

Universitat de Barcelona
Facultat de Medicina
Departament de Cirurgia i Especialitats Quirúrgiques

**ESTUDI DE L'EFECTE PROFILÀCTIC DE L'ÒXID
NÍTRIC INHALAT I DE LA PROSTACICLINA
NEBULITZADA EN UN MODEL EXPERIMENTAL
DE LESIÓ PULMONAR AGUDA**

Memòria presentada per optar al Títol de Doctor en Medicina i Cirurgia per:
ANNABEL BLASI IBAÑEZ

Directores: Prof. Irene Rovira Canudas

Prof. Carmen Gomar Sancho

Departament de Cirurgia i Especialitats Quirúrgiques
Facultat de Medicina
Universitat de Barcelona

Barcelona, gener 2006

A la M^a Antònia i al Santiago, per tot.

El treball de recerca, tema d'aquesta tesi va estar finançat per un Premi Fí de Residència de l'Hospital Clínic de Barcelona

ABREVIATURES

AMPc	Adenosín monofosfat cíclic
BAL	Rentat broncoalveolar
°C	Graus centígrads
COX	Ciclooxigenasa
DC	Dèbit cardíac
FC	Frequència cardíaca
FiO ₂	Fracció inspirada d'oxigen
GMPc	Guanosin monofosfat cíclic
HTA	Hipertensió arterial
HTP	Hipertensió pulmonar
IL	Interleuquina
iNO	Òxid nítric inhalat
LPA	Lesió pulmonar aguda
LPS	Lipopolisacàrid
MetaHb	Metahemoglobina
NO	Òxid nítric
NO ₂	Diòxid de nitrogen
NOS	Òxid nítric sintetasa
O ₂	Oxigen
OxiHb	Oxihemoglobina
PAm	Pressió arterial sistèmica mitja
PaCO ₂	Pressió parcial de diòxid de carboni arterial
PaO ₂	Pressió parcial d'oxigen arterial
PAPm	Pressió artèria pulmonar mitja
PCP	Pressió capil·lar pulmonar
PEEP	Pressió positiva espiratòria final
PDE	Fosfodiesterasa
PG	Prostaglandines
PGI	Prostaciclina

PGneb	Prostaglandines nebulitzades
ppb	Parts per bilió
ppm	Parts per milió
PVC	Pressió venosa central
PvO ₂	Pressió parcial venosa d'oxigen
RNOS	Espècies reactives als òxids de nitrogen
RVP	Resistències vasculars pulmonars
RVS	Resistències vasculars sistèmiques
VPH	Vasoconstricció pulmonar hipòxica

AGRAÏMENTS

Dono les gràcies a totes les persones que des del punt de vista personal i professional han contribuït a la realització d'aquest projecte d'investigació.

A les directores de la Tesi. La **Prof. Irene Rovira**, per la direcció del treball experimental, que sens dubte ha estat la part més dura per a mi, i la **Prof. Carmen Gomar** per la direcció en la redacció del mateix.

A tots els **companys de feina** que en horari laboral m'han lliurat de les tasques assistencials en benefici d'aquest projecte. Gràcies també per la seva tolerància i comprensió.

A la disponibilitat i eficàcia de l'**Emma Arcos** i del **Llorens Quintó** en l'anàlisi estadístic de les dades.

Als **tècnics de laboratori d'urgències de l'Hospital Clínic** per l'amabilitat i rapidesa en el processament de les mostres al llarg de l'estudi.

Al **personal encarregat de l'estabulari**, per la col.laboració inestimable en el treball experimental.

Al **Dr. Josep Ramírez** Cap de Secció del Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Clínic per la col.laboració en l'estudi de les biòpsies pulmonars.

A la **Dra. Montse Elena** del servei de Bioquímica de l'Hospital Clínic per la col.laboració en les determinacions enzimàtiques.

A la **Dra M. Jesús Martínez de Osaba** i al **Dr. Vladimiro Jiménez** del laboratori d'hormonal de l'Hospital Clínic, per la determinació dels nivells de AMPc i GMPc.

Als **Drs. Joan Beltran, Pere Gambús, Ricard Valero**, i a la **Dra. Graciela Martínez** per les hores d'ordinador estalviades.

A la **Dra. Anna López** li agraeixo l'ajut logístic, però més encara, el recolzament emocional.

ÍNDEX

1. RESUM.....	19
1.1. RESUM	21
1.2. RESUMEN.....	27
2. INTRODUCCIÓ	33
2.1. Lesió pulmonar aguda.....	35
2.2. Òxid nítric	58
2.3. Prostaciclínes	69
2.4. Models experimentals de lesió pulmonar aguda.....	75
3. JUSTIFICACIÓ DE L'ESTUDI.....	77
4. HIPÒTESIS I OBJECTIUS.....	81
4.1. Hipòtesis.....	83
4.2. Objectius	83
5. MATERIAL I MÈTODES	85
5.1. Criteris d'inclusió dels animals.....	87
5.2. Anestèsia i instrumentalització.	88
5.3. Medicions hemodinàmiques.....	88
5.4. Determinacions analítiques	89
5.5. Rentat broncoalveolar.....	89
5.6. Teixit pulmonar.....	89
5.7. Paràmetres calculats.....	90
5.8. Monitorització de gasos	90
5.9. Administració d'endotoxina.....	90
5.10. Administració d'òxid nítric inhalat.....	91
5.11. Administració de prostaglandines nebulitzades.....	91
5.12. Protocol experimental.....	91

5.13.	Anàlisi estadístiques	93
6.	RESULTATS	95
6.1.	Grup control.....	97
6.2.	Grup endotoxina.....	100
6.3.	Grup òxid nítric.....	103
6.4.	Grup prostaciclina nebulitzada.....	107
6.5.	Grup òxid nítric + prostaciclina nebulitzada	111
6.6.	Comparacions entre grups.....	115
7.	DISCUSSIÓ	125
8.	CONCLUSIONS	169
9.	BIBLIOGRAFIA.....	173

1. RESUM

1.1. RESUM

Introducció: la lesió pulmonar aguda (LPA) és una entitat clínica que inclou un ampli espectre de dany pulmonar i que pot donar-se en associació a una gran varietat de condicions precipitants. La manifestació més severa de la LPA es coneix amb el nom de síndrome de distres respiratori agut. La sepsis és l'etiologia més freqüent de LPA, amb una mortalitat superior al 50%. El mecanisme de producció d'aquesta entitat, implica una complexa resposta immunològica humoral i cel·lular, que es tradueix en una alteració estructural i funcional que origina trastorns en la vasculatura i en la mecànica pulmonar, alterant la relació ventilació/perfusió; això es manifesta clínicament amb hipertensió pulmonar i hipoxèmia severa.

Actualment el tractament d'aquesta entitat es basa en mesures de manteniment hemodinàmic i respiratori en espera que es resolgui la causa precipitant. L'òxid nítric inhalat i les prostaciclins nebulitzades no s'inclouen en el tractament habitual de la LPA; contemplat-se el seu ús en els casos de hipoxèmia o hipertensió pulmonar severa refractàries al tractament convencional és a dir, en una fase evolutiva avançada de la malaltia. L'administració profilàctica d'aquests fàrmacs en la LPA s'ha reportat de manera aïllada i amb resultats dispersos. Donada la naturalesa immunològica-inflamatòria de la LPA i les propietats antiinflamatòries del NO i de les PG, l'administració de manera profilàctica de iNO i de PGneb, abans de produir-se la noxa que desencadena el quadre, podria ser molt més efectiva que el seu ús amb finalitat terapèutica.

Hipòtesis i Objectius:

1. Verificar que l'administració endovenosa d'endotoxina produeix una lesió aguda a nivell de la membrana alveolo-capil·lar que condiciona un augment de la permeabilitat capil·lar, migració i activació de neutròfils ocasionant edema alveolar, hipertensió pulmonar i hipoxèmia severa.

2. Investigar l'efecte de l'administració profilàctica de NO inhalat, de prostaglandines nebulitzades i d'ambdós alhora, sobre la hemodinàmica sistèmica, la hemodinàmica pulmonar i l'intercanvi de gasos.

3. Investigar si l'administració profilàctica del iNO, de PGneb i d'ambdós alhora, evita l'increment de permeabilitat vascular, la migració i l'activació de neutròfils

Material i mètodes: l'estudi es va realitzar amb 31 ovelles anestesiades i ventilades mecànicament (8 en el grup control, 7 en el grup endotoxina, 6 en el grup iNO, 5 en el grup PGneb i 5 en el grup iNO+PGneb) de 20-25 kg. Es va monitoritzar la pressió arterial i la hemodinàmica pulmonar a través d'un catèter de Swan Ganz. Es realitzaven gasometries arterials i venoses, recompte de leucòcits en sang arterial, i nivells de GMPc i AMPc en sang arterial i venosa mixta, així com un rentat broncoalveolar (BAL) de cada pulmó. De la mostra obtinguda es va estudiar la cel.lularitat (nombre, viabilitat i tipus cel.lular), i la concentració de proteïnes. Al final de l'estudi s'obtenia una mostra de teixit pulmonar, per estudi anatomopatològic i determinació de mieloperoxidasa. La endotoxina (LPS) administrada era E. Coli. El iNO s'administrava amb un regulador caudalímetre de baix fluxe, connectat a la branca inspiratòria del respirador. Les PGneb s'administraven mitjançant un nebulitzador ultrasònic (OMRON, model NE-012) connectat a la branca inspiratòria del respirador. Els animals foren distribuïts de manera aleatòria en 5 grups. Grup control: rebien una infusió de sèrum fisiològic, grup LPS: rebien un bolus de 20 η g/kg/min de LPS seguit d'una perfusió de 10 η g/kg/min fins al final de l'estudi, grup iNO: rebien 10 ppm de iNO, grup PGneb: rebien 10 η g/kg/min de PGneb, i grup iNO+PGneb: rebien ambdós fàrmacs alhora. Tots els gups van ser estudiats durant un període de 4 hores, i els controls es realitzaven en situació basal (T00), als 20 minuts de l'inici de l'administració de iNO, PGneb, o iNO+PGneb (T0), a la 1, 2, 3 i 4 hores d'iniciar-se la infusió sèrum salí/LPS (T1,T2,T3,T4 respectivament), i als 20 minuts de retirar el iNO, les PGneb o ambdós.

Per analitzar l'evolució de les variables en el temps, es va comparar l'efecte de cadascun dels tractaments, mitjançant la descomposició de la variància de les diferències entre el moment basal i després d'haver passat 4 hores. En el cas que la diferència es distribuïa segons una Normal, es feien les múltiples comparacions pel mètode Bonferroni, i en el cas en que la variable a comparar no es distribuïa segons una Normal, es va contrastar la igualtat entre els grups mitjançant la prova Kruskal Wallis. Es va considerar significativa una $p < 0,05$.

Resultats: en el grup d'animals que únicament van rebre endotoxina es va observar una disminució del dèbit cardíac (DC) i un increment de les resistències vasculars sistèmiques (RVS) significatius en l'hemodinàmica sistèmica; així com un increment significatiu de la pressió de l'artèria pulmonar (PAPm) i de les resistències vasculars pulmonars (RVP) respecte dels animals del grup control. L'administració de LPS també va produir una disminució significativa de la PaO₂, i dels leucòcits en sang perifèrica. En el BAL d'aquest grup d'animals, hi havia un increment significatiu del percentatge de neutròfils i del valor de la mieloperoxidasa. A l'anatomia patològica de les mostres de teixit pulmonar s'observava un infiltrat inflamatori difús amb augment dels leucòcits a l'interior de les arterioles.

El grup d'animals que va rebre 10 ppm de iNO no va mostrar variacions significatives en els paràmetres de l'hemodinàmica sistèmica. L'administració de iNO en aquest grup va evitar la disminució del dèbit cardíac, l'increment de la PAPm i l'increment de les RVP de manera significativa. L'administració de iNO també va evitar la disminució significativa de la PaO₂ i dels leucòcits en sang perifèrica. En el BAL d'aquest grup el percentatge de neutròfils va ser significativament inferior al del grup que va rebre LPS. En les mostres de teixit pulmonar no hi havia edema ni infiltrat inflamatori agut, típics de l'administració de LPS.

El grup d'animals que va rebre 10 μ g/kg/min de PGneb no va mostrar variacions significatives en l'hemodinàmica sistèmica respecte del grup que va rebre LPS. Amb l'administració de PGneb es va observar un increment significatiu de la PAPm i de les

RVP respecte del grup que va rebre iNO. També es va observar una disminució significativa de la PaO₂ respecte del grup que va rebre iNO. La disminució de la xifra de leucòcits en sang perifèrica observada en aquest grup va ser significativament inferior a la del grup LPS. El percentatge de neutròfils en el BAL d'aquest grup va ser significativament superior al del grup iNO. En la mostra de teixit pulmonar destacava un intens infiltrat inflamatori agut amb marcat edema periarteriolar i perivenular.

El grup d'animals que va rebre conjuntament 10 ppm de iNO i 10 η g/kg/min de PGneb no van mostrar variacions en l'hemodinàmica sistèmica. Es va observar una disminució significativa de la PAPm i de les RVP respecte del grup LPS i respecte del grup PGneb. No es van observar diferències significatives en la resta de paràmetres hemodinàmics ni gasomètrics mesurats. El percentatge de neutròfils en el BAL d'aquest grup va ser significativament superior al del grup iNO, mentre que el percentatge de macròfags va ser significativament inferior al del grup iNO. L'anatomia patològica d'aquest grup mostrava un infiltrat inflamatori agut i un edema perivascular moderats.

No van haver-hi diferències significatives en els valors de AMPc i GMPc, arterials i venosos, entre els grups estudiats.

Discusió: el model de LPA per endotoxina presentat en aquest estudi, es caracteritza fonamentalment per hipertensió pulmonar i hipoxèmia severa com a conseqüència de la vasoconstricció i de l'augment de permeabilitat vascular, que origina extravassació de proteïnes, infiltració i degranulació de neutròfils. Aquest model està ampliament demostrat anteriorment en la literatura en diferents estudis experimentals. Nosaltres vàrem escollir el model oví per tenir una resposta vascular més similar a la dels humans. Per tant és un bon model per avaluar l'efecte de diferents fàrmacs com a tractament o profilaxi d'aquesta entitat.

L'administració profilàctica de iNO va evitar la HTP, la disminució del DC i la hipoxèmia produïts per l'administració de LPS. Aquests resultats estan en la mateixa línia que les dades previament reportades en la literatura, però amb un grau d'eficàcia

superior, que atribuïm al fet que aquests hagi estat administrat profilàcticament, abans d'iniciar-se l'insult sèptic. De manera paral·lela, l'administració profilàctica de iNO va evitar la LPA al reduir la migració alveolar de neutròfils i la leucopènia perifèrica induïdes per LPS. Les propietats antiinflamatòries del iNO es presenten de manera variable en funció del model experimental/clínic emprat; i l'ús potencial del iNO amb finalitat antiinflamatòria passa per assajar l'administració en diferents moments de l'evolució de la LPA. L'administració de PGneb en canvi, no va evitar la disminució del DC, la HTP ni la hipoxèmia produïts per l'administració de LPS, i va afavorir la LPA, al potenciar la migració intraalveolar de neutròfils. En contraposició a aquests resultats, en la majoria d'estudis reportats els prostanoids, igual que tots els fàrmacs que incrementen els nivells de AMPc, mostren propietats antiinflamatòries. No tenim una explicació clara que justifiqui aquest fenomen. És possible que les PGneb fossin absorvides a nivell traqueobronquial, passant així a la circulació sistèmica; però la tendència a l'increment dels valors del AMPc en els animals d'aquest grup apunta que en una o altra mesura les PGneb van arribar a nivell alveolar, sense tenir l'efecte esperat. L'administració de iNO+PGneb va evitar la HTP però no la hipoxèmia produïdes per l'administració de LPS. Amb aquesta associació no es va observar l'efecte profilàctic de l'administració de iNO, però tampoc es van manifestar els efectes proinflamatoris de l'administració de PGneb soles. És possible que aquest fenomen estigui en relació a un mecanisme de retroalimentació entre els respectius segons missatgers AMP i GMP cíclics.

Conclusions:

1. L'administració d'endotoxina de E. Coli produeix una LPA que es caracteritza per migració transendotelial i activació dels neutròfils, edema alveolar, hipertensió pulmonar i hipoxèmia severa.

2. L'administració profilàctica de 10 ppm de iNO prevé de l'aparició de hipertensió pulmonar i de hipoxèmia induïdes per l'endotoxina. Així mateix prevé la

migració transendotelial dels neutròfils, amb una disminució significativa del nombre de neutròfils en el rentat broncoalveolar.

3. L'administració profilàctica de 10ng/kg/min de PGneb no evita l'aparició de hipertensió pulmonar ni de hipoxèmia induïdes per l'endotoxina. Tampoc evita la migració transendotelial de neutròfils.

4. L'administració profilàctica de iNO i de PGneb conjuntament, si bé evita el desenvolupament de hipertensió pulmonar, no prevé la hipoxèmia. Tampoc evita l'augment de neutròfils en el rentat broncoalveolar i en el teixit pulmonar.

5. La lesió pulmonar aguda induïda per endotoxina de E. coli es prevé totalment amb l'administració de iNO, mentre que la PGneb no exerceix cap efecte profilàctic d'aquesta lesió pulmonar i la l'associació d'ambdós tractaments té nomès un efecte profilàctic parcial.

1.2. RESUMEN

Introducción: la lesión pulmonar aguda (LPA) es una entidad clínica que incluye un amplio espectro de daño pulmonar y que puede darse en asociación a una gran variedad de condiciones precipitantes. La manifestación más severa de la LPA se conoce con el nombre de síndrome de distres respiratorio agudo. La sepsis es la etiología más frecuente de la LPA, con una mortalidad superior al 50%. El mecanismo de producción de esta entidad, implica una compleja respuesta inmunológica humoral y celular, que se traduce en una alteración estructural y funcional que origina trastornos en la vasculatura y en la mecánica pulmonar, alterando la ventilación-perfusión. Esto se manifiesta clínicamente con hipertensión pulmonar (HTP) e hipoxemia severa.

Actualmente el tratamiento de esta entidad se basa en medidas de mantenimiento hemodinámicas y respiratorias, en espera que se resuelva la causa precipitante. El óxido nítrico inhalado (iNO) y las prostaciclina nebulizadas (PGneb) no se incluyen en el tratamiento habitual de la LPA; contemplándose su uso en los casos de hipoxemia o HTP severa refractarias al tratamiento convencional es decir, en una fase evolutiva avanzada de la enfermedad. La administración profiláctica de estos fármacos en la LPA ha sido reportada de manera aislada y con resultados dispares. Dada la naturaleza inmunológica-inflamatoria de la LPA y las propiedades antiinflamatorias del NO y de las PG, la administración de manera profiláctica de iNO e iPGneb, antes de producirse el insulto que desencadena el cuadro, podría ser mucho más efectiva que su uso con finalidad terapéutica.

Hipotesis y objetivos:

1. Verificar que la administración endovenosa de endotoxina produce una lesión aguda a nivel de la membrana alveolocapilar que condiciona un aumento de la permeabilidad capilar, migración y activación de neutrófilos ocasionando edema alveolar, HTP e hipoxemia severa.

2. Investigar el efecto de la administración profiláctica de NO inhalado, de prostaciclina nebulizada y de ambos a la vez, sobre la hemodinámica sistémica, la hemodinámica pulmonar y el intercambio de gases.

3. Investigar si la administración profiláctica de NO inhalado, de prostaciclina nebulizada y de ambos a la vez, evita el incremento de la permeabilidad vascular, la migración y activación de neutrófilos.

Material y métodos: el estudio se realizó con 31 ovejas anestesiadas y ventiladas mecánicamente (8 en el grupo control, 7 en el grupo endotoxina, 6 en el grupo iNO, 5 en el grupo PGneb y 5 en el grupo iNO más PGneb) de 20-25 kg. Se monitorizó la tensión arterial y la hemodinámica pulmonar a través de un catéter de Swan-Ganz. Se realizaron gasometrías arteriales y venosas, recuento de leucocitos en sangre arterial, y niveles de AMP i GMP cíclicos en sangre arterial y venosa mixta, así como un lavado broncoalveolar (BAL) de cada pulmón. De la muestra obtenida se estudió la celularidad (número, viabilidad y tipos celulares) y la concentración de proteínas. Al final del estudio se obtuvo una muestra de tejido pulmonar, para estudio anatomopatológico y determinación de mieloperoxidasa. La endotoxina (LPS) administrada fue de E. Coli. El iNO se administró con un regulador caudalímetro de bajo flujo, conectado a la rama inspiratoria del respirador. Las PGneb se administraron mediante un nebulizador ultrasónico (OMRON, modelo NE-012) conectado a la rama inspiratoria del respirador. Los animales fueron distribuidos de manera aleatoria en 5 grupos. Grupo control: recibieron una perfusión de suero fisiológico, Grupo LPS: recibieron un bolus de 20 η g/kg/min. Grupo iNO: recibieron 10 ppm de NO. Grupo PGneb: recibieron 10 η g/kg/min de PGneb, i Grupo iNO+PGneb: recibieron ambos fármacos a la vez. Todos los grupos fueron estudiados durante un periodo de 4 horas, y los controles se realizaron en situación basal (T00), a los 20 minutos del inicio de la administración de iNO, PGneb o iNO+PGneb (T0), a las 1, 2, 3 i 4 horas de iniciarse la infusión suero salino/LPS (T1, T2, T3, T4 respectivamente) y a los 20 minutos de retirar el iNO, las PGneb o ambos (T5).

Para analizar la evolución de las variables en el tiempo, se comparó el efecto de cada uno de los tratamientos, mediante la descomposición de la varianza de las diferencias entre el momento basal y después de haber pasado 4 horas. Si la diferencia se distribuía según una Normal, se hacían múltiples comparaciones aplicando la corrección de Bonferroni, en los casos en que la variable a comparar no se distribuía según una Normal, se contrastó la igualdad entre los grupos mediante la prueba Kruskal Wallis. Se consideró significativa una $p < 0,05$.

Resultados: en el grupo de animales que únicamente recibió endotoxina se observó una disminución del gasto cardíaco (GC) y un incremento de las resistencias vasculares sistémicas (RVS) significativos; así como un incremento significativo de la presión de la arteria pulmonar (PAPm) y de las resistencias vasculares pulmonares (RVP) respecto los animales del grupo control. La administración de LPS también produjo una disminución significativa de la PaO₂ y de los leucocitos en sangre periférica. En el BAL de este grupo de animales, había un incremento significativo del porcentaje de neutrófilos y del valor de la mieloperoxidasa. En la anatomía patológica de las muestras de tejido pulmonar se observó un infiltrado inflamatorio difuso con aumento de leucocitos en el interior de las arteriolas.

El grupo de animales que recibió 10 ppm de iNO no mostró variaciones significativas en los parámetros de la hemodinámica sistémica. La administración de iNO en este grupo evitó la disminución del GC, el incremento de la PAPm y el incremento de las RVP de manera significativa. La administración de iNO también evitó la disminución significativa de la PaO₂ y de los leucocitos en sangre periférica. En el BAL de este grupo el porcentaje de neutrófilos fue significativamente inferior al del grupo que recibió LPS.

El grupo de animales que recibió 10 η g/kg/min de PGneb no mostró variaciones significativas en la hemodinámica sistémica respecto al grupo que recibió LPS. Con la administración de PGneb se observó un incremento significativo de la PAPm y de las RVP respecto el grupo que recibió iNO. También se observó una disminución

significativa de la PaO₂ respecto el grupo que recibió iNO. La disminución de la cifra de leucocitos en sangre periférica observada en este grupo fue significativamente inferior a la del grupo LPS. El porcentaje de neutrófilos en el BAL de este grupo fue significativamente superior al del grupo iNO. En la muestra de tejido pulmonar destacó un intenso infiltrado inflamatorio agudo con marcado edema periarteriolar y perivenular.

El grupo de animales que recibió conjuntamente 10 ppm de iNO i 10 η g/kg/min de PGneb no mostró variaciones significativas en la hemodinámica sistémica respecto el grupo que recibió LPS. Se observó una disminución significativa de la PAPm y de las RVP respecto el grupo LPS y respecto el grupo PGneb. No se observaron diferencias significativas en el resto de parámetros hemodinámicos ni gasométricos medidos. El porcentaje de neutrófilos en el BAL de este grupo fue significativamente superior al del grupo iNO, mientras que el porcentaje de macrófagos fue significativamente inferior al del grupo iNO. La anatomía patológica de este grupo mostró un infiltrado inflamatorio agudo y un edema perivascular moderados.

No hubo diferencias significativas en los valores de AMPc y GMPc arteriales ni venosos, entre los grupos estudiados.

Discusión: el modelo de LPA por endotoxina presentado en este estudio, se caracterizó fundamentalmente por hipertensión pulmonar y hipoxemia severa como consecuencia de la vasoconstricción y del aumento de permeabilidad vascular, que origina extravasación de proteínas, infiltración y degranulación de neutrófilos. Este modelo está ampliamente demostrado anteriormente en la literatura en diferentes estudios experimentales. Nosotros escogimos el modelo ovino por tener éste una respuesta vascular más parecida a la de los humanos. Por tanto, se considera un buen modelo para valorar el efecto de diferentes fármacos como tratamiento o profilaxis de esta entidad.

La administración profiláctica de iNO evitó la HTP, la disminución del GC y la hipoxemia producidas por la administración de LPS. Estos resultados están en la misma línea que los datos previamente reportados en la literatura, pero en un grado de eficacia superior, que atribuimos al hecho de que éstos hayan estado administrados profilácticamente, antes de iniciarse el insulto séptico. De manera paralela la administración profiláctica de iNO evitó la LPA al reducir la migración alveolar de neutrófilos y la leucopenia periférica inducidas por LPS. Las propiedades antiinflamatorias del iNO se presentan de manera variable en función del modelo experimental/clínico estudiados; i el uso potencial del iNO con finalidad antiinflamatoria pasa por ensayar su administración en diferentes momentos de la evolución de la LPA. La administración de PGneb en cambio, no evitó la disminución del GC, la HTP ni la hipoxemia producidos por la administración de LPS, favoreciendo la LPA, al potenciar la migración intraalveolar de neutrófilos. En contraposición a estos resultados, en la mayoría de estudios reportados los prostanoides, al igual que el resto de los fármacos que incrementan el AMPc, muestran propiedades antiinflamatorias. No tenemos una explicación clara que justifique este fenómeno. Es posible que las PGneb fueran absorbidas a nivel traqueobronquial, pasando de esta manera a la circulación sistémica; pero la tendencia al incremento de los valores del AMPc en los animales de este grupo apunta que en alguna medida las PGneb llegaron a nivel alveolar, sin tener el efecto deseado. La administración de iNO+PGneb evitó la HTP pero no la hipoxemia producida por la administración de LPS. Con esta asociación no se observó el efecto profiláctico de la administración de iNO, pero tampoco se manifestaron los efectos proinflamatorios de la administración de PGneb aislada. Es posible que este fenómeno esté en relación a un mecanismo de retroalimentación entre los respectivos segundos mensajeros AMPc i GMPc.

Conclusiones:

1. La administración de endotoxina de E. Coli produce una LPA que se caracteriza por migración transendotelial y activación de los neutrófilos, edema alveolar, HTP e hipoxemia severa.

2. La administración profiláctica de 10 ppm de iNO previene la aparición de hipertensión pulmonar y de hipoxemia inducidas por endotoxina. Así mismo previene la migración transendotelial de neutrófilos, con una disminución significativa del número de neutrófilos en el lavado broncoalveolar.

3. La administración de 10 η g/kg/min de PGneb no evita la aparición de hipertensión pulmonar ni de hipoxemia inducidas por endotoxina. Tampoco evita la migración transendotelial de neutrófilos.

