tuvo en cuenta al calcular el tamaño de la muestra (ver Tamaño de la muestra en **Material y métodos**).

En base a este análisis, en los resultados hemos analizado si el efecto de la VM sobre el pulmón, el daño sistémico y la función vascular, fue diferente en aquellos animales cuyos pulmones mostraron daño histológico en respuesta a la VM, respecto a aquellos animales cuyos pulmones no se alteraron al ser ventilados con  $V_T$  elevado.

El objetivo del presente trabajo, no fue estudiar los mecanismos que explicarían esta susceptibilidad o respuesta pulmonar y sistémica diferente al mismo insulto, en nuestro caso la ventilación con  $V_T$  elevado. Sin embargo, como se observa en los resultados, el subgrupo de animales ventilado con  $V_T$  elevado que no sufre daño pulmonar, se comporta de manera similar al grupo control, en nuestro caso, el ventilado con  $V_T$  bajo, en cuanto a la mecánica pulmonar.

De manera especulativa, se podrían plantear diferentes explicaciones al hecho de que un mismo insulto produzca dos tipos de respuesta en animales de las mismas características, en nuestro caso ratas macho Sprague-Dawley (SD) de un rango de peso concreto y unas características genéticas similares.

En primer lugar, podrían existir diferencias genéticas en los animales de experimentación utilizados. Esta sería una posibilidad, aun cuando las ratas usadas son criadas en nuestro animalario y por tanto su genética debería ser similar. Sin embargo, las condiciones medioambientales pueden modificar la activación o no de ciertos genes. Los cambios epigenéticos permiten la regulación de la expresión de proteínas activando o desactivando determinados genes, mediante diversos mecanismos, como la metilación del DNA, la modificación de histonas y la modulación de micro-RNAs [138].

En estudios clínicos se ha objetivado que los pacientes presentan variabilidad en la respuesta a diferentes factores de riesgo de lesión pulmonar aguda. En estudios en

## Discusión

personas sanas a las que se administra lipopolisacárido (LPS), se observan diferentes patrones de respuesta en relación a la producción de citoquinas (CQs), y se han identificado polimorfismos en el receptor Toll-like (TLR). En estudios en pacientes con sepsis, se ha encontrado una asociación entre el polimorfismo en TLR y pacientes que fallecieron. Por tanto, la variabilidad de la inmunidad innata puede jugar un papel en la susceptibilidad a ciertas condiciones, como el daño pulmonar agudo [32].

Aunque no fue el objeto de nuestro trabajo, sería de gran interés la búsqueda de biomarcadores en las muestras de los diferentes grupos de animales de nuestro estudio, para intentar identificar aquellos animales susceptibles de desarrollar VILI de manera precoz, y su posible aplicación traslacional. Hasta el momento, no se ha identificado ningún biomarcador con suficiente sensibilidad para el diagnóstico precoz de las alteraciones típicas del SDRA, como el DAD o el aumento de la permeabilidad alveolo-capilar.

En este sentido, varios trabajos han analizado la presencia de microRNAs como posibles biomarcadores de SDRA en modelos de daño pulmonar [139].

Los microRNAs son pequeñas moléculas de ácido ribonucleico (RNA) no codificante, capaces de regular la actividad de diversos genes. Entre sus ventajas, destacan: i) se pueden localizar en una amplia variedad de muestras corporales (suero, plasma, orina, líquido pleural, secreciones bronquiales, etc); ii) son muy estables y resistentes a la degradación; iii) se han mostrado precisos para el diagnóstico y pronóstico de algunas entidades patológicas como la sepsis [140].

En el contexto del SDRA, se ha objetivado que los microRNAs están implicados en funciones relacionadas con su patogénesis, como la regulación de genes relacionados con el sistema inmune y la liberación de mediadores inflamatorios. También existe evidencia de modelos animales de ALI con un perfil de expresión de microRNAs determinado. Así mismo, los pacientes con SDRA, también muestran un patrón característico de microRNAs [141].

Otra posible explicación de la diferente respuesta de los animales al mismo insulto, serían artefactos que expliquen el comportamiento diferente de los pulmones ventilados con  $V_T$  elevado. Por ejemplo, la intubación selectiva de uno de los bronquios produciría un

## Discusión

aumento de la PIP y quizá mayor daño en el pulmón intubado selectivamente. En nuestro modelo, esta situación es improbable, al tratarse de pulmones ventilados *ex vivo*, donde el experimentador puede ver directamente la cánula de la traqueostomía correctamente posicionada en la tráquea por encima de la carina.

Otra posibilidad sería el daño causado a los pulmones durante la cirugía, por la manipulación durante la canulación de la circulación pulmonar, o el tiempo de isquemia al que son sometidos los pulmones por las características del modelo. Se podría pensar que debido a la curva de aprendizaje del experimentador sobre el modelo, los experimentos con mayor daño pulmonar serían los primeros, debido a una menor destreza manual, junto con un mayor tiempo de ejecución. Sin embargo, esto no fue así, con una distribución temporal aleatoria de los pulmones que mostraron daño pulmonar. En contra de esta teoría, estaría que el experimentador fue siempre la misma persona, con una experiencia previa adquirida en el modelo mediante un periodo de aprendizaje, y la posterior realización de varios experimentos piloto con este mismo modelo animal.

Dado que durante la cirugía el pulmón no es ventilado hasta que no se realiza la esternotomía, se podrían producir atelectasias, ocasionando áreas de hiperinsuflación y áreas no ventiladas, de forma similar a lo que ocurre en el SDRA. Esto podría explicar el diferente comportamiento de los pulmones en cuanto al desarrollo del daño pulmonar. Los pulmones que presentan daño podrían haber sufrido un mayor colapso alveolar con un reclutamiento insuficiente al iniciar la ventilación. Sin embargo, el hecho de que no observemos daño pulmonar en el grupo ventilado con  $V_T$  bajo (no se observaron membranas hialinas en ningún pulmón ventilado con  $V_T$  bajo), iría en contra de esta hipótesis. Además, teóricamente al ventilar con  $V_T$  bajo, la posibilidad de reclutar el pulmón y abrir estas posibles áreas atelectasiadas, sería menor que al ventilar con  $V_T$  elevado.

Por otro lado, algunos factores externos, como determinados agentes infecciosos, pueden modificar la susceptibilidad al VILI. Por ejemplo, en ratones con infección por el virus respiratorio sincitial (VRS), la VM empeora el daño pulmonar, comparados con ratones infectados con otros virus como pneumovirus o ratones sometidos sólo a VM [32].

## Discusión

Al tratarse de un modelo *ex vivo*, podemos excluir otras posibles interferencias, como la desadaptación de los animales con el respirador por insuficiente sedo-analgesia.

Independientemente del motivo de la diferente respuesta pulmonar y sistémica al aplicar un  $V_T$  elevado en nuestro modelo de VILI, consideramos que es imprescindible comprobar la validez de los modelos animales en base a criterios objetivos, en función de la histología, la alteración barrera alveolo-capilar, o la disfunción fisiológica, y no sólo tener en cuenta el tipo de insulto aplicado (en nuestro caso  $V_T$  elevado).

Nuestro hallazgo de que existe un subgrupo de animales que responden de manera diferente a un mismo insulto, la VM agresiva, no ha sido descrito previamente en modelos *ex vivo*. En un modelo *in vivo* previo de nuestro grupo, se describió este fenómeno, consistente en que al aplicar los mismos parámetros de VM en ratas sanas, en este caso un  $V_T$  de 25 ml/kg y una PEEP de 0 cm H<sub>2</sub>O, existía un subgrupo de animales que desarrollaban cambios pulmonares y alteraciones hemodinámicas en respuesta a la VM, y otro subgrupo de animales que no mostraban modificaciones en la mecánica pulmonar ni alteraciones cardiovasculares [137]. A diferencia de nuestro trabajo, en el modelo *in vivo* comentado, el aumento de la PIP que presentaban los animales susceptibles se producía en al comienzo de la VM. Además, este aumento de PIP se correlacionó con daño histológico pulmonar. En este trabajo, se determinó un valor de PIP en T=0 de 26,5 cm H<sub>2</sub>O, que definía los 2 subgrupos de animales, denominados “resistentes” y “susceptibles”.

En pacientes, podríamos encontrar un cierto paralelismo con este fenómeno. A partir de trabajos que han analizado autopsias de pacientes que cumplían criterios clínicos de SDRA, se ha objetivado que la presencia o ausencia de DAD en el análisis histológico, determinaba un subfenotipo específico de pacientes [27]. Mediante un modelo predictivo, se encontró que la presencia de DAD se asoció a una menor relación  $PaO_2/FiO_2$ , menor distensibilidad dinámica, y mayor probabilidad de muerte por hipoxemia, que los pacientes sin DAD. Sin embargo, aunque la VM puede contribuir al daño pulmonar en pacientes, los determinantes del DAD son múltiples y mucho más complejos que en un modelo animal, puesto que existe una amplia variabilidad en relación a las modalidades y parámetros de VM aplicados, factores desencadenantes del SDRA o comorbilidades asociadas.

## Discusión

El primer **primer objetivo** de este trabajo fue demostrar que la VM con  $V_T$  elevado en un modelo *ex vivo* se asociaba con VILI. Para ellos vamos a discutir los resultados de la mecánica pulmonar y el análisis histológico. Finalmente, comentaremos los cambios que se produjeron en el líquido de perfusión.

### MECÁNICA PULMONAR

En cuanto a la mecánica pulmonar, en nuestro modelo encontramos un mayor aumento del delta de PIP en el grupo de  $V_T$  elevado (**Tabla 6** y **Figura 20**). Como la PIP depende del  $V_T$  utilizado, en nuestro caso 6 y 25 ml/kg, para comparar ambos grupos se calculó el delta de PIP (diferencia entre los valores de PIP máxima y los valores de PIP en  $T=0$ ). En relación al delta de distensibilidad dinámica (parámetro que también depende del  $V_T$  aplicado), fue significativamente menor en el grupo ventilado con  $V_T$  elevado (**Tabla 8** y **Figura 22**). Además, se monitorizó la presión en la arteria pulmonar durante el experimento, que permaneció estable en todos los grupos. Por tanto, el aumento progresivo de la PIP y el descenso de la distensibilidad dinámica, indicarían una alteración en las propiedades mecánicas del pulmón. Al analizar los resultados en función de la presencia o no de daño pulmonar al ventilar con  $V_T$  elevado, se objetivó que el delta de PIP y el delta de distensibilidad dinámica sólo se alteraron de manera significativa en el subgrupo que presentaba daño pulmonar, mientras que permanecieron prácticamente sin cambios en el los pulmones ventilados con  $V_T$  elevado sin daño pulmonar (**Tablas 7** y **9** y **Figuras 21** y **23**). Visualmente, el hallazgo macroscópico que presentaban los pulmones ventilados con  $V_T$  elevado que mostraron PIP más elevadas, fue el edema macroscópico y amplias áreas de decoloración pulmonar.

Nuestros resultados son similares a los de otros trabajos que han estudiado la mecánica pulmonar en modelos *in vivo* y *ex vivo* de VILI. Nin *et al.* observaron un aumento de la PIP en ratas ventiladas *in vivo* con  $V_T$  elevado de 35 ml/kg [5,12,13]. En modelos *ex vivo*, se reproduce este incremento de la PIP en pulmones de rata ventilados con  $V_T$  elevado [7].

## Discusión

Numerosos trabajos han relacionado el aumento progresivo de la PIP en el seno del daño pulmonar inducido por la VM con la formación de edema pulmonar [46,53]. En nuestro modelo, no analizamos las alteraciones de la permeabilidad alveolo-capilar, aunque el edema macroscópico fue evidente durante la realización de los experimentos, sobre todo en el caso de los pulmones que mostraron un aumento progresivo de la PIP.

Lo novedoso de este trabajo, es que previamente no se ha descrito este fenómeno en modelos *ex vivo* de VILI. El interés de nuestro hallazgo estaría en la posibilidad de encontrar un biomarcador que se asocie a desarrollo de DAD en un modelo animal en futuros estudios, con su potencial aplicación en la práctica clínica.

## CAMBIOS HISTOLÓGICOS

Un aspecto fundamental en los modelos de ALI es la evaluación histológica. En humanos, el *gold standard* en el análisis anatomopatológico es el hallazgo de daño alveolar difuso (DAD) [25–27].

El daño alveolar difuso se caracteriza por: i) una fase exudativa temprana caracterizada por la acumulación de neutrófilos, conocida como alveolitis neutrofílica; ii) depósito de membranas hialinas compuestas de fibrina y otros desechos proteínicos; iii) engrosamiento intersticial; y iv) formación de microtrombos (evidencia de daño endotelial y activación intraluminal de la cascada de coagulación). Posteriormente se produce una fase proliferativa caracterizada por hiperplasia de las células alveolares epiteliales y fibrosis intersticial [26,28] (**Figura 1**).

Es razonable esperar que los modelos animales de ALI/SDRA reflejen alguna de estas características. Sin embargo, ningún modelo animal reproduce de forma completa todas las características histológicas del DAD en humanos. La presencia de un único dato histológico de ALI en un animal experimental (p.e. alveolitis neutrofílica), no necesariamente indica que se trate de un buen modelo de ALI, y al contrario, la ausencia de una o más características, no lo excluye, todo depende de la hipótesis planteada. A pesar de estos inconvenientes, la evaluación cuantitativa de las características histológicas de ALI es

## Discusión

fundamental para evaluar el grado del daño pulmonar en modelos animales. Este análisis requiere que los pulmones estén adecuadamente fijados con un volumen equivalente a la capacidad funcional residual, para lo cual se insuflan los pulmones con una presión de 15 a 20 cm H<sub>2</sub>O.