4. La administración profiláctica de iNO+PGneb conjuntamente, si bien evita el desarrollo de hipertensión pulmonar, no previene la hipoxemia. Tampoco evita el aumento de neutrófilos en el lavado broncoalveolar ni en el tejido pulmonar.

5. La lesión pulmonar aguda inducida por endotoxina de E. Coli se previene totalmente con la administración de iNO, mientras que las PGneb no ejercen ningún efecto profiláctico de esta lesión pulmonar y la asociación de ambos tratamientos sólo tiene un efecto profiláctico parcial.

2. INTRODUCCIÓ

2.1. LESIÓ PULMONAR AGUDA

La lesió pulmonar aguda (LPA) és una entitat clínica reconeguda que inclou un ampli espectre de dany pulmonar i que pot donar-se en associació a una gran varietat de condicions precipitants, només algunes de les quals inclouen una lesió pulmonar directa. La manifestació més severa de la LPA es coneix amb el nom de síndrome de distres respiratori agut (SDRA). La LPA és una entitat heterogènea i és difícil conèixer les seves dades epidemiològiques reals; però es calcula que aproximadament es declaren de 2-8 casos per cada 100.000 habitants per any. El seu curs clínic és molt variable i la mortalitat de la mateixa en les pitjors sèries supera el 50%. L'etiologia de la LPA és extensa, incloent causes pulmonars i extrapulmonars, però la sepsis en representa més de la meitat dels casos, i dins d'aquesta l'originada per bacils aerobis gram negatius. La hipoxèmia *per se* és responsable únicament del 5% de la mortalitat, i per tant es pot dir que és la sepsis, i no la insuficiència respiratòria, la causa més freqüent de mort en la LPA. Tenint en compte que la sepsis és la causa de mort més freqüent en les unitats de cures intensives, s'entén el grau de rellevància clínica d'aquesta entitat.

La primera **definició** de LPA oSDRA data de fa més de 30 anys quan Petty i Ashbaugh l'any 1971 estableixen els criteris diagnòstics d'aquesta síndrome en infiltrats pulmonars difusos, hipoxèmia i disminució de la compliança en absència de insuficiència cardíaca ^{1,2}. No es va tornar a definir aquesta entitat fins l'any 1994, quan es va establir com la síndrome de inflamació i augment de la permeabilitat associada a una constel·lació d'anormalitats clíniques, radiològiques i fisiològiques, que no poden ser explicades per hipertensió capil·lar pulmonar però que poden coexistir amb ella; mentre que el terme síndrome de distres respiratòria aguda (SDRA), es reserva per la forma més severa del quadre, de manera que tots els pacients que presenten SDRA tenen una LPA però no viceversa. Actualment hi ha dues classificacions acceptades que fan referència a aquesta malaltia: la *North American-European Consensus Comitè* (NAEEC) i la *Lung Injury Severity Score* (LISS). La NAEEC requereix pel diagnòstic de la SDRA, inici agut, PaO₂/FiO₂ inferior a 200, infiltrats difusos bilaterals i PCP inferior a 18 cm H₂O,

o en cas de no tenir monitorització de la PCP, absència d'evidència clínica de hipertensió capil·lar pulmonar. La LISS emprà la modificació de la definició feta per Murray l'any 1988 que considera la PaO₂/FiO₂, la radiografia de tòrax, on es valora el nombre de quadrants afectats per la consolidació alveolar, la compliança del sistema respiratori i el nivell de PEEP; cadascun dels quatre paràmetres es puntuen de 0-4, de manera que amb aquesta classificació, no únicament es defineixen els criteris diagnòstics si no que a més s'estableix el grau de severitat de la malaltia. La incidència de la malaltia és similar utilitzant ambdues classificacions esmentades: 55,1% i 61,9%, per la NAECC i el LISS, respectivament. Entre elles tampoc hi ha diferències respecte el pronòstic, de manera que poden ser utilitzades indistintament. La conferència consens de l'any 2000 ³ apunta que la disfunció orgànica en la sepsis i en la LPA és força diferent en quant al insult inicial i a les condicions prèvies del pacient, i que seria recomanable agrupar els pacients en base als mecanismes patogenètics.

La sepsis és **l'etiologia** més freqüent de LPA, en representa més de la meitat dels casos, però no l'única car les causes que poden originar-la són múltiples i es poden dividir en pulmonars i extrapulmonars. De tota manera, la broncoaspiració de contingut gàstric, el politraumatisme i la sepsis, sumen el 75% de la totalitat dels casos ⁴. Entre les causes extrapulmonars destaquen, a banda de la sepsis, el xoc, el politraumatisme, l'embòlia grassa, l'embolisme aeri, la politransfusió, la pancreatitis aguda, la tuberculosi miliar, les cremades extenses, les reaccions transfusionals, la púrpura trombòtica trombocitopènica, les leucèmies mieloproliferatives, la hipertensió endocranial, la circulació extracorporea, l'hemodiàlisi, la síndrome del xoc tòxic, la eclàmpsia i l'embolisme de líquid amniòtic. La LPA també s'ha relacionat amb la ingesta de fàrmacs com ara la sobredosi d'heroïna, metadona, àcid acetil salicílic, antidepressius tricíclics i propoxifé; o amb la hipersensibilitat a colxicina, ampicil·lina i contrastes. Les causes pulmonars més freqüents són l'aspiració de contingut gàstric, la contusió pulmonar bilateral, la pneumònia difusa per adenovirus, citomegalovirus, micoplasma, pneumocistis, legionel·la i estreptococ, l'ofegament, i la inhalació de fum, de NO₂, Cl₂,

SO₂, NH₃. També, la toxicitat per oxigen, les radiacions i l'edema d'alçaria poden causar una LPA.

La **incidència** de la LPA és difícil de determinar, ja sigui per la heterogeneïtat de processos patològics que en ella poden desembocar, per la manca de diferenciació entre SDRA i LPA, o per errors metodològics en la classificació. Malgrat això, els més de deu estudis epidemiològics que fins ara s'han dut a terme conclouen que la incidència de la SDRA varia entre 1,5 i 13,5 casos per 100.000 habitants per any. Pel que fa a la LPA les dades són també força variables; així While Luce estima en 70 casos per 100.000 habitants anuals en els Estats Units, mentre que Kanawaza redueix a la meitat la incidència a Japó. Per altra banda Luhr troba als països nòrdics 179 casos per 100.000 habitants.

La **mortalitat** de la LPA no ha variat substancialment des de 1967 fins 1994, estimant-se superior al 50%. Actualment les series descrites informen d'un marge entre 30-70%. Zilberberg (1998) troba una mortalitat del 58% i Monchi (1998) del 65%. Luhr (1999) informa dels resultats del primer multicèntric que estima la mortalitat en un 41%. L'índex de mortalitat augmenta fins al 90% quan coincideixen LPA i sepsis. S'estima que entre 20-40% dels pacients que tenen sepsis desenvolupen LPA, la majoria dins les primeres 6 hores, mentre que és únicament del 10% quan s'associa a embòlia grassa. El 90% de les morts es produeixen dins les 2-3 primeres setmanes que segueixen l'inici del quadre ⁴. Les que es donen als pocs dies estan directament relacionades amb el factor etiològic o predisposant, mentre que les que tenen lloc en els dies següents estan en relació a les complicacions infeccioses. Així doncs la mortalitat tardana depèn de l'aparició de sepsis, i el focus més habitual d'aquesta és el pulmó. Un estudi europeu realitzat el 1997, en 38 unitats de cures intensives revela com a factors pronòstic amb valor predictiu la causa de la LPA, no tant l'índex d'oxigenació (PaO₂/FiO₂) a l'ingrés com la seva resposta al tractament dins la primera setmana, l'edat per sobre dels 60 anys, la durada de la ventilació mecànica, el desenvolupament de fallada multiorgànica i la presència de sepsis. ⁵

El mecanisme de producció o **patogènia** de la LPA en un model de sepsis per gram negatiu, és el resultat de la interacció de tres entitats que són el lipopolisacàrid, l'endoteli vascular i l'epiteli alveolar.

L'endotoxina o lipopolisacàrid de la paret bacteriana (LPS) inicia la lesió de l'endoteli, estructura anatòmica que primer s'altera i que esdevé el factor desencadenant de l'LPA. El lipopolisacàrid de la paret bacteriana està constituït per macromolècules altament antigèniques⁶: 1) el cap de diglucosamina anomenat lípid A (amb poca variació antigènica) unit als àcids grassos de la membrana, responsable de la majoria de les accions tòxiques de l'endotoxina (com l'alliberament d'interleuquines a partir dels macròfags, i l'activació del complement per la via clàssica), 2) l'antigen O, un oligosacàrid en forma de cadena lateral que pot activar la via alternativa del complement i que confereix especificitat serotípica antigènica a la bactèria doncs és altament variable, i 3) la regió antigènica Recorre, un polisacàrid poc variable per la majoria de bactèries gramnegatives. La funció de l'LPS és augmentar la resistència de la paret bacteriana i els canvis en la porció lipídica es relacionen amb la seva activitat. L'LPS produeix disrupció funcional de l'endoteli de la macro i microvasculatura de manera directa, tant *in vivo* com *in vitro*, demostrat en models animals i en humans ⁷. Dins la circulació sistèmica, l'endotoxina també activa el complement, els neutròfils i els monòcits.

L'endoteli no és una barrera física passiva i actualment sabem que el "sistema endotelial" sintetitza substàncies com NO, PG, endotelines i factors de creixement amb propietats vasoconstrictores, immunomoduladores, endocrines i neurològiques, implicades en la fisiopatologia del xoc endotòxic. El primer pas és l'alteració en l'adhesió cel·lular, la primera etapa en la migració dels leucòcits, i l'alteració en la permeabilitat de la barrera. Hi ha un augment en l'adhesivitat de leucòcits i plaquetes que genera un estat procoagulant i una disminució del to arteriolar amb modificació de la reactivitat a molts agonistes. El dany tissular és conseqüència de la disminució de la

perfusió i de les substàncies alliberades per cèl·lules endotelials, leucòcits, plaquetes i macròfags activats.^{8 9}.

Es sap però que el que determina l'aparició o no del dany pulmonar i la severitat del mateix és el grau d'integritat i funcionalisme de l'epiteli alveolar format pels pneumòcits tipus I i II, que és molt més resistent que l'endoteli. De manera que la capacitat de reabsorció de l'edema alveolar les primeres 12 h que segueixen l'insult pulmonar poden marcar el pronòstic i la seva integritat es relaciona amb la recuperació de la lesió pulmonar i probablement amb la mortalitat⁸. Mitjançant l'estudi d'antígens de superfície de pneumòcits tipus I, s'ha relacionat la lesió morfològica d'aquest tipus cel·lular amb l'augment de la permeabilitat a proteïnes de la barrera epitelial i de la concentració d'aquest marcador específic en el BAL. La interrelació de l'endoteli capil·lar i de l'epiteli alveolar és tant alta que des del punt de vista funcional actua com una membrana al·veol-capil·lar. Els mecanismes de lesió pulmonar que segueixen la infusió de pseudomona viva en ovelles són similars als produïts per administració d'endotoxina d'E. Coli, objectivant-se augment d'edema ric en proteïnes a les dos hores d'administració de la mateixa.

Els models experimentals han demostrat que tant la resposta humoral com la cel·lular són importants en la patogènesi de la lesió pulmonar. Dins la resposta cel·lular destaca el paper dels neutròfils, els macròfags, els fibroblastes, les plaquetes i la resta de factors de coagulació, i dins la resposta humoral hi participen, els radicals tòxics d'oxigen, els metabolits de l'àcid araquidònic, les citoquines i el sistema del complement.

Pel que fa a la resposta cel·lular s'ha vist que hi ha un acúmulo de neutròfils en els pulmons en les primeres fases de la LPA associat sovint a neutropènia en sang perifèrica. Això no és una troballa constant ja que s'ha vist desenvolupar distrés respiratori en pacients neutropènics, indicant que són possibles els dos mecanismes de lesió pulmonar, el que depèn i el que és independent dels neutròfils.¹⁰. De tota manera la persistència de la resposta inflamatòria neutrofílica inicial es relaciona amb la severitat

del dany pulmonar i amb la mortalitat ⁸. El funcionalisme dels neutròfils s'ha demostrat alterat a tots tres nivells de la seva activitat, de manera que hi ha un augment en: a) la resposta quimiotàctica, b) la capacitat d'adhesió, i c) l'estat metabòlic; a més hi ha una fagocitosi defectuosa en pacients que desenvolupen septicèmia severa. La migració intraalvèolar dels neutròfils s'inicia a partir d'un estímul quimiotàctic que es produeix abans que la pròpia lesió pulmonar, de manera que s'ha vist un augment de l'activitat dels neutròfils circulats respecte dels intraalvèolars en pacients amb LPA. L'increment de la capacitat d'adhesió dels neutròfils pot ser deguda a l'augment de les molècules d'adhesió cel·lular, principalment ICAM-1, selectines i beta 2 integrines. L'augment en l'activitat metabòlica condueix a l'alliberament de radicals tòxics d'oxigen (mieloperoxidasa i peròxid d'hidrogen, entre altres), metabolits de l'àcid araquidònic (tromboxà, PG i leucotriens) que contribueixen a la lesió pulmonar, i enzims proteolítics que degraden la matriu extracel·lular produint un augment de la permeabilitat vascular (elastasa, i colagenasa)^{11 8}. La resposta neutrofilica és responsable en gran part de la LPA, i el grau de la mateixa és un dels principals factors condicionants del pronòstic. De manera que en molts estudis aquesta s'avalua tant des d'un punt de vista quantitatiu com funcional. Mesures quantitatives són el grau d'infiltració pulmonar per neutròfils (objectivat en el BAL i en l'anatomia patològica del teixit pulmonar), mentre que per tal d'avaluar el seu estat metabòlic es determinen productes procedents de la seva degranulació (mieloperoxidasa, elastasa, colagenasa i radicals tòxics d'oxigen), així com citoquines en la síntesi de les quals estan implicats (tromboxà, PG, interleuquines), en el BAL i en mostres homogeneïtzades de teixit pulmonar.¹²

S'ha relacionat l'increment de macròfags en el rentat broncoalveolar de pacients amb lesió pulmonar amb millor resolució i augment de la supervivència. Aquestes cèl·lules tenen alhora un efecte pro i antiinflamatori. Per una banda fagociten partícules intraalvèolars (eritròcits, proteases de neutròfils i neutròfils mateixos) i tenen funció antibacteriana, i per d'altra esdevenen una font de citoquines (factor de necrosi tumoral i interleuquines entre d'altres) que amplifiquen la resposta inflamatòria i contribueixen

al reclutament de neutròfils intraalvèolars. També alliberen factors de creixement que promouen la fibrosi, l'angiogènesi i la migració de cèl·lules endotelials, modulant així la reparació de la lesió pulmonar. En general s'accepta que la infiltració per aquest tipus cel·lular és un indicador de bon pronòstic⁸.

La reconstrucció en la que participen els fibroblastes pot conduir a la reparació de l'aparell respiratori o a una resposta fibroproliferativa inadequada que ocasiona disfunció pulmonar en grau variable per acúmulo de material fibroblàstic intraalvèolar. L'ús de FiO₂ elevades es relaciona amb l'augment en el BAL de PCPIII (procolagen pèptid III), un marcador de la secreció de colagen que pot reflectir el desenvolupament d'una alveolitis fibrosant.

En estudis realitzats en pacients sèptics amb LPA s'ha vist sovint recomptes plaquetars inferiors a 100.000 així com microtrombosi intrapulmonar. També s'ha observat anormalitats en el funcionament de les plaquetes i en la cascada de la coagulació. Ambdós fenòmens poden relacionar-se amb la patogènesi de la lesió pulmonar.

En quan a la resposta humoral, hi han estudis adreçats a mesurar marcadors biològics d'inflamació aguda, amb valor predictiu o significació pronòstica, en el plasma i en el BAL de pacients amb LPA, els més importants són: les citokines, els radicals tòxics d'oxigen, els metabolits de l'àcid araquidònic, el complement, el factor activador de plaquetes, la cascada de la coagulació, els factors de creixement, i les pròpies endotoxines⁸.

Les citokines més importants són el factor de necrosi tumoral- α , sintetitzat pels macròfags i que estimula la producció de interleuquina-1 α , la qual precipita la degranulació dels neutròfils¹³, i la interleuquina-8, el més important factor quimiotàctic de neutròfils. Tots tres estan augmentats en el BAL de pacients amb dany pulmonar.

Els radicals d'oxigen alliberats per neutròfils i macròfags activats, són proposats com un dels principals mecanismes de dany pulmonar, mitjançant la peroxidació

lipídica que altera morfològica i funcionalment la membrana cel·lular¹⁴. També les altes FiO₂ i la reperfusió de teixits hipòxics són una font addicional de radicals tòxics d'oxigen. El peròxid d'hidrogen en orina i els nivells d'hipoxantina en plasma poden reflectir la severitat del procés oxidatiu sistèmic en pacients amb lesió pulmonar. Per d'altra banda, els productes resultants de la peroxidació lipídica¹⁵ com la lipofuccina plasmàtica i altres, es correlacionen amb el dany pulmonar i el fracàs multiorgànic. El pulmó disposa de mecanismes per inactivar aquests radicals, com són la citocrom oxidasa intramitocondrial, la catalasa, la superòxid dismutasa i la N-acetilcisteïna, que actua netejant els radicals tòxics d'oxigen en ovelles que han rebut endotoxina, i l'activitat antioxidant de les vitamines A, C i E.

La fosfolipasa A₂ (PLA₂), sintetitzada pels neutròfils i les plaquetes, és un enzim involucrat en la síntesis de potents mediadors inflamatoris com són els metabolits de l'àcid araquidònic, el qual és alliberat de la membrana plasmàtica per acció de la PLA₂ i alimenta la síntesis de prostaglandines i tromboxans per la via de la ciclooxigenasa, o la de leucotriens, per la via de la lipooxigenasa. En models experimentals en els que s'ha administrat endotoxina d'E.Coli, els metabolits resultants de la via de la ciclooxigenasa s'han relacionat amb el pic de hipertensió pulmonar i broncoconstricció que segueixen la infusió de la mateixa; s'accepta que el tromboxà és el vasoconstrictor més potent implicat en l'increment de les resistències vasculars pulmonars¹⁶. Per aquest motiu el tractament amb indometacina inhibeix la hipertensió pulmonar. L'augment de permeabilitat vascular observada en fases posteriors s'ha relacionat amb els mediadors de la via de la lipooxigenasa. Així s'han trobat nivells elevats de leucotriè D₄ en el BAL de pacients amb LPA i edema pulmonar. Tant les PG com els leucotriens al promoure l'edema inflamatori, són responsables en gran mesura de la hipoxèmia observada en la lesió pulmonar, sense que es pugui esbrinar quin pes específic tenen en la mateixa.

El C 5a és el factor del complement més proinflamatori que es coneix¹⁷ i els seus nivells plasmàtics es relacionen amb la severitat del xoc però no amb la lesió pulmonar.

Donada la complexitat del sistema del complement s'hauria de mirar varis components alhora per establir alguna relació entre els nivells plasmàtics i el seu significat clínic.

És difícil implicar factors de coagulació en els estadis inicials de la LPA; s'han vist però dipòsits de fibrina en les parts distals del tracte respiratori degut a l'augment de l'activitat procoagulant i a la disminució de l'activitat fibrinolítica, això explica la troballa de membranes hialines i altres proteïnes en els alvèols de pacients amb LPA. En el BAL d'aquests pacients s'ha vist un augment dels inhibidors de la via extrínseca de la coagulació. Les concentracions sèriques però, difícilment reflecteixen el que passa a nivell alveolar.

El grau de funcionalisme pulmonar que resta després de la lesió pulmonar depèn de com s'hagi dut a terme la reparació de la mateixa. En aquest sentit hi ha estudis adreçats a esbrinar si els factors de creixement mesurats en el BAL poden tenir una importància pronòstica en aquest procés de reparació.

De totes aquestes substàncies citades com a mediadors d'inflamació aguda no hi ha cap que hagi demostrat tenir especificitat, valor pronòstic suficient com perquè la mesura dels seus nivells pugui ser utilitzada en la clínica. Els motius pels quals això resulta difícil són varis. Per una banda moltes d'aquestes substàncies són inestables i amb una vida mitja curta, cosa que les fa molt difícils de mesurar, i per d'altra els nivells plasmàtics de les mateixes sovint no reflecteixen els fenòmens que es produeixen a nivell pulmonar. La multiplicitat d'accions simultànies, sovint contradictòries, i la complexitat de les interrelacions entre elles fan que la determinació aïllada de les mateixes tingui poc valor i que l'augment o disminució dels seus nivells plasmàtics, i/o del rentat broncoalveolar, siguin poc conclouents.

A la vista de la fisiopatologia de la LPA s'entén que aquesta no sigui més que la manifestació pulmonar d'una reacció panendotelial. Qualsevol temptativa terapèutica proposada en els darrers anys va encaminada a bloquejar el desenvolupament de la resposta immunològica en l'estadi més inicial possible, ja que un cop desencadenada,

L'avenç de la mateixa és exponencial, implicant a cada pas un nombre superior de tipus cel·lulars i de mecanismes de defensa els quals en un intent de controlar la infecció, desenvolupen una resposta excessiva que esdevé perjudicial per l'hoste.

En resum, la LPA per endotoxina s'inicia a l'entrar en contacte una porció de la paret bacteriana (lípid A), amb la membrana alveol-endotelial, desencadenant una resposta immunològica cel·lular i humoral, un dels principals efectors de la qual són els neutròfils i els productes que d'ells se'n deriven, produint una lesió en la mateixa. Hi ha dos fenòmens que es consideren clau en la seva evolució que són, l'increment de permeabilitat vascular a proteïnes i el grau d'infiltració leucocitària. La traducció clínica d'aquestes alteracions és l'aparició de hipertensió pulmonar i hipoxèmia. Es mesuren diferents paràmetres en relació als tipus cel·lulars implicats i als metabolits sintetitzats pels mateixos, en sang perifèrica i en el BAL, amb objectiu pronòstic i terapèutic, i són d'especial rellevància els que estan en relació a o són reflex de la resposta neutrofílica i la disfunció de la barrera endoteli-capil·lar.

La traducció **histopatològica** d'aquesta complexa resposta immunològica és l'edema per augment de permeabilitat, és a dir no cardiològic, de la unitat funcional alveolo-capil·lar, el qual constitueix el trastorn primari de la LPA. És per aquest motiu que en l'estudi microscòpic de les mostres pulmonars s'hi veu una lesió alveolar difusa caracteritzada per edema alveolar sever amb alta concentració de proteïnes, i infiltració de l'interstici i de l'espai alveolar per grans quantitats de cèl·lules inflamatòries, principalment neutròfils, així com membranes hialines i fibrosis intersticial. Aquestes lesions es troben distribuïdes de manera no homogènia, de manera que coexisteixen zones pulmonars normals entre zones de lesió alveolar difusa, podent estar aquestes últimes en diferents fases evolutives. A banda d'aquestes lesions s'han afegit les lesions induïdes per la ventilació mecànica (barotrauma i/o volotrauma), així com àrees de broncopneumònia produïdes per sobreinfecció bacteriana. Macroscòpicament els pulmons amb aquestes lesions, tenen augmentat el pes i la consistència.

L'alteració estructural i funcional de la LPA, origina trastorns en la vasculatura i en la mecànica pulmonar, alterant la relació ventilació/perfusió, que es manifesta **clínicament** amb hipertensió pulmonar i hipoxèmia severa.

L'origen de la HTP en les fases inicials és funcional, causada per la vasoconstricció pulmonar hipòxica, mecanisme fisiològic que tendeix a reduir el flux sanguini que perfón zones mal oxigenades, i per l'alteració dels mecanismes vasodilatadors, que en condicions normals regulen el to de la vasculatura pulmonar. En fases més avançades s'afegeix un component anatòmic degut a hipertròfia muscular, microtrombosi, destrucció dels vasos pulmonars i fibrosi, a banda de la iatrogènia ocasionada per la ventilació mecànica. L'augment de la resistència vascular pulmonar està implicada en la insuficiència ventricular dreta, que a la vegada pot traduir-se en un augment de pressió venosa del territori esplàncnic; això afavoreix la translocació bacteriana d'origen intestinal i incrementa el risc de pneumònia nosocomial en aquests pacients.

El mecanisme fisiopatològic de la hipoxèmia es una alteració en la relació ventilació/perfusió de manera que les zones perfoses i mal ventilades són responsables del xunt intrapulmonar, que es veu agreujat al fallar la vasoconstricció pulmonar hipòxica freqüentment deficitària en els pacients amb LPA. S'afegeix a més, que els dos trastorns de la circulació pulmonar, tant la hipertensió pulmonar com la disminució de la (VPH), potencien les alteracions ventilació-perfusió agreujant la hipoxèmia. De tota manera en un model de sepsis, la hipòxia tisular es heterogènea: monitoritzant la microcirculació s'observa que malgrat la recuperació de les variables oxigen dependents persisteixen els signes de hipòxia amb efecte xunt per disfunció metabòlica cel·lular. La hipòxia citopàtica fa referència a la disminució de la producció de ATP mitocondrial malgrat l'aportació normal o àdhuc supra-normal d'oxigen. A banda d'això, l'edema i l'infiltrat inflamatori originen trastorns en la mecànica pulmonar que es manifesten amb la disminució de la compliància pulmonar total i dels volums pulmonars.

A manca d'un **tractament** específic, la terapèutica de la LPA es basa encara avui en assegurar l'oxigenació tisular mentre es soluciona la causa que l'ha originat. Això és

possible mitjançant les mesures de suport respiratori i hemodinàmic, juntament amb el tractament farmacològic, administrat amb diferents objectius.

La dificultat de proporcionar suport ventilatori en aquests pacients radica en el problema mecànic de ventilar uns pulmons que presenten una compliància i una capacitat residual funcional disminuïdes, originant elevades pressions de via aèria, amb el consegüent risc de barotrauma i volotrauma. L'objectiu és mantenir l'oxigenació, i eliminar el CO₂ (o reduir-lo fins uns nivells tolerables) evitant la lesió per excés de pressió i/o volum. En aquells casos en que la insuficiència respiratòria no és severa és possible mantenir l'oxigenació amb el pacient en ventilació espontània augmentant la concentració de O₂ i aplicant una pressió positiva continua en la via aèria (CPAP) de 5-10 cm H₂O. Amb això s'aconsegueix reduir el treball respiratori i augmentar la compliància i la capacitat residual funcional. Però en la majoria dels casos la insuficiència respiratòria es més severa i es fa necessari la intubació endotraqueal i ventilació mecànica.

La modalitat ventilatòria més utilitzada fins ara ha estat la ventilació amb pressió positiva intermitent (IPPV), amb pressió positiva espiratòria final (PEEP) i FiO₂ altes. El volum corrent (10-15 ml/kg) i la PEEP requerides per mantenir la oxigenació amb aquesta modalitat, disminueixen el retorn venós, la despesa cardíaca, i augmenten la pressió intratoràcica i el risc de baro i volotrauma. En un intent de mantenir l'oxigenació minimitzant els riscos de lesió pulmonar per la pròpia ventilació mecànica i de conservar l'estabilitat hemodinàmica s'assagen modalitats alternatives com la ventilació amb relació invertida o *inverse ratio ventilation (IRV)* que allarga la fase inspiratòria entre 1:1 i 2:1. Aquesta a la vegada pot ser controlada per volum (VC-IRV), en la que s'administra un volum corrent fix amb independència de la pressió pic d'insuflació, o controlada per pressió (PC-IRV), en la que es ventila amb un volum corrent que pot ser variable però limitat per la pressió inspiratòria prefixada. La ventilació amb volums corrents baixos (6-8 ml/kg) i PEEP elevada coneguda com ventilació de protecció pulmonar, aconsegueix obrir i mantenir oberts (reclutar) els

alvèols amb baix volum de tancament, que d'altra manera estarien col·lapsats, impedit el tancament/obertura repetits, que acaba lesionant-los. Aquest és el concepte de pulmó obert (*open lung approach*)^{18,19}. Aquesta modalitat de ventilació millora l'oxigenació i disminueix el risc de barotrauma però presenta com a efectes secundaris la depressió circulatòria per disminució del retorn venós i la lesió pulmonar per sobredistensió alveolar.