En nuestro modelo, la ventilación con  $V_T$  elevado de 25 ml/kg produjo daño pulmonar histológico y macroscópico en un subgrupo de animales. Al igual que en trabajos previos, observamos que no todos los pulmones ventilados con  $V_T$  elevado presentaban datos anatomopatológicos de daño alveolar difuso [137]. Como se puede observar en las **Tablas 10 y 11**, estos hallazgos son más frecuentes en los pulmones de los animales ventilados con  $V_T$  elevado, así como en el subgrupo que presentó un mayor aumento de la PIP a lo largo del experimento ( $V_T$  elevado con daño pulmonar). Aunque lo ideal hubiese sido clasificar todos los experimentos en función de los hallazgos histológicos, no disponíamos de muestras de pulmón para anatomía patológica en todos los casos, por lo que los grupos se establecieron en función de un punto de corte de PIP obtenido mediante una curva ROC (*vide supra*).

Para el estudio anatomopatológico se tomó como referencia el “*Lung scoring system*” (**Figura 18**) [126], propuesto en trabajo de Matute-Bello *et al.* (Ver **Material y métodos**). Este score se basa en la presencia de membranas hialinas, neutrófilos alveolares e intersticiales, material proteináceo, engrosamiento septos alveolares y hemorragia. Como se ha comentado, para que un modelo de ALI sea válido, no es necesario que reproduzca todas las características citadas de DAD.

En nuestro trabajo, tuvimos en cuenta la presencia o ausencia de membranas hialinas para determinar el punto de corte de PIP máxima que definía un subgrupo de animales que sufrían daño pulmonar, ya que este hallazgo es considerado el más característico en el SDRA [127,128]. El segundo hallazgo más frecuente en nuestro trabajo, fue la presencia de neutrófilos alveolares y en el espacio intersticial. Sin embargo, al tratarse de un modelo de pulmón perfundido con un líquido de perfusión acelular, se podría especular que la presencia de neutrófilos alveolares e intersticiales habría sido más evidente en un modelo perfundido con sangre. Por este motivo, se decidió usar la presencia o ausencia de membranas hialinas

## Discusión

en lugar de la puntuación total del *score*. El hallazgo de membranas hialinas en nuestro trabajo tiene una gran relevancia, pues otorga validez al modelo al hacerlo similar al daño alveolar difuso en humanos. Hay que tener en cuenta, que la presencia de membranas hialinas en modelos murinos es infrecuente [126]. De hecho, otros modelos murinos *ex vivo* de VILI no encuentran membranas hialinas en el análisis histológico [22,67].

Esta heterogeneidad en los hallazgos histológicos también se ha comprobado en estudios realizados en pacientes. En estudios realizados en autopsias de pacientes que cumplían los criterios de SDRA, se objetivó que no todos los casos tenían DAD en el análisis anatomopatológico [26,142]. El DAD fue más frecuente en pacientes que cumplían los criterios clínicos de SDRA durante más de 72 horas y aquéllos con SDRA grave [26]. Una posible explicación al hecho de que algunos pacientes cumplieran criterios de SDRA, sin presentar ninguna lesión histológica, sería la presencia de atelectasias. Otra limitación de estos estudios es su carácter retrospectivo, y el sesgo que supone realizarlo sólo en pacientes que no sobreviven, lo que implica mayor gravedad de estos pacientes.

El motivo por el cual encontramos algún pulmón en el que la PIP máxima estaba por encima de nuestro punto de corte, que no presentaba membranas hialinas, podría explicarse por: i) defectos técnicos en la fijación del pulmón, que como se ha comentado anteriormente, es de vital importancia para la valoración histológica; ii) la naturaleza heterogénea del daño pulmonar difuso, con áreas pulmonares de características normales y otras áreas con presencia de alteraciones histológicas; iii) tiempo insuficiente para el desarrollo de las membranas hialinas, dado que el experimento duraba 150 minutos, y algunos autores estiman que las membranas hialinas se forman a lo largo de 2-3 días [127].

### CAMBIOS EN EL LÍQUIDO DE PERFUSIÓN.

#### Equilibrio ácido-base

En nuestro modelo, tanto en el análisis de los 2 grupos de VM, como al analizar el grupo ventilado con  $V_T$  elevado en función de la PIP máxima, no hubo diferencias entre los parámetros del equilibrio ácido-base basales y finales entre los grupos estudiados, aunque se objetivó una tendencia no significativa al descenso del bicarbonato, así como un aumento del exceso de bases, a lo largo del experimento (**Tablas 12 y 13**).

La importancia de mantener estables los valores del equilibrio ácido-base durante el experimento es fundamental, por su implicación en la función de enzimas, la expresión de genes y diversas funciones biológicas como la respuesta inflamatoria.

En este sentido, son numerosos los trabajos que han estudiado el efecto de la acidosis tanto hipercápnica como metabólica sobre el daño pulmonar inducido por la ventilación mecánica. Brocard *et al.* demostraron en un modelo *ex vivo* en conejos que la acidosis respiratoria disminuía la gravedad del daño pulmonar inducido por la ventilación mecánica [143]. La hipercapnia tiene efectos en la producción y funcionalidad del surfactante, modula la permeabilidad vascular y regula la formación del NO (disminuye su producción endógena). Otros trabajos han puesto de manifiesto que la acidosis, tanto hipercápnica como metabólica, previene la formación de edema pulmonar [144]. El efecto beneficioso de la acidosis parece ser más pronunciado en el caso de los pulmones más gravemente dañados. Por otro lado, sobre el lecho vascular pulmonar, la acidosis contrarresta el efecto vasodilatador del dióxido de carbono.

En nuestro modelo, el uso de un  $V_T$  elevado para inducir daño pulmonar ocasionaría un descenso de la  $pCO_2$ , lo que supondría un factor de confusión en este grupo de animales. Este hecho se compensó aumentando el espacio muerto en el sistema, añadiendo un tramo de tubuladura. Para averiguar la longitud del tramo de tubuladura (espacio muerto) a añadir, se realizaron varios experimentos de ensayo-error, de forma que la  $p_a$  la salida de la cánula de la aurícula izquierda fuera similar a la del grupo ventilado con  $V_T$  bajo. Por otro lado, dado que se administró carbógeno en el reservorio del líquido de perfusión, era esperable que se

## Discusión

mantuvieran constantes los valores de  $pO_2$  y  $pCO_2$ , debido a la rápida difusión de los mismos.

Como se observa en los resultados (**Tablas 12 y 13**), tanto la  $pCO_2$  basal como la final fueron similares en todos grupos de ventilación, aunque sí se observó una tendencia a la hipocapnia en todos los grupos tanto al inicio como al final del experimento. Sin embargo, este descenso de la  $pCO_2$  no repercute de manera importante sobre el pH. Los valores de pH al inicio del experimento están en torno a 7,5 en todos los grupos, y desciende de manera no significativa hasta cifras en torno a 7,45 al final del experimento, independientemente del  $V_T$  aplicado. Este descenso está probablemente en relación con la disminución del bicarbonato.

En relación a lo comentado anteriormente, esta tendencia a la hipocapnia en nuestro modelo, actuaría en todo caso como una desventaja y facilitaría el daño pulmonar, aunque dado que no se acompaña de acidosis, interpretamos que su efecto sobre el pulmón es escaso. Por tanto, en nuestro trabajo, los valores de los parámetros del equilibrio ácido-base permanecieron estables a lo largo del experimento, en todos los grupos, por lo que los cambios observados en nuestro modelo son atribuibles a los efectos de la sobredistensión y el biotrauma inducido por la ventilación mecánica con  $V_T$  elevado, más que por los cambios en las condiciones de pH del líquido de perfusión.

En cuanto a los valores de lactato en el líquido de perfusión, en nuestro modelo se produjo un aumento progresivo del mismo a lo largo del experimento, significativamente mayor en el grupo ventilado con  $V_T$  elevado (**Figura 24**) y en el subgrupo ventilado con  $V_T$  elevado que presentaba daño pulmonar (**Figura 25**). Así mismo, en nuestro modelo, se observó un descenso de la glucosa, siendo los valores finales de glucosa más bajos en el grupo ventilado con  $V_T$  elevado (**Figura 26**) y en el subgrupo ventilado con  $V_T$  elevado que presentaba daño pulmonar (**Figura 27**).

De la misma forma, otros autores han encontrado un aumento del lactato y un descenso de la glucosa en el tejido de pulmones ventilados con  $V_T$  elevado respecto a controles ventilados con  $V_T$  bajo [145,146]. Serkova *et al.*, en un modelo de VILI en ratón, instilaron por vía intratraqueal citoquinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ ) y observaron

## Discusión

mediante espectroscopia de resonancia magnética cambios en la concentración de ATP, ADP y del ratio lactato-glucosa. Esto indica una afectación del metabolismo energético (depleción de ATP) con aumento del metabolismo anaeróbico y la actividad glucolítica (elevación del ratio lactato-glucosa) en el grupo tratado [145]. En otro trabajo, se comparaba mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas el perfil metabólico en tejido pulmonar, LBA y suero de ratas sometidas a 2 estrategias de VM. Comparados con los controles, los animales con daño pulmonar inducido por la VM tenían mayores concentraciones de lactato y un descenso de la glucosa en tejido pulmonar, así como niveles aumentados de glucosa y lactato en LBA. Estos hallazgos sugieren que se produce una modificación del metabolismo energético con una mayor utilización de glucosa y la alteración del metabolismo aeróbico en los animales que sufren daño pulmonar. El aumento de la concentración de lactato y glucosa en LBA, podría estar en relación con la alteración de la permeabilidad vascular. Además, encontraron una correlación entre los niveles de los metabolitos cuyos valores eran distintos en el grupo de VILI, con parámetros relacionados con el daño pulmonar como la PIP, PaO<sub>2</sub> y el score de daño pulmonar [146].

### **Daño celular: actividad de AST, ALT, LDH y CK**

El aumento de enzimas de citolisis como la LDH, CK y AST, medidas en el líquido de perfusión en nuestro modelo, es indicativo de lesión celular, que progresa a lo largo del experimento, ya que los valores finales son significativamente mayores que los basales. Además, este aumento es significativamente más marcado en el grupo ventilado con V<sub>T</sub> elevado (**Tabla 18**) y los pulmones con daño pulmonar (**Tabla 19**).

La LDH es una enzima presente en el citoplasma de las células de diversos tejidos, entre ellos los pulmones. Ante una lesión de dichos tejidos, independientemente de la causa, las células liberan LDH, bien por lisis celular o por alteración en su membrana, por lo que su aumento es un dato inespecífico de daño celular. En trabajos previos, se ha demostrado la utilidad de determinar LDH en el lavado broncoalveolar como indicador de daño pulmonar, tanto en modelos *in vivo* [147], como *ex vivo* [148,149]. En algunos estudios, se ha

## Discusión

determinado la concentración sérica de LDH, y en los modelos *ex vivo*, sus niveles en el líquido de perfusión.

En el trabajo de Behnia *et al.* se determinaron los niveles de AST, CPK y LDH en muestras sanguíneas y en LBA, encontrando un aumento de los niveles de AST y LDH en el LBA, y una elevación de LDH, AST y CPK en el suero de los animales ventilados con  $V_T$  elevado. Sin embargo, en este trabajo, el grupo control eran ratas no ventiladas.

En estudios previos de nuestro grupo, se observó un aumento en la concentración de AST, ALT y LDH, tanto en suero como en LBA de ratas ventiladas *in vivo* con  $V_T$  elevado [5,12], respecto a animales ventilados con  $V_T$  bajo. En otro modelo de VILI *in vivo*, se apreció que algunos signos de daño celular sistémico inespecífico (elevación de AST y ALT), aumentaban de forma diferencial en un subgrupo de animales ventilados con  $V_T$  elevado que presentaba una PIP basal más alta [137].

Esta elevación en suero y en LBA de la actividad de estas enzimas presentes en numerosos tipos de células, en modelos *in vivo*, se podrían interpretar como el resultado del daño celular producido en el contexto de la inflamación sistémica asociada a VILI, pero no se puede descartar que sean secundarios a la hipoperfusión que se produce al disminuir la precarga al ventilar con volúmenes pulmonares tan elevados.

En cuanto a los estudios *ex vivo*, Liu *et al.* [148], en un modelo de pulmón aislado ventilado y perfundido, en ratas con daño pulmonar secundario a isquemia-reperfusión, midieron la actividad de LDH en el líquido de perfusión, encontrando valores más elevados en el grupo sometido al insulto respecto al control, y un descenso de los valores de LDH con el tratamiento con isoflurano y sevoflurano.

En otro modelo *ex vivo* de pulmón en fetos de ovejas, encontraron una correlación entre la LDH en el líquido de perfusión y el edema pulmonar, por lo que consideraron que el aumento de dicha enzima podría estar en relación a la destrucción de las células endoteliales y epiteliales pulmonares. Este hecho produciría un aumento de la permeabilidad de la barrera alveolo-capilar con la consiguiente formación de edema pulmonar [136].

## Discusión

La hipótesis que explicaría la presencia de LDH en el LBA, sería que el daño mecánico producido por la VM con  $V_T$  elevado lesiona las células pulmonares, si bien no se conoce exactamente el tipo celular que libera el contenido enzimático. Se especula que podría ser debido a un daño de las células endoteliales, o bien de las células presentes en el espacio alveolar e intersticial, o quizás de las células bronquiales. El líquido de perfusión utilizado en nuestro modelo está exento de estas enzimas. Por ello, el aumento progresivo de LDH en el líquido de perfusión se explicaría por la liberación de LDH por las células pulmonares dañadas: i) daño de las células endoteliales con liberación de la LDH a los vasos, o bien ii) daño de células presentes en el espacio alveolar o intersticial, con translocación de las moléculas de LDH que pasarían hacia el espacio intravascular gracias al aumento de la permeabilidad capilar.