Un estudi multicèntric recent que inclou 549 pacients amb LPA i SDRA ventilats amb un volum corrent de 6 ml/Kg i una pressió plateau inferior a 30 cm H₂O, no mostra diferències significatives en el pronòstic entre els que són ventilats amb una PEEP alta o baixa²⁰. L'ús de volums corrents baixos dificulta l'eliminació de CO₂, produint hipercàpnia, que malgrat ser ben tolerada en la majoria dels casos està limitada per un pH que s'aconsella que no disminueixi de 7,20. Durant l'ús de la ventilació amb volums corrents baixos, s'intercalen maniobres de reclutament alveolar que consisteixen en aplicar una CPAP elevada durant pocs cicles respiratoris, controlant les pressions de la via aèria, amb la finalitat d'obrir el màxim nombre d'alvèols possible i mantenir-los oberts amb la PEEP més adequada, que s'individualitza en cada pacient en base al punt d'inflexió esmentat. Donat el potencial risc d'aquestes maniobres, el seu ús no es recomana rutinàriament dins l'estratègia ventilatòria; i s'aconsella una valoració individual de cada cas²¹.

Hi ha varis estudis que demostren que la ventilació en decúbit pro millora l'oxigenació de pacients amb LPA²²⁻²⁴. El mecanisme pel qual es produeix aquest fenomen és que en decúbit pro, les zones dependents o dorsals, que en decúbit supí estan col·lapsades, superen el volum de tancament i són reclutades augmentant d'aquesta manera la capacitat residual funcional. A més, la perfusió és superior en la part dorsal sigui quina sigui la posició emprada, i com en decúbit pro la ventilació es més favorable en aquesta zona, amb aquesta modalitat s'aconsegueix major equilibri entre ventilació i perfusió. Gatinoni²⁵ demostra per imatges de topografia que en decúbit pro es produeix obertura de zones col·lapsades²⁶ i Pappert²⁷ demostra amb la

tècnica de gasos inerts que en aquesta posició hi ha una distribució de la perfusió cap a zones millor ventilades i menys edematoses. També disminueix la lesió pulmonar per ventilació mecànica. La combinació decúbit pro i iNO té efecte additiu, doncs el iNO pot actuar sobre un nombre addicional d'alvèols, reclutats per efecte de la posició²⁸. També s'ha associat decúbit pro, iNO i almitrina ^{29,30} amb bons resultats. Però fins a l'actualitat tampoc s'ha demostrat que aquesta modalitat ventilatòria augmenti la supervivència. Un estudi realitzat per Chiumello i cols. mostra que emprant un volum corrent i un pic de flux inspiratori determinats, no hi ha diferències en la interacció pacient-ventilador sigui quina sigui la modalitat ventilatòria amb la que aquests s'administrin³¹.

En els casos en que la lesió pulmonar és predominantment unilateral s'ha intentat la intubació endotraqueal selectiva i ventilació a pulmons separats ³².

Altres tècniques utilitzades encara que no emprades àmpliament en la pràctica clínica són la ventilació amb pressió positiva i baixa freqüència amb extracció de CO₂ ³³ on es manté una pressió de vies respiratòries molt baixa a base d'aplicar volums corrents i freqüència respiratòries baixes. L'oxigenació s'aconsegueix a través del pulmó gairebé immòbil, "oxigenació apneica" i el CO₂ s'ha d'extreure a través d'una membrana artificial extracorporea per pontatge veno-venós.

La ventilació a alta freqüència pot ser de tres tipus: ventilació amb pressió positiva a alta freqüència (HFPPV), ventilació jet a alta freqüència (HFJV), i oscil·lació a alta freqüència (HFO). Aquestes modalitats aconseguixen l'intercanvi de gasos a través de l'administració de petits volums corrents, similars al volum de l'espai mort (150-200 ml) a freqüències molt elevades (entre 60-400 pm),³⁴ D'aquesta manera, a l'evitar les elevades pressions intratoràciques de la ventilació convencional, disminueix el risc de barotrauma i s'aconsegueix més estabilitat hemodinàmica. S'ha demostrat que l'associació d'aquestes modalitats ventilatòries amb òxid nítric inhalat (iNO), augmenta la resposta a la inhalació de iNO dels nounats ^{35,36}.

L'oxigenació per membrana extracorporea ³⁷, es realitza a través d'una membrana intercanviadora d'oxigen a nivell extracorpori ; a diferència de l'oxigenador intravascular on un cilindre de fibres de polipropilè introduït a la vena cava inferior a través de la vena femoral, intercanvia O₂ i CO₂ per difusió segons el gradient de pressió. Ambdues tècniques estan pràcticament en desús en l'actualitat.

El perfluorocarbó és un líquid que permet la solubilitat dels gasos respiratoris en ell i per tant fa possible l'intercanvi de O₂ i CO₂. La ventilació parcial líquida, consisteix en omplir el pulmó amb perfluorocarbó fins a la seva capacitat residual funcional i després ventilar-lo de manera convencional. El perfluorocarbó disminueix la tensió superficial dels alvèols que el contenen amb el qual aquests romandran oberts (reclutats). Hi han estudis experimentals ³⁸, en nounats prematurs i en adults amb LPA ³⁹ que demostren que la ventilació parcial líquida millora la compliància pulmonar i l'oxigenació arterial. La combinació de iNO amb ventilació parcial líquida hauria de tenir un efecte additiu sobre l'intercanvi de gasos, però són necessaris més coneixements sobre la solubilitat del NO i dels seus metabolits en el perfluorocarbó.

Les mesures de suport hemodinàmic van adreçades a disminuir la hipertensió pulmonar, restablir un volum intravascular efectiu, i a proporcionar un debít cardíac que assegori el transport d'oxigen. La disminució de la hipertensió pulmonar, present en diferents graus, disminueix les resistències vasculares, la PCP i augmenta el DC.

S'han utilitzat fàrmacs vasodilatadors com isoproterenol, nitroprussiat sòdic, minoxidil, prostaglandina E₁ i hidralazina amb aquesta finalitat. El problema comú que presenten aquests fàrmacs és que indueixen hipotensió arterial sistèmica, a més al produir una vasodilatació no selectiva dels vasos pulmonars inhibeixen la vasoconstricció pulmonar hipòxica i afavoreixen el xunt intrapulmonar.

D'acord amb els mecanismes fisiopatològics que originen la LPA, hi ha una disrupció de la barrera endotelial que es tradueix en un augment de la permeabilitat. Com ja es coneix, el pas de líquid a través de la membrana alvèolo-capil·lar ve

determinada per la pressió hidrostàtica i la pressió coloidosmòtica; Això significa que per mantenir un volum intravascular efectiu evitant l'aparició d'edema i formació d'un tercer espai, a banda de procurar un balanç negatiu de líquids per reduir la pressió hidrostàtica amb l'ús de diürètics, és necessària la reposició de volum a base de substàncies coloides que augmentin la pressió oncòtica.

El tractament farmacològic es dirigeix per una banda, a modular els mediadors de la resposta inflamatòria responsables de la lesió pulmonar, i per altra a redistribuir el flux sanguini pulmonar produint una vasodilatació de les zones ben ventilades, i/o una vasoconstricció de les zones que no es ventilen, de manera que la relació ventilació - perfusió sigui òptima, és a dir pròxima a 1. En aquest últim grup s'inclouen el iNO, les PGneb, i l'almitrina.

El iNO, actua només sobre la circulació pulmonar. Per via inhalatòria arriba als alvèols ben ventilats i s'uneix ràpidament a la part Fe de la oxihemoglobina, quedant inactivat dins la circulació pulmonar. El iNO presenta doncs una acció doblement selectiva doncs es limita a la vasculatura pulmonar i dins d'aquesta, a la que perfón les zones pulmonars que estan ben ventilades. L'efecte global és una disminució del xunt intrapulmonar que és el mecanisme fisiopatològic causant de la hipoxèmia en la LPA. El seu efecte vasodilatador es manifesta en una reducció de la pressió arterial pulmonar (PAP) i de les resistències vasculars pulmonars (RVP), només quan aquestes estan elevades, de manera que com més alt és el valor basal de les mateixes més gran és el descens provocat pel iNO i més gran és la millora observada en l'oxigenació. L'ús de PEEP i iNO simultanis té efectes additius doncs permet que el iNO arribi als alvèols que es mantenen oberts gràcies a l'efecte de la PEEP. L'ús de iNO també pot ser beneficiós en ventilació protectora de LPA, ja que al disminuir l'espai mort, augmenta l'eliminació de CO₂ i possibilita l'ús de volums corrents baixos, el factor limitant dels quals es la hipercàpnia. El iNO disminueix la PCP i la formació d'edema pulmonar al tenir un efecte superior sobre les resistència venoses que sobre les resistències arterials pulmonars, afavorint la reabsorció de l'aigua extravascular i millorant l'oxigenació i la

compliancia. Les dosis a les que és efectiu el iNO són força variables en funció del model en el que s'assagen. Hi ha estudis experimentals en els que el iNO té màxima efectivitat a altes dosis (60 ppm) altres en que resulta màximament efectiu a dosi de entre 5-10 ppm. mentre que altres han relacionat el grau de resposta amb el grau de HTP o de hipoxèmia. En general s'accepta que les dosis requerides pel tractament de la hipertensió pulmonar (a partir de 2 ppm) són superiors a les requerides pel tractament de la hipoxèmia (a partir de 0,2 ppm). En la pràctica clínica acostumen a fer-se servir dosis entre 5-20 ppm.⁴⁰ Sovint s'ha comprovat que l'augment de la dosi no és tradueix en un augment de la resposta ni en un canvi en la qualitat de la mateixa. S'han estudiat els efectes secundaris de l'administració crònica de baixes dosis de iNO (2-20 ppm), en el tractament de la HTP secundària al distres respiratori agut, sense observar-se taquifilaxis o toxicitat en pacients tractats durant 27 dies.⁴¹ La inhalació crònica de iNO també s'ha mostrat eficaç en el tractament de la HTP primària.⁴² En pacients amb LPA sense xoc sèptic l'efecte màxim del iNO sobre la PaO₂ s'observa a concentracions inspiratòries entre 1-5 ppm ^{40,43,44}. L'efecte màxim sobre les RVP pot observar-se a concentracions menors, amb efecte sostre a 0,1 ppm ⁴⁰. A dosis majors no millora la resposta i augmenta la toxicitat secundària. En pacients amb xoc sèptic l'administració de iNO a concentracions més altes poden ser efectives. En aquests pacients, el iNO presenta un efecte màxim sobre les RVP a 5 ppm ⁴⁵. L'any 1993 Roissant et al ⁴⁶ demostren una reducció de la HTP i del xunt, en humans amb LPA, sense observar variació en la pressió arterial sistèmica ni en el dèbit cardíac. El grup d'estudi francès l'any 1996, no troba diferències significatives en la supervivència de pacients que reben iNO. Els resultats de l'estudi multicèntric europeu iniciat l'any 1997 per Lundin et al ⁴⁷ mostren una mortalitat als 30 dies del 45% en pacients tractats amb iNO i del 38% en el grup control. Els pacients no responedors al iNO tenien una mortalitat també del 45%. Dellinger ⁴⁸ al 1998 comunica una millora de l'oxigenació en el 60% dels pacients que reben iNO vs 24% del pacients tractats amb placebo, sense que hi hagi diferències significatives en la mortalitat. A la vista d'aquests resultats, l'ús de iNO en pacients amb LPA, malgrat millorar el grau de hipoxèmia i de HTP, no augmenta la supervivència

dels mateixos i per tant no es recomana com a tractament estàndard en aquests pacients.

Els nitrovasodilatadors o “donadors de NO” exerceixen el seu efecte vasodilatador a través de la molècula de NO: nitroglicerina, nitroprussiat sòdic, nitrits, nitrats, molsidomina i linsidomina, N-acetilpenicilamina i els S-nitrosotriols. Hi han estudis experimentals ⁴⁹ que demostren que l’administració en aerosol dels mateixos, pot ser una alternativa a la inhalació de NO.

S’han assajat inhibidors de la fosfodiesterasa, amb la finalitat d’augmentar els nivells de GMPc i perllongar d’aquesta manera els efectes del iNO. El zaprinast ha resultat efectiu en models experimentals ^{50,51}, i administrat de manera inhalada pot tenir efecte selectiu. El dipiridamol augmenta la resposta al iNO en nounats ^{52,53}, i també s’ha utilitzat amb èxit per evitar la hipertensió pulmonar de rebot que s’observa al retirar la nitroteràpia.

La prostaciclina (PGI₂) és sintetitzada per les cèl·lules endotelials a partir de l’àcid araquidònic i contribueix a mantenir baixes les resistències vasculars pulmonars (RVP). Administrada per via endovenosa produeix una disminució de les RVP i de les resistències vasculars sistèmiques (RVS). Que es manifesta en una reducció de la pressió arterial mitja (PAm), de la pressió de l’artèria pulmonar mitja (PAPm) i en un augment del xunt intrapulmonar donat que la vasodilatació que exerceix no és selectiva. La disminució de la precàrrega del ventricle esquerre contribueix a la disminució del transport d’oxigen. La prostaciclina (PGI₂) administrada de forma inhalada provoca vasodilatació únicament dels vasos que estan en les zones ben ventilades, de manera similar al iNO ⁵⁴⁻⁵⁶, i tampoc té efecte sistèmic doncs és hidrolitzada als 2-3 minuts en el plasma a pH fisiològic donant metabolits inactius. Administrada per via inhalatòria mitjançant nebulització té una eficàcia similar a la del iNO. Altres efectes són inhibició de l’agregabilitat plaquetar i broncoconstricció. La dosificació de les PGI₂ és difícil doncs sovint la concentració efectiva que arriba a l’alvèol és molt inferior a l’administrada; a més és difícil determinar a quina dosi s’obté vasodilatació pulmonar

selectiva en un pacient determinat. S'ha vist que a dosi de 2 µg/kg/min pot produir vasodilatació pulmonar selectiva en nens i en adults ^{55,56} amb LPA. Dosis de 10-20 µg/kg/min empitjoren el xunt en alguns pacients ⁵⁷, mentre que en altres ocasions s'han assajat dosis de 52 µg/kg/min sense observar repercussió sistèmica ni sobre l'intercanvi de gasos ⁵⁴. Actualment són necessaris més estudis per definir el paper de les PGI₂ inhalades en el tractament de la LPA.

El bimesilat d'almitrina és un fàrmac que provoca vasoconstricció predominantment sobre les zones no ventilades, potenciant la VPH^{58,59} i els seus efectes depenen de dos factors: del grau de VPH i de la dosi administrada. L'almitrina només augmenta la VPH quan aquesta és deficient, i això ho fa a dosis inferiors a 4 µg/kg/min, mentre que en varis estudis de laboratori s'ha vist que dosis superiors a 5 µg/kg/min pot produir vasoconstricció pulmonar global.⁶⁰⁻⁶³ En pacients sense xoc sèptic s'observa un efecte sostre a dosis de 4 µg/kg/min, mentre que en pacients amb xoc sèptic aquest efecte desapareix a 2 µg/kg/min. El motiu podria ser que en pacients amb xoc sèptic la vasoconstricció pulmonar hipòxica és més deficient i per tant els vasos pulmonars tenen més reactivitat a l'almitrina; per altra banda molts d'ells reben alhora noradrenalina, i no es pot descartar que es potenciï l'efecte de l'almitrina. En pacients sense xoc sèptic, l'almitrina també disminueix de manera dosis dependent l'espai mort alveolar, millorant l'eliminació de CO₂ ⁴³. El seu ús no sempre resulta efectiu però donat que no es coneixen els factors que determinen la seva eficàcia, cal assajar-la individualment en cada pacient.

El principal efecte secundari es la HTP, que es presenta tant en pacients estables com en xoc sèptic i que és dosi dependent ⁶⁴. Donat que exerceix vasoconstricció arterial i no venosa, no augmenta la pressió microvascular i per tant no empitjora l'edema pulmonar. Efectes secundaris menys importants son vòmits, diarrea i neuropaties perifèriques reversibles.

La combinació de iNO i almitrina pot tenir utilitat clínica ja que ambdós fàrmacs tenen mecanismes d'acció diferents i complementaris. L'efecte additiu d'aquesta

associació permet reduir les concentracions administrades de dos fàrmacs potencialment iatrògens. En pacients sense xoc pot esperar-se un efecte màxim sobre l'oxigenació combinant $4\mu/\text{kg}/\text{min}$ d'almitrina amb 1,5-4,5 ppm de iNO, mentre que en pacients amb xoc pot reduir-se la dosi d'almitrina però la concentració de iNO requerida probablement sigui superior. Amb la combinació dels dos fàrmacs, a les dosis d'almitrina recomanades, predomina l'efecte vasodilatador del iNO de manera que el resultat net és una disminució de la hipertensió pulmonar ⁴³. La combinació per contra no millora l'espai mort respecte a la seva administració per separat. S'ha intentat la combinació d'altres fàrmacs vasopressors com la fenilefrina i la noradrenalina amb el iNO amb la finalitat de provocar vasoconstricció de les zones mal ventilades, però cap combinació ha resultat ser més efectiva que la de iNO amb almitrina.

Els moduladors de la resposta immunològica que també s'han assajat amb finalitat terapèutica en la LPA són la prostaglandina E1 (PGE1), els inhibidors de l'òxid nítric sintetasa, els inhibidors de la ciclooxigenasa, els antioxidants, i els corticosteroids.

La prostaglandina E₁ (PGE1), que com la PGI₂ actua per la via del AMPc, és un potent vasodilatador pulmonar, que intervé en la regulació de la resposta inflamatòria mitjançada per neutròfils i macròfags, i té propietats antiagregants plaquetars ⁶⁵. En estudis animals l'administració de PGE₁ liposomal disminueix l'edema i l'acumulació de neutròfils en un model de LPA per interleuquina-1 ⁶⁶, i millora la supervivència en rates. ⁶⁷. En un estudi prospectiu randomitzat en humans ⁶⁸, l'administració de PGE₁ liposomal augmenta l'índex d'oxigenació de manera inicial, però no millora la supervivència; a més s'observen efectes adversos en el 69% dels casos, essent la hipotensió el més freqüent, de manera que actualment no es considera l'ús d'aquest fàrmac en el tractament de la LPA.

L'òxid nítric sintetasa (NOS) i la ciclooxigenasa (COX) sintetitzen respectivament NO i PGI₂; ambdós relaxen la musculatura llisa vascular mitjançant l'activació de la guanilciclasa i l'adenilciclasa respectivament. En situacions patològiques com la sepsis i l'endotoxèmia, aquests enzims presenten formes induïbles (NOS i COX₂), de manera

que els inhibidors inespecífics d'aquestes isoformes poden tenir diferents efectes en funció de la presència o absència de la forma induïble ⁶⁹. Els inhibidors de la NOS causen un augment del to vascular pulmonar de manera no selectiva i no ajuden a desviar el flux cap a les zones millor ventilades, per tant no es poden utilitzar per millorar la hipoxèmia en pacients amb LPA. Per contra, els inhibidors de la ciclooxigenasa (COX) poden potenciar la VPH i disminuir el xunt intrapulmonar, mitjançant dos mecanismes: disminució de la síntesis de PG, i augment de la síntesi de leucotriens per la via de la lipooxigenasa, que són vasoconstrictors pulmonars, a l'augmentar-ne el seu substrat, que és l'àcid araquidònic. En aquest sentit, l'aspirina, la indometacina i el meclofenamat milloren la hipoxèmia per disminució del xunt en diferents models de lesió pulmonar experimentals i clínics ^{63,70,71}. La inhibició no selectiva de la ciclooxigenasa bloqueja la síntesis de PGI₂ en la forma constitucional i induïble; això pot alterar la resposta fisiològica normal de l'organisme. Per aquesta raó serien ideals els inhibidors selectius de la forma induïble, o al menys aquells que tinguessin un efecte predominant sobre la mateixa. El Ketoconazol és un inhibidor específic de la síntesis de tromboxà A₂ (metabolit de l'àcid araquidònic que provoca vasoconstricció pulmonar, i augment de l'agregabilitat de plaquetes i neutròfils), i de la 5-lipooxigenasa, enzim amb activitat procoagulant. En un estudi multicèntric realitzat l'any 97, no es va demostrar que el Ketoconazol tingués benefici sobre la mortalitat o la durada de la ventilació en pacients amb LPA⁷².

Els metabolits reactius d'oxigen derivats de neutròfils, macròfags i cèl·lules endotelials, són un important mecanisme de lesió cel·lular en la patogènesi de la LPA i podent interaccionar a nivell de la membrana, les proteïnes i el DNA de les cèl·lules. Entre ells s'inclouen: anió superòxid (O⁻), radical hidroxyl (OH⁻), peròxid d'hidrogen (H₂O₂) i l'àcid hipocloric (HOCl). L'anió superòxid és capaç de reaccionar amb la molècula de NO i formar peroxinitrit (NOOO⁻) un metabolit reactiu d'oxigen altament tòxic. L'organisme disposa d'un sistema endogen antioxidant que inclou la superòxid dismutasa, catalasa, glutatión oxidasa, sulfidril i les vitamines E i C. La N-acetilcisteïna és un precursor capaç d'augmentar la síntesi de glutatión i el seu ús s'ha assajat en

estudis animals⁷³. S'han realitzat varis assaigs clínics en humans per conèixer la utilitat de la N-acetilcisteïna en el tractament de la LPA i, malgrat observar una millora en l'oxigenació, en cap d'ells s'ha demostrat augment de la supervivència.^{74,75 76,77}. Els intents d'utilitzar corticosteroids com a tractament en la fase inicial de la LPA es fan des de l'any 1963 sense que des d'aleshores s'hagi obtingut un resultat positiu.

S'ha assajat l'ús de metilprednisolona a dosi de 30/mg/kg/h durant 24 hores i no s'ha demostrat diferències significatives en la mortalitat respecte dels grups control ⁷⁸. Els estudis recents demostren que l'ús d'aquest fàrmac en el context de sepsis i xoc sèptic augmenta la mortalitat ⁷⁹. Per contra, els corticoids podrien tenir el seu lloc en el tractament de la LPA en fases més avançades. S'ha demostrat que l'augment mantingut en plasma de factor de necròsi tumoral alfa, interleuquines 1, 6, i 8, durant les primeres 24 hores del desenvolupament de la LPA, s'associen amb una disminució de la supervivència.⁸⁰. Els mateixos investigadors han demostrat una reducció dels nivells plasmàtics i en el BAL d'interleuquines en pacients que havien rebut glucocorticoids, així com una millora clínica en l'índex de Murray. L'assaig clínic realitzat per Meduri amb 24 pacients no mostra un benefici clar de l'ús de corticoids, i queda per determinar el lloc que aquests ocupen en el tractament de la LPA.

El surfactant pulmonar és una proteïna sintetitzada pel pneumòcits tipus II encarregada de mantenir la tensió superficial de l'alvèol i prevenir-ne el colapse. En el distres respiratori neonatal existeix un dèficit de surfactant i en el de l'adult s'ha demostrat una alteració del mateix. En el primer cas l'administració de surfactant artificial ha demostrat ser efectiva ⁸¹, mentre que en el segon els resultats són més dispersos sense que s'hagi demostrat un benefici clar del seu ús. En els nadons l'administració conjunta de surfactant i NO té efecte additiu en millorar l'oxigenació arterial ⁸².

Es important no perdre de vista que únicament el 5% de pacients amb SDRA moren per hipoxèmia, i que totes les temptatives terapèutiques aquí examinades van adreçades a millorar l'oxigenació. Això significa que la millora en el pronòstic d'aquesta

entitat ha d'incloure molts factors com son noves estratègies ventilatòries, fluidoteràpia i suport nutricional i l'antibioticoteràpia, a banda de tots els fàrmacs que s'assagen per augmentar la PaO₂ arterial. Donada la gran heterogeneïtat d'etiologies que condueixen a desenvolupar la LPA, i que aquestes tenen a més significància pronòstica, seria interessant per futures estratègies terapèutiques intentar identificar subgrups de pacients amb fisiopatologia i mecanismes bioquímics comuns, per tal d'aplicar el tractament més específic possible, en relació a la seva historia natural.

2.2. ÒXID NÍTRIC

El NO es un gas que es produeix en tots els processos de combustió, l'interès del qual era únicament el de controlar els seus nivells en ambients polucionats, fins que l'any 1987 es descobreix que el NO es produeix de manera continua i en petites quantitats en les cèl·lules endotelials de tots els mamífers i que té un paper fonamental en el control del to vascular. Més endavant es va comprovar que també era sintetitzat en plaquetes, neurones, i cèl·lules del sistema immunològic entre d'altres, i que tenia moltes altres accions a banda de les vasculars ⁶⁹.

La molècula de NO és un gas incolor, amb una densitat de 1,04 relativa a la de l'aire, i un punt d'ebullició de $-151,6$ °C. Té un pes molecular de 30 Da. És inestable i altament reactiva, amb un temps de vida mitja de 3-5 segons. No és soluble en aigua a temperatura i pressió ambientals i és molt lipofílica, amb gran capacitat per tant de passar a través de membranes. És un dels òxids del nitrogen, junt amb el diòxid de nitrogen (NO₂), tetròxid de nitrogen (N₂O₂) i protòxid de nitrogen (N₂O). És tracta d'una molècula sense càrrega pel que es considera un radical lliure. Depenent del medi on es trobi pot ser oxidada, reduïda, o formar complexos amb altres biomolècules. En presència de O₂ el NO s'oxida i forma NO₂, en medi aquós forma nitrits (NO₂⁻) i nitrats (NO₃⁻). Quan reacciona amb l'anió superòxid (O₂⁻) dona lloc a l'anió peroxinitrit (OONO) i l'àcid peroxinitós (OONO₂), i aquests formen NO₂ i radical hidroxil (OH), agents amb gran poder oxidant. El NO també reacciona amb altres biomolècules tant en fase gasosa com aquosa, com el ferro i les metaloproteïnes, especialment les hemoproteïnes (hemoglobina, guanilciclasa, citocrom C i catalasa), també reacciona amb les amines. Totes aquestes reaccions fan possible les múltiples accions fisiològiques i fisiopatològiques de la molècula de NO ^{69,83}. Fins ara s'han identificat dos mecanismes de vasodilatació, un que depèn de l'endoteli i l'altre que és independent del mateix. El primer es veu en preparacions *in vitro* amb substàncies com l'acetilcolina, nucleòtids d'adenina, trombina, substància P, calci ionòfor A23187 i bradiquinina, i també amb estímuls com la hipòxia, l'augment de flux i l'estimulació

elèctrica. Aquest mecanisme requereix la presència d'una molècula sintetitzada per les cèl·lules endotelials, que és en definitiva l'efectora de les accions, inicialment coneguda com factor relaxant derivat de l'endoteli, fins que Palmer i Moncada 1987 es varen adonar de que compartia les propietats fisicoquímiques amb el NO. Altres agents com la nitroglicerina, el nitroprussiat sòdic, els nitrits, el factor natriurètic atrial, els agonistes beta adrenèrgics i la prostaciclina, no requereixen la presència de l'endoteli per produir relaxació vascular ⁶⁹.

El NO es sintetitza a partir de l'àtom de nitrogen guanidino terminal procedent de l'aminoàcid L- arginina, mitjançant un enzim soluble NADPH dependent, anomenada òxid nítric sintetasa (NOS), de la qual es coneixen tres isoformes, dues constitutives (NOS I que s'expressa predominantment en el teixit neuronal, i NOS III originalment aïllada en les cèl·lules endotelials), i una induïble (NOS II). Totes elles s'inhibeixen per anàlegs de la L-arginina. La NOS constitutiva està sempre present en el citosol de les cèl·lules endotelials, les plaquetes i les neurones. La seva activitat està regulada pels nivells de calci intracel·lular, el qual a l'augmentar s'uneix a la calmodulina de manera que el complex calci-calmodulina activa la NOS; és per això que es considera un enzim calci-calmodulina dependent. També s'ha identificat la seva presència a les glàndules suprarenals, el miocardi, la retina i els mastòcits. La NOS induïble es localitza en el citosol de macròfags, hepatòcits i cèl·lules de la musculatura llisa vascular, encara que també pot expressar-se en neutròfils, cèl·lules endotelials, fibroblastes, cèl·lules de Kuffer, miocardi, ronyó i pulmó. S'expressa únicament davant d'estímuls com endotoxines, factor de necrosi tumoral o interleuquines, i un cop activada, mecanisme que és calci-calmodulina independent, sintetitza NO en grans quantitats (nanomols). Un cop sintetitzada la molècula de NO activa directament l'enzim guanil ciclasa el qual transforma el guanosin trifosfat (GTP) amb guanosin monofosfat (GMPc), que a través d'una cadena de proteïn quinases produeix la relaxació de la fibra llisa vascular. El GMPc també és responsable dels efectes antiagregants i antiadherents del NO. La relaxació del múscul llis produïda pels nitrovasodilatadors també s'associa a un augment dels nivells de GMPc, car aquestes molècules són donadores de NO i el NO és

considerat com el nitrovasodilatador endogen. Es coneixen molts receptors àmpliament distribuïts del NO, encara que el més conegut és el ferro del grup hem present en proteïnes com la guanilciclasa entre altres i això justifica la multiplicitat d'accions que se li atribueixen. La seva degradació es fa a través de fosfodiesterases del GPMc, la més específica de les quals és la fosfodiesterasa V.⁶⁹ La síntesi de NO pot inhibir-se de manera competitiva amb substàncies que tenen substituït el grup amí de l'aminoàcid L-arginina; es tracta d'anàlegs de la L-arginina i els més coneguts són la L-monometil-L-arginina (L-NMMA) i la L-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME). Els glucocorticoids poden inhibir la síntesi de la NOS induïble just després de l'administració d'endotoxina però no poden bloquejar la síntesi de NO un cop s'ha induït l'enzim. La manipulació farmacològica de la via L-arginina-òxid nítric-GMP ofereix moltes possibilitats terapèutiques ja que permet modular la producció de NO quan aquesta és inadequada. En les situacions patològiques en les que es produeix en excés pot inhibir-se la síntesi de NO amb anàlegs de la L-arginina o bloquejant l'enzim sobre el que actua el NO (la guanilciclasa) amb el blau de metilè o la cisteïna. De la mateixa manera, quan l'anomalia sigui un dèficit en la síntesi aquesta pot corregir-se administrant NO, donadors de NO o evitant la degradació del mateix mitjançant inhibidors de la fosfodiesterasa GPMc específica com són el zaprinast i el dipiridamol.

Les **accions fisiològiques del NO endogen** es manifesten a nivell del sistema cardiovascular, les plaquetes, el sistema nerviós, el sistema immunològic, el ronyó, les glàndules suprarenals i altres glàndules endocrines. El mecanisme fisiopatològic de varies malalties es considera una alteració en la producció endògena de NO.

En el sistema cardiovascular, la síntesi continua de NO per part de l'endoteli vascular es responsable de la regulació de la pressió arterial, a més el NO modula la VPH. També regula la circulació coronària i la contractilitat cardíaca. Un dèficit en la producció endògena de NO s'ha relacionat amb la HTA sistèmica i pulmonar, tant primària com secundària, amb l'arteriosclerosi i la malaltia coronària. En els estats hipertensius relacionats amb l'embaràs s'ha demostrat una disfunció en la síntesi de NO

a nivell dels vasos umbilicals. La hipotensió, la hiporeactivitat vascular als vasopressors exògens i la disminució de la contractilitat miocàrdica que caracteritzen al xoc sèptic, són produïts per l'excés de síntesi de NO estimulada per endotoxines bacterianes i citocines (factor de necrosi tumoral, interleuquines). Però la modulació farmacològica de la sobreproducció de NO en el xoc sèptic és encara una teràpia experimental.⁶⁹ La vasodilatació i l'estat hiperdinàmic de la cirrosi hepàtica, junt amb la hipertensió portal crònica, es relacionen amb un excés de síntesi de NO. El NO endogen intervé en el manteniment del to dels vasos cerebrals i ha demostrat tenir un efecte neuroprotector en la isquèmia focal; per altra banda pot produir toxicitat neuronal al reaccionar amb l'anió O₂⁻ i ser responsable de la hiperèmia post isquèmia.

En el sistema nerviós el NO actua com a neurotransmissor a nivell del sistema nerviós central i perifèric. També s'ha demostrat la seva implicació en la transmissió neuronal no adrenèrgica-no colinèrgica, present en el sistema cardiovascular, en la via aèria, en el tracte gastrointestinal i el genitourinari. El dèficit de NO endogen del sistema no adrenèrgic-no colinèrgic del tracte gastrointestinal s'ha relacionat amb l'acalàsia i la hipertròfia congènita de pílor. També regula el to broncomotor al tenir un efecte broncodilatador lleu, que s'oposa al to broncoconstrictor de la via colinèrgica. La impotència podria deure's a un dèficit en la síntesi de NO en els vasos peneans, de manera que els inhibidors de la fosfodiesterasa GMPc dependent són efectius en el tractament de la disfunció erèctil (sildenafil). De manera contraposada, el priapisme podria relacionar-se amb una alliberació continua de NO a partir del sistema nerviós autònom dels cossos cavernosos.

A nivell renal el NO és sintetitzat en la màcula densa i passa a l'arteriola eferent on ajuda al manteniment del flux renal. En la medulla i còrtex suprarenal intervé en la regulació de la síntesi d'esteroids i catecolamines. Pel que fa al sistema immunològic el NO participa en mecanismes de defensa inespecífics de l'organisme, de manera que l'activació dels macròfags per citocines produeixen grans quantitats NO que són tòxiques per bacteries, fongs, paràsits i cèl·lules tumorals. En les reaccions de rebuig

d'òrgans es generaria una sobreproducció de NO que actuaria contra l'empelt. També en malalties inflamatòries intestinals com la colitis ulcerosa s'ha demostrat un augment de l'enzim que sintetitza NO i xifres altes de NO endoluminal. La depressió del sistema immunològic en pacients amb insuficiència renal crònica pot deure's a un augment dels inhibidors endògens de la síntesi de NO. En la lesió cel·lular en la síndrome de isquèmia-reperfusió no està clar el paper del NO, doncs per una banda podria contribuir al dany cel·lular al reaccionar amb altres radicals lliures, i per altra hi ha estudis que impliquen el NO en el fenomen de preconditionament isquèmic del cor i del fetge.

En les plaquetes el NO inhibeix l'agregació i l'adhesió plaquetar exercint un efecte antitrombòtic continu.

Dins el sistema respiratori el NO es produeix a nivell de l'epiteli de nas, boca i sins paranasals, en l'endoteli d'artèries i venes, en les fibres no adrenèrgiques-no colinèrgiques de la via aèria i en macròfags, neutròfils i mastòcits pulmonars que intervenen en la immunitat cel·lular. S'han detectat petites quantitats de NO endogen en l'aire espirat, que estan disminuïdes en fumadors i augmentades en processos inflamatoris com l'asma, les infeccions del tracte respiratori superior o les bronquièctasis, de manera que la seva mesura podria utilitzar-se com un marcador de l'activitat d'aquestes últimes. El NO també dilata la musculatura llisa bronquial, però té una sensibilitat més baixa que a nivell vascular.

Les **indicacions clíniques del NO inhalat** són la hipertensió pulmonar, la hipoxèmia per xunt i el distrés neonatal.

El primer cop que es va utilitzar clínicament el NO fou en pacients amb HTP primària, on s'ha vist que la disminució de la síntesi endògena és un dels principals mecanismes implicats en la seva gènesi, i experimentalment amb hipertensió pulmonar induïda per anàlegs del tromboxà.⁸⁴ El NO inhalat no actua sobre la circulació pulmonar normal, únicament té efecte vasodilatador quan les RVP estan augmentades,

de manera que la davallada de les mateixes és directament proporcional al grau de HTP basal. Quan apareixen canvis estructurals en la vasculatura pulmonar, com en alguns casos de HTP crònica, l'efecte del NO està limitat; així la seva administració pot diferenciar la HTP reversible de la fixa, i amb aquest objectiu s'ha utilitzat com a test de cribatge en pacients candidats a trasplantament cardíac per tal de valorar el grau de reversibilitat. El NO podria disminuir la PCP i el flux transcapil·lar d'albumina en pacients amb LPA per efecte sobre les resistències venoses pulmonars. Les dosis a administrar són inferiors a les emprades per millorar la hipoxèmia havent-se observat un efecte sobre a dosi de 0,1 ppm; en pacients amb xoc sèptic el NO té un efecte màxim a 5 ppm ⁴⁵. Hi ha estudis experimentals que han demostrat que la inhalació de NO a dosis altes (80 ppm) pot ocasionar vasodilatació sistèmica, probablement perquè certa quantitat del mateix es pot unir a altres molècules de transport com l'albumina i exercir l'efecte vascular a distància.

La insuficiència respiratòria és l'aplicació més freqüent i més controvertida del NO donat que no s'ha demostrat que el seu ús augmenti la supervivència. El NO està indicat quan el mecanisme fisiopatològic de la hipoxèmia és el xunt, degut al seu efecte vasodilatador doblement selectiu: sobre els vasos pulmonars, i entre aquests, sobre els que estan ben ventilats, que són als que hi arriba el gas inhalat. Com a conseqüència de la vasodilatació de zones ben ventilades, el iNO facilita l'eliminació de CO₂, que es manifesta en una reducció de la PCO₂ arterial, que tot i ser lleu, en molts casos és suficient com per poder disminuir el volum corrent i el risc de barotrauma. En els pacients amb foramen oval permeable (30% de la població) que presenten HTP, l'administració de iNO disminueix les RVP, redueix la postcàrrega del ventricle dret i la pressió de plenat de les cavitats dretes i per tant el xunt dreta-esquerra, a més de disminuir el xunt intrapulmonar. L'efecte sobre la oxigenació en aquests pacients és espectacular. L'ús combinat de iNO i PEEP millora la PaO₂ quan la PEEP aconsegueix mantenir oberts alvèols que estaven col·lapsats (fenomen que es coneix amb el nom de reclutament), però no quan únicament distén els alvèols prèviament oberts que presenten risc de sobredistensió. L'efecte del iNO sobre la hipoxèmia té una gran

variabilitat interindividual. S'entén per responedors aquells en els que s'observa una disminució de les RVP i/o millora de la PaO₂ en un 15% amb l'administració de iNO. S'han identificat com factors predictius de la resposta el valor basal de les RVP⁵⁹ i la severitat de la hipoxèmia^{85 59} tot i que aquesta última no és acceptada per tothom. A la pràctica clínica es prova i es valora de manera individual la seva efectivitat. Tampoc són clars els motius pels quals un pacient no respon al iNO. S'han proposat com a causes, que la HTP tingui una base més anatòmica que funcional o que el mecanisme de la hipoxèmia no sigui per xunt. Per altra banda hi ha responedors que esdevenen no responedors; això podria justificar-se perquè els valors de les RVP han arribat a la normalitat o perquè el distres està en fase evolucionada i el component anatòmic predomina sobre el funcional. En pacients amb LPA sense xoc sèptic, la millora de l'oxigenació s'observa a dosi de iNO que oscil·len entre 1-5 ppm, mentre que en presència de xoc sèptic pot ser efectiva l'administració de iNO a dosis més altes (fins 150 ppm). En canvi l'efecte sobre les RVP en presència de xoc sèptic, té un efecte sostre a 5 ppm⁴⁵ No és freqüent haver d'augmentar la dosi de NO per mantenir el seu efecte, és a dir l'aparició de taquifilàxia, però sí que s'ha observat efecte rebot al retirar-lo si s'ha administrat de manera perllongada.⁸⁶ Hi ha resultats dispars al respecte doncs s'ha vist que després de l'administració de 100 ppm de iNO no hi ha modificació en la forma induïble de la NO sintetasa.⁸⁷ De vegades l'efecte rebot obliga a reintroduir el iNO a dosi inferiors o a retirar-lo de manera progressiva. També s'ha assajat l'ús concomitant d'inhibidors de la fosfodiesterasa que augmenten els nivells de GMPc, alhora de retirar la nitroteràpia (zaprinast, dipiridamol).

L'ús de NO en neonatologia és en l'únic camp en el que ha demostrat una millora de la supervivència i una disminució de la necessitat d'oxigenació extracorpòria.⁸⁸ Roberts⁵⁸ demostra que la inhalació de 80 ppm de NO millora la hipoxèmia en nounats amb HTP persistent; el mateix autor va demostrar de manera experimental que el iNO invertia el flux a través del ductus arteriós, fent-se aquest d'esquerra a dreta. Posteriorment s'ha assajat dosi més baixes (10-20 ppm) que també han resultat ser efectives. Això fa que el NO s'utilitzi en el distres respiratori neonatal de múltiples

etiologies (pneumònia, aspiració de meconi, membrana hialina), amb cardiopaties congènites i en el postoperatori de cirurgia cardíaca i també en hèrnies diafragmàtiques.

L'entitat clínica que per excel·lència aglutina la HTP i la hipoxèmia és la lesió pulmonar aguda LPA en adults, amb diferents nivells de gravetat. L'ús de iNO en aquesta patologia s'ha assajat en nombroses ocasions; obtenint uns resultats possiblement inferiors a les expectatives creades. És per això que la conferència consens de la teràpia en adults amb NO inhalat ⁸⁹ en el tractament de la LPA acorda que:

El NO inhalat millora l'hemodinàmica i l'oxigenació arterial en la majoria de pacients amb LPA en la fase aguda i el seu ús permet adoptar una estratègia ventilatòria més protectora.

Els successius assaigs clínics no mostren evidència de que el seu ús redueixi la mortalitat en la LPA i per tant no està recomanat el seu ús rutinari.

Els assaigs clínics no resolen la qüestió de si determinat grup de pacients amb hipoxèmia severa refractària al tractament convencional podria beneficiar-se de l'administració de iNO.

Es considera raonable l'ús de iNO com a tractament de rescat en aquest grup de pacients.

No es recomana l'ús de iNO combinat amb altres fàrmacs d'acció sinèrgica en adults fora dels assaigs clínics.

Altres efectes observats del iNO que encara no constitueixen indicacions terapèutiques clares són l'efecte antiagregant plaquetar i antiinflamatori. El NO endogen activa la guanilciclasa plaquetària i l'augment de GMPC té efecte antiagregant a banda d'altres efectes anticoagulants ⁹⁰. S'ha vist que en pacients amb LPA el iNO té efecte antiagregant a dosi entre 0,045 i 1,5 ppm, de manera dosi dependent amb efecte sobre a 1,5 ppm, sense modificació del temps de sangria. Donat que hi ha estudis

experimentals que sí demostren un allargament en el temps de sangria, es fan necessàries més dades per avaluar els beneficis de l'administració de iNO amb aquesta finalitat. Pel que fa a l'efecte antiinflamatori, Kubes ⁹¹ demostra que el iNO és capaç d'inhibir l'adhesió dels neutròfils activats a l'endoteli pulmonar, suggerint així un efecte antiinflamatori ⁹²⁻⁹⁴. En un model experimental de LPA per endotoxina Bloomfield demostra que el pretractament amb iNO, inhibeix la migració transendoteial dels neutròfils i disminueix la capacitat oxidativa ⁹⁵. En estudis clínics s'ha vist que la inhalació de NO en pacients amb LPA disminueix la concentració de interleuquina 6 i 8, molècules d'adhesió CD18 i CD11 i radicals lliures en el rentat broncoalveolar.⁹⁶ Altres estudis demostren que el iNO pot tenir un efecte protector de la lesió pulmonar per isquèmia-reperfusió. No està clar quin és la via a través de la qual el iNO exerceix aquestes propietats antiinflamatòries però podrien ser produïdes per una via diferent de la del GMP cíclic, doncs la naturalesa de la molècula de NO fa que tingui una gran capacitat per interactuar amb gran varietat de receptors.

Hi ha situacions en les que el iNO s'ha d'administrar amb precaució com són els pacients amb malaltia pulmonar obstructiva crònica que presenten insuficiència respiratòria ⁹⁷ i els pacients amb insuficiència cardíaca congestiva.

La hipoxèmia dels pacients amb malaltia pulmonar obstructiva crònica no està causada per un mecanisme de xunt intrapulmonar sinó que és secundària a l'existència de zones del pulmó amb baixa relació ventilació-perfusió. En aquests pacients la VPH contribueix a disminuir la perfusió dels alvèols que estan ventilats només parcialment. L'administració de iNO arriba a aquests alvèols i inhibeix el fenomen de la VPH amb la qual cosa empitjora la hipoxèmia. Altres estudis han demostrat que el iNO pot prevenir la hipoxèmia induïda per l'esforç en aquests malalts, així com millorar la PaO₂ i l'hemodinàmica pulmonar en pacients amb oxigenoteràpia crònica domiciliària. Probablement l'ús de iNO a dosis baixes no inhibiria la VPH, i aplicat amb cura i selecció dels pacients podria ser beneficiós en aquests casos.

Els pacients amb insuficiència cardíaca esquerra presenten hipertensió pulmonar reactiva que té com a objectiu disminuir la precàrrega d'un ventricle esquerra insuficient. Com més gran sigui el grau d'insuficiència cardíaca, més altes estaran les RVP i més efecte tindrà el iNO disminuint-les; això conduirà a l'augment del retorn venós i al fracàs ventricular. De manera que l'administració de iNO a pacients amb insuficiència cardíaca descompensada, pot induir un edema agut de pulmó.

El NO s'emmagatzema en botelles dissolt en nitrogen (concentrat entre 200-1000 ppm), i **s'administra** mesclat amb el gas procedent del respirador. Donat que la concentració de NO de les botelles és tant alta, són necessaris fluxos molt baixos de NO per assolir concentracions terapèutiques, i per tant la reducció de la FiO₂ causada per la mescla NO, i O₂, és mínima. En la clínica, la forma d'administració més habitual és després del respirador, intercalant un caudalímetre entre la botella de NO i la connexió que va a parar a la branca inspiratòria. El flux de iNO administrat pot ser continu o seqüencial, és a dir sincrònica amb la inspiració. Per aquesta segona modalitat és necessari un aparell que detecti la pressió positiva del respirador. Hi ha unes taules que permeten ajustar el flux en funció de la concentració de iNO. La forma de monitorització d'elecció és la quimioluminiscència, doncs permet detectar concentracions de NO i NO₂ de parts per bilió (1ppb = 1000 ppm). La localització més adequada és la branca inspiratòria, a prop del pacient, ja que si es mesura a nivell de la tràquea o de la tubuladura en que es barregen els gasos inspirats i espirats, poden obtenir-se valors inferiors als administrats.⁶⁹

El NO és una molècula altament reactiva i la seva **toxicitat** es difícil de separar de la dels seus metabolits. El diòxid de nitrogen es produeix quan el NO entra en contacte amb el O₂ segons la relació $2\text{NO} + \text{O}_2 = 2\text{NO}_2$. La quantitat de NO₂ produïda és directament proporcional a la concentració de O₂, a la de NO i al temps de contacte, així com a una constant K: $\text{NO}_2 = K \cdot t \cdot \text{FiO}_2 \cdot \text{NO}$. El NO₂ és tòxic pulmonar directe produint peroxidació de les membranes lipídiques, lesió endotelial i epitelial, edema pulmonar, inflamació i hipereactivitat bronquial. S'ha demostrat que *in vitro* pot tenir

efecte mutagènic, motiu pel qual podria ser carcinògen. És imprescindible la monitorització de NO₂ en pacients que reben iNO. Les concentracions detectades d'aquesta molècula són habitualment inferiors a 1 ppm. Donat que el NO₂ forma part de la pol·lució ambiental, l'administració Americana per la Salut i la Seguretat accepta com a màxim una exposició de 5 ppm durant 8 hores diàries a NO₂. La unió del NO amb l'anió superòxid dona lloc a l'anió peroxinitrit: $\text{NO} + \text{O}_2 = \text{ONOO}^-$. Aquesta és una molècula amb elevat poder oxidant i produeix LPA per peroxidació lipídica de les membranes cel·lulars. La molècula de NO s'uneix a la oxihemoglobina i forma nitrosilo-hemoglobina, que és oxidada en presència de O₂ a metahemoglobina. La metahemoglobina es converteix novament a hemoglobina en els hematies gràcies a l'enzim metahemoglobina reductasa. Els nivells normals de metahemoglobina en humans són inferiors al 1%. La metahemoglobina, disminueix el contingut arterial de O₂ i provoca hipòxia tissular quan els nivells superen el 15%. En els estudis publicats les concentracions de metahemoglobina durant el tractament amb iNO són baixes, tot i que de manera aïllada s'hagi descrit algun cas amb nivells més alts. Els pacients que tenen més risc de desenvolupar metahemoglobinèmia són els pacients pediàtrics, els que reben altes dosis de iNO durant temps perllongat, els que reben alhora nitrovasodilatadors endovenosos, doncs també poden donar metahemoglobinèmia), i aquells amb dèficit congènit o disfunció de l'enzim metahemoglobina-reductasa. Amb la determinació sèrica diària del nivell de metahemoglobina es minimitza el risc d'obtenir nivells tòxics. El tractament en el cas d'intoxicació és, a part de suspendre el iNO, l'administració de blau de metilí o àcid ascòrbic.⁹⁸ El NO *per se*, és tòxic quan s'inhala a altes concentracions fenomen que fou descobert amb la inhalació accidental durant una anestèsia general a partir d'un cilindre de protòxid contaminat amb NO. Posteriorment, tant en models experimentals com en humans s'ha demostrat que la inhalació d'altres concentracions durant períodes llargs de temps, no són perjudicials.⁹⁹ S'ha descrit un cas d'etilisme crònic en el que el iNO podria haver lesionat la motoneurona a l'existir en aquestes circumstàncies, igual que en la isquèmia cerebral, una sobrerregulació dels receptor N-metil-D-aspartat. A nivell experimental i en

preparacions de cèl·lules humanes in vitro el NO intracel·lular té capacitat per lesionar l'ADN i la membrana eritrocitària.

2.3. PROSTACICLINES

Les prostaglandines (PG) són sintetitzades predominantment per les cèl·lules endotelials i indueixen una potent vasodilatació sobre tots els vasos sanguinis estudiats. Es consideren el més potent inhibidor endogen de l'agregabilitat plaquetar i tenen també propietats citoprotectores i antiproliferatives.

Són mediadors lipídics de la inflamació derivats de l'àcid araquidònic, el qual s'oxida per l'acció de dos enzims, la ciclooxygenasa i la lipooxygenasa, essent els productes finals les prostaglandines, els tromboxans i els leucotriens. Bioquímicament estan formades per una sèrie d'àcids grassos no saturats de 20 carbonis que contenen un anell de ciclopentà, en funció del qual es classifiquen en grups. El nombre d'enllaços dobles en les cadenes laterals s'indica en forma de subíndex: PG D₂, E₂, F₂α (amb propietats vasoconstrictores), i I₂ o prostaciclina amb propietats vasodilatadores.

Les PG es fixen als receptors prostanoids de les membranes de les cèl·lules efectores, dels que se'n coneixen 8 subtipus, activant l'adenilciclasa i augmentant la concentració d'AMPc, el qual activa la proteïn quinasa A i disminueix el calci lliure intracel·lular, i provoca la relaxació de la musculatura llisa vascular. Les PG tenen una vida mitja molt curta, de 2-3 min, i són hidrolitzades en plasma a metabolits inactius; per tant actuen en el lloc on es sintetitzen. L'anàleg sintètic de la PGI₂, beraprost, és més estable i té una vida mitja de 60-12 minuts.

Les PG poden ser administrades per via sistèmica i en forma d'aerosol. El factor limitant de la primera forma d'administració és l'augment del xunt intrapulmonar i la hipotensió arterial, mentre que administrades en aerosol tenen, com el iNO, un efecte doblement selectiu: sobre la vasculatura pulmonar i concretament sobre la que perfón àrees ben ventilades. Amb aquesta via d'administració és difícil saber quina

concentració arriba a l'alvèol, però es creu que és entre un 5-10% de la dosi administrada. L'administració endovenosa de prostaglandines provoca una vasodilatació sistèmica i pulmonar no selectiva ocasionant hipotensió arterial i augment del xunt intrapulmonar amb el consegüent empitjorament de la hipoxèmia¹⁰⁰. En un altre estudi la infusió de PGI₂ va disminuir la PAPm, la PCP i va augmentar el xunt intrapulmonar alhora que el dèbit cardíac, sense disminuir el contingut arterial d'oxigen¹⁰¹. L'administració endovenosa de PGE₁ a dosis de 0,03/μg/kg/min durant un període de 7 dies va demostrar augmentar la supervivència en pacients amb LPA. Però en un estudi posterior en el que es van assajar dosis de 0,02-0,04 μg/kg/min endovenosa, la PGE₁ va aconseguir disminuir la hipertensió pulmonar a costa d'empitjorar l'intercanvi de gasos.¹⁰²

En el tractament farmacològic de la HTP s'accepta l'ús de PG inhalades i endovenoses. L'epoprostenol és un anàleg sintètic de la PGI₂ que s'administra de manera endovenosa. Té una vida mitja de 3-5 minuts, és estable a temperatura ambient durant 8 hores i requereix la inserció d'un catèter tunelitzat de manera permanent. Aquest fàrmac millora els símptomes, la hemodinàmica i la capacitat d'exercici. És l'únic tractament que ha demostrat en els diferents estudis randomitzats augmentar la supervivència dels pacients amb HTP idiopàtica. Les dosis òptimes varien en cada individu i oscil·len entre 20-40 ng/kg/min. Els principals efectes secundaris del tractament crònic amb epoprostenol són, eritema, mal de cap, dolor abdominal, diarrea, i rara vegada hipotensió arterial a més de totes les complicacions derivades de la inserció d'un catèter endovenós permanent. L'iloprost és un anàleg químic estable de la prostaciclina, que està disponible en forma oral, endovenosa i inhalada. L'administració inhalada en teoria és selectiva sobre la circulació pulmonar. El diàmetre crític de les partícules nebulitzades per arribar a l'alvèol és de 3-5 μg. L'inconvenient de la forma nebulitzada és que la brevetat de la durada d'acció obliga a l'administració de 6 a 12 cops diàriament; la duració de la nebulització oscil·la entre 5-15 minuts segons el tipus de nebulitzador, *jet* o ultrasònic respectivament. La inhalació de iloprost en els estudis clínics randomitzats també ha demostrat millorar la clínica i augmentar la capacitat a

l'exercici dels pacients. amb HTP crònica, doncs la disminució de les RVP millora el dèbit cardíac.¹⁰³ L'administració inhalada és millor tolerada que l'endovenosa. En un estudi multicèntric el iloprost inhalat ha resultat ser efectiu disminuint la PAPm sense afectar l'intercanvi de gasos ni la PAm, en pacients amb HTP severa amb insuficiència cardíaca progressiva, refractàries a terapèutiques convencionals¹⁰⁴. El iloprost endovenós sembla ser tant efectiu com l'epoprostenol en una reduïda sèrie de pacients amb HTP, i presenta l'avantatge de que és permanentment estable a temperatura ambient i no requereix ser reconstruït ni refrigerat. S'accepta que l'administració de iloprost, en qualsevol de les seves formes, té un grau de recomanació inferior a l'epoprostenol.¹⁰⁵ La inhalació de beraprost, un anàleg sintètic de les PG, s'ha mostrat efectiva en la reducció de les RVP quan s'administra a rates amb HTP hipòxica. El grau de reducció observat és directament proporcional al grau d'hipòxia.¹⁰⁶

En el tractament de la LPA la majoria d'estudis en animals demostren que l'administració de PG inhalades ocasiona una reducció de la PAPm i una millora de la PaO_2/FiO_2 , sense variació de la PAm, amb una efectivitat similar a la del iNO ¹⁰⁷⁻¹⁰⁹. La disminució de la PAPm però, no sempre és constant i s'han comunicat casos en els que aquesta es gairebé nul·la ¹¹⁰. La PGE1 s'ha assajat de manera tant nebulitzada com instil·lada intratraqueament durant la ventilació parcial líquida en conills, observant-se una millora en l'oxigenació i en la HTP, efectes que no s'observen quan el mateix fàrmac s'administra en ventilació convencional. La PG més utilitzada és la PGI₂ o prostaciclina, la dosi de la qual no està establerta; hi ha una variabilitat interindividual que fa necessari assajar les dosis en cada cas per tal d'obtenir la mínima dosi eficaç. En forma inhalada, a concentracions de 2 ng/kg/min ja indueix vasodilatació pulmonar selectiva en nounats i en adults, i a dosis superiors a 10-20 ng/kg/min pot augmentar el xunt intrapulmonar, tot i que s'ha observat que l'administració de fins 50 ng/Kg/min pot no empitjorar l'intercanvi gasos ni provocar hipotensió arterial¹¹⁰ En aquest mateix estudi 10 ng/kg/min fou la dosi ideal a administrar. L'efecte màxim sobre l'oxigenació arterial s'obté a concentracions inferiors a les requerides per produir vasodilatació pulmonar. S'ha dut a terme un estudi multicèntric per conèixer els efectes de

l'administració sistèmica de la PGE₁ liposomal, que ha demostrat una millora en l'índex d'oxigenació però no en la supervivència ni en el temps de durada de la ventilació mecànica.¹¹¹ S'ha demostrat desensibilització del receptor de les PGI₂ per exposició diària per via inhalatòria en un pacient en tractament de HTP associada a esclerodèrmia, amb disminució de la resposta després de l'any tractament.¹¹² Comparat amb el iNO, les PG semblen tenir una eficàcia similar a aquest en la reducció de la PAPm i en la millora de la PaO₂.⁵⁵ Una mesura estratègica en el tractament de la hipoxèmia de la LPA consisteix en potenciar la VPH. En aquest sentit s'ha assajat l'ús de la PGF₂α, administrada per via endovenosa, amb efecte vasoconstrictor no selectiu, obtenint millora de l'oxigenació en gossos. Amb la mateixa finalitat també s'ha assajat en porcs l'administració simultània de PG nebulitzades i almitrina, sense observar efectes additius respecte l'administració de cadascun d'ells per separat ¹¹³.