En nuestro modelo, no se determinó la actividad de dichas enzimas en el lavado broncoalveolar, sólo se midió en el líquido de perfusión. En un trabajo previo de nuestro grupo [129], se determinó la actividad de LDH, CK, AST y ALT tanto en el LBA como en el líquido de perfusión, encontrando aumento de LDH, AST y ALT en el LBA, y de LDH y AST en el líquido de perfusión asociado a la ventilación con  $V_T$  elevado.

En resumen, encontramos indicios de daño celular pulmonar asociado al daño pulmonar inducido por la VM. Además, el incremento de las enzimas de citolisis, es más acusado en el líquido de perfusión de los pulmones ventilados con  $V_T$  elevado y los pulmones que sufren daño pulmonar. El aumento progresivo de las enzimas de citolisis en el líquido de perfusión, cuya composición inicial carece de dichos elementos, sería indicativo de: i) daño de las células endoteliales, o bien ii) lesión de las células epiteliales bronquiales o alveolares, u otras células presentes en el intersticio pulmonar, con el paso posterior desde el espacio alveolar al intravascular facilitado por el aumento de la permeabilidad alveolo-capilar.

### Otros parámetros bioquímicos

En nuestro modelo, encontramos un aumento del sodio en el líquido de perfusión al final del experimento, sin diferencias entre los distintos grupos establecidos en base al  $V_T$  usado y el daño pulmonar. Esto puede ser explicado por la absorción activa de sodio por el epitelio pulmonar inducida por la VM. Otra posibilidad sería por evaporación de agua libre a lo largo del experimento [136].

Por otro lado, se produce un descenso del potasio y el calcio en el líquido de perfusión. El descenso del potasio asociado al aumento del sodio en el líquido de perfusión, podría estar en relación con la actividad de la bomba sodio-potasio, presente en las membranas celulares, encargada entre otras funciones de regular la presión osmótica.

El descenso del calcio total, podría ser debido al descenso de las proteínas totales en el líquido de perfusión, pues aproximadamente un 40% del calcio total se encuentra unido a proteínas. Por otro lado, el pH discretamente elevado (alcalosis) del líquido de perfusión podría ocasionar un descenso del calcio iónico.

En nuestro modelo, se observa un descenso de la concentración de proteínas en el líquido de perfusión a lo largo del experimento. En modelos *in vivo*, se observa un aumento de las proteínas en el LBA de los animales ventilados con  $V_T$  elevado, acompañado de un descenso de la concentración de proteínas en suero, en relación con la disrupción de la barrera alveolo-capilar [147]. En un modelo *ex vivo* realizado previamente por nuestro grupo, se objetivó un aumento de proteínas en el LBA [129], por lo que es probable que el descenso de proteínas en el líquido de perfusión sea debido al aumento de la permeabilidad alveolo-capilar que favorece el paso de proteínas hacia la luz alveolar.

### VILI Y DISFUNCIÓN VASCULAR. PAPEL DEL ESTRÉS NITRO-OXIDATIVO

La principal hipótesis planteada en este trabajo, fue que el VILI se asocia a disfunción vascular, caracterizada por una alteración en la relajación y en la contracción vascular. A continuación, se discuten los resultados obtenidos en los experimentos de función vascular, así como la implicación del estrés nitro-oxidativo en la alteración de la función endotelial y contráctil.

#### **Función endotelial**

En nuestro modelo, los anillos incubados con el líquido de perfusión procedente de los pulmones ventilados con  $V_T$  elevado, mostraron una alteración significativa en la relajación respecto a los controles (anillos incubados con líquido de perfusión que no había pasado por el pulmón). Sin embargo, los anillos procedentes de los pulmones ventilados con  $V_T$  bajo, no mostraron diferencias estadísticamente significativas en relación a los controles (**Figuras 30 y 31**). Además, al comparar las curvas de relajación de los anillos incubados con el líquido de perfusión problema procedente de los 2 grupos de ventilación ( $V_T$  bajo y  $V_T$  elevado), se observó que aquellos anillos incubados con el líquido de perfusión procedente de los pulmones ventilados con  $V_T$  elevado, relajaban discretamente peor en relación a los anillos incubados con el líquido de perfusión procedente de los pulmones ventilados con  $V_T$  bajo, aunque las diferencias no alcanzaron la significación estadística (**Figura 29**).

Al analizar el efecto de la VM teniendo en cuenta si se había producido daño pulmonar o no al ventilar con  $V_T$  elevado, en nuestro modelo, los anillos incubados con el efluente procedente de los pulmones ventilados con  $V_T$  elevado con daño pulmonar, mostraron una alteración significativa en la relajación respecto a los controles (**Figura 35**). Sin embargo, los anillos incubados con el efluente de los pulmones ventilados con  $V_T$  bajo o bien con  $V_T$  elevado sin daño pulmonar, no mostraron diferencias estadísticamente significativas en comparación con los controles (**Figuras 34 y 35**). Además, al comparar las curvas de relajación de los anillos incubados con el líquido de perfusión problema procedente de los 3 grupos de ventilación ( $V_T$  bajo,  $V_T$  elevado sin daño pulmonar y  $V_T$  elevado con daño pulmonar), se observó que aquellos anillos incubados con el líquido de perfusión procedente de los pulmones ventilados con  $V_T$  elevado con daño pulmonar,

## Discusión

relajaban peor en relación a los anillos incubados con el líquido de perfusión procedente tanto de los pulmones ventilados con  $V_T$  bajo, como de los pulmones ventilados con  $V_T$  elevado sin daño pulmonar, aunque la diferencia no alcanzó la significación estadística en las comparaciones por pares (**Figura 33**).

Nuestro objetivo principal fue valorar si el VILI se asociaba con disfunción vascular. En base a nuestros resultados, se puede concluir que la ventilación con  $V_T$  elevado indujo una disfunción vascular caracterizada por un empeoramiento en la relajación. Nuestro cuarto objetivo, fue valorar si la disfunción vascular asociada al VILI se desarrollaba de forma más marcada en el grupo que presentaba daño alveolar difuso. En nuestro modelo, la disfunción endotelial, se produjo de forma significativamente más marcada en aquellos anillos aórticos incubados con el efluente procedente de los pulmones que desarrollaron daño pulmonar, en comparación con su control, mientras que en el caso de los anillos incubados con el efluente de los pulmones sin daño pulmonar, las diferencias no fueron significativas en relación a los controles.

En un trabajo previo de nuestro equipo, en un modelo *ex vivo* perfundido con solución de Krebs, mediante la realización de un bioensayo, se objetivó de forma similar a nuestro modelo, un deterioro en la respuesta a Ach en los pulmones sometidos a  $V_T$  elevado tras 60 min de incubación, pero no en los pulmones ventilados con  $V_T$  bajo, ni al incubar los anillos aórticos durante 30 minutos [129].

Debido a las características del modelo animal empleado, un modelo *ex vivo* de VILI, y un bioensayo para estudiar la función vascular, se puede concluir que el pulmón en respuesta a la VM con parámetros agresivos (en nuestro caso un  $V_T$  de 25 ml/kg con PEEP de 0 cm  $H_2O$ ), libera a la circulación mediadores capaces de producir una alteración en la función endotelial en los anillos de aorta procedentes de animales sanos. Puesto que es un modelo *ex vivo*, permite aislar el efecto de la VM con  $V_T$  elevado de otras variables confundidoras en los modelos *in vivo*, como son las alteraciones hemodinámicas secundarias al uso de volúmenes suprafisiológicos. Además, a diferencia de los modelos previos *in vivo* en los que se demostraba una alteración vascular *ex vivo* en los vasos del animal sometido a la VM [5,13,16], en nuestro caso incubamos *ex vivo* anillos de aorta

## Discusión

procedentes de ratas sanas con el líquido de perfusión que ha recirculado por los pulmones ventilados, por lo que se demuestra la transferencia del daño pulmonar al sistema vascular.

Este *cross-talk* entre el pulmón y los órganos no pulmonares es de vital importancia en la fisiopatología del DPA. En trabajos realizados en pacientes, se ha observado que la principal causa de mortalidad en el SDRA es el shock y el fallo multiorgánico [4,6,10,15,56,150]. En un estudio de Esteban *et al.* que comparaba los criterios clínicos del SDRA con los hallazgos anatomopatológicos en la autopsia, se encontró que el 70% de los pacientes con SDRA fallecían de shock refractario sin hipoxemia [142]. En otro trabajo similar, ampliando la cohorte de pacientes, se observó que la principal causa de muerte fue el shock refractario, en el 45% [26]. Lorente *et al.*, realizaron otro estudio teniendo en cuenta la presencia o ausencia de DAD en los pacientes fallecidos con diagnóstico de SDRA, y encontró que los pacientes sin DAD fallecían el doble de shock que los pacientes con DAD [27]. Por otro lado, en pacientes con SDRA, se ha objetivado que el empleo de VM protectora con  $V_T$  bajo, disminuye los días de shock y FMO [4].

En diversos modelos animales de VILI, se ha observado que los animales ventilados con  $V_T$  elevados sufrían hipotensión. Dreyfuss *et al.* en un trabajo clásico comentado anteriormente (*vide supra*), encontraron que las ratas ventiladas con presión pico elevada sin cinchas para limitar el  $V_T$  aplicado, y aquéllas ventiladas con presión negativa con un  $V_T$  elevado, presentaban cifras de presión arterial sistólica significativamente menores respecto a los animales ventilados con  $V_T$  bajo (grupo control) y a los ventilados con PIP elevada con cinchas para limitar el  $V_T$  aplicado [50]. En un modelo de VILI en ovejas sanas, sometidas a VM dañina, todos los animales del grupo de daño severo y 8 de las 11 ovejas del grupo de daño pulmonar moderado, murieron de hipotensión refractaria a fluidos y fallo multiorgánico [151]. Nin *et al.* en un modelo murino *in vivo* de VILI, objetivaron que los animales del grupo ventilado con 35 ml/kg sin PEEP sufrían hipotensión, con respecto al grupo control ( $V_T$  9 ml/kg), y que esta caída en la TAM era atenuada con la administración previa de dexametasona [12]. Choi *et al.* en otro modelo de VILI en rata, observaron un descenso de la TAM en el grupo ventilado con  $V_T$  elevado (20ml/kg), aunque se corrigió tras la administración de suero salino fisiológico (10ml/kg) [9].

## Discusión

La disfunción vascular asociada al daño pulmonar inducido por la ventilación mecánica, se caracteriza por tanto por hipotensión, pero también se ha observado un aumento de la permeabilidad vascular y alteración en la respuesta a sustancias vasoconstrictoras y vasodilatadoras [5,11,13].

En relación a esto, nuestro grupo cuenta con una amplia experiencia previa en el estudio *ex vivo* de la disfunción vascular asociada a la VM dañina [5,13,16]. Nin *et al.* [13], en un modelo murino de daño pulmonar inducido por la VM, demostraron disfunción vascular en anillos aórticos *ex vivo*. Los anillos de aorta torácica de las ratas ventiladas con  $V_T$  elevado, presentaban una menor respuesta contráctil a NE, así como disfunción en la relajación en respuesta a Ach y nitroprusiato sódico. La causa de esta disfunción vascular podría ser una alteración en la función del músculo liso y una menor disponibilidad de NO debida a una disminución de su vida media en un ambiente oxidativo. Estos mismos autores, en un modelo similar, encontraron que las ratas que fueron sometidas a parámetros ventilatorios dañinos sufrían hipotensión, y *ex vivo*, disfunción en la relajación y la contracción en respuesta a Ach y NE respectivamente, tanto en vasos pulmonares como aórticos, pero de carácter reversible [5].

Sin embargo, los trabajos citados anteriormente, son modelos *in vivo*, por lo que presentan una serie de limitaciones en cuanto al estudio de la disfunción vascular asociada a VILI. La principal limitación de los modelos *in vivo* es que al ventilar con  $V_T$  elevado se produce un aumento en la presión intratorácica, que provocaría un descenso en el retorno venoso y por tanto una disminución del flujo sanguíneo, que podría ser responsable de la disfunción vascular. La estabilidad de la presión esofágica, que fue medida en los trabajos de Nin *et al.* [5,13], iría en contra de esta teoría. Pero para excluir totalmente esta posibilidad, no sería válido un modelo *in vivo*.

Otra limitación de los modelos *in vivo* es que el tono vasomotor de los vasos está sometido a variables confundidoras. La administración *in vivo* de vasodilatadores produce vasodilatación sistémica, que reduce la poscarga del ventrículo izquierdo, con un aumento en el gasto cardiaco y una reducción en la presión de la aurícula izquierda.

## Discusión

Con nuestro modelo *ex vivo*, al ventilar y perfundir los pulmones fuera de la caja torácica, se salvaron estas limitaciones. Además, mediante la realización de un bioensayo, utilizando el líquido de perfusión que había circulado por los pulmones sometidos a las diferentes estrategias de VM, para incubar los anillos aórticos de animales sanos que no habían recibido VM, permitió demostrar la hipótesis principal planteada en nuestro trabajo.

De acuerdo con los postulados de Koch [122], en nuestro modelo se demostró:

1) La presencia de una asociación positiva: la VM con  $V_T$  elevado produce daño en el pulmón.

2) En segundo lugar, verificamos que existe una asociación negativa: aunque la VM con  $V_T$  bajo produce alguna alteración pulmonar, esta no es suficiente para causar un daño caracterizado por la alteración en la mecánica respiratoria (aumento de la PIP), alteración en la permeabilidad alveolo-capilar (edema macroscópico) o daño histológico (presencia de membranas hialinas).

3) Finalmente, comprobamos un “efecto transferible”: el líquido de perfusión procedente de pulmones ventilados con  $V_T$  elevado que mostraban daño pulmonar indujo disfunción vascular, caracterizada por una alteración en la relajación, cuando se usó para incubar anillos de aorta de otros animales sanos.