Hi ha disparitat de dades en quan al l'efecte antiinflamatori de les PG. S'ha vist que l'administració endovenosa de beraprost redueix l'edema inflamatori en cèl·lules *in vivo* de mono a diferència de la PGE₁ que té efecte edematogènic. Per altra banda hi ha estudis realitzats en models animals, que demostren que l'administració de PGE₁ liposomal modula l'activitat dels neutròfils i dels seus receptors de membrana CD18, mostrant un efecte global antiinflamatori ³. Es creu que aquestes accions estan mitjades per l'AMPc. Les PG redueixen també l'agregabilitat plaquetar. Però també s'ha observat que el funcionalisme plaquetar no es veu afectat amb l'administració de PG nebulitzades en adults als quals milloren l'índex d'oxigenació i redueixen la PAPm.⁵⁷

La inhalació de PG té efectes contraposats sobre l'arbre bronquial; si bé per una banda es produeix en grans quantitats en reaccions al·lèrgiques amb fort component broncoconstrictor, s'ha postulat que el seu potent efecte vasodilatador de la mucosa bronquial augmenta l'aclariment d'altres substàncies espasmogèniques, reduint-ne el seu efecte.¹¹⁴

En nens, les PG nebulitzades s'utilitzen en el tractament i en la valoració de la reversibilitat de la HTP, prèvia al trasplantament,^{115 116} També en nens les PG inhalades

van resultar igual d'efectives que el iNO en la millora de la hipoxèmia i en la reducció de la HTP⁵⁶ en la LPA. Igual que passa en adults, hi ha una gran variabilitat en les dosis efectives i cal ajustar la dosi de manera individualitzada. Recentment s'ha descrit l'administració simultània de iNO+PG nebulitzades en nens amb HTP i, si bé per separat ambdós fàrmacs redueixen les RVP en grau similar, l'administració conjunta no mostra efectes additius;¹¹⁶ per contra la combinació de beraprost oral i iNO en nens amb HTP sí que ha demostrat disminuir les resistències vasculars pulmonars en grau superior al iNO, sense provocar hipotensió arterial sistèmica¹¹⁷. L'administració endovenosa en nens de 10 ng/Kg/min de PG, les 24 hores prèvies a la suspensió del tractament amb iNO, evita l'efecte rebot que s'observa quan aquest és retirat.

En resum, si bé per una banda la utilització de PG en la HTP està ben tipificada, ni aquestes ni el iNO, no s'inclouen en el tractament habitual de la LPA. El seu ús és contempla en els casos de hipoxèmia o HTP severa refractària al tractament convencional. Això significa que són administrats en una fase evolutiva avançada de la malaltia, quan les possibilitats d'èxit terapèutic estan més reduïdes. En la majoria dels estudis experimentals reportats l'administració de iNO i PGneb s'inicia força abans, just després de la producció de l'insult; comparant els resultats obtinguts amb els observats en la clínica, aquests últims resulten, en general decebedors. Un altre punt a considerar, donada la relativa ineficàcia en el tractament d'aquesta entitat, seria l'abordatge profilàctic de la mateixa. S'ha vist que el pretractament amb *scavengers* d'espècies reactives d'oxigen és capaç de reduir la hipertensió pulmonar, la hipòxia, i l'increment de permeabilitat vascular a proteïnes que caracteritza la LPA post infusió d'endotoxina.^{118 119} Es possible que estudis dirigits a aquest objectiu aportin resultats que millorin el pronòstic de la lesió pulmonar aguda. Fins al moment, l'administració profilàctica d'aquests fàrmacs en la LPA s'ha reportat de manera aïllada i amb resultats dispars. Però donada la naturalesa immunològica-inflamatòria de la LPA i les propietats antiinflamatòries del NO i de les PG, l'administració profilàctica de iNO i de PGneb, podria ser molt més efectiva que el seu ús amb finalitat terapèutica. Més encara si tenim

en compte que es tracta d'una patologia amb una gens despreciable incidència i mortalitat, el tractament de la qual no està resolt.

2.4. MODELS EXPERIMENTALS DE LESIÓ PULMONAR AGUDA

Donat que el tractament de la LPA segueix essent un tema no resolt, s'han assajat una gran varietat de models experimentals en diferents espècies animals. És difícil però trobar el més adient, atès que no n'hi ha cap que simuli exactament les mateixes característiques de la LPA en humans, i les diferents respostes observades entre les espècies estudiades, dificulta l'extrapolació dels resultats. S'han descrit models de LPA en diferents animals com ovelles, porcs, gossos, conills, rates i ratolins.

A nivell experimental, la LPA pot reproduir-se per lesió pulmonar indirecta (més freqüentment) o directa. Entre les primeres està l'administració endovenosa de pseudomona, d'enterococ, d'endotoxina d'E.Coli, d'àcid oleic ¹²⁰, de trombina ¹²¹, de moll d'òs ¹²², de metil uretà, de clorur d'etil i l'administració subcutània d'endotoxina ¹²³. També reproduceix una LPA per lesió pulmonar indirecta la pancreatitis aguda.

Produeixen una LPA per lesió pulmonar directa, els rentats pulmonars ¹²⁴, l'administració endotraqueal d'àcid clorhídric, de xantín oxidasa, l'oxigen al 100%, la irradiació, i la isquèmia- reperfusió.

El model de LPA per administració endovenosa de bacils gram negatius està ampliamment documentada.^{118,125-131}, i la resposta fisiològica obtinguda és constant i reproducible. En ell estan clarament diferenciades dues fases. La primera apareix dins les primeres dues hores posteriors a l'administració de l'endotoxina i es caracteritza per HTP i hipoxèmia. A partir de la segona hora s'observa una disminució amb posterior manteniment de la vasoconstricció pulmonar i un progressiu increment de la permeabilitat microvascular a proteïnes. De la primera fase n'és responsable el tromboxà, i amb la segona fase s'hi han relacionat PG i IL.

Aquest model està descrit tant amb l'administració endovenosa com subcutània de bacils gram negatius. En aquesta segona, l'increment de permeabilitat a proteïnes és

molt més irregular que amb l'administració endovenosa, doncs en la seva gènesi estan implicats prostanoids sintetitzats a nivell pulmonar.¹²⁸

L'administració de IL 2 provoca una reacció inflamatòria intravascular amb augment de la permeabilitat de la microvasculatura pulmonar a proteïnes i xoc hiperdinàmic, que simula l'administració d'endotoxina.¹³² Un fenomen similar s'observa amb l'administració de factor de necrosi tumoral.¹³³

Nosaltres varem triar l'ovella com animal d'experimentació perquè la fisiologia respiratòria d'aquest animal és la més similar a la humana i vam fer servir el model de sepsis per endotoxina perquè reproduïx una circumstància clínica habitual.

3. JUSTIFICACIÓ DE L'ESTUDI

El dany o LPA, ja sigui per causa directa o indirecta, es dona en una gran varietat de situacions clíniques. Es una entitat molt freqüent a les unitats de cures intensives i la seva morbi-mortalitat, malgrat els avenços dels darrers anys, segueix essent molt elevada.

La sepsis és l'etiologia més freqüent entre les causes indirectes o extrapulmonars, mentre que entre les causes pulmonars o directes hi ha la broncoaspiració i la pneumònia com a principals etiologies. Però sigui quina sigui la etiologia, els dos tipus de lesió produeixen una alteració de l'intercanvi pulmonar de gasos, canvis en la mecànica i en la vasculatura pulmonar que fan que clínicament aparegui hipoxèmia més o menys severa i diferents graus de HTP. El mecanisme fisiopatològic de la LPA resideix en una alteració de la unitat funcional alveolocapil·lar, ja sigui des de la banda epitelial o des de la banda endotelial. Aquesta alteració es tradueix en un augment de permeabilitat de la membrana alveolocapil·lar i la formació d'edema. La causa més freqüent de lesió endotelial és la sepsis ja que les endotoxines o lipopolisacàrids de la paret bacteriana són potents activadors del complement y dels polimorfonuclears, tots ells responsables de l'alliberació de diversos mediadors inflamatoris i d'enzims proteolítics que perpetuen la lesió.

El tractament d'aquesta entitat clínica, a banda de tractar la causa desencadenant, resideix amb mesures de suport respiratori i hemodinàmic. Darrerament, s'han afegit les tècniques de ventilació de protecció pulmonar i les mesures farmacològiques per a revertir els efectes dels diversos mediadors de la resposta inflamatòria o per modular les relacions ventilació/perfusió pulmonar. En aquestes últimes mesures s'inclouen la administració de iNO i de PGneb. Diversos estudis han demostrat que tant l'òxid nítric inhalat com les prostaciclins nebulitzades milloren l'oxigenació i redueixen la hipertensió arterial en pacients amb LPA, encara que no augmenten la supervivència i no formen part de la teràpia convencional.

Per altra banda, tant el iNO com les PG tenen propietats antiinflamatòries i donada la naturalesa immunològica-inflamatòria de la LPA, la seva administració de manera profilàctica, és a dir abans de produir-se la noxa que desencadena el quadre, podria ser molt més efectiva que el seu ús amb finalitat terapèutica.

Per tant l'ús profilàctic de iNO i de les prostaciclins nebulitzades podria ser de gran interès i tenir una gran rellevància clínica en la prevenció de la LPA. Per això estaria justificada tota investigació encaminada a demostrar-ho. Al dissenyar aquest estudi experimental, només hi havia l'estudi de Bloomfield ⁹⁵ sobre el possible paper profilàctic del iNO. Per tant, era necessari tant confirmar l'efecte profilàctic del iNO, com estudiar el possible paper d'altres fàrmacs, com són les PGneb que tenen les mateixes propietats però el mecanisme d'acció és diferent.

Vàrem dissenyar el present estudi d'investigació per demostrar l'efecte profilàctic del iNO, de les PGneb, i de la seva combinació amb un model experimental de LPA induït per endotoxines. L'objectiu del qual era que en cas d'obtenir-se els resultats esperats, es podrien identificar els grups de risc de desenvolupar una LPA per tal de prendre mesures per prevenir el seu desenvolupament.

4. HIPÒTESIS I OBJECTIUS

4.1. HIPÒTESIS

Les hipòtesis plantejades en aquests estudi foren que l'administració endovenosa d'endotoxines bacterianes produeix una lesió aguda a nivell de la membrana alveolocapil·lar que condiciona un augment de la permeabilitat capil·lar, migració i activació de neutròfils que donen lloc a edema alveolar, hipertensió pulmonar i hipoxèmia severa. L'òxid nítric inhalat per la via del GMPc i les PG nebulitzades per la via del AMPc, produeixen vasodilatació pulmonar selectiva de les zones pulmonars ben ventilades reduint la hipertensió pulmonar i millorant l'intercanvi de gasos. A més, ambdós fàrmacs administrats directament a nivell pulmonar tenen un efecte profilàctic d'aquesta lesió pulmonar al inhibir l'adhesió, migració i activació de neutròfils polimorfonuclears. L'administració conjunta estimularia a la vegada la producció de GMPc i AMPc i es produiria un efecte additiu, aconseguint un major efecte vasodilatador pulmonar, una major disminució del xunt, i una potenciació dels seus efectes profilàctics sobre la lesió pulmonar, respecte de l'administració de cadascun d'ells per separat, al sumar-se els respectius mecanismes d'acció.

4.2. OBJECTIUS

Els objectius del present estudi foren:

1. Verificar que l'administració endovenosa d' endotoxina produeix una lesió aguda a nivell de la membrana alveolo-capil·lar que condiciona un augment de la permeabilitat capil·lar, migració i activació de neutròfils ocasionant edema alveolar, hipertensió pulmonar i hipoxèmia severa.
2. Investigar l'efecte de l'administració profilàctica de iNO, de PGneb i d'ambdós alhora, sobre la hemodinàmica sistèmica, la hemodinàmica pulmonar i l'intercanvi de gasos.
3. Investigar si l'administració profilàctica de iNO, de PGneb i d'ambdós alhora, evita l'increment de permeabilitat vascular, la migració i l'activació de neutròfils

5. MATERIAL I MÈTODES

5.1. CRITERIS D'INCLUSIÓ DELS ANIMALS.

Aquest estudi fou aprovat pel Comit  Ét c d'Investigació de l'Hospital Clínic de Barcelona i pel Comit  Ét c d'Experimentació Animal (CEEA) de la Universitat de Barcelona. Fou realitzat integrament a l'estabulari de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona.

L'estudi es va dissenyar per ser realitzat amb 31 ovelles entre 20 i 25 kg amb els següents criteris d'inclusió:

Temperatura central < 40° C

Recompte leucocitari entre 4000 i 12000 cel/mm³

Pressió mitja de l'artèria pulmonar basal < 20 mmHg

Dels 31 animals varen ser útils 26, distribuïts en els següents grups: vuit animals en el grup control, set animals en el grup endotoxina, sis animals en el grup iNO, cinc animals en el grup PGneb, i cinc animals als que se'ls hi va administrar la combinació iNO+PGneb.

Tres animals foren desestimats des de l'inici per hipoxèmia ($PaO_2/FiO_2 < 200$) i /o hipertensió pulmonar ($PAPm >20$ mmHg). En aquests es va realitzar una toracotomia que va evidenci  una condensació pneum nica bibasal en els tres casos. Un animal fou desestimat a les tres hores, al presentar de manera sobtada pressions pic i plateau superiors a 35 mmHg acompanyades de hipoxèmia. La puncci  intercostal amb un cat ter 18G, va posar de manifest un pneumotòrax. El cinqu  animal va tenir una aturada card ica secundària a hipoxèmia deguda a intubació esofàgica inadvertida.

Al finalitzar l'estudi els animals foren sacrificats sota anestèsia general mitjançant l'administració de clorur pot sic ev.

Per motius tècnics, només disposem de valors de AMPc de dos animals del grup PGneb.

5.2. ANESTÈSIA I INSTRUMENTALITZACIÓ.

Els animals van ser anestesiats amb tiopental sòdic (5 mg/kg), intubats i ventilats mecànicament amb un respirador servo 900C, amb freqüència respiratòria de 15 respiracions per minut, volum corrent de 15 ml/kg i fracció inspiratòria d'oxigen del 0.5.

El manteniment de l'anestèsia es va fer amb tiopental en perfusió a dosis de 4 mg/kg/h i 0,1 mg/kg de pancuroni administrat en bolus, per la relaxació muscular. Colocàvem un catèter 7F de termodilució (Edwards) a l'artèria pulmonar a través de la vena jugular interna dreta mitjançant un introductor 8F (Cordis^R) per mesurar:

- Hemodinàmica pulmonar
- Dèbit cardíac
- Temperatura
- Obtenir mostres de sang venosa mixta

L'artèria femoral dreta es canulava a uns 20 cm de l'aorta amb un catèter de polivinil (8mm DI), per monitorització contínua de pressió arterial i obtenció de mostres de sang arterial.

5.3. MEDICIONS HEMODINÀMIQUES

Es va mesurar la pressió arterial sistèmica (PAS), pressió arterial pulmonar (PAP), pressió capil·lar pulmonar (PCP) i pressió aurícula dreta o pressió venosa central (PVC), mitjançant transductors calibrats i connectats a un monitor Hewlett-Packard. El dèbit cardíac es va obtenir mitjançant un mòdul de dèbit cardíac per termodilució, obtenint-se la mitja de 3 determinacions.

5.4. DETERMINACIONS ANALÍTIQUES

Es van obtenir mostres de sang arterial i sang venosa mixta per anàlisi de:

PaO₂ i PaCO₂

Recompte de leucòcits en sang arterial

Determinació de guanil monofosfat cíclic (GMPc) i adenil monofosfat cíclic (AMPc) en sang arterial i venosa mixta, mitjançant una tècnica de radioimmunoassaig (RIA).

Metahemoglobina.

5.5. RENTAT BRONCOALVEOLAR

Es va realitzar un mini-rentat broncoalveolar (m-BAL) mitjançant una sonda de doble llum (Ballard BAL Cath) introduïda a través d'un connector en el tub endotraqueal, que es podia dirigir a cegues a un o un altre pulmó. S'introduïen 25 ml de sèrum fisiològic que es recuperaven parcialment amb una xeringa de 50 ml. El procediment es realitzava en cada pulmó. El líquid alveolar recuperat es processava per les següents determinacions: concentració de proteïnes, nombre total de cèl·lules, viabilitat cel·lular i fórmula cel·lular

5.6. TEIXIT PULMONAR

L'activitat oxidativa dels neutròfils (determinació de mieloperoxidasa) es va estudiar a partir d'un homogeneïtzat de teixit pulmonar obtingut al final de l'estudi mitjançant una petita toracotomia. Una altra mostra de teixit pulmonar es va emprar per estudi anatomopatològic amb tinció d'hematoxilina-eosina.

5.7. PARÀMETRES CALCULATS

A partir de les variables hemodinàmiques i gasomètriques es van calcular els següents paràmetres:

Índex d'oxigenació: PaO_2/FiO_2

Compliancia estàtica: $VC/P_{plateau}-PEEP$

Resistències vasculars sistèmiques (RVS): $PAm-PVC/DC \times 80$

Resistències vasculars pulmonars (RVP): $PAPm-PCP/DC \times 80$

5.8. MONITORITZACIÓ DE GASOS

La FiO_2 es va monitoritzar mitjançant un oxímetre (Trinity Oxygen Monitor). La concentració espiratòria final de CO_2 ($ETCO_2$) es va monitoritzar mitjançant un capnògraf (Hewlett Packard). Les concentracions d'òxid nítric (NO) i de diòxid de nitrogen (NO_2) durant la inhalació de NO es van mesurar mitjançant un analitzador d'òxids de nitrogen electroquímic (NO_x BOX, Air líquid, France) en la branca inspiratòria del respirador.

5.9. ADMINISTRACIÓ D'ENDOTOXINA

L'endotoxina o LPS (Escherichia Coli, serotip 011:B4; proveïda per Sigma) a una dosi de $20\eta g/kg/min$, es va administrar dissolta en aigua bidestilada i apirògena en un volum de 20 ml a infondre en 30 minuts. Al grup control se li va administrar 20 ml de sèrum fisiològic sol. El bolus anava seguit d'una perfusió contínua d'endotoxina a dosi de $10\eta g/kg/min$, que es mantenia fins al final de l'estudi.

5.10. ADMINISTRACIÓ D'ÒXID NÍTRIC INHALAT

El gas NO estava emmagatzemat en nitrogen, en cilindres de 3 m³ a una concentració de 400 ppm (Abelló, Barcelona). S'administrava mitjançant un regulador caudalímetre de baix fluxe, a l'inici de la branca inspiratòria. El fluxe de iNO s'ajustava fins obtenir la concentració desitjada. Els gasos espirats eren evacuats pel sistema de buit del laboratori.

5.11. ADMINISTRACIÓ DE PROSTAGLANDINES NEBULITZADES

La prostaciclina (PGI₂) (Flolan^R, Wellcome, London) era dissolta amb glicina

buffer i posteriorment amb sèrum salí (dilució estable durant 12 hores). L'administració es realitzava mitjançant un nebulitzador ultrasònic (OMRON, model NE-012), connectat a la branca inspiratòria del respirador i col·locat just abans de la peça en Y. El nebulitzador contenia un reservori de 10 ml, i nebulitzava a 0,3 ml/min, creant partícules amb un diàmetre mig de 4 micres.

5.12. PROTOCOL EXPERIMENTAL

Els animals que complien els esmentats criteris d'inclusió, van ser distribuïts de forma aleatòria en els següents grups:

Grup control (C) : s'administrava una infusió de sèrum salí.

Grup endotoxina (E): s'administrava el bolus, seguit de la perfusió d'endotoxina.

Grup òxid nítric (iNO) : s'administrava 10 ppm de NO inhalat.

Grup prostaciclina (PGneb): s'administrava 10 η g/kg/min de prostaciclina en aerosol.

Grup òxid nítric+prostaciclina (iNO+PGneb): s'administrava NO inhalat i prostaciclina en aerosol.

Tots els grups van ser estudiats durant un període de 4 hores. Els controls es realitzaven en els següents temps:

T00: en situació basal, 20 minuts després del període d'instrumentalització.

T0: als 20 minuts de l'inici del iNO, PGneb o iNO+PGneb, i previ a l'administració d'endotoxina.

T1: a l'hora d'iniciada la infusió de sèrum salí / endotoxina

T2: a les 2 hores d'iniciada la infusió de sèrum salí / endotoxina

T3: a les 3 hores d'iniciada la infusió de sèrum salí / endotoxina

T4: a les 4 hores d'iniciada la infusió de sèrum salí / endotoxina

T5: als 20 minuts de retirar iNO, PGneb o iNO+PGneb.

A la figura 1 es mostra l'esquema del protocol experimental, i a la figura 2 es mostra el laboratori experimental on es va realitzar l'estudi.

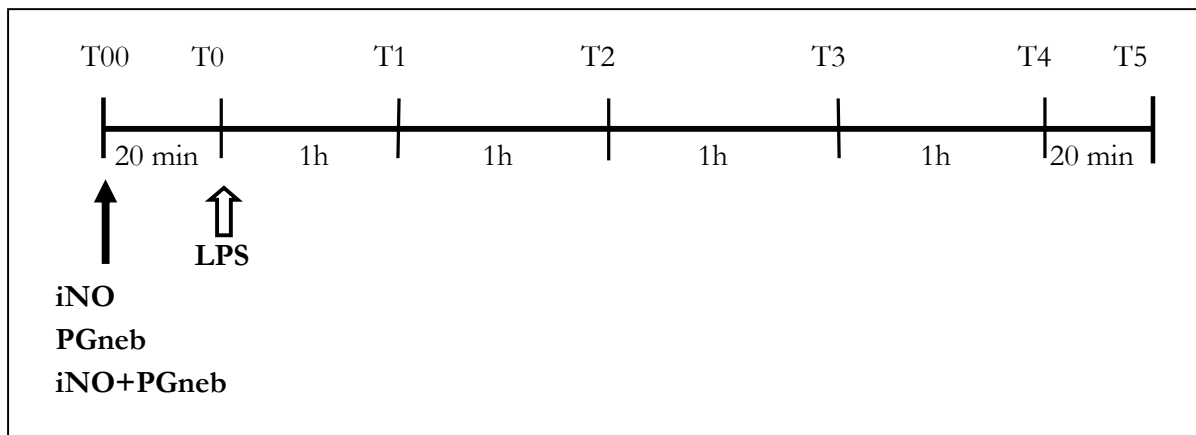


Figura 1. Esquema del protocol experimental

Les mesures hemodinàmiques i les anàlisis de gasos en sang arterial i venosa mixta es van realitzar en tots els temps. L'hemograma i la determinació de metahemoglobina, es va realitzar en els temps T00 i T4. El BAL i l'obtenció de teixit pulmonar es va realitzar en el temps T4.



Figura 2. Es mostra el laboratori experimental on es va instrumentalitzar, monitoritzar i administrar el iNO i les PGneb en un dels animals.

5.13. ANÀLISIS ESTADÍSTIQUES

Les variables contínues es van descriure amb mesures de tendència central i mesures de dispersió; les que seguien una distribució Normal es van descriure amb Mitjana i Desviació Estàndard, les que no la seguien es va fer amb la Mediana i els interquàrtils Q25 i Q75. Les variables categòriques es van descriure mitjançant taules de freqüències.

Per analitzar l'evolució en el temps de l'hemodinàmica sistèmica, l'hemodinàmica pulmonar, l'intercanvi de gasos, i la producció de GMP i AMP cíclics, es va calcular la diferència entre el moment basal i el final de cadascun d'aquests paràmetres. Es va comparar l'efecte de cadascun dels tractaments, mitjançant la descomposició de la variància de les diferències entre el moment basal i després d'haver passat 4 hores des de l'administració del tractament en funció del factor tractament.

En el cas que la diferència es distribuïa segons una Normal, es feien les múltiples comparacions pel mètode Bonferroni, i en el cas en que la variable a comparar no es distribuïa segons una Normal, es va contrastar la igualtat entre els grups mitjançant la prova Kruskal Wallis. Es van seguir els mateixos passos en la comparació de l'efectivitat dels diferents tractaments sobre les variables que quantifiquen la lesió pulmonar.

Es va considerar significativa una $p < 0,05$.

6. RESULTATS

S'exposen els resultats obtinguts en cada grup per separat, seguint l'ordre: grup control, grup endotoxina, grup iNO, grup PGneb i grup iNO+PGneb.

En cada grup es descriuen per aquest ordre, les variables hemodinàmiques, l'intercanvi de gasos, la mecànica pulmonar, el recompte leucocitari en sang perifèrica, el rentat broncoalveolar, la mieloperoxidasa en teixit pulmonar, l'anatomia patològica, els nivells de AMP i GMP cíclics en sang arterial i venosa mixta, i la metahemoglobinèmia

Posteriorment s'exposen les figures i les taules comparatives entre els diferents grups.

6.1. GRUP CONTROL

La determinació dels paràmetres hemodinàmics i gasomètrics al llarg de 4 hores en el grup d'animals que no van rebre endotoxina ni cap altre tractament van permanèixer estables al llarg de l'estudi (Taula 1 i 2). Tampoc vam observar canvis en la mecànica pulmonar (Taula 3 i 4).

Es va observar una davallada no significativa en el nombre de leucòcits en sang perifèrica entre els animals del grup control, de $5.425 \pm 3.434 \times 10^9$ /L a l'inici de l'estudi (T00), fins $4.102 \pm 3.318 \times 10^9$ /L al final del mateix (T4) (Gràfica 8).

En el rentat broncoalveolar del grup control, realitzat al final de l'estudi (T4), es van aïllar $17 \pm 25 \times 10^5$ cel/mm³. La viabilitat de les mateixes era del 71 ± 15 %. La majoria eren macròfags (89 ± 6 %), mentre que els neutròfils representaven el 1 ± 2 %. (Gràfiques 9, 10 i 11). El valor de les proteïnes procedents del rentat broncoalveolar d'aquest grup va ser de 335 ± 124 mg/L. Entre les quals 96 ± 55 U/g de proteïna corresponien a mieloperoxidasa. Aquesta última també va ser determinada a nivell del

teixit pulmonar mitjançant la biòpsia realitzada al finalitzar l'estudi; el seu valor va ser de $3,2 \pm 1$ U/g de teixit. (Gràfica 12, 13 i 14).

La mostra de teixit pulmonar obtinguda per estudi anatomopatològic no mostrava alteracions significatives (Figura 3).

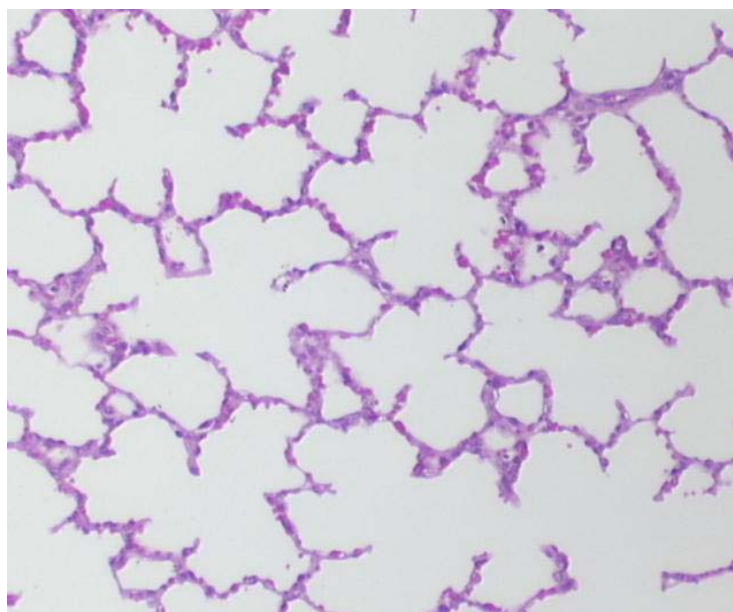


Figura 3. Anatomia patològica del grup control. Tinció hematoxilina-eosina en la que es mostren els espais alveolars i intersticials lliures.

Taula 1. Hemodinàmica sistèmica del grup control

	T00	T1	T2	T3	T4
FC (batecs/min)	165±29	151±26	146±31	147±24	154±25
Temperatura (°C)	39±2	39±4	39,1±3	39,3±3	39,7±2
PAm (mmHg)	102±10	101±17	100±16	96±17	100±11
DC (L/min)	3,6±0,9	3,6±0,6	3,5±0,5	3,2±0,6	3,2±0,6
PVC (mmHg)	4±4	5±4	4±4	4±4	5±5
RVS (dines/seg/cm ⁻⁵)	2277±72	2140±43	2227±634	2273±57	2399±51

Abreviacions: T00, Temps basal; T1, 1h; T2, 2h; T3, 3h; T4, 4h; FC; freqüència cardíaca; PAm, Pressió arterial mitja; DC; dèbit cardíac; PVC, pressió venosa central; RVS, resistències vasculars sistèmiques.

Taula 2. Hemodinàmica pulmonar del grup control

	T00	T1	T2	T3	T4
PAPm (mmHg)	17±3	18±3	16±2	16±2	16±3
PCP (mmHg)	5±3	5±3	6±3	5±3	6±5
RVP(dines/seg/cm ⁻³)	228±124	274±73	241±67	264±66	257±108

Abreviacions: T00, Temps basal; T1, 1h; T2, 2h; T3, 3h; T4, 4h; PAPm, Pressió artèria pulmonar mitja; PCP, pressió capilar pulmonar; RVP, resistències vasculars pulmonars.

Taula 3. Intercanvi de gasos del grup control

	T00	T1	T2	T3	T4
pH	7,49±2,8	7,46±8,2	7,47±6,4	7,47±6,2	7,4±6,9
PaO ₂ (mmHg)	242±17	215±49	217±37	223±23	230±34
PaCO ₂ (mmHg)	29±4	28±5	31±6	29±4	29±4
PvO ₂ (mmHg)	48±4,2	49±4,9	47±2	46±1,9	48±2
PaO ₂ /FiO ₂	448±34	431±98	435±75	447±46	461±69

Abreviacions: T00, Temps basal; T1, 1h; T2, 2h; T3, 3h; T4, 4h; PaO₂, pressió arterial d'oxigen; PaCO₂, pressió arterial de CO₂; PvO₂, pressió venosa d'oxigen; PaO₂/FiO₂, índex d'oxigenació.

Taula 4. Mecànica Pulmonar del grup control

	T00	T1	T2	T3	T4
P.P (cmH ₂ O)	25±3	28±5	29±4	28±4	28±4
P.Pl (cmH ₂ O)	21±3	25	26±4	25±5	25±5
C. estàtica (ml/cmH ₂ O)	22±5	18±5	19±4	20±4	19±5

Abreviacions: T00, Temps basal; T1, 1h; T2, 2h; T3, 3h; T4, 4h; P.P, pressió pic; P.Pl, pressió plateau; C. estàtica, compliància estàtica.

6.2. GRUP ENDOTOXINA

L'administració d'endotoxina o LPS va produir en l'hemodinàmica sistèmica una disminució del debèit cardíac i un increment en les RVS significatius. El debèit cardíac va disminuir a la meitat del seu valor inicial passant de $4,1 \pm 1$ L/min en T00 a $2 \pm 0,5$ L/min en T4 ($p < 0,05$). Les RVS també van augmentar significativament respecte del grup control passant de 2.222 ± 849 dinas/cm²/seg, a 3.372 ± 630 dinas/cm²/seg a les 4 h d'haver iniciat l'administració d'endotoxina ($p < 0,05$). Finalment, la temperatura va mostrar un increment significatiu, essent al final de l'estudi de $40,6^\circ\text{C}$ ($p < 0,05$). La PAm, la FC i la PVC es van mantenir estables (Taula 5).

En l'hemodinàmica pulmonar, l'administració de LPS va produir un increment significatiu de la PAPm ($p < 0,05$), passant de 14 ± 3 mmHg en situació basal, a 25 ± 3 mmHg al final de l'estudi; i de les RVP ($p < 0,05$), passant de 243 ± 182 mmHg en el T00 a 680 ± 412 mmHg en el T4. La PCP també va augmentar però no de manera significativa (Taula 6).

En relació a l'intercanvi de gasos, l'administració d'endotoxina va provocar una disminució significativa de la PaO₂ ($p < 0,05$), passant de 228 ± 29 mmHg en T00 a 61 ± 11 mmHg en T4, acompanyada d'una disminució similar de l'índex d'oxigenació. També vam observar una disminució significativa del pH (Taula 7).

Va haver-hi un increment no significatiu de les pressions pic i plateau en la mecànica pulmonar, mentre que el grau de compliància o distensibilitat pulmonars no van variar (Taula 8).

L'administració de LPS també va ocasionar una reducció del nombre de leucòcits en sang perifèrica passant de $7.437 \pm 2.025 \times 10^9$ /L a l'inici de l'estudi, a $2.430 \pm 1.188 \times 10^9$ /L a les 4 hores d'haver-la administrat (Gràfica 8).

En el rentat broncoalveolar obtingut a les 4 hores de l'inici de la perfusió contínua d'endotoxina es van comptabilitzar $20 \pm 18 \times 10^5$ cèl·lules, essent la viabilitat de les

mateixes del 75%, la majoria de les quals eren macròfags (78%). Vam observar un increment significatiu ($p < 0,05$) en el nombre de neutròfils (9%, versus el 1% del grup control). (Gràfiques 9, 10 i 11). La determinació de proteïnes obtinguda a partir de la mateixa mostra era de 518 ± 194 mg/L. (Gràfica 12). El valor de la mieloperoxidasa era de 331 ± 189 U/g proteïna, diferència estadísticament significativa respecte del grup control ($p < 0,05$) (Gràfica 13).

La determinació de mieloperoxidasa aïllada al final de l'estudi, a partir de l'homogeneïtzat de teixit pulmonar fou de $6,2 \pm 3$ U/g (Gràfica 14).

L'administració de LPS no va fer variar significativament els valors de AMPc i GMPc, arterials ni venosos (Gràfica 15).

L'estudi anatomopatològic de la biòpsia pulmonar va mostrar un infiltrat inflamatori difús amb augment dels leucòcits a l'interior de les arterioles (Figura 4).

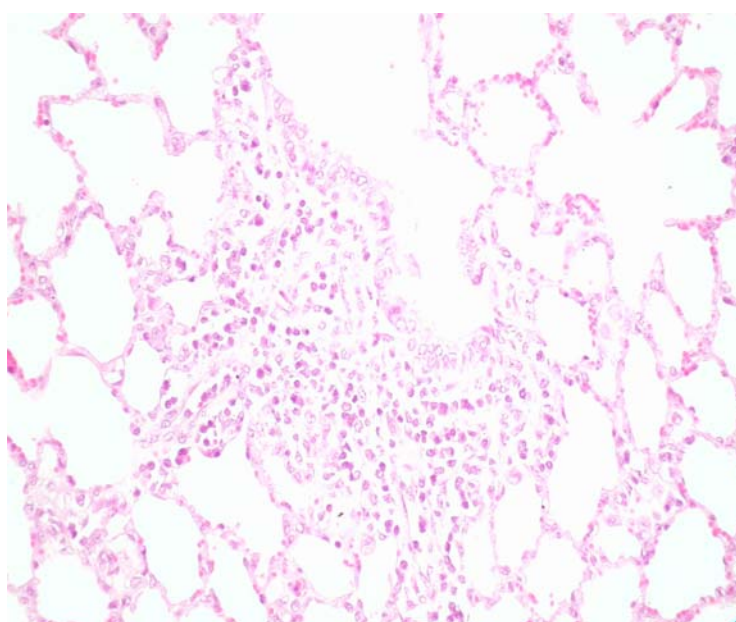


Figura 4. Anatomia patològica del grup endotoxina. Tinció hematoxilina eosina. on s'observa una severa infiltració intersticial i alveolar per neutròfils.

Taula 5. Hemodinàmica sistèmica del grup endotoxina

	T00	T1	T2	T3	T4
FC (batecs/min)	161±22	160±22	162±27	160±28	159±22
Temperatura (°C)	39	39,5	39,9	40,4	40,6
PAm (mmHg)	109±14	92±16	88±12	92±8	91±14
DC (L/min)	4,1±1	3,2±0,8	2,8±1	2,1±0,4	2±0,5
PVC (cm/H ₂ O)	4±2	4±2	5±3	5±3	5±3
RVS(dines/seg/cm ²)	2.222±849	2.360±1097	2.563±1012	3.404±880	3.372±630

Abreviacions: T00, Temps basal; T1, 1h; T2, 2h; T3, 3h; T4, 4h; FC; freqüència cardíaca; PAm, Pressió arterial mitja; DC; dèbit cardíac; PVC, pressió venosa central; RVP, resistències vasculars pulmonars.

Taula 6. Hemodinàmica pulmonar del grup endotoxina

	T00	T1	T2	T3	T4
PAPm (mmHg)	14±3	25±4	26±3	25±3	25±3
PCP (mmHg)	6±2	10±5	12±5	12±5	11±4
RVP(dines/seg/cm ²)	243±182	450±330	500±352	603±385	680±412

Abreviacions: T00, Temps basal; T1, 1h; T2, 2h; T3, 3h; T4, 4h; PAPm, Pressió artèria pulmonar mitja; PCP, pressió capil·lar pulmonar; RVP, resistències vasculars pulmonars.

Taula 7. Intercanvi de gasos del grup endotoxina

	T00	T1	T2	T3	T4
pHa	7,43±5,8	7,34±7,9	7,34±8,4	7,33±6,9	7,32±6,6
PaO ₂ (mmHg)	228±29	105±56	98±47	73±18	61±11
PaCO ₂ (mmHg)	34±5	37±8	40±9	40±8	39±5
PvO ₂ (mmHg)	49±15	42±7	40±3	36±7	38±8
PaO ₂ /FiO ₂	457±58	210±113	196±94	147±37	123±22

Abreviacions: T00, Temps basal; T1, 1h; T2, 2h; T3, 3h; T4 4h; PaO₂, pressió arterial d'oxigen; PaCO₂, pressió arterial de CO₂; PvO₂, pressió venosa d'oxigen; PaO₂/FiO₂ ,índex d'oxigenació.

Taula 8. Mecànica pulmonar del grup endotoxina

	T0	T1	T2	T3	T4
P.P (cm H ₂ O)	24±3	31±6	31±6	31±6	31±5
P.Pl (cmH ₂ O)	21±3	26±6	27±5	27±5	26±5
C. estàtica.(ml/cmH ₂ O)	22±2	16±2	14±2	15±2	21±1

Abreviacions: T00, Temps basal; T1, 1h; T2, 2h; T3, 3h; T4, 4h; P.P, pressió pic; P.Pl, pressió plateau; C. estàtica, compliància estàtica.

6.3. GRUP ÒXID NÍTRIC

L'administració de iNO en el temps basal, previ a l'inici de la infusió d'endotoxina, no va tenir cap efecte sobre els paràmetres hemodinàmics, ni sobre l'intercanvi de gasos. L'administració de iNO abans d'iniciar la perfusió d'endotoxina, no va modificar els paràmetres ventilatoris (Taula 12).

L'administració de iNO va evitar increment de les RVP observat amb l'administració d'endotoxina, de manera que s'observa una diferència estadísticament significativa en el comportament de les mateixes entre el grup endotoxina i el grup iNO ($p < 0,05$). Amb l'administració de iNO tampoc es va observar increment de la PAPm ($p < 0,05$), ni disminució del dèbit cardíac ($p < 0,05$) produïts per l'administració d'endotoxina. De manera que aquests i la resta de paràmetres de l'hemodinàmica sistèmica i pulmonar es van mantenir estables al llarg de tot l'estudi (Taula 9 i 10).

Pel que fa a l'intercanvi de gasos, l'administració de iNO va mantenir estable la PaO₂, de manera que després de 4 hores de rebre LPS el seu valor era similar al basal (219±54 mmHg) (Taula 11).

La mecànica pulmonar no es va veure afectada, ja que els valors de les pressions pic i plateau no van augmentar de manera significativa al final de l'estudi.

Als 20 minuts d'aturar l'administració de iNO, vàrem observar una tendència a l'increment de la PAPm que va passar a ser de 16 ± 5 a 23 ± 6 mmHg, així com una disminució de la PaO₂ de 219 ± 54 a 160 ± 54 mmHg. Ambdues, no significatives.

Amb l'administració de iNO no es va observar davallada en el nombre de leucòcits en sang perifèrica provocada per l'administració d'endotoxina ($p < 0,05$). (Gràfica 8)

En el BAL obtingut d'aquests animals al finalitzar l'estudi, es van obtenir $14\pm 23 \times 10^5$ cèl·lules, amb una viabilitat del 72%. Aquesta xifra, malgrat no resultar estadísticament significativa, va ser inferior a la determinada en el grup endotoxina (Gràfica 9). El percentatge de neutròfils d'aquesta mostra va ser significativament inferior ($p < 0,05$) al percentatge de neutròfils procedent del grup que va rebre LPS (1% versus 9%, respectivament) (Gràfica 11).

La xifra de proteïnes del BAL va ser de 467 ± 385 mg/L, i el de mieloperoxidasa de 214 ± 292 U/g de proteïna; ambdós valors inferiors als trobats en el grup endotoxina ($p > 0,05$). (Gràfica 12 i 13).

El valor de la mieloperoxidasa del teixit pulmonar en els animals que van rebre iNO, era inferior a la del grup endotoxina ($3,6\pm 1,5$ U/g de teixit), de manera no significativa ($p > 0,05$).

Es va observar un increment en els valors de GMPc, de manera que en sang arterial aquests passen de 6 en el T00 a 31 ± 51 en el T4, i en sang venosa, de 10 ± 15 a 44 ± 45 (Gràfica 15). No va haver-hi variació en els nivells de AMPc al llarg de l'estudi.

L'estudi anatomopatològic va mostrar un teixit pulmonar amb absència d'edema i lliure de l'infiltrat inflamatori agut típic de l'administració d'endotoxina. En aquestes mostres s'observava alguns focus de fibrosi intersticial aïllats (Figura 5).

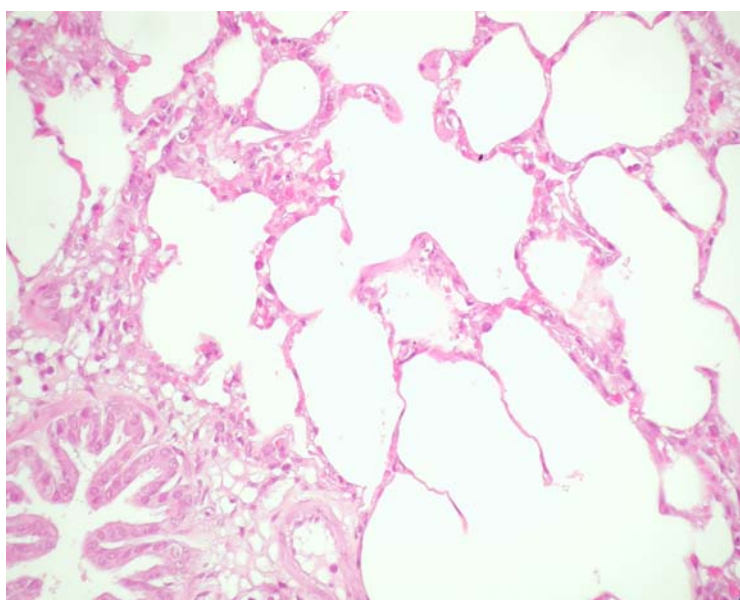


Figura 5: Anatomia patològica del grup iNO. Tinció hematoxilina eosina que mostra els espais alveolars lliures amb alguns neutròfils intersticials.

Taula 9. Hemodinàmica sistèmica del grup òxid nítric

	T00	T0	T1	T2	T3	T4	T5
FC (batecs/min)	168±49	185±59	169±51	163±61	152±48	157±38	166±39
Temp (°C)	38±2	38±2	39±1	39,3±2	39,5±3	39,7±3	37,7±2
PAm (mmHg)	96±16	97±14	94±20	95±21	95±16	91±19	88±15
DC (L/min)	3,4±1,1	3,6±1,1	3,1±1,1	3,5±0,6	3,5±0,8	3,3±0,7	2,5±0,8
PVC mmHg	5±3	5±4	5±3	4±3	5±3	5±4	5±4
RVS(dines/seg/cm ⁵)	2288±675	2164±706	2432±750	2181±774	2120±661	2167±802	2656±523

Abreviacions: T00, Temps basal; T1, 1h; T2, 2h; T3, 3h; T4, 4h; T5, 20 minuts post retirada de iNO; FC; freqüència cardíaca; PAm, Pressió arterial mitja; DC; débit cardíac; PVC, pressió venosa central; RVS, resistències vasculars sistèmiques.

Taula 10. Hemodinàmica pulmonar del grup òxid nítric

	T00	T0	T1	T2	T3	T4	T5
PAPm (mmHg)	14±3	15±4	20±5	17±5	16±5	16±5	23±6
PCP (mmHg)	6±3	7±3	7±2	7±3	7±3	7±2	7±3
RVP(din/seg/cm ²)	222±142	180±58	359±214	233±120	214±103	223±124	512±99

Abreviacions: T00, Temps basal; T1, 1h; T2, 2h; T3, 3h; T4, 4h; T5, 20 minuts post retirada de NO; PAPm, pressió artèria pulmonar mitja; PCP, pressió capil·lar pulmonar; RVP, resistències vasculars pulmonars.

Taula 11. Intercanvi de gasos del grup òxid nítric

	T00	T0	T1	T2	T3	T4	T5
pHa	7,40±0,1	7,36±0,1	7,38±0,1	7,39±0,1	7,40	7,42	7,3±5
PaO ₂ (mmHg)	227±38	207±58	211±47	211±58	223±60	219±54	167±54
PaCO ₂ (mmHg)	36±9	38±12	35±7	34±5	32±3	32±3	32±4
PvO ₂ (mmHg)	51±13	50±10	51±9	51±11	49±5	47±7	45±10
PaO ₂ /FiO ₂	455±77	414±117	422±50	422±67	446±73	438±84	334±109

Abreviacions: T00, Temps basal; T1, 1h; T2, 2h; T3, 3h; T4, 4h; T5, 20 minuts post retirada de NO; PaO₂, pressió arterial d'oxigen; PaCO₂, pressió arterial de CO₂; PvO₂, pressió venosa d'oxigen; PaO₂/FiO₂, índex d'oxigenació.

Taula 12. Mecànica pulmonar grup òxid nítric

	T00	T1	T2	T3	T4
P.P (cm H ₂ O)	22±5	26±3	27±3	27±3	27±4
P.Pl (cm H ₂ O)	20±7	25±2	23±2	24±2	24±4
C.estàtica (ml/H ₂ O)	22±6	15±4	17±2	15±3	16±2

Abreviacions: T00, Temps basal; T1, 1h; T2, 2h; T3, 3h; T4, 4h; P.Pic, P.pic; P.Plateau, pressió plateau; C. estàtica, compliància estàtica.

6.4. GRUP PROSTACICLINA NEBULITZADA

L'administració de PGneb als animals en el temps basal, abans de qualsevol intervenció, no va alterar l'hemodinàmica sistèmica ni pulmonar. Tampoc no va fer variar els paràmetres de la mecànica pulmonar (Taula 16).

Dins l'hemodinàmica sistèmica, amb l'administració de PGneb les RVS i el dèbit cardíac van mostrar una tendència a la disminució, per bé que aquesta no va ser significativa ($p > 0,05$). La PAm va mostrar un comportament similar. La resta de paràmetres de l'hemodinàmica sistèmica (FC, PVC) i la temperatura, es van mantenir estables (Taula 13).

Pel que fa a l'hemodinàmica pulmonar, amb l'administració de PGneb es va observar un increment de la PAPm i de les RVP. La PAPm va augmentar de 13 ± 1 mmHg a l'inici de l'estudi fins 26 ± 3 mmHg al final del mateix, i de les RVP de 285 ± 150 mmHg en el T00 a 679 ± 212 mmHg en el T4. Aquesta diferència era estadísticament significativa ($p < 0,05$) respecte del grup que va rebre iNO. La PCP va permanèixer estable al llarg de tot l'estudi (Taula 14).

Respecte l'intercanvi de gasos, la PaO₂ va passar de 227 ± 24 mmHg en el T00 a 67 ± 11 mmHg en el T4. ($p < 0,05$). La retirada de les PGneb al final de l'estudi, no va modificar el valor de la PaO₂ (Taula 15).

Amb l'administració de PGneb es va observar una tendència a l'increment en les pressions pic i plateau, i a la reducció en la distensibilitat pulmonar en la mecànica pulmonar ($p > 0,05$).

La retirada de les PGneb 20 minuts abans de finalitzar l'estudi i després de 4 hores de tractament, no va variar la tendència dels paràmetres hemodinàmics ni de la mecànica pulmonar determinats.

La disminució de la xifra de leucòcits en sang perifèrica observada en el grup que va rebre PGneb és significativament inferior a la del grup endotoxina ($p < 0,05$) (Gràfica 8).

En el BAL obtingut al final de l'estudi, es van obtenir $5 \pm 8 \times 10^5$ cèl·lules, amb una viabilitat del 60% (Gràfica 9). Va haver-hi una diferència estadísticament significativa en el percentatge de neutròfils del BAL entre els grups que van rebre PGneb (soles o en combinació) i el grup que va rebre iNO sol ($p < 0,05$) (Gràfica 11).

La xifra de proteïnes del BAL en el grup que va rebre PGneb soles, va ser de 1.269 mg/L (Gràfica 12). El valor de la mieloperoxidasa del BAL només va ser de 402 U/g proteïna (Gràfica 13).

La mieloperoxidasa aïllada en el teixit pulmonar era superior de 9,4 U/g proteïna. (Gràfica 14). Es va constatar un increment en els valors de AMP cíclic al llarg de l'estudi en sang arterial i venosa en el grup d'animals que va rebre PG, que no va resultar ser estadísticament significatiu (Gràfica 15), mentre que no vam observar variació en els valors de GMPc.

L'estudi anatomopatològic de la biòpsia obtinguda al final de l'experiment és concordant amb els resultats descrits a l'objectivar un intens infiltrat inflamatori amb marcat edema periarteriolar i perivenular, reflex de l'increment de la permeabilitat vascular (Figura 6).

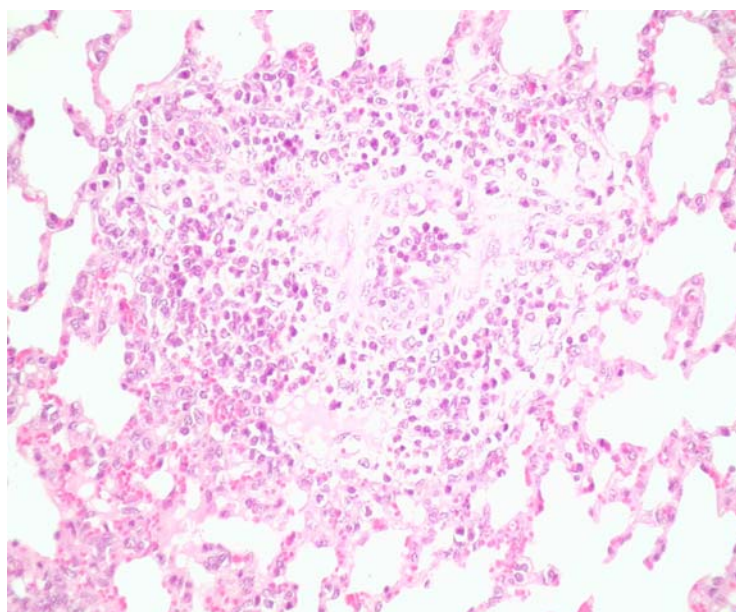


Figura 6. Anatomia patològica del grup PGneb. Tinció hematoxilina-eosina. en la que es mostra infiltració neutrofílica i edema alveolar i intersticial severos.