El objetivo de nuestro trabajo, no fue el aislamiento del mediador bioquímico responsable del daño vascular, sino el demostrar la relación entre el DPA y el daño a distancia a nivel del sistema cardiovascular.

En cuanto a los mecanismos implicados en la disfunción vascular asociada a VILI, en modelos *in vivo* se propone que la alteración de la función endotelial sería debida a la sobredistensión a la que son sometidas tanto las células epiteliales alveolares como las células endoteliales cuando se ventila con  $V_T$  elevado.

Al igual que sobre las células epiteliales alveolares, el grado de estiramiento también influye sobre las células endoteliales. En estudios *in vitro*, la exposición a un estiramiento cíclico del 5% (fisiológico), protege la integridad de la barrera alveolo capilar y promueve la

## Discusión

expresión de genes de perfil antiinflamatorio, mientras que la exposición de las células endoteliales a un mayor estiramiento (18%, similar al causado por la VM dañina), aumenta la permeabilidad alveolo-capilar, mediante la disrupción intercelular y la expresión de genes que codifican CQs proinflamatorias [138].

Se sabe que la tensión que soportan las células endoteliales influye en diversas funciones [138]: i) regulación del tono vascular mediante la modulación de la eNOS, la COX-II y la ET-1; ii) regulación de la proliferación de células endoteliales; iii) migración celular; iv) angiogénesis; v) adhesión célula-célula. Por tanto, el daño mecánico a las células endoteliales, pondría en marcha mecanismos de daño celular como serían el aumento de la apoptosis, la adhesión de células inflamatorias y la liberación de mediadores inflamatorios como citoquinas. Esta respuesta de las células endoteliales al estiramiento, junto a la pérdida de la integridad de la barrera alveolo-capilar, contribuiría a la “descompartimentalización” y amplificación de la respuesta inflamatoria [138].

Nuestro modelo *ex vivo* de disfunción vascular apoyaría esta hipótesis. En nuestro caso, se incubaron los anillos aórticos con el efluente procedente de los pulmones ventilados con  $V_T$  elevado, en el cual habrían sido liberadas las moléculas responsables de inducir el daño en los vasos. Estos mediadores, serían los responsables de la disfunción endotelial de los anillos aórticos. Además, la alteración en la relajación fue más evidente en los anillos incubados con el líquido de perfusión procedente de los pulmones que presentaban daño pulmonar histológico, lo que reforzaría la teoría de que la disfunción vascular asociada al VILI se desarrolla de forma más marcada en el grupo que presenta daño alveolar difuso.

En cuanto a los mecanismos implicados en la disfunción endotelial, nuestra hipótesis fue que el estrés nitro-oxidativo estaba implicado en la alteración de la relajación.

Puesto que el NO es el principal vasodilatador producido por el endotelio, esta repercusión sobre la relajación se podría explicar por una alteración en las vías de producción y degradación del NO. El descenso de la producción de NO se ha relacionado con diversos factores:

## Discusión

1) Un déficit de sustrato (L-arginina) o cofactores (tetrahidrobiopterina, BH<sub>4</sub>). La posibilidad del déficit de sustrato, es poco probable porque la concentración plasmática de L-arginina es suficiente para el normal funcionamiento de la enzima eNOS. Sin embargo, el aumento de la expresión o actividad de arginasa, enzima que degrada la L-arginina, podría causar un descenso en la disponibilidad de sustrato. En un modelo de neumoperitoneo en ratas, el pretratamiento con un inhibidor de la arginasa, protege del daño pulmonar [152]. En otro modelo en rata de VILI inducida por endotoxina, que estudiaba *ex vivo* la reactividad vascular de la arteria pulmonar, se observó una disfunción vascular mediada por el endotelio [153]. En este trabajo, se estudiaba el efecto de administrar L-arginina sobre la función vascular pulmonar. La relajación se estudió en respuesta a acetilcolina o a un calcio ionóforo (A23187), que requieren la producción endotelial de NO, y en respuesta a nitroprusiato sódico, que estimula directamente la guanilato ciclasa del músculo liso. Estos autores encontraron que la administración de L-arginina revertía parcialmente la disfunción vascular dependiente del endotelio inducida por endotoxina.

Otra posibilidad sería el déficit del tetrahidrobiopterina, un cofactor esencial para la función de la NOS.

- 2) Por otro lado, los análogos de la L-arginina, como la dimetilarginina asimétrica (ADMA), pueden bloquear la síntesis de NO. Esta molécula se encuentra en plasma y se ha propuesto como un factor de riesgo en patología cardiovascular y como un biomarcador de lesión pulmonar aguda [154].
- 3) La presencia de inhibidores de la eNOS o una menor expresión o actividad de la eNOS.
- 4) Finalmente, el aumento de la degradación del NO, podría ser debido a un exceso de especies reactivas del oxígeno, como el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) [81]. El exceso de radicales libres como el O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, liberados en respuesta a la VM dañina, produciría un descenso en el NO al unirse al O<sub>2</sub><sup>•-</sup> [16,155].

## Discusión

Puesto que el NO es esencial para la función vasodilatadora de los vasos sanguíneos, una menor biodisponibilidad del NO explicaría la alteración de la función endotelial en nuestro modelo. Por otro lado, el NO puede reaccionar con  $O_2^{\bullet-}$  para formar sustancias tóxicas como el peroxinitrito ( $OONO^-$ ), el cual nitrifica residuos de tirosina de las proteínas [80]. La formación de  $OONO^-$  está implicada en la disfunción vascular asociada a la sepsis y en el FMO [80,83,85,87]. Además, se ha demostrado la presencia de peroxinitrito en los anillos vasculares de animales ventilados con  $V_T$  elevado [16], por lo que la formación de esta sustancia podría contribuir a la disfunción vascular asociada al VILI, objetivada en nuestro trabajo. En este trabajo, se exploró esta hipótesis, mediante el uso de atrapadores de radical superóxido y peroxinitrito, para evaluar su efecto sobre la función vascular

### Efecto de la metaloporfirina sobre la función endotelial

La **metaloporfirina** [Mn(III)tetrakis(1-metil-4-piridil) porfirina (MnTMPyP)], es una porfirina que contiene como metal manganeso, capaz de aumentar la biodisponibilidad del NO por su actividad SOD mimética y de prevenir la oxidación e inactivación de la SOD. Por otro lado, la metaloporfirina tiene un efecto anti-inflamatorio mediante la inactivación de factores de transcripción como el factor nuclear  $\kappa B$ . Finalmente, la metaloporfirina cataliza la descomposición del peroxinitrito [87].

En nuestro modelo, tras preincubar durante 15 minutos los anillos de aorta con metaloporfirina, la curva dosis-respuesta a concentraciones crecientes de Ach mostró discreta mejoría de la relajación en el grupo ventilado con  $V_T$  bajo y  $V_T$  elevado sin daño pulmonar, aunque no fue significativa. No se observó ningún efecto en el grupo ventilado con  $V_T$  elevado con daño pulmonar (**Figuras 44-45 y 50-51**).

En contraposición con un trabajo previo realizado por nuestro grupo en un modelo *in vivo* de VILI, en el que el tratamiento con metaloporfirina corregía la alteración en la relajación en anillos de aorta procedentes de ratas sometidas a  $V_T$  elevado durante 60 minutos [16], en nuestro modelo, la metaloporfirina no produjo una mejoría significativa de la relajación.

## Discusión

A diferencia del trabajo citado anteriormente, en nuestro modelo los anillos de aorta incubados *ex vivo* con metaloporfirina procedían de ratas sanas. Es posible que el tiempo de incubación de los anillos de aorta con el líquido de perfusión problema fuera insuficiente para generar un daño debido a la formación de peroxinitrito en los vasos de animales sanos. En el modelo *in vivo*, el sistema cardiovascular está sometido al insulto de la VM dañina, que genera de forma secundaria hipotensión sistémica, acidosis metabólica, hipoxemia e hiperlactacidemia. Por tanto, es de esperar que el efecto deletéreo producido por el VILI en los anillos aórticos, sea mayor en el modelo *in vivo*, ya que en el bioensayo los anillos vasculares empleados proceden de animales sanos.

Otra diferencia con el modelo *in vivo*, es que el daño en los anillos aórticos se produce con anterioridad a la incubación con el fármaco, mientras que en el bioensayo el fármaco se administra previo a daño, puesto que los anillos de aorta son preincubados con el fármaco y posteriormente con el Krebs problema. Dado que la metaloporfirina mejora la relajación, aunque no de forma significativa, en el grupo ventilado con  $V_T$  elevado sin daño pulmonar y el grupo ventilado con  $V_T$  bajo, se podría pensar que la ausencia de efecto en el grupo que presentaba daño pulmonar, estaría en relación con un aumento tan importante del estrés nitro-oxidativo en este grupo, que superaría la capacidad catalizadora de la metaloporfirina al ser administrada previo al insulto.

Otra posible explicación, podría ser debida al tiempo de incubación, ya que en el trabajo citado se incuban los anillos aórticos durante 30 minutos con los fármacos, mientras que en nuestro modelo el tiempo de preincubación fue de 15 minutos, por lo que podría ser insuficiente para mostrar un efecto más beneficioso.

En otro trabajo de nuestro grupo, se evaluó el efecto de la metaloporfirina sobre la función pulmonar y cardiovascular en un modelo *in vivo* de VILI [18]. Se administró una dosis de metaloporfirina IV a los animales aleatorizados a 2 estrategias de VM, al inicio del experimento y a los 75 minutos (un 50% de la dosis). Los resultados del grupo ventilado con  $V_T$  elevado mostraron que la administración de metaloporfirina atenuó el descenso de  $PaO_2$ , el aumento de la PIP, la hipotensión, la acidosis e hiperlactacidemia. Además, el tratamiento redujo la expresión de NOS1 en tejido vascular, y la reactividad a DHE y 3 nitrotirosina.

## Discusión

En otros modelos animales, como el modelo de sepsis, la metaloporfirina revirtió la disfunción vascular asociada a la sepsis, tanto la disfunción contráctil como endotelial, en grandes vasos y en la microcirculación [87].

### Efecto del tempol sobre la función endotelial

El tempol es un SOD mimético, soluble en agua, cuya reacción con  $O_2^{\bullet-}$  depende del pH. Su acción es menos potente que la SOD endógena. El tempol es capaz de penetrar en el interior celular. Además de su capacidad de dismutar  $O_2^{\bullet-}$ , el tempol puede reaccionar con distintos oxidantes y reductores. Mediante la reacción del tempol con  $NO_2^{\bullet}$  y  $CO_3^{\bullet-}$ , el tempol inhibe la nitración de proteínas por el peroxinitrito. Su capacidad de atrapar radicales libres contribuye a la mayor biodisponibilidad de NO, restaurando la vasodilatación mediada por NO.

Tras preincubar los anillos de aorta con tempol durante 15 minutos, la relajación mostró una mejoría en el grupo ventilado con  $V_T$  elevado. Al realizar el análisis en función de la existencia de daño pulmonar, la mejoría de la relajación de los anillos preincubados con tempol fue estadísticamente significativa en el grupo ventilado con  $V_T$  elevado con daño pulmonar. Por el contrario, el tempol empeoró la relajación en el grupo ventilado con  $V_T$  bajo (**Figuras 46-47 y 52-53**).

En relación a la mejoría de la relajación que encontramos en nuestro trabajo al preincubar los anillos de aorta con tempol, en el grupo ventilado con  $V_T$  elevado con daño pulmonar, podría deberse a una mayor biodisponibilidad de NO por el efecto “atrapador” de  $O_2^{\bullet-}$  del tempol.

Sin embargo, el tempol empeora la relajación en los anillos aórticos incubados con líquido de perfusión procedente de pulmones ventilados con  $V_T$  bajo. Se sabe que el tempol tiene un efecto bifásico dependiente de la concentración, siendo capaz de aumentar la producción de  $H_2O_2$  y  $OH^{\bullet}$ , lo cual podría contrarrestar el efecto vasodilatador del tempol. El tempol a concentraciones micromolares actúa como SOD mimético disminuyendo los niveles de  $O_2^{\bullet-}$ , pero a concentraciones milimolares tiene un efecto prooxidante [112]. En nuestro modelo, al preincubar con tempol anillos aórticos que relajan de forma adecuada, se

## Discusión

produciría un atrapamiento de los radicales libres necesarios para la función endotelial, con el consiguiente empeoramiento de la relajación.

Por tanto, en nuestro modelo el tempol mejora de forma significativa la función endotelial, sobre todo en el grupo ventilado con  $V_T$  elevado con daño pulmonar, lo que sugiere que el VILI se asocia a un exceso de formación de radicales libres que interfiere en la función endotelial, probablemente por un descenso de la biodisponibilidad de NO. Sin embargo, el tempol empeora la función endotelial en el grupo de  $V_T$  bajo, lo que indica que los radicales libres también son necesarios en los mecanismos de relajación, aunque un exceso de su producción podría resultar perjudicial.

### Efecto de la SOD sobre la función vascular

La SOD cataliza la dismutación de  $O_2^{\bullet-}$  en  $O_2$  y  $H_2O_2$ . Posteriormente,  $H_2O_2$  se convierte en agua por la acción de la catalasa o la glutatión peroxidasa. Existen 2 formas de SOD en las células: Cu-Zn SOD, una enzima constitutiva localizada en el citoplasma, y Mn-SOD, una enzima inducible presente en la mitocondria. La expresión de Mn-SOD es inducida por el estrés oxidativo y por varias citoquinas proinflamatorias [115]. La Zn-Mn-SOD es una enzima extracelular sin capacidad de penetrar en el interior celular.