Taula 13. Hemodinàmica sistèmica del grup prostaciclina nebulitzada

	T00	T0	T1	T2	T3	T4	T5
FC (batecs/min)	156±29	169±34	141±18	164±23	159±27	153±33	155±39
Temp (°C)	39	38	39	39	40	40	40
PAm (mmHg)	97±1	93±3	95±5	95±6	90±9	93±9	91±8
DC (L/min)	2,8±1,5	2,9±1,4	2,6±0,6	3,5±1,4	2,7±0,9	2,5±1	2,6±0,9
PVC (mmHg)	4±1	4±1	4±2	4±2	4±1	5±2	6±1
RVS din/seg/cm ⁵	3341±916	3017±697	2937±946	2385±967	2739±778	3046±916	2615±830

Abreviacions: T00, Temps basal; T0, 20 minuts post inici PG.; T1, 1h; T2, 2h; T3, 3h; T4, 4h; T5, 5h; FC, freqüència cardíaca; Temp, temperatura; PAm, Pressió arterial mitja; DC, dèbit cardíac; PVC, pressió venosa central; RVS, resistències vasculars sistèmiques.

Taula 14: Hemodinàmica pulmonar del grup prostaciclina nebulitzada

	T00	T0	T1	T2	T3	T4	T5
PAPm (mmHg)	13±1	13±1	23±3	26±4	25±4	26±3	27±3
PCP (mmHg)	5	5±1	7±2	7±2	5±1	6±2	6±2
RVP(din/seg/cm ⁻⁵)	285±150	252±109	552±197	499±234	618±197	679±212	646±145

Abreviacions: T00, Temps basal; T0, 20 minuts post NO-PG; T1, 1h; T2, 2h; T3, 3h; T4, 4h; PAPm, pressió artèria pulmonar mitja; PCP, pressió capil·lar pulmonar; RVP, resistències vasculars pulmonars.

Taula 15: Intercambi de gasos del grup prostaciclina nebulitzada

	T00	T0	T1	T2	T3	T4	T5
pHa	7,43±4,5	7,41±3,5	7,39±2,3	7,36±2,7	7,33±4,4	7,32±6,3	7,31±4,2
PaO ₂ (mmHg)	227±24	222±20	110±40	81±31	73±28	67±33	60±11
PaCO ₂ (mmHg)	35±2	35±	37±2	42±11	45±11	45±8	40±4
PvO ₂ (mmHg)	47±5	44±3	43±3	42±8	41±2	40±3	45±4
PaO ₂ /FiO ₂	454±56	445±56	220±60	162±45	147±50	135±45	120±56

Abreviacions: T00, Temps basal; T1, 1h; T2, 2h; T3, 3h; T4, 4h; PO₂, pressió arterial d'oxigen; PaCO₂, pressió arterial de CO₂; PvO₂, pressió venosa d'oxigen; PaO₂/FiO₂, índex d'oxigenació.

Taula 16. Mecànica Pulmonar del grup prostaciclina nebulitzada

	T00	T0	T1	T2	T3	T4	T5
P.P. (cmH ₂ O)	20±4	21±5	29±3	34±5	34±3	36±3	35±5
P.Pl.(cmH ₂ O)	18±3	19±4	27±5	32±5	31±3	33±4	32±3
C.estàtica(ml/cmH ₂ O)	23±3	24±3	13±4	11±3	11±2	11±4	11±4

Abreviacions: T00, Temps basal; T1, 1h; T2, 2h; T3, 3h; T4, 4h; P.P., pressió pic; P.Pl., pressió plateau; C.. estàtica, compliància estàtica.

6.5. GRUP ÒXID NÍTRIC + PROSTACICLINA NEBULITZADA

L'administració conjunta de iNO i PGneb, abans d'iniciar l'administració d'endotoxina (T0), no va fer variar els paràmetres hemodinàmics sistèmics ni pulmonars.

Els efectes més destacats sobre l'hemodinàmica sistèmica de l'administració profilàctica de la combinació iNO±PGneb van ser la manca de canvis en el dèbit cardíac i en les RVS. La PAm tampoc va mostrar variacions significatives. La resta de paràmetres hemodinàmics (FC i PVC) i la temperatura van mantenir-se estables.

Pel que fa a l'hemodinàmica pulmonar, amb l'administració profilàctica de iNO±PGneb no s'observa increment de la PAPm ni de les RVP. S'observa una diferència significativament estadística en el comportament d'ambdós paràmetres entre el grup iNO±PGneb i els grups endotoxina i PGneb ($p < 0,05$). El valor de la PCP es va mantenir estable (Taula 18). Tanmateix, la retirada d'aquests dos fàrmacs al cap de 4 hores d'haver iniciat la perfusió d'endotoxina (T5) no va alterar l'hemodinàmica sistèmica, però sí que va incrementar el valor de la PAPm de 19 ± 4 a 26 ± 5 mmHg de manera no significativa ($p > 0,05$).

En quan a l'intercanvi de gasos, amb l'associació de iNO±PGneb la PaO₂ va passar de 219 ± 3 mmHg en T00 a 135 ± 71 mmHg en T4 ($p > 0,05$) (Taula 19).

Amb l'administració de iNO±PGneb es va constatar en la mecànica pulmonar un increment de les pressions pic, de 22 cm H₂O a 32 cm H₂O, i plateau 20 cm H₂O a 31 cm H₂O, alhora que una reducció de la compliància, al llarg de les 4 hores de l'estudi. ($p > 0,05$) (Taula 20).

Amb l'administració de iNO±PGneb es va observar una disminució dels leucòcits en sang perifèrica de $5.303 \pm 2.217 \times 10^9 /L$ a $2.915 \pm 1.716 \times 10^9 /L$ ($p > 0,05$) (Gràfica 8).

El BAL procedent dels animals que van rebre la combinació de iNO±PGneb mostrava $27 \pm 31 \times 10^5$ cèl·lules, amb una viabilitat del 70%. Amb un increment dels neutròfils i una disminució dels macròfags respecte del grup iNO ($p < 0,05$) (Gràfica 9). La quantitat de proteïnes del BAL en el grup que va rebre la combinació d'ambdós fàrmacs va ser de 523 mg/L i els nivells de mieloperoxidasa, de 147 U/g de proteïna. (Gràfica 12 i 13).

La mieloperoxidasa en el teixit pulmonar va ser de 4 U/g de teixit. No hi havia diferències significatives en aquests paràmetres, ni respecte el grup endotoxina ni respecte la resta de grups tractament ($p > 0,05$). (Gràfica 14).

Vam observar una tendència a l'increment en els nivells de AMPc en el grup d'animals que va rebre iNO±PGneb. ($p > 0,05$). Els nivells de GMPc no van variar al llarg de l'estudi, en aquest grup (Gràfica 15).

L'anatomia patològica de la biòpsia pulmonar mostrava infiltrat inflamatori agut i edema perivascular moderat. (Figura 7).

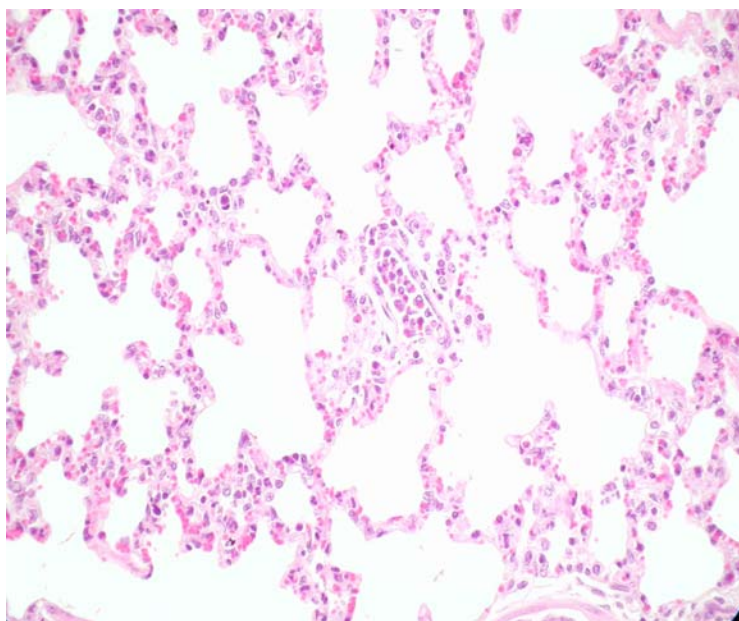


Figura 7. Anatomia patològica del grup iNO+PGneb. Tinció hematoxilina-eosina en la que s'observa infiltració neutrofilica i edema intersticial moderats.

Taula 17. Hemodinàmica sistèmica del grup òxid nítric+prostaciclina nebulitzada

	T00	T0	T1	T2	T3	T4	T5
FC (batecs/min)	129±28	137±23	142±32	134±28	125±20	122±24	142±34
Temp °C	39,1±0,5	39,2±1	39,6±2	39,9±1	40,2±1	40,4±2	40,3±2
Pam (mmHg)	98±10	98±7	93±6	87±10	87±6	89±7	89±13
DC (L/min)	2,9±0,7	3,7±1,1	2,9±0,5	2,9±0,4	2,4±0,6	2,5±0,5	2,8±0,8
PVC mmHg	6±3	7±1	6±1	7±1	8±1	8±1	8±1
RVS(din/seg/cm ⁻⁵)	2691±758	2061± 556	2384± 414	2233± 488	2773± 877	2748± 101	2312±320

Abreვიacions: T00, Temps basal; T0, 20 minuts post NO-PG; T1, 1h; T2, 2h; T3, 3h; T4, 4h; T5, 20 minuts post retirada de NO-PG; FC, freqüència cardíaca; PAm, Pressió arterial mitja; DC; dèbit cardíac; PVC, pressió venosa central; RVS, resistències vasculars sistèmiques.

Taula 18. Hemodinàmica pulmonar del grup òxid nítric+prostaciclina nebulitzada

	T00	T0	T1	T2	T3	T4	T5
PAPm (mmHg)	16±2	14±1	23±3	20±2	19±3	19±4	26±5
PCP (mmHg)	7±2	6±2	8±2	7±1	8±1	8±1	9±3
RVP(dines/seg/cm ⁻⁵)	257±87	196±120	444±129	338±99	373±132	393±95	480±90

Abreვიacions: T00, Temps basal; T0, 20 minuts post NO-PG; T1, 1h; T2, 2h; T3, 3h; T4, 4h; T5, 20 minuts post retirada de NO-PG; PAPm, pressió artèria pulmonar mitja; PCP, pressió capil·lar pulmonar; RVP, resistències vasculars pulmonars.

Taula 20. Intercanvi de gasos del grup òxid nítric+prostaciclina nebulitzada

	T00	T0	T1	T2	T3	T4	T5
pHa	7,4±3,6	7,4±6,3	7,4±6,7	7,4±9,3	7,3±6,9	7,3±6,1	7,3±4,9
PaO ₂ (mmHg)	219±19	194±34	128±60	133±64	138±75	135±71	131±72
PaCO ₂ (mmHg)	32±4	29±8	36±3	36±5	37±5	37±5	36±9
PvO ₂ (mmHg)	49±7	43±5	44±10	44±7	41±7	38±8	40±8
PaO ₂ /FiO ₂	454	445	220	162	147	135	120

Abreვიacions: T00, Temps basal; T0, 20 minuts post inici iNO-PGneb; T1, 1h; T2, 2h; T3, 3h; T4, 4h; T5, 20 minuts post retirada de iNO-PGneb; PaO₂, pressió arterial d'oxigen; PaCO₂, pressió arterial de CO₂; PvO₂, pressió venosa d'oxigen; PaO₂/FiO₂, índex d'oxigenació.

Taula 19. Mecànica pulmonar del grup òxid nítric+prostaciclina nebulitzada

	T00	T0	T1	T2	T3	T4
P.P (cmH ₂ O)	22±4	25±5	29±4	31±3	32±4	32±3
P.Pl. (cmH ₂ O)	20±3	23±5	26±4	30±3	31±4	30±4
C.estàtica (ml/cmH ₂ O)	25±3	20±2	16±3	15±4	12±1	13±

Abreviacions: T00, Temps basal; T0, 20 minuts post NO-PG; T1, 1h; T2, 2h; T3, 3h; T4, 4h; P.P., pressió pic; P.Pl, pressió plateau; C. estàtica, compliància estàtica.

6.6. COMPARACIONS ENTRE GRUPS

A continuació es mostra els resultats de les comparacions de les variables hemodinàmiques entre tots els grups.

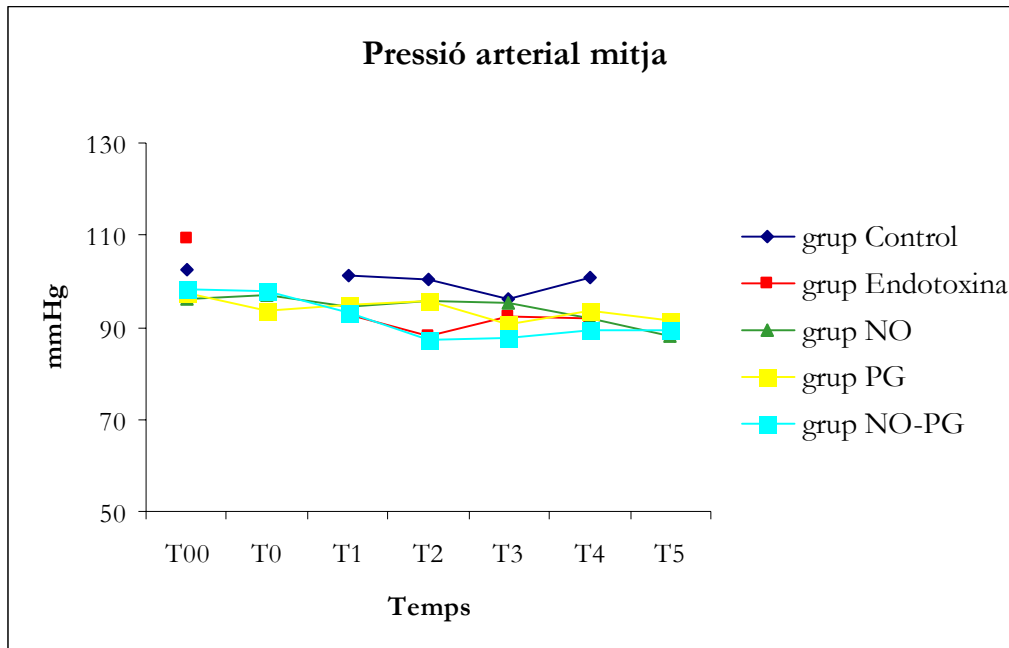
No hi havia diferències significatives en el comportament de la PAm entre els grups estudiats. Hi havia un increment de les RVS en el grup endotoxina respecte del grup control ($p < 0,05$).

La PAPm i les RVP van ser significativament més altes en els grups endotoxina i PGneb respecte dels grups control i iNO ($p < 0,05$).

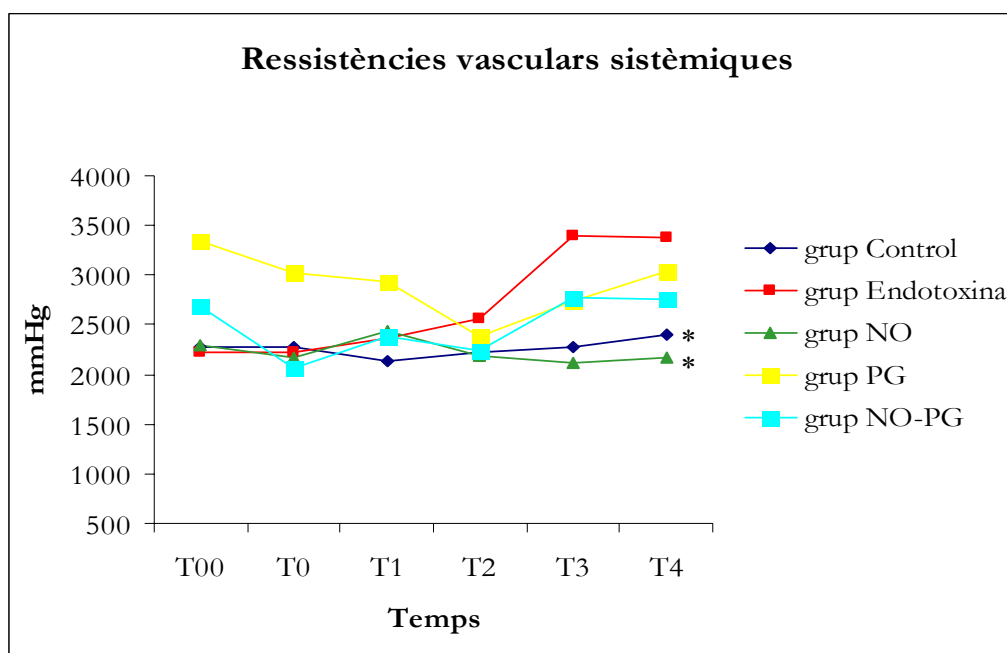
El dèbit cardíac en el grup endotoxina va disminuir respecte els grups control i iNO ($p < 0,05$).

La PaO₂ va ser significativament més baixa en el grup endotoxina respecte del grup control ($p < 0,05$), i va mantenir valors més elevats en el grup iNO respecte dels grups endotoxina i PGneb ($p < 0,05$).

Gràfica 1. Pressió arterial mitja dels grups control, endotoxina, NO, PG i iNO-PG.

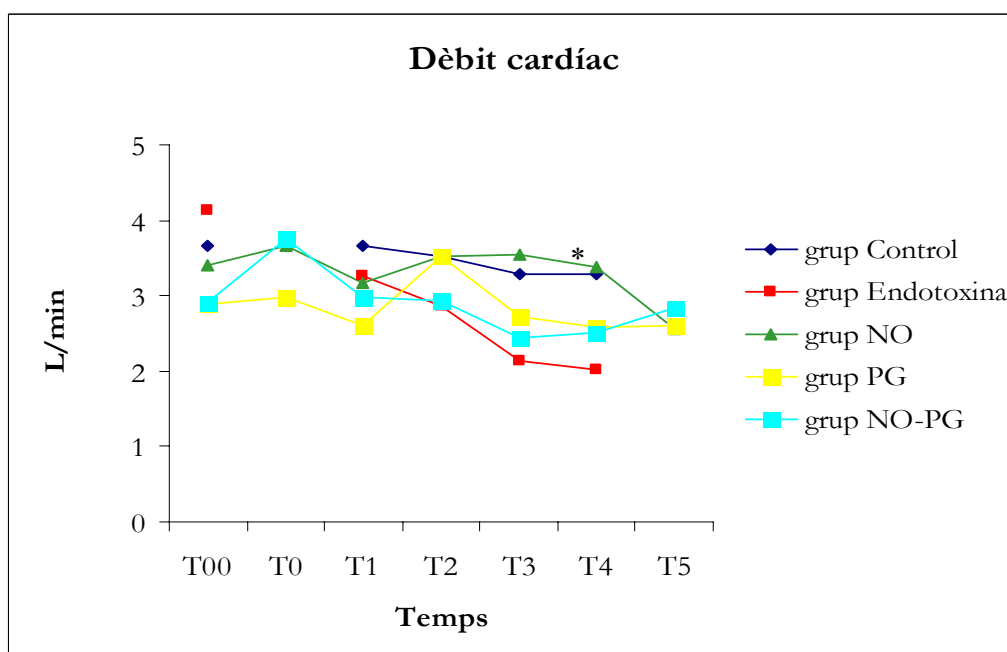


Gràfica 2. Resistències vasculars sistèmiques dels grups control, endotoxina, NO, PG i iNO-PGneb.



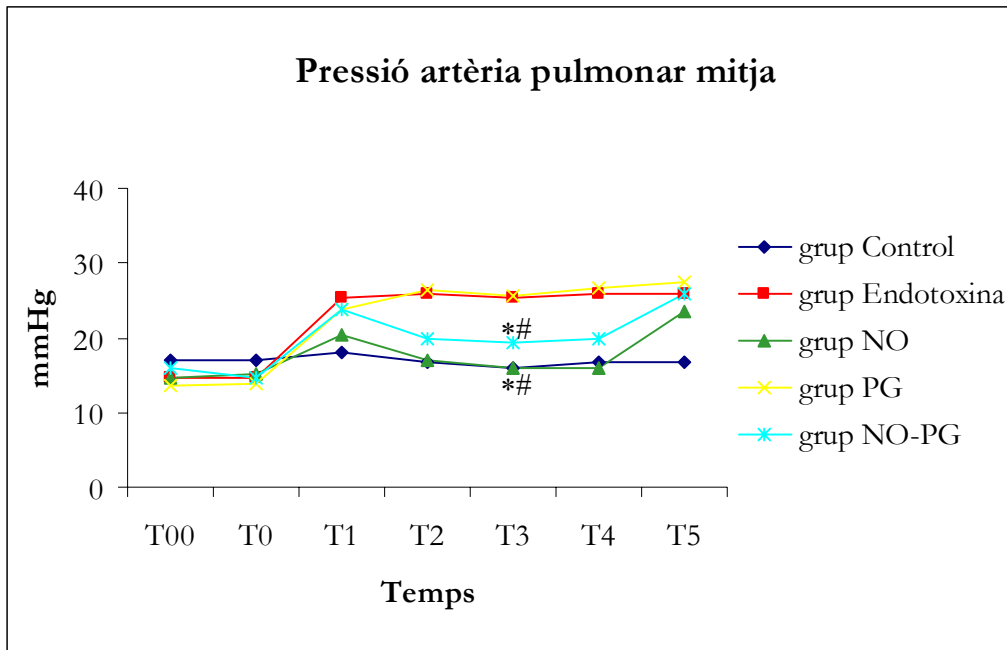
* p < 0,05 respecte al grup endotoxina

Gràfica 3. Dèbit cardíac dels grups control, endotoxina, iNO, PGneb i iNO+PGneb



*p < 0,05 respecte al grup endotoxina

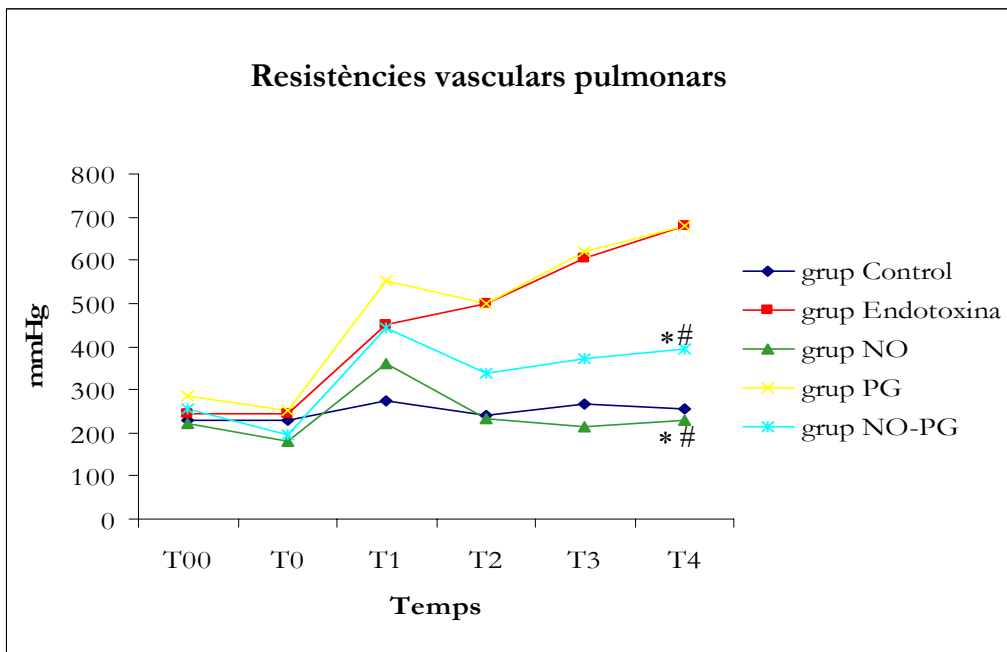
Gràfica 4. Pressió artèria pulmonar mitja dels grups control, endotoxina, NO, PG i NO-PG



* $p < 0,05$ respecte al grup endotoxina

$p < 0,05$ respecte al grup PG

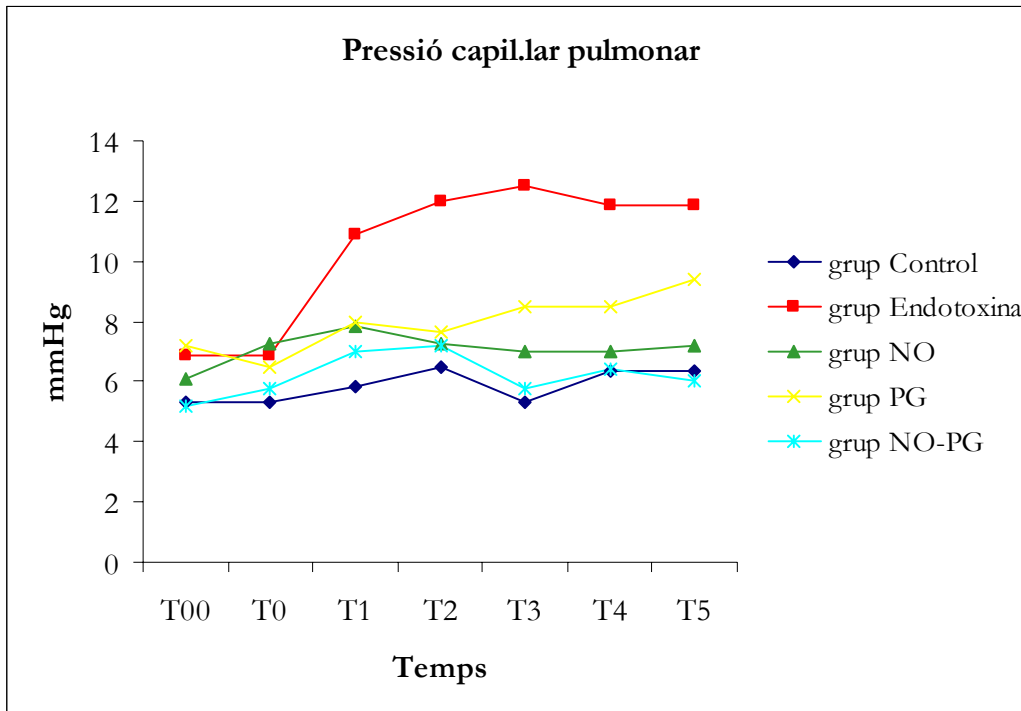
Gràfica 5. Resistències vasculars pulmonars dels grups control, endotoxina, NO, PG i NO+PG.



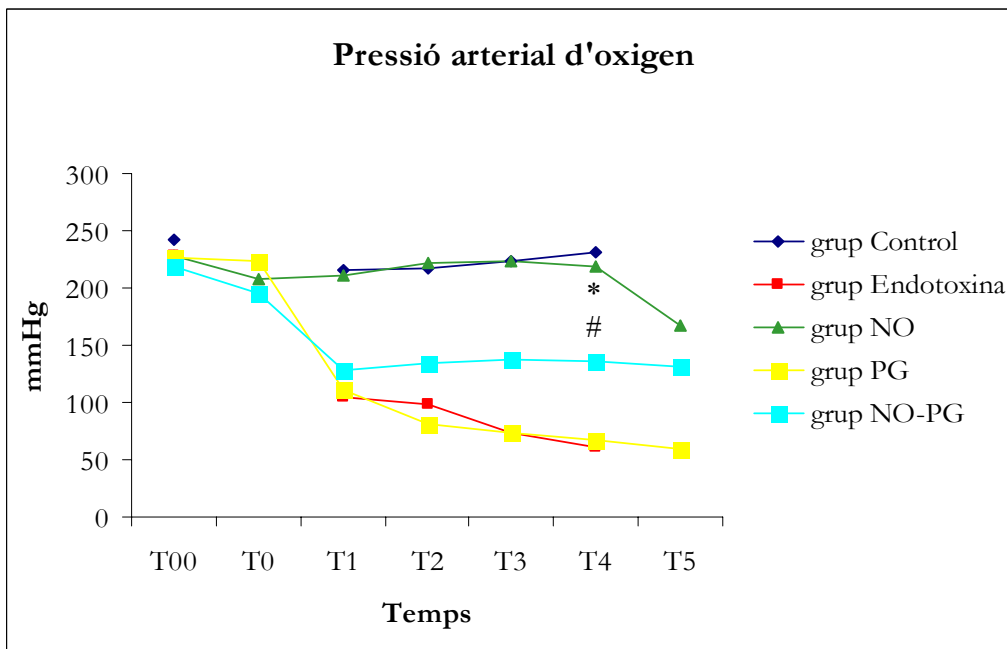
* $p < 0,05$ respecte al grup endotoxina.