Tras preincubar los anillos de aorta con SOD durante 15 minutos, la función endotelial mejoró significativamente en el grupo ventilado con  $V_T$  elevado y en el grupo ventilado con  $V_T$  elevado con daño pulmonar. Por el contrario, la SOD empeoró la relajación en el grupo ventilado con  $V_T$  bajo (**Figuras 48-49 y 54-55**).

Estos resultados difieren de los del trabajo de Martínez-Caro *et al.*, en el que la SOD no mejoraba la disfunción endotelial en los anillos de aorta procedentes de ratas ventiladas con  $V_T$  elevado [16]. Puesto que la SOD no puede atravesar las células, es posible que su efecto beneficioso en nuestro modelo sea debido a su capacidad de dismutar radicales superóxido presentes en el espacio extracelular, puesto que mejora la función endotelial en el grupo que presenta daño pulmonar y por tanto en teoría mayor presencia de EROs.

## Discusión

Al igual que el tempol, la SOD empeoró la relajación en los anillos aórticos incubados con el líquido de perfusión procedente de pulmones ventilados con  $V_T$  bajo. Se ha descrito un efecto dual de la SOD, que puede producir citotoxicidad por el aumento de la actividad peroxidasa y la peroxidación lipídica [158,159]. Los efectos de la SOD en el grupo de  $V_T$  bajo son consistentes con tempol: al preincubar una arteria que relaja de forma adecuada con SOD se atraparían los radicales libres necesarios para la función endotelial produciendo una alteración en la relajación.

Por tanto, SOD, al igual que el tempol, mejora la función endotelial de forma significativa, en el grupo ventilado con  $V_T$  elevado con daño pulmonar, probablemente por su capacidad de contrarrestar el exceso de radicales superóxido que se producen por el VILI, y así aumentar la biodisponibilidad de NO.

### Función contráctil

En nuestro modelo, los anillos incubados con el líquido de perfusión procedente de los pulmones ventilados tanto con  $V_T$  bajo como con  $V_T$  elevado, mostraron un empeoramiento no significativo en la contracción, en relación con los controles (anillos incubados con el líquido de perfusión que no había pasado por el pulmón) (**Figuras 38 y 39**). Al comparar las curvas de contracción de los anillos incubados con el líquido de perfusión procedente de los 2 grupos de ventilación ( $V_T$  bajo y  $V_T$  elevado), no se observaron diferencias en la contracción (**Figura 37**).

Al analizar las curvas dosis-respuesta a NE en función del volumen *tidal* utilizado y el daño pulmonar ( $V_T$  bajo,  $V_T$  elevado sin daño pulmonar y  $V_T$  elevado con daño pulmonar), en todos los grupos, los anillos incubados con líquido de perfusión problema mostraron un empeoramiento de la contracción respecto a los controles (**Figuras 38, 42 y 43**). Sin embargo, al comparar las curvas dosis-respuesta a NE de los anillos incubados con el Krebs problema, el grupo de  $V_T$  elevado con daño pulmonar fue el que presentó menor alteración en la contracción, mientras que el grupo de  $V_T$  elevado sin daño pulmonar, fue el que mostraba un empeoramiento de la contracción más marcado, siendo en este grupo

## Discusión

significativo respecto al control (**Figura 41**). Sin embargo, los controles del grupo de  $V_T$  elevado sin daño pulmonar, contraían peor que los otros 2 grupos, por lo que aunque las diferencias entre los controles no fueron significativas, esto podría suponer un sesgo en el análisis de este subgrupo, por un posible peor funcionamiento de las arterias.

Por tanto, podemos concluir que la ventilación tanto con  $V_T$  bajo como con  $V_T$  elevado, produjo disfunción vascular caracterizada por una disminución en la contracción. Los anillos aórticos incubados con el líquido de perfusión procedente de los pulmones ventilados con  $V_T$  elevado que desarrollaron daño pulmonar, fueron los que mostraron una menor disfunción contráctil, mientras que los anillos incubados con el líquido de perfusión procedente de los pulmones ventilados con  $V_T$  elevado sin daño pulmonar, fueron los que mostraron un mayor empeoramiento en la contracción, con diferencias significativas en relación a su grupo control.

En estudios previos en modelos *in vivo* de VILI de nuestro grupo, en el que se estudió la función contráctil en respuesta a NE de los anillos aórticos de animales sometidos bien a  $V_T$  bajo o a  $V_T$  elevado, se observó una alteración significativa en la contracción en el grupo ventilado con  $V_T$  elevado [5,13,16]. Sin embargo, a diferencia de nuestro modelo, en este caso los anillos estudiados procedían del animal sometido a la VM dañina, y en nuestro caso, los anillos aórticos proceden de ratas sanas que se incuban con el efluente procedente de los pulmones ventilados tanto con  $V_T$  bajo como elevado. En el modelo *in vivo* citado, los autores especulan sobre un aumento del estrés nitro-oxidativo como posible causa de la disfunción contráctil [16].

Estas diferencias de la función contráctil en respuesta a un insulto como la VM dañina en los modelos *in vivo* podría obedecer a diferentes factores. Nuestro modelo fue un bioensayo, cuyo objetivo fue demostrar que los pulmones sometidos a VM dañina liberaban sustancias capaces de inducir daño en el sistema vascular. En los estudios previos citados, se estudió *ex vivo* la función vascular en anillos aórticos procedentes de los animales ventilados, por lo que la respuesta contráctil podría verse alterada por múltiples insultos derivados de tanto de la respuesta sistémica a la VM agresiva (acidosis metabólica, hipoxia, hipotensión), como de los trastornos hemodinámicos consecuencia del uso de  $V_T$

## Discusión

suprafisiológicos [5,13,16]. En nuestro trabajo, empeoró la función contráctil respecto al control, por lo que se deduce un efecto nocivo de la VM sobre la función vascular, pero no encontramos diferencias entre los anillos incubados con líquido de perfusión procedente de pulmones ventilados con  $V_T$  bajo o elevado. Otros factores de índole técnica, que podrían estar implicados en la diferente respuesta vasoconstrictora a NE, como la manipulación y preparación de los anillos aórticos o las dosis de NE utilizadas, son poco probables, puesto que el protocolo utilizado fue similar al de los estudios previos, y el personal encargado cuenta con una amplia experiencia en el estudio de la función vascular.

En otro modelo *ex vivo* previo de nuestro grupo, en el que se realizó un bioensayo con la misma metodología que en nuestro trabajo, se encontró un deterioro de la respuesta contráctil a NA tanto en los anillos aórticos incubados con el líquido de perfusión procedente de los pulmones ventilados con  $V_T$  bajo como con  $V_T$  elevado, tras ser incubados durante 30 ó 60 minutos, en relación al control [129]. Al igual que en nuestro modelo, no se observaron diferencias significativas entre los anillos incubados con el líquido de perfusión problema procedente de los pulmones ventilados con  $V_T$  bajo o con  $V_T$  elevado. En el caso de los anillos aórticos incubados durante 60 minutos con el líquido de perfusión problema, la respuesta contráctil a NE en el grupo ventilado con  $V_T$  elevado fue discretamente mejor que en los anillos incubados con el líquido de perfusión procedente de los pulmones ventilados con  $V_T$  bajo. Estos resultados están en consonancia con los encontrados en nuestro trabajo, a excepción de que en el trabajo citado no se hace mención a la existencia de un subgrupo de pulmones sometidos a  $V_T$  elevado que no desarrollen daño pulmonar.

En cuanto a los mecanismos implicados en la disfunción contráctil, nuestra hipótesis fue que el estrés nitro-oxidativo estaba implicado en la alteración vascular.

Las especies reactivas del oxígeno (EROs), como el  $O_2^{\bullet-}$  y el  $H_2O_2$ , juegan un importante papel como moléculas de señalización en la fisiología de las células vasculares, como la proliferación, diferenciación, apoptosis y reordenamiento de su citoesqueleto. En condiciones fisiológicas, la destrucción de EROs por enzimas antioxidantes mantiene el equilibrio en las cascadas de señalización. Sin embargo, la producción excesiva en situaciones patológicas, como sucede en las enfermedades vasculares, supera la capacidad

## Discusión

antioxidante provocando un estrés oxidativo, con consecuencias anormales en las respuestas fisiológicas de las células vasculares [156].

La mejor función contráctil de los anillos incubados con líquido de perfusión procedente de pulmones que desarrollaron daño pulmonar, en relación a anillos incubados con solución de Krebs procedente de pulmones sin daño pulmonar, podría ser debido a una mayor presencia de EROs en el primer grupo, o bien a un sesgo, puesto que el control del grupo de  $V_T$  elevado sin daño pulmonar contraían peor respecto al resto de controles, aunque las diferencias no fueron significativas.

Tanto el  $O_2^{\bullet}$  como el  $H_2O_2$  pueden contribuir a estimular la ciclooxygenasa (COX) en las células musculares vasculares, activando la liberación de diversos prostanoïdes vasoconstrictores. Además, el  $O_2^{\bullet}$  puede amplificar las respuestas vasoconstrictoras al reducir la biodisponibilidad del NO. En la aorta de rata, los EROs producen una sensibilización al calcio, que es mediada por la activación de Rho y un aumento de la actividad Rho kinasa, que juega un papel importante en la respuesta del músculo liso vascular a los vasoconstrictores derivados del endotelio. Además, las EROs pueden despolarizar las células vasculares lisas inhibiendo directamente los canales de potasio [156,157].

Por tanto, las EROs generadas en respuesta al VILI, estimularían la liberación de sustancias vasoconstrictoras como prostanoïdes, o bien facilitarían la contracción muscular mediante la sensibilización al calcio o la despolarización de las células musculares lisas.

### **Efecto de la metaloporfirina sobre la función contráctil**

La metaloporfirina produjo una mejoría no significativa de la contracción en relación a los anillos aórticos incubados con Krebs problema, en los anillos aórticos incubados con líquido de perfusión procedente de pulmones ventilados con  $V_T$  bajo y  $V_T$  elevado, tanto en el grupo con daño pulmonar como en el grupo sin daño pulmonar (**Figuras 56-57 y 62-63**).

## Discusión

En el modelo *in vivo*, la metaloporfirina corregía la disfunción contráctil en los anillos de aorta procedentes de ratas ventiladas con  $V_T$  elevado [16]. Como se ha comentado (*vide supra*), en el bioensayo el fármaco se administró previo a la incubación con el Krebs problema. Se podría especular que el efecto beneficioso de la metaloporfirina en la función contráctil hubiese sido mayor si se hubiese administrado posteriormente a la incubación con Krebs problema, por el efecto acelerador de la descomposición del peroxinitrito.

Por tanto, la metaloporfirina mejora la función contráctil en todos los grupos, aunque no de forma significativa, por lo que podría indicar la implicación de la formación de peroxinitrito en la disfunción contráctil asociada a VILI.

### Efecto del tempol sobre la función contráctil

El tempol mejoró, aunque no de forma significativa, la contracción en el grupo de  $V_T$  bajo, mientras que empeoró la función contráctil en el grupo de  $V_T$  elevado, de forma más llamativa en el subgrupo con daño pulmonar (**Figuras 58-59 y 64-65**).

Nuestros resultados difieren de los del trabajo de Martínez-Caro *et al.*, en el que el tempol corregía la disfunción contráctil en los anillos de aorta procedentes de ratas ventiladas con  $V_T$  elevado [16].

Puesto que el  $O_2^{\bullet}$  juega un papel importante en la contracción de las células musculares vasculares, mediante la liberación de prostanoïdes vasoconstrictores, la disminución del NO, la sensibilización al calcio y la despolarización directa de las células vasculares lisas [156,157], la capacidad de atrapar radicales libres por el tempol podría justificar el empeoramiento de la función contráctil en el grupo con mayor daño pulmonar y por tanto con mayor generación de EROs. Los radicales libres son esenciales para las funciones fisiológicas de las células, y por tanto un desequilibrio en su producción y/o destrucción puede resultar dañino. Este frágil equilibrio podría explicar los resultados dispares en cuanto al efecto deletéreo del tempol en un ambiente con mayor estrés oxidativo (anillos incubados con Krebs problema procedente de pulmones que sufren daño pulmonar)

vs. un efecto protector de la disfunción contráctil en un ambiente con menos EROs (anillos incubados con Krebs problema procedente de pulmones ventilados con  $V_T$  bajo).

### Efecto de la SOD sobre la función contráctil

La SOD empeoró la contracción en todos los grupos de VM. Estos resultados están en consonancia con los reportados por Martínez-Caro *et al.*, en un modelo *in vivo* de VILI, y por Nin *et al.*, en un modelo de sepsis (**Figuras 60-61 y 66-67**).

En nuestro modelo, el efecto de la **SOD** es consistente con el efecto del tempol, puesto que su mecanismo de acción es similar, al atrapar los radicales libres necesarios para la función contráctil. Sin embargo, el empeoramiento de la contracción es significativo en el caso de la SOD, lo cual indicaría la importancia de los radicales libres extracelulares en los mecanismos de contracción muscular, puesto que su atrapamiento produce un empeoramiento significativo de la función contráctil.

### LIMITACIONES

Una de las limitaciones de este trabajo estaría en relación con el modelo empleado, pues se trata de un modelo *ex vivo*, en el que el pulmón se encuentra en isquemia y no existe caja torácica, lo que interfiere en sus propiedades biológicas y mecánicas, pero a su vez tiene la ventaja de evitar la influencia del  $V_T$  empleado sobre el sistema cardiovascular.

Por otro lado, las diferencias con los modelos experimentales a la hora de modelar el SDRA en humanos son importantes, pues en nuestro modelo sólo existe un insulto, en nuestro caso los parámetros dañinos de VM, y los animales de experimentación son ratas jóvenes y sanas. Sin embargo, el SDRA en pacientes es una entidad compleja con diversos factores de riesgo asociados y los pacientes presentan habitualmente múltiples comorbilidades [33]. Además, en nuestro modelo experimental la duración de la VM es de 150 minutos, mientras que los pacientes son ventilados durante días o semanas. En relación a esto, en los modelos animales el daño pulmonar se produce de forma hiperaguda, en

## Discusión

horas e incluso minutos, mientras que en los pacientes el daño se produce de forma subaguda. Otra limitación, son los parámetros de VM utilizados para ocasionar el daño, en nuestro caso, un  $V_T$  elevado sin PEEP. Aunque son parámetros similares a los utilizados en otros estudios, el  $V_T$  usado está muy por encima del recomendado en la práctica clínica habitual.

Por otro lado, respecto a la especie animal utilizada, aunque se ha usado ampliamente en modelos de VILI, hay que tener en consideración sus diferencias respecto a los humanos, como pueden ser: i) mayor frecuencia respiratoria, que oscila entre 80-120 rpm en roedores, mientras que en humanos adultos está en torno a 12-20 rpm; ii) diferencias anatómicas; iii) diferencias inmunológicas, puesto que las ratas poseen un mayor número de células clara en sus conductos bronquiales, un amplio tejido linfoide bronquial y no tienen glándulas submucosas en la zona proximal de la tráquea [160].

Otra desventaja del presente trabajo, como se ha comentado anteriormente, fue que no se procesaron para el estudio histológico todos los pulmones utilizados en los experimentos, por lo que la ausencia o existencia de daño pulmonar se ha extrapolado en base a la asociación entre la PIP máxima alcanzada y la presencia o ausencia de membranas hialinas. Además, en este modelo no se realizó ninguna determinación para cuantificar el aumento de la permeabilidad alveolo-capilar, aunque por el aspecto macroscópico de los pulmones en los que aumentaba la PIP a lo largo del experimento, con edema pulmonar y áreas de decoloración, resultaba evidente el aumento de la permeabilidad alveolo-capilar.

Otra limitación de nuestro modelo de VILI es la necesidad de practicar una traqueostomía y una cirugía agresiva, ya que es exanguinado previamente a la intervención, y durante la cirugía se debe ser extremadamente cuidadoso para no lesionar el tejido pulmonar. La agresión a la que es sometido el animal puede contribuir a la respuesta inflamatoria. Sin embargo, puesto que el procedimiento es similar en el grupo control ventilado con  $V_T$  bajo, los hallazgos encontrados en nuestro modelo no pueden ser sólo atribuibles a los mediadores inflamatorios liberados en respuesta a la cirugía.

## Discusión

Otra limitación del presente modelo, es que el estudio *ex vivo* de la función vascular es técnicamente complejo, puesto que la manipulación de los anillos aórticos debe hacerse con especial cuidado para no dañar el endotelio, fundamental en la regulación de la función vascular. El estudio *ex vivo* proporciona una información muy valiosa para entender la respuesta vascular, pero sus resultados deben tomarse con cautela [161].

Por otro lado, las ratas usadas para el estudio de la función vascular eran ratas sanas, pero de mayor edad (12-16 semanas), que las empleadas en los experimentos de VM. Puesto que se sabe que la edad influye en la disfunción endotelial [81], hubiese sido más adecuado utilizar ratas jóvenes de la misma edad para evitar esta variable de confusión.

Otra desventaja de este trabajo es que sólo se estudiaron anillos aórticos. Podría haber sido de interés el estudio de otros lechos vasculares, como la microcirculación intestinal o el lecho pulmonar. Además, sólo se estudió la respuesta vascular a acetilcolina (un vasodilatador dependiente del endotelio) y norepinefrina.

Además, en relación a la implicación del estrés nitro-oxidativo en el daño vascular asociado al VILI, en nuestro trabajo los fármacos inhibidores del estrés nitro-oxidativo se aplicaron antes de incubar los anillos aórticos con el Krebs problema y en un modelo de función vascular *ex vivo*. Aunque éste enfoque tiene su interés, en la práctica clínica habitual, los tratamientos se inician una vez producido el daño, por lo que podría ser de interés estudiar el efecto de los fármacos aplicados una vez ocasionado el daño, además de estudiar el efecto de los inhibidores en modelos *in vivo*.

Finalmente, en este trabajo no se midió de forma directa ningún marcador de estrés nitro-oxidativo en muestras de tejido pulmonar o en los anillos aórticos (por ejemplo, DHE o nitrotirosina), lo que podrían haber añadido consistencia a la hipótesis de que el estrés nitro-oxidativo está implicado en el daño pulmonar y vascular asociados al VILI.

### APORTACIONES MÁS RELEVANTES DEL ESTUDIO

La principal aportación de este estudio es la demostración mediante un bioensayo, de que los pulmones sometidos a ventilación con  $V_T$  elevado, inducen una alteración en la función vascular.

En nuestro modelo, algunos pulmones ventilados con  $V_T$  elevado no mostraron daño macroscópico ni histológico, así como cambios en la mecánica pulmonar en respuesta a la VM. Además, observamos que las alteraciones de la función vascular inducidas por la ventilación con  $V_T$  elevado, eran distintas en función de si los pulmones presentaban o no daño alveolar difuso.

Finalmente, objetivamos la implicación del estrés nitro-oxidativo en la regulación de los mecanismos de disfunción vascular asociada al VILI.

### FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

Puesto que la aportación más relevante del presente trabajo radica en la posible existencia de mediadores liberados por el pulmón, en respuesta a la ventilación con  $V_T$  elevado, capaces de producir alteraciones en la función vascular, las futuras líneas de investigación irían hacia la identificación de dichos mediadores, con el propósito de entender mejor la fisiopatología del VILI y encontrar posibles tratamientos farmacológicos.

En este sentido, el fenómeno observado en nuestro modelo, consistente en que algunos pulmones ventilados con  $V_T$  elevado no mostraban daño pulmonar en respuesta a la VM, podría ayudar a identificar dichos mediadores mediante la comparación con el grupo con daño pulmonar. Por otro lado, este enfoque podría ser de utilidad para buscar marcadores que se asocien al desarrollo de daño alveolar difuso.

Finalmente, en futuros trabajos sería de interés estudiar el efecto de los fármacos inhibidores del estrés nitro-oxidativo en modelos de VILI *in vivo*.



## **VIII. Conclusiones**

## Conclusiones

## Conclusiones

1. La ventilación mecánica con  $V_T$  elevado en un modelo *ex vivo* produce lesión pulmonar (VILI), caracterizada por alteraciones en las propiedades mecánicas del pulmón, daño celular pulmonar y cambios histológicos (daño alveolar difuso).
2. El VILI se asocia con disfunción vascular.
3. Existen dos fenotipos de respuesta a la ventilación mecánica, caracterizados por distinto grado de deterioro en la mecánica respiratoria, en el daño celular pulmonar y en los cambios histológicos del pulmón.
4. La disfunción vascular asociada al VILI se desarrolla de forma más marcada en el grupo que presenta daño alveolar difuso.
5. La disfunción vascular asociada al VILI se debe a un aumento del estrés nitro-oxidativo.

## Conclusiones

## **IX. Bibliografía**

## Bibliografía

## Bibliografía

- [1] Smith LS, Zimmerman JJ, Martin TR. Mechanisms of acute respiratory distress syndrome in children and adults: a review and suggestions for future research. *Pediatr Crit Care Med* 2013;14:631–43.
- [2] Respirator lung syndrome. *Minn Med* 1967;50:1693–705.
- [3] Wolthuis EK, Vlaar AP, Choi G, Roelofs JJ, Juffermans NP, Schultz MJ. Mechanical ventilation using non-injurious ventilation settings causes lung injury in the absence of pre-existing lung injury in healthy mice. *Crit Care* 2009;13:R1.
- [4] Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network. *N Engl J Med* 2000;342:1301–8.
- [5] Nin N, Lorente J a, de Paula M, El Assar M, Vallejo S, Peñuelas O, et al. Rats surviving injurious mechanical ventilation show reversible pulmonary, vascular and inflammatory changes. *Intensive Care Med* 2008;34:948–56.
- [6] Esteban A, Anzueto A, Frutos F, Alía I, Brochard L, Stewart TE, et al. Characteristics and outcomes in adult patients receiving mechanical ventilation: a 28-day international study. *JAMA* 2002;287:345–55.
- [7] Tremblay L, Valenza F, Ribeiro SP, Li J, Slutsky AS. Injurious ventilatory strategies increase cytokines and c-fos m-RNA expression in an isolated rat lung model. *J Clin Invest* 1997;99:944–52.
- [8] Chiumello D, Pristine G, Slutsky AS. Mechanical ventilation affects local and systemic cytokines in an animal model of acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:109–16. doi:10.1164/ajrccm.160.1.9803046.
- [9] Choi W-I, Quinn DA, Park KM, Moufarrej RK, Jafari B, Syrkin O, et al. Systemic microvascular leak in an in vivo rat model of ventilator-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:1627–32. doi:10.1164/rccm.200210-1216OC.
- [10] Imai Y, Parodo J, Kajikawa O, de Perrot M, Fischer S, Edwards V, et al. Injurious mechanical ventilation and end-organ epithelial cell apoptosis and organ dysfunction in an experimental model of acute respiratory distress syndrome. *JAMA* n.d.;289:2104–12.
- [11] Mandava S, Kolobow T, Vitale G, Feti G, Aprigliano M, Jones M ME. Lethal systemic capillary leak syndrome associated with severe ventilator-induced lung injury: an experimental study. *Crit Care Med* 2003;31:885–92.
- [12] Nin N, Peñuelas O, de Paula M, Lorente J a, Fernández-Segoviano P, Esteban A. Ventilation-induced lung injury in rats is associated with organ injury and systemic inflammation that is attenuated by dexamethasone. *Crit Care Med* 2006;34:1093–8.
- [13] Nin N, Valero JA, Lorente JA, de Paula M, Fernández-Segoviano P, Sánchez-

## Bibliografía

- Ferrer A, et al. Large tidal volume mechanical ventilation induces vascular dysfunction in rats. *J Trauma* 2005;59:711–6.
- [14] Guery BP, Welsh DA, Viget NB, Robriquet L, Fialdes P, Mason CM, et al. Ventilation-induced lung injury is associated with an increase in gut permeability. *Shock* 2003;19:559–63.
- [15] Ranieri VM, Suter PM, Tortorella C, De Tullio R, Dayer JM, Brienza A, et al. Effect of mechanical ventilation on inflammatory mediators in patients with acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. *JAMA* 1999;282:54–61.
- [16] Martínez-Caro L, Lorente JA, Marín-Corral J, Sánchez-Rodríguez C, Sánchez-Ferrer A, Nin N, et al. Role of free radicals in vascular dysfunction induced by high tidal volume ventilation. *Intensive Care Med* 2009;35:1110–9.
- [17] Chapman KE, Sinclair SE, Zhuang D, Hassid A, Desai LP, Waters CM. Cyclic mechanical strain increases reactive oxygen species production in pulmonary epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;289:L834-41.
- [18] Martínez-Caro L, Nin N, Sánchez-Rodríguez C, Ferruelo A, El Assar M, de Paula M, et al. Inhibition of nitro-oxidative stress attenuates pulmonary and systemic injury induced by high-tidal volume mechanical ventilation. *Shock* 2015;44:36–43.
- [19] Held HD, Boettcher S, Hamann L, Uhlig S. Ventilation-induced chemokine and cytokine release is associated with activation of nuclear factor-kappaB and is blocked by steroids. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:711–6.
- [20] Peter JV, John P, Graham PL, Moran JL, George IA, Bersten A. Corticosteroids in the prevention and treatment of acute respiratory distress syndrome (ARDS) in adults: meta-analysis. *BMJ* 2008;336:1006–9.
- [21] Meduri GU, Headley AS, Golden E, Carson SJ, Umberger RA, Kelso T, et al. Effect of prolonged methylprednisolone therapy in unresolving acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. *JAMA* 1998;280:159–65.
- [22] Chiang C-H, Chuang C-H, Liu S-L, Chian C-F, Zhang H, Ryu JH. N-acetylcysteine attenuates ventilator-induced lung injury in an isolated and perfused rat lung model. *Injury* 2012;43:1257–63.
- [23] Domenighetti G, Suter PM, Schaller MD, Ritz R, Perret C. Treatment with N-acetylcysteine during acute respiratory distress syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study. *J Crit Care* 1997;12:177–82.
- [24] International consensus conferences in intensive care medicine: Ventilator-associated Lung Injury in ARDS. This official conference report was cosponsored by the American Thoracic Society, The European Society of Intensive Care Medicine, and The Société d. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:2118–24.

## Bibliografía

- [25] Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 1967;2:319–23.
- [26] Thille AW, Esteban A, Fernández-Segoviano P, Rodríguez J-M, Aramburu J-A, Peñuelas O, et al. Comparison of the Berlin definition for acute respiratory distress syndrome with autopsy. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;187:761–7.
- [27] Lorente JA, Cardinal-Fernández P, Muñoz D, Frutos-Vivar F, Thille AW, Jaramillo C, et al. Acute respiratory distress syndrome in patients with and without diffuse alveolar damage: an autopsy study. *Intensive Care Med* 2015;41:1921–30.
- [28] Thille AW, Esteban A, Fernández-Segoviano P, Rodríguez J-M, Aramburu J-A, Vargas-Errázuriz P, et al. Chronology of histological lesions in acute respiratory distress syndrome with diffuse alveolar damage: a prospective cohort study of clinical autopsies. *Lancet Respir Med* 2013;1:395–401.
- [29] Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, Fan E, et al. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA* 2012;307:2526–33.
- [30] Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, et al. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149:818–24.
- [31] Thomas NJ, Jouvett P, Willson D. Acute lung injury in children--kids really aren't just "little adults". *Pediatr Crit Care Med* 2013;14:429–32. doi:10.1097/PCC.0b013e31827456aa.
- [32] Martin TR, Matute-Bello G. Experimental models and emerging hypotheses for acute lung injury. *Crit Care Clin* 2011;27:735–52.
- [33] Bellani G, Laffey JG, Pham T, Fan E, Brochard L, Esteban A, et al. Epidemiology, Patterns of Care, and Mortality for Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome in Intensive Care Units in 50 Countries. *JAMA* 2016;315:788.
- [34] De Luca D, Piastra M, Chidini G, Tissieres P, Calderini E, Essouri S, et al. The use of the Berlin definition for acute respiratory distress syndrome during infancy and early childhood: multicenter evaluation and expert consensus. *Intensive Care Med* 2013;39:2083–91.
- [35] Villar J, Sulemanji D, Kacmarek RM. The acute respiratory distress syndrome: incidence and mortality, has it changed? *Curr Opin Crit Care* 2014;20:3–9.
- [36] Linko R, Okkonen M, Pettilä V, Perttilä J, Parviainen I, Ruokonen E, et al. Acute respiratory failure in intensive care units. FINNALI: a prospective cohort study. *Intensive Care Med* 2009;35:1352–61.

## Bibliografía

- [37] Villar J, Blanco J, Añón JM, Santos-Bouza A, Blanch L, Ambrós A, et al. The ALIEN study: incidence and outcome of acute respiratory distress syndrome in the era of lung protective ventilation. *Intensive Care Med* 2011;37:1932–41.
- [38] Sigurdsson MI, Sigvaldason K, Gunnarsson TS, Moller A, Sigurdsson GH. Acute respiratory distress syndrome: nationwide changes in incidence, treatment and mortality over 23 years. *Acta Anaesthesiol Scand* 2013;57:37–45.
- [39] Li G, Malinchoc M, Cartin-Ceba R, Venkata C V, Kor DJ, Peters SG, et al. Eight-year trend of acute respiratory distress syndrome: a population-based study in Olmsted County, Minnesota. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;183:59–66.
- [40] Rubenfeld GD, Caldwell E, Peabody E, Weaver J, Martin DP, Neff M, et al. Incidence and outcomes of acute lung injury. *N Engl J Med* 2005;353:1685–93.
- [41] Zimmerman JJ, Akhtar SR, Caldwell E, Rubenfeld GD. Incidence and outcomes of pediatric acute lung injury. *Pediatrics* 2009;124:87–95.
- [42] Erickson S, Schibler A, Numa A, Nuthall G, Yung M, Pascoe E, et al. Acute lung injury in pediatric intensive care in Australia and New Zealand: a prospective, multicenter, observational study. *Pediatr Crit Care Med* 2007;8:317–23. doi:10.1097/01.PCC.0000269408.64179.FF.
- [43] Hu X, Qian S, Xu F, Huang B, Zhou D, Wang Y, et al. Incidence, management and mortality of acute hypoxemic respiratory failure and acute respiratory distress syndrome from a prospective study of Chinese paediatric intensive care network. *Acta Paediatr* 2010;99:715–21. doi:10.1111/j.1651-2227.2010.01685.x.
- [44] López-Fernández Y, Azagra AM, de la Oliva P, Modesto V, Sánchez JI, Parrilla J, et al. Pediatric Acute Lung Injury Epidemiology and Natural History study: Incidence and outcome of the acute respiratory distress syndrome in children. *Crit Care Med* 2012;40:3238–45.
- [45] Wong JJ-M, Jit M, Sultana R, Mok YH, Yeo JG, Koh JWJC, et al. Mortality in Pediatric Acute Respiratory Distress Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Intensive Care Med* 2017:88506661770510.
- [46] Slutsky AS. Inflammatory mechanisms of lung injury during mechanical ventilation. Uptodate 2015 (accessed September 9, 2015).
- [47] dos Santos CC, Slutsky AS. The contribution of biophysical lung injury to the development of biotrauma. *Annu Rev Physiol* 2006;68:585–618.
- [48] Dreyfuss D, Basset G, Soler P, Saumon G. Intermittent positive-pressure hyperventilation with high inflation pressures produces pulmonary microvascular injury in rats. *Am Rev Respir Dis* 1985;132:880–4.
- [49] Slutsky AS, Ranieri VM. Ventilator-induced lung injury. *N Engl J Med* 2013;369:2126–36.

## Bibliografía

- [50] Dreyfuss D, Soler P, Basset G, Saumon G. High inflation pressure pulmonary edema. Respective effects of high airway pressure, high tidal volume, and positive end-expiratory pressure. *Am Rev Respir Dis* 1988;137:1159–64.
- [51] Dreyfuss D, Saumon G. Ventilator-induced lung injury: lessons from experimental studies. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:294–323.
- [52] Slutsky AS. Lung injury caused by mechanical ventilation. *Chest* 1999;116:9S–15S.
- [53] Webb HH, Tierney DF. Experimental pulmonary edema due to intermittent positive pressure ventilation with high inflation pressures. Protection by positive end-expiratory pressure. *Am Rev Respir Dis* 1974;110:556–65.
- [54] Gattinoni L, Pesenti A. The concept of “baby lung.” *Intensive Care Med* 2005;31:776–84.
- [55] Mead J, Takishima T, Leith D. Stress distribution in lungs: a model of pulmonary elasticity. *J Appl Physiol* 1970;28:596–608.
- [56] Slutsky AS, Tremblay LN. Multiple system organ failure. Is mechanical ventilation a contributing factor? *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:1721–5.
- [57] Halbertsma FJJ, Vaneker M, Scheffer GJ, van der Hoeven JG. Cytokines and biotrauma in ventilator-induced lung injury: a critical review of the literature. *Neth J Med* 2005;63:382–92.
- [58] Pugin J, Dunn I, Jolliet P, Tassaux D, Magnenat JL, Nicod LP, et al. Activation of human macrophages by mechanical ventilation in vitro. *Am J Physiol* 1998;275:L1040-50.
- [59] Belperio J, Keane M, Lynch J, Strieter R. The Role of Cytokines during the Pathogenesis of Ventilator-Associated and Ventilator-Induced Lung Injury. *Semin Respir Crit Care Med* 2006;27:350–64.
- [60] Haitsma JJ, Uhlig S, Göggel R, Verbrugge SJ, Lachmann U, Lachmann B. Ventilator-induced lung injury leads to loss of alveolar and systemic compartmentalization of tumor necrosis factor-alpha. *Intensive Care Med* 2000;26:1515–22.
- [61] Wilson MR, Choudhury S, Takata M. Pulmonary inflammation induced by high-stretch ventilation is mediated by tumor necrosis factor signaling in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;288:L599-607.
- [62] Narimanbekov IO, Rozycki HJ. Effect of IL-1 blockade on inflammatory manifestations of acute ventilator-induced lung injury in a rabbit model. *Exp Lung Res* 21:239–54.
- [63] Imai Y, Kawano T, Iwamoto S, Nakagawa S, Takata M, Miyasaka K. Intratracheal anti-tumor necrosis factor-alpha antibody attenuates ventilator-

- induced lung injury in rabbits. *J Appl Physiol* 1999;87:510–5.
- [64] Plötz FB, Vreugdenhil HAE, Slutsky AS, Zijlstra J, Heijnen CJ, van Vught H. Mechanical ventilation alters the immune response in children without lung pathology. *Intensive Care Med* 2002;28:486–92.
- [65] Kawano T, Mori S, Cybulsky M, Burger R, Ballin A, Cutz E, et al. Effect of granulocyte depletion in a ventilated surfactant-depleted lung. *J Appl Physiol* 1987;62:27–33.
- [66] Belperio JA, Keane MP, Burdick MD, Londhe V, Xue YY, Li K, et al. Critical role for CXCR2 and CXCR2 ligands during the pathogenesis of ventilator-induced lung injury. *J Clin Invest* 2002;110:1703–16.
- [67] von Bethmann AN, Brasch F, Nüsing R, Vogt K, Volk HD, Müller KM, et al. Hyperventilation induces release of cytokines from perfused mouse lung. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:263–72.
- [68] Verbrugge SJ, Sorm V, van 't Veen A, Mouton JW, Gommers D, Lachmann B. Lung overinflation without positive end-expiratory pressure promotes bacteremia after experimental *Klebsiella pneumoniae* inoculation. *Intensive Care Med* 1998;24:172–7.
- [69] Murphy DB, Cregg N, Tremblay L, Engelberts D, Laffey JG, Slutsky AS, et al. Adverse ventilatory strategy causes pulmonary-to-systemic translocation of endotoxin. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:27–33.
- [70] Matute-Bello G, Liles WC, Radella F, Steinberg KP, Ruzinski JT, Jonas M, et al. Neutrophil apoptosis in the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:1969–77.
- [71] Matute-Bello G, Liles WC, Frevert CW, Nakamura M, Ballman K, Vathanaprida C, et al. Recombinant human Fas ligand induces alveolar epithelial cell apoptosis and lung injury in rabbits. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;281:L328-35.
- [72] Martin TR, Nakamura M, Matute-Bello G. The role of apoptosis in acute lung injury. *Crit Care Med* 2003;31:S184-8.
- [73] Davidson WJ, Dorscheid D, Spragg R, Schulzer M, Mak E, Ayas NT. Exogenous pulmonary surfactant for the treatment of adult patients with acute respiratory distress syndrome: results of a meta-analysis. *Crit Care* 2006;10:R41.
- [74] Duffett M, Choong K, Ng V, Randolph A, Cook DJ. Surfactant therapy for acute respiratory failure in children: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care* 2007;11:R66.
- [75] Dahlem P, Bos AP, Haitsma JJ, Schultz MJ, Meijers JCM, Lachmann B. Alveolar fibrinolytic capacity suppressed by injurious mechanical ventilation. *Intensive Care Med* 2005;31:724–32.

- [76] Ware LB, Matthay MA, Parsons PE, Thompson BT, Januzzi JL, Eisner MD. Pathogenetic and prognostic significance of altered coagulation and fibrinolysis in acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 2007;35:1821–8.
- [77] Liu KD, Levitt J, Zhuo H, Kallet RH, Brady S, Steingrub J, et al. Randomized Clinical Trial of Activated Protein C for the Treatment of Acute Lung Injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;178:618–23.
- [78] Wort SJ, Evans TW. The role of the endothelium in modulating vascular control in sepsis and related conditions. *Br Med Bull* 1999;55:30–48.
- [79] Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol* 2006;147 Suppl:S193-201.
- [80] Liaudet L, Rosenblatt-Velin N, Pacher P. Role of peroxynitrite in the cardiovascular dysfunction of septic shock. *Curr Vasc Pharmacol* 2013;11:196–207.
- [81] El Assar M, Angulo J, Vallejo S, Peiró C, Sánchez-Ferrer CF, Rodríguez-Mañas L. Mechanisms Involved in the Aging-Induced Vascular Dysfunction. *Front Physiol* 2012;3:132. doi:10.3389/fphys.2012.00132.
- [82] Erusalimsky JD, Moncada S. Nitric oxide and mitochondrial signaling: from physiology to pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:2524–31.
- [83] Pacher P, Szabo C. Role of the peroxynitrite-poly(ADP-ribose) polymerase pathway in human disease. *Am J Pathol* 2008;173:2–13.
- [84] Sittipunt C, Steinberg KP, Ruzinski JT, Myles C, Zhu S, Goodman RB, et al. Nitric oxide and nitrotyrosine in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:503–10.
- [85] Liaudet L, Vassalli G, Pacher P. Role of peroxynitrite in the redox regulation of cell signal transduction pathways. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2009;14:4809–14.
- [86] Szabó C, Ischiropoulos H, Radi R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2007;6:662–80.
- [87] Nin N, El-Assar M, Sánchez C, Ferruelo A, Sánchez-Ferrer A, Martínez-Caro L, et al. Vascular dysfunction in sepsis: effects of the peroxynitrite decomposition catalyst MnTMPyP. *Shock* 2011;36:156–61.
- [88] Cuzzocrea S, Mazzon E, Di Paola R, Esposito E, Macarthur H, Matuschak GM, et al. A Role for Nitric Oxide-Mediated Peroxynitrite Formation in a Model of Endotoxin-Induced Shock. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;319:73–81.
- [89] Salvemini D, Riley DP, Lennon PJ, Wang Z-Q, Currie MG, Macarthur H, et al. Protective effects of a superoxide dismutase mimetic and peroxynitrite decomposition catalysts in endotoxin-induced intestinal damage. *Br J Pharmacol*

- 1999;127:685–92.
- [90] Vaschetto R, Kuiper JW, Musters RJP, Eringa EC, Della Corte F, Murthy K, et al. Renal hypoperfusion and impaired endothelium-dependent vasodilation in an animal model of VILI: the role of the peroxynitrite-PARP pathway. *Crit Care* 2010;14:R45.
- [91] Marín-Corral J, Martínez-Caro L, Lorente JA, de Paula M, Pijuan L, Nin N, et al. Redox balance and cellular inflammation in the diaphragm, limb muscles, and lungs of mechanically ventilated rats. *Anesthesiology* 2010;112:384–94.
- [92] Tremblay LN, Slutsky AS. Ventilator-induced lung injury: from the bench to the bedside. *Intensive Care Med* 2006;32:24–33.
- [93] Petrucci N, De Feo C. Lung protective ventilation strategy for the acute respiratory distress syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* 2013;2:CD003844.
- [94] Briel M, Meade M, Mercat A, Brower RG, Talmor D, Walter SD, et al. Higher vs lower positive end-expiratory pressure in patients with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2010;303:865–73.
- [95] Santa Cruz R, Rojas JI, Nervi R, Heredia R, Ciapponi A. High versus low positive end-expiratory pressure (PEEP) levels for mechanically ventilated adult patients with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* 2013;6:CD009098.
- [96] Chacko B, Peter J V, Tharyan P, John G, Jeyaseelan L. Pressure-controlled versus volume-controlled ventilation for acute respiratory failure due to acute lung injury (ALI) or acute respiratory distress syndrome (ARDS). *Cochrane Database Syst Rev* 2015;1:CD008807.
- [97] Ferguson ND, Cook DJ, Guyatt GH, Mehta S, Hand L, Austin P, et al. High-frequency oscillation in early acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2013;368:795–805.
- [98] Young D, Lamb SE, Shah S, MacKenzie I, Tunnicliffe W, Lall R, et al. High-frequency oscillation for acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2013;368:806–13.
- [99] Hu SL, He HL, Pan C, Liu AR, Liu SQ, Liu L, et al. The effect of prone positioning on mortality in patients with acute respiratory distress syndrome: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Crit Care* 2014;18:R109.
- [100] Terragni P, Faggiano C, Ranieri VM. Extracorporeal membrane oxygenation in adult patients with acute respiratory distress syndrome. *Curr Opin Crit Care* 2014;20:86–91.
- [101] Slutsky AS. Neuromuscular blocking agents in ARDS. *N Engl J Med* 2010;363:1176–80.

## Bibliografía

- [102] Alhazzani W, Alshahrani M, Jaeschke R, Forel JM, Papazian L, Sevransky J, et al. Neuromuscular blocking agents in acute respiratory distress syndrome: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Crit Care* 2013;17:R43.
- [103] Zhang L-N, Sun J-P, Xue X-Y, Wang J-X. Exogenous pulmonary surfactant for acute respiratory distress syndrome in adults: A systematic review and meta-analysis. *Exp Ther Med* 2013;5:237–42.
- [104] Spieth PM, Zhang H. Pharmacological therapies for acute respiratory distress syndrome. *Curr Opin Crit Care* 2014;20:113–21.
- [105] Raghavendran K, Willson D, Notter RH. Surfactant therapy for acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Clin* 2011;27:525–59.
- [106] Steinberg KP, Hudson LD, Goodman RB, Hough CL, Lanken PN, Hyzy R, et al. Efficacy and safety of corticosteroids for persistent acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2006;354:1671–84. doi:10.1056/NEJMoa051693.
- [107] Tang BMP, Craig JC, Eslick GD, Seppelt I, McLean AS. Use of corticosteroids in acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care Med* 2009;37:1594–603.
- [108] Afshari A, Brok J, Møller AM, Wetterslev J. Inhaled nitric oxide for acute respiratory distress syndrome (ARDS) and acute lung injury in children and adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2010:CD002787.
- [109] Boyle AJ, McNamee JJ, McAuley DF. Biological therapies in the acute respiratory distress syndrome. *Expert Opin Biol Ther* 2014;14:969–81.
- [110] Lee JW, Fang X, Gupta N, Serikov V, Matthay MA. Allogeneic human mesenchymal stem cells for treatment of E. coli endotoxin-induced acute lung injury in the ex vivo perfused human lung. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:16357–62.
- [111] Wang Y-Y, Li X-Z, Wang L-B. Therapeutic implications of mesenchymal stem cells in acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. *Stem Cell Res Ther* 2013;4:45.
- [112] Simonsen U, Christensen FH, Buus NH. The effect of tempol on endothelium-dependent vasodilatation and blood pressure. *Pharmacol Ther* 2009;122:109–24.
- [113] Chang L-YL, Subramaniam M, Yoder BA, Day BJ, Ellison MC, Sunday ME, et al. A catalytic antioxidant attenuates alveolar structural remodeling in bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:57–64.
- [114] MacKenzie A, Martin W. Loss of endothelium-derived nitric oxide in rabbit aorta by oxidant stress: restoration by superoxide dismutase mimetics. *Br J Pharmacol* 1998;124:719–28.

## Bibliografía

- [115] Fink MP. Role of reactive oxygen and nitrogen species in acute respiratory distress syndrome. *Curr Opin Crit Care* 2002;8:6–11.
- [116] Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animal models of acute lung injury. *AJP Lung Cell Mol Physiol* 2008;295:L379–99.
- [117] Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animal models of acute lung injury. *AJP Lung Cell Mol Physiol* 2008;295:L379–99.
- [118] Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000;12:121–7.
- [119] Nelson K, Bobba C, Ghadiali S, Hayes D, Black SM, Whitson BA. Animal models of ex vivo lung perfusion as a platform for transplantation research. *World J Exp Med* 2014;4:7–15.
- [120] Niemeier RW. The isolated perfused lung. *Environ Health Perspect* 1984;56:35–41.
- [121] Nelson K, Bobba C, Eren E, Spata T, Tadres M, Hayes D, et al. Method of isolated ex vivo lung perfusion in a rat model: lessons learned from developing a rat EVLP program. *J Vis Exp* 2015.
- [122] Jaecklin T, Engelberts D, Otulakowski G, O’Brodovich H, Post M, Kavanagh BP. Lung-derived soluble mediators are pathogenic in ventilator-induced lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2011;300:L648-58.
- [123] Preti SC, da Cunha V, Vassallo DV, Stefanon I. The superoxide dismutase mimetic, tempol, reduces the bioavailability of nitric oxide and does not alter L-NAME-induced hypertension in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2005;97:29–34.
- [124] Hatoum OA, Otterson MF, Kopelman D, Miura H, Sukhotnik I, Larsen BT, et al. Radiation induces endothelial dysfunction in murine intestinal arterioles via enhanced production of reactive oxygen species. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:287–94.
- [125] Marín MC, Martínez-Caro L, González E, Ferruelo A, Nin N, Lorente JA, Fernández-Segoviano P EA. Characterization of the hypotension induced by high tidal volume mechanical ventilation. *Intensive Care Med* 2010;36:S94.
- [126] Matute-Bello G, Downey G, Moore BB, Groshong SD, Matthay MA, Slutsky AS, et al. An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011;44:725–38.
- [127] Katzenstein AL, Bloor CM, Leibow AA. Diffuse alveolar damage--the role of oxygen, shock, and related factors. A review. *Am J Pathol* 1976;85:209–28.
- [128] Cardinal-Fernández P, Correger E, Villanueva J, Rios F. Distrés respiratorio

- agudo: del síndrome a la enfermedad. *Med Intensiva* 2016;40:169–75.
- [129] Smit Bellot L. Diseño de un modelo experimental de daño pulmonar agudo inducido por la ventilación mecánica en pulmón perfundido aislado. Universidad Autónoma de Madrid, 2015.
- [130] Tschumperlin DJ, Margulies SS. Alveolar epithelial surface area-volume relationship in isolated rat lungs. *J Appl Physiol* 1999;86:2026–33.
- [131] Rich PB, Douillet CD, Hurd H, Boucher RC. Effect of ventilatory rate on airway cytokine levels and lung injury. *J Surg Res* 2003;113:139–45.
- [132] Welsh DA, Summer WR, Dobard EP, Nelson S, Mason CM. Keratinocyte growth factor prevents ventilator-induced lung injury in an ex vivo rat model. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:1081–6.
- [133] Broccard AF, Feihl F, Vannay C, Markert M, Hotchkiss J, Schaller M-D. Effects of L-NAME and inhaled nitric oxide on ventilator-induced lung injury in isolated, perfused rabbit lungs. *Crit Care Med* 2004;32:1872–8.
- [134] Chang RS, Wright K, Effros RM. Role of albumin in prevention of edema in perfused rabbit lungs. *J Appl Physiol* 1981;50:1065–70.
- [135] Czartolomna J, Voelkel NF, Chang SW. Permeability characteristics of isolated perfused rat lungs. *J Appl Physiol* 1991;70:1854–60.
- [136] Schmolling J, Seeger W, Jensen A. Liquid movements in ventilated and perfused isolated lungs of fetal sheep at 0.87, 0.90, and 0.95 of term. *Reprod Fertil Dev* 1995;7:1345–50.
- [137] Rojas Vega Y. Efecto de la descontaminación digestiva selectiva sobre el daño pulmonar inducido por la ventilación mecánica. Universidad Complutense de Madrid, 2015.
- [138] Wang T, Gross C, Desai A, Zemskov E, Wu X, Garcia AN, et al. Endothelial Cell Signaling and Ventilator-Induced Lung Injury (VILI): Molecular Mechanisms, Genomic Analyses & Therapeutic Targets. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2016:ajplung.00231.2016.
- [139] Cardinal-Fernández P, Ferruelo A, Esteban A, Lorente JA. Characteristics of microRNAs and their potential relevance for the diagnosis and therapy of the acute respiratory distress syndrome: from bench to bedside. *Transl Res* 2016;169:102–11.
- [140] Wang H, Zhang P, Chen W, Feng D, Jia Y, Xie L. Serum microRNA signatures identified by Solexa sequencing predict sepsis patients' mortality: a prospective observational study. *PLoS One* 2012;7:e38885.

- [141] Cardinal-Fernández P, Ferruelo A, Esteban A, Lorente JA. Characteristics of microRNAs and their potential relevance for the diagnosis and therapy of the acute respiratory distress syndrome: from bench to bedside. *Transl Res* 2016;169:102–11.
- [142] Esteban A, Fernández-Segoviano P, Frutos-Vivar F, Aramburu JA, Nájera L, Ferguson ND, et al. Comparison of clinical criteria for the acute respiratory distress syndrome with autopsy findings. *Ann Intern Med* 2004;141:440–5.
- [143] Broccard AF, Hotchkiss JR, Vannay C, Markert M, Sauty A, Feihl F, et al. Protective effects of hypercapnic acidosis on ventilator-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:802–6.
- [144] Kapetanakis T, Siempos II, Metaxas EI, Kopterides P, Agrogiannis G, Patsouris E, et al. Metabolic acidosis may be as protective as hypercapnic acidosis in an ex-vivo model of severe ventilator-induced lung injury: a pilot study. *BMC Anesthesiol* 2011;11:8.
- [145] Serkova NJ, Van Rheen Z, Tobias M, Pitzer JE, Wilkinson JE, Stringer KA. Utility of magnetic resonance imaging and nuclear magnetic resonance-based metabolomics for quantification of inflammatory lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008;295:L152-61.
- [146] Izquierdo-García JL, Naz S, Nin N, Rojas Y, Erazo M, Martínez-Caro L, et al. A Metabolomic Approach to the Pathogenesis of Ventilator-induced Lung Injury. *Anesthesiology* 2014;120:694–702.
- [147] Behnia R, Molteni A, Waters CM, Panos RJ, Ward WF, Schnaper HW, et al. Early markers of ventilator-induced lung injury in rats. *Ann Clin Lab Sci* n.d.;26:437–50.
- [148] Liu R, Ishibe Y, Ueda M. Isoflurane-sevoflurane administration before ischemia attenuates ischemia-reperfusion-induced injury in isolated rat lungs. *Anesthesiology* 2000;92:833–40.
- [149] Ghazi-Khansari M, Nasiri G, Honarjoo M. Decreasing the oxidant stress from paraquat in isolated perfused rat lung using captopril and niacin. *Arch Toxicol* 2005;79:341–5.
- [150] Plötz FB, Slutsky AS, van Vught AJ, Heijnen CJ. Ventilator-induced lung injury and multiple system organ failure: a critical review of facts and hypotheses. *Intensive Care Med* 2004;30:1865–72.
- [151] Borelli M, Kolobow T, Spatola R, Prato P, Tsuno K. Severe acute respiratory failure managed with continuous positive airway pressure and partial extracorporeal carbon dioxide removal by an artificial membrane lung. A controlled, randomized animal study. *Am Rev Respir Dis* 1988;138:1480–7.
- [152] Cho JS, Oh YJ, Kim OS, Na S. The effects of arginase inhibitor on lung oxidative stress and inflammation caused by pneumoperitoneum in rats. *BMC Anesthesiol*

- 2015;15:129.
- [153] Sheridan BC, McIntyre RC, Meldrum DR, Fullerton DA. L-arginine attenuates endothelial dysfunction in endotoxin-induced lung injury. *Surgery* 1999;125:33–40.
- [154] Ma T, Liu X, Liu Z. Role of asymmetric dimethylarginine in rat acute lung injury induced by acute ischemic kidney injury. *Mol Med Rep* 2015;12:1923–8.
- [155] Schmidt R, Luboeinski T, Markart P, Ruppert C, Daum C, Grimminger F, et al. Alveolar antioxidant status in patients with acute respiratory distress syndrome. *Eur Respir J* 2004;24:994–9.
- [156] Lyle AN, Griendling KK. Modulation of vascular smooth muscle signaling by reactive oxygen species. *Physiology (Bethesda)* 2006;21:269–80.
- [157] Vanhoutte PM. Endothelium-dependent contractions in hypertension: when prostacyclin becomes ugly. *Hypertens (Dallas, Tex 1979)* 2011;57:526–31.
- [158] Aronovitch Y, Godinger D, Israeli A, Krishna M, Samuni A, Goldstein S. Dual activity of nitroxides as pro- and antioxidants: Catalysis of copper-mediated DNA breakage and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dismutation. *Free Radic Biol Med* 2007;42:1317–25. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.01.017.
- [159] Offer T, Russo A, Samuni A. The pro-oxidative activity of SOD and nitroxide SOD mimics. *FASEB J* 2000;14:1215–23.
- [160] Mestas J, Hughes CCW. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol* 2004;172:2731–8.
- [161] Vanhoutte PM. Endothelial Lessons. *Curr Vasc Pharmacol* 2016;14:175–80.



*Unexpected results are the gold mine of the investigator and serendipity his/her greatest helper to dig*

*Paul M. Vanhoutte*