$p < 0,05$ respecte al grup PG

Gràfica 6. Pressió capil·lar pulmonar dels grups control, endotoxina, NO, PG i NO-PG.



Gràfica 7. Pressió arterial d'oxigen dels grups control, endotoxina, NO, PG i NO-PG.



* $p < 0,05$ respecte al grup endotoxina

$p < 0,05$ respecte al grup PG

En el grup endotoxina es va observar una disminució en el nombre de leucòcits en sang perifèrica al final de l'estudi, respecte del grup control ($p < 0,05$) (Gràfica 8).

No va haver-hi diferències significatives en el nombre de cèl·lules procedents del rentat broncoalveolar entre els grups estudiats (Gràfica 9).

El grup que va rebre iNO tenia un percentatge de macròfags superior al del grup que va rebre la combinació iNO+PGneb ($p < 0,05$) (Gràfica 10).

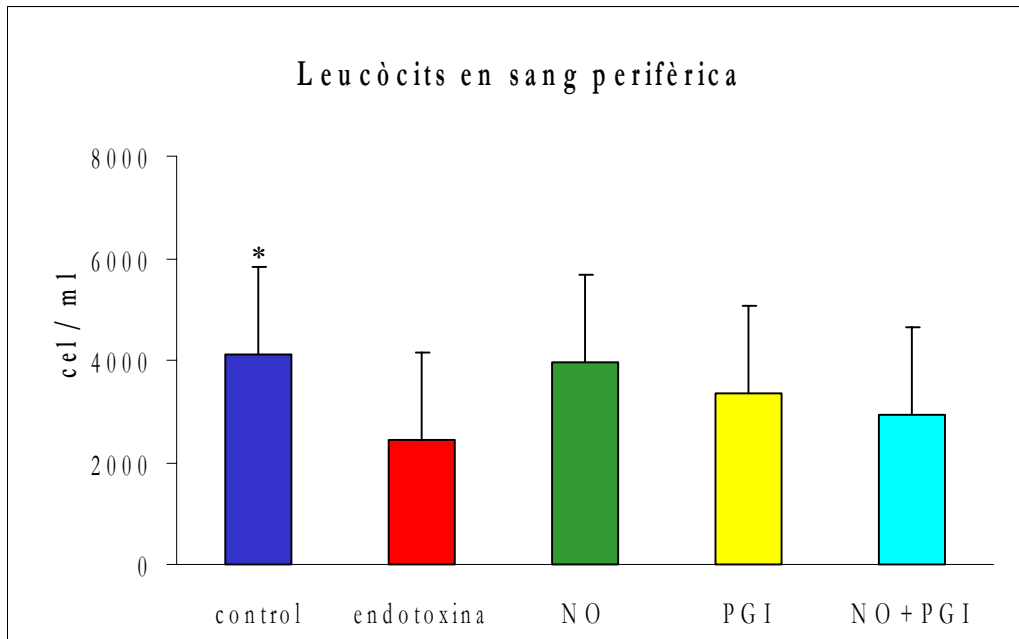
En els grups que van rebre endotoxina, PGneb i iNO+PGneb hi havia un percentatge de neutròfils superior respecte els grups control i iNO ($p < 0,05$) (Gràfica 11).

No hi havia diferències significatives en la quantitat de proteïnes procedents del BAL entre els grups estudiats (Gràfica 12). Tot i que es mostra una tendència a l'increment en els nivells de proteïnes del BAL en el grup que va rebre PG.

El grup endotoxina mostrava un nivell de mieloperoxidasa en el rentat broncoalveolar superior al del grup control ($p < 0,05$). Entre la resta de grups no hi havia diferències significatives en els nivells de mieloperoxidasa del BAL (Gràfica 13).

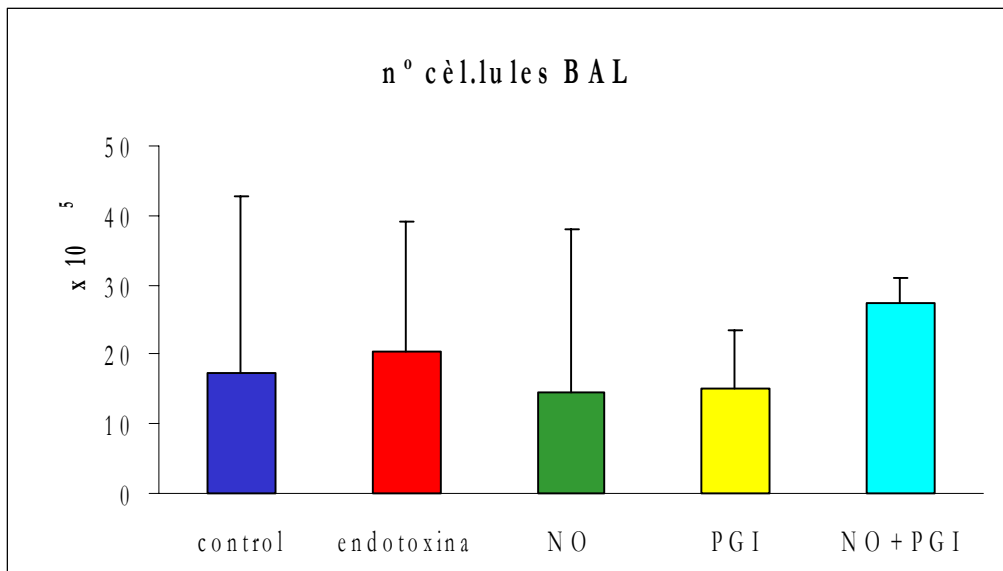
No hi havia diferències significatives en els nivells de mieloperoxidasa en teixit pulmonar entre els diferents grups encara que es mostra una tendència a l'increment en els nivells de mieloperoxidasa del teixit pulmonar en el grup endotoxina i PGI (Gràfica 14).

Gràfica 8. Recompte de leucòcits en sang perifèrica en tots els grups.

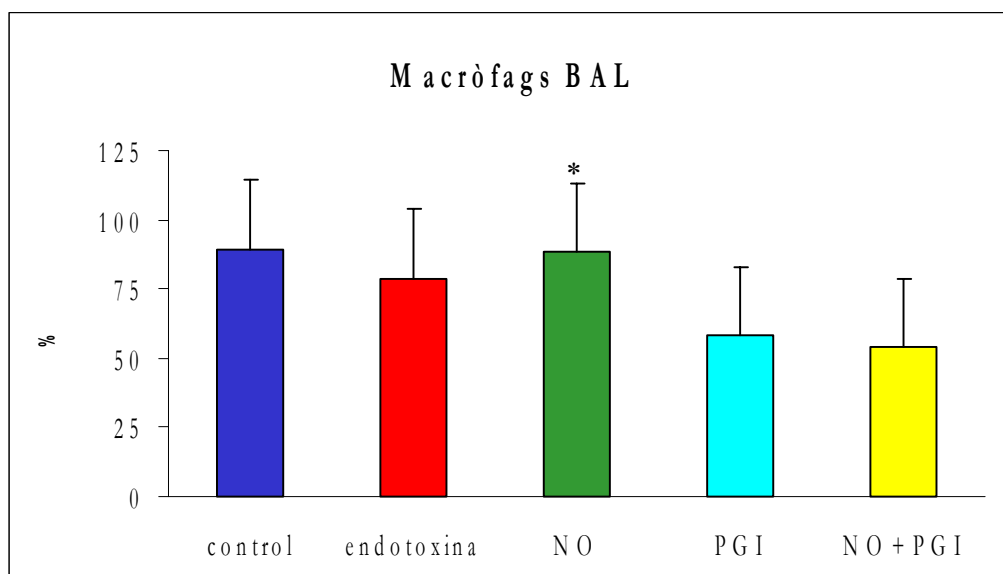


* $p < 0,05$ respecte al grup endotoxina

Gràfica 9. Nombre de cèl·lules del BAL en tots els grups.

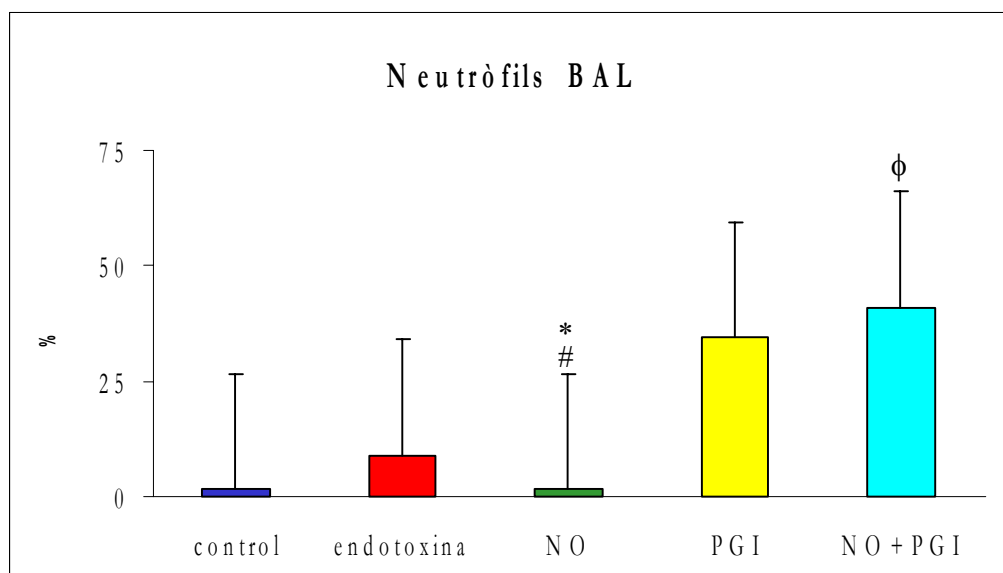


Gràfica 10. Macròfags en el rentat broncoalveolar de tots els grups.



* $p < 0,05$ respecte al grup NO + PG

Gràfica 11. Neutròfils en el rentat broncoalveolar de tots els grups.

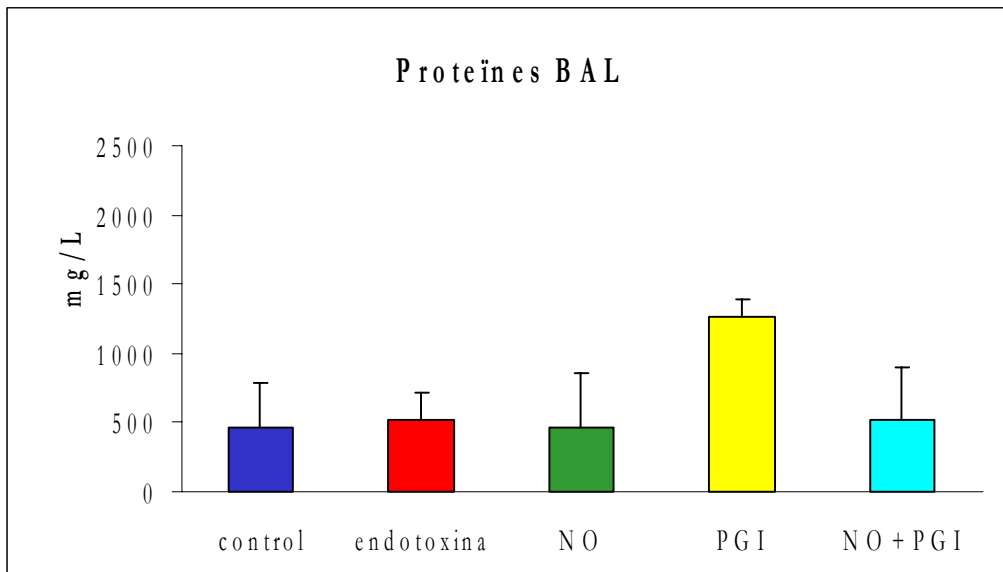


* $p < 0,05$ respecte al grup endotoxina.

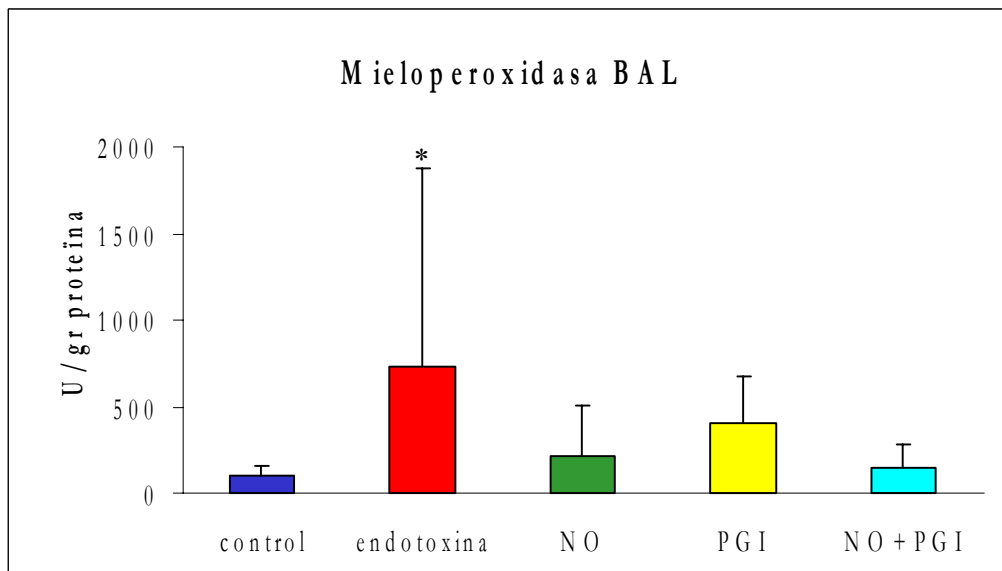
$p < 0,05$ respecte al grup PG.

ϕ $p < 0,05$ respecte al grup NO

Gràfica 12. Proteïnes en el rentat broncoalveolar de tots els grups.

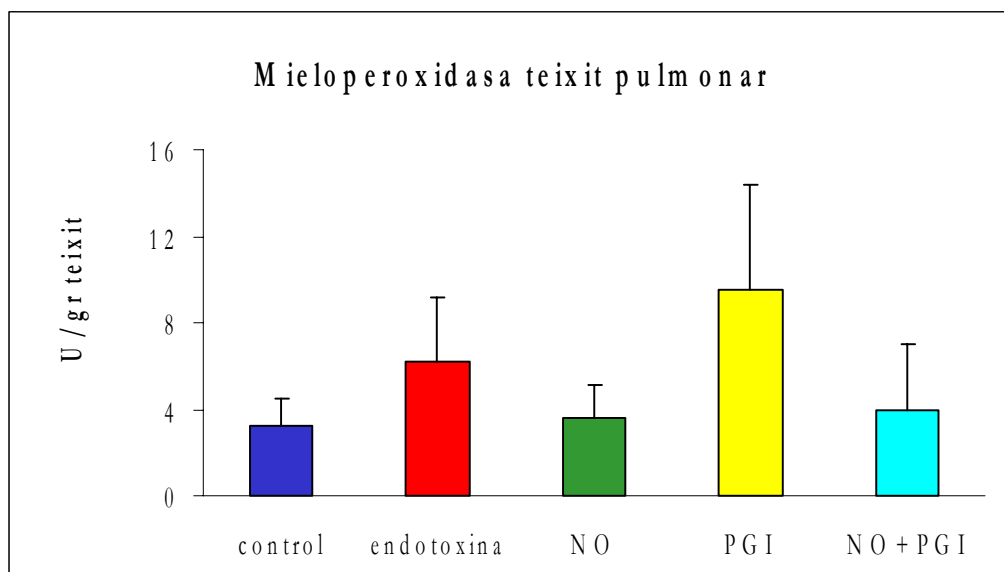


Gràfica 13. Mieloperoxidasa en el rentat broncoalveolar de tots els grups



* $p < 0,05$ respecte del grup control

Gràfica 14. Mieloperoxidasa en el teixit pulmonar de tots els grups.



Es va observar una tendència a l'increment en els nivells de GMPc en els animals que van rebre iNO i una tendència a l'increment de AMPc en els animals que van rebre PGneb. No es va observar increment en l'AMPc ni en el GMPc en els animals que van rebre la combinació iNO+PGneb.

Taula 21 AMPc i GMPc arterials i venosos de tots els grups

		AMPcA	AMPcV	GMPcA	GMPcV
grup Control	T0	37±17	40±17	14±21	19±28
	T4	44±21	46±22	21±36	11±14
grup Endotoxina	T0	36±15	38±17	6±5	6±5
	T4	67±46	62±45	10±10	8±9
grup iNO	T0	34±7	34±6	6±5	10±15
	T4	35±4	32±4	31±51	44±45
grup PGneb	T0	44±30	57±23	9±11	8±11
	T4	61±15	74±2	11±14	12±15
grup iNO+PGneb	T0	58±10	65±6	3±1	6±5
	T4	55±31	67±42	6±1	4±0,7

7. DISCUSSIÓ

En aquest treball experimental hem estudiat l'efecte profilàctic del iNO, les PGneb, i la combinació d'ambdós fàrmacs, en un model de LPA per la infusió endovenosa de LPS de la paret bacteriana de *Escherichia Coli* en la ovella adulta anestesiada.

En primer lloc hem comprovat que l'administració d'endotoxina produïa una LPA, iniciada a partir de la disrupció de l'endoteli vascular pulmonar, caracteritzada clínicament per hipertensió pulmonar i hipoxèmia severes. A partir d'aquí, hem estudiat si l'administració profilàctica iNO, PGneb, i iNO+PGneb podia evitar tant la lesió pulmonar pròpiament dita com les seves manifestacions clíniques. També hem esbrinat si administrant conjuntament iNO i PGneb obtindríem una potenciació dels efectes de l'administració de cadascun d'ells per separat.

Per tant el **primer objectiu** era verificar que l'administració de LPS produeix una lesió aguda a nivell de la membrana alveolocapil·lar que condiciona un augment de la permeabilitat capil·lar, migració i activació de neutròfils ocasionant edema alveolar, HTP i hipoxèmia severes.

La LPA és una entitat clínica no resolta des del punt de vista del tractament, i la seva morbimortalitat és encara elevada. D'aquí que segueixin assajant-se diferents abordatges terapèutics en busca d'una millora de la supervivència d'aquests pacients. Gran part d'aquests es realitzen en models experimentals.

Per aquest estudi nosaltres hem escollit el model oví, doncs és el que té els paràmetres hemodinàmics pulmonars més similar als humans ^{134 7 118 134}. El porc presenta una resposta vasoconstrictora més intensa ^{135 135} i el gos difereix en l'alliberació de NO en les artèries pulmonars.¹³⁶ El model oví de LPA per administració endovenosa de *Escherichia. Coli*, està àmpliament utilitzat en la literatura ^{128,137,138}, i reproduïx amb força semblança la HTP, la hipoxèmia i la reducció de la compliança observades en la LPA en humans.

La successió de fenòmens fisiopatològics que segueixen a la infusió endovenosa de LPS impliquen una resposta immunològica cel·lular i humoral. Els principals efectors de la primera són els neutròfils, la degranulació dels quals augmenta els nivells de radicals lliures d'oxigen i d'enzims proteolítics. En la resposta humoral tenen un paper primordial els metabolits de l'àcid araquidònic, els eicosanoids, uns amb efecte vasoconstrictor (PGF2 α i Tx) i altres amb efecte vasodilatador (PG). Ambdós fenòmens condueixen a la vasoconstricció pulmonar (fenomen que depèn dels prostanoids) i a la disrupció endotelial amb consegüent augment de la permeabilitat (fenomen independent dels prostanoids) ^{139 128} marcant l'inici de la LPA.

En el nostre estudi, al cap d'una hora d'haver-se iniciat l'administració d'endotoxina vam observar en l'hemodinàmica sistèmica un increment significatiu de les RVS i una disminució significativa del DC. La PAm, tot i tenir una tendència al descens, no va arribar a fer-ho de manera significativa.

En la literatura hi ha diferents estudis que fan servir un model similar, obtenint respostes hemodinàmiques variades en funció sobretot de la dosi emprada i de la durada de l'experiment. Pittet i cols. van fer un estudi administrant una perfusió de LPS a dosi de 20 η g/kg/min durant vuit hores. Van observar un augment de les RVS, disminució del DC i hipotensió arterial i a partir de la quarta hora, apareix un patró hiperdinàmic amb hipotensió arterial sistèmica mantinguda i recuperació del cabdal cardíac ¹⁶. El nostre estudi es comparable a la primera fase del model de Pittet. D'haver-lo perllongat en el temps possiblement nosaltres també hauríem observat caiguda de les RVS amb recuperació parcial del dèbit cardíac i hipotensió arterial persistent. En el mateix treball de Pittet i cols. hi ha un segon grup d'animals que reben el doble de dosi d'endotoxina (40 η g/kg/min); la resposta hemodinàmica dins la primera hora té la mateixa tendència, però la severitat dels canvis és superior, i els animals evolucionen ràpidament a una fallada multiorgànica amb hipotensió arterial severa, per disminució de les RVS i del DC. També vàrem observar una disminució significativa de la PAm en un estudi realitzat pel nostre grup prèviament (dades no publicades) en el que la

perfusió d'endotoxina s'administrava a dosis similars a les emprades en el present treball però durant sis hores.

L'administració d'endotoxina a dosis de $1\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ durant cinc minuts, en un altre estudi realitzat per Hüttemeier i cols., va ocasionar una disminució de la PAm no significativa, mentre que el DC va permanèixer estable. En aquest treball, la quantitat d'endotoxina administrada era molt superior a la utilitzada en el nostre estudi, però aquesta es va mantenir només durant cinc minuts a diferència dels estudis anteriorment comentats, en que la perfusió es manté al llarg de quatre i vuit hores. Sembla que la reducció de la PAm en aquest model experimental està en relació al temps d'administració de LPS, de manera que té més repercussió hemodinàmica una perfusió administrada al llarg de 6-8 hores, que un bolus inicial de la mateixa malgrat que aquesta sigui a dosis netament superiors.

A nivell de l'hemodinàmica pulmonar l'administració d'endotoxina va produir un increment significatiu de la PAPm i de les RVP de manera bifàsica. S'observa un pic inicial dins la primera mitja hora, per estabilitzar-se posteriorment i mantenir-se en nivells superiors als basals durant la resta de l'estudi. Aquest comportament de l'hemodinàmica pulmonar és el característicament observat amb la infusió d'endotoxina.

En el treball de Pittet i cols.¹⁶, el principal efecte hemodinàmic de l'administració d'endotoxina també va ser l'augment de la PAPm i de les RVP. Aquestes van incrementar-se el doble en el grup que rebia $4\ \eta\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ de LPS respecte el que rebia $20\ \eta\text{g}/\text{kg}/\text{min}$.

En el model de Hüttemeier i cols. també s'observa un increment de la PAPm i de la PCP a la mitja hora^{140,141}. Però en aquest cas la perfusió de LPS es va administrar durant cinc minuts únicament i a les 2 hores aquests paràmetres van retornar al nivell basals.

En altres estudis, com el de Winn i cols. la normalització de la PAPm es dona a partir de la primera hora posterior a l'administració del bolus d'endotoxina¹³⁹, mentre que en l'estudi de Kennet i cols, l'administració de LPS no aconsegueix un increment de la PAPm significatiu ¹⁴². Del qual se'n deriva que la durada de l'administració de la perfusió de LPS és un factor determinant en les alteracions produïdes en l'hemodinàmica pulmonar. En aquests dos últims estudis, l'administració de LPS es mantenia durant 30 minuts.

De tots els canvis hemodinàmics, tant sistèmics com pulmonars, que s'observen amb l'administració d'endotoxina en les publicacions, el que apareix de manera més significativa i constant és l'augment de les RVP a partir dels 30 minuts d'administració de la mateixa. Aquest fenomen s'observa tant amb la injecció local en "bolus" com amb l'administració en perfusió contínua d'endotoxina ^{123,128} i està relacionada amb el pic plasmàtic de tromboxà A₂ i 6Keto PGF1 α , que s'observa de manera paral·lela ^{139 141}.

El tromboxà A₂ té una vida mitja de segons i és probablement convertit a tromboxà B₂ el qual té el mateix efecte sobre la circulació sistèmica. S'ha vist que la inhibició selectiva de la síntesi de tromboxà A₂ amb dazoxibén, atenua aquesta resposta. En els estudis en els que únicament s'administra un bolus, els paràmetres tendeixen a recuperar progressivament els valors basals. És possible que donat que el tromboxà té una vida mitja molt curta, és necessari que la síntesi sigui continuada, per que la seva acció pugui mantenir-se. Si bé inicialment el tromboxà és el responsable del pic inicial de HTP, a mesura que es desenvolupa el model sembla que és el desequilibri entre la síntesi d'aquests i la de PG, el que contribueix a l'aparició i manteniment de l'estat hiperdinàmic i la vasodilatació observats en els estudis que s'allarguen més enllà de les 6 hores¹⁶.

Pel que fa referència a l'intercanvi de gasos, l'administració d'endotoxina va produir en el nostre estudi una disminució significativa de la PaO₂ de manera progressiva al llarg del mateix. Aquest comportament de la PaO₂ és l'observat en la majoria de models descrits de LPA per endotoxina. La PO₂ disminueix de manera

progressiva sense recuperar els valors inicials, a diferència de com passa amb els paràmetres hemodinàmics de manera que fins i tot en els estudis en els que els animals reben LPS només durant 5 i 30 min, s'observa hipoxèmia persistent^{140,141 139}.

El motiu d'aquesta diferència de comportament entre la HTP i la hipoxèmia podria deure's a que la hipoxèmia de la LPA es secundària a l'efecte xunt, que produeix la perfusió de zones pulmonars deficientment ventilades (per augment de permeabilitat capil·lar, disjunció de l'endoteli i edema); fenomen que no gaudeix de la reversibilitat que té la resposta vascular a les diferents substàncies vasoactives (tromboxans, PG,...).

És característic de la LPA, l'alteració de la mecànica pulmonar per reducció de la distensibilitat pulmonar. En alguns estudis la reducció de la compliància s'acompanya d'un augment en la resistència en la via aèria. En el nostre estudi no vàrem observar canvis significatius en la compliància estàtica, ni en les pressions pulmonars.

Per avaluar la lesió pulmonar vam estudiar el BAL dels animals a les 4 hores de l'administració de LPS, així com l'anatomia patològica i la quantificació de mieloperoxidasa procedent del teixit pulmonar. Es va objectivar un acúmul intrapulmonar de neutròfils, amb el consegüent augment dels productes sintetitzats pels mateixos (mieloperoxidassa) i un increment de la xifra de proteïnes. Tot reflex de la lesió pulmonar, que va ser corroborada pels fenòmens inflamatoris observats en l'estudi anatomopatològic del teixit pulmonar. En el rentat broncoalveolar de les ovelles que van rebre LPS, s'observava un increment significatiu en el percentatge de neutròfils, principals efectors cel·lulars de la lesió endotelial. Aquest acúmul intrapulmonar es relacionava amb una disminució dels leucòcits totals a nivell perifèric.

En estudis similars, la leucoestasi pulmonar també es relaciona amb la leucopènia observada en sang perifèrica^{138 131}, tal i com passa en l'estudi de Pittet et al⁸ Aquest fenomen, s'objectiva en la majoria de models experimentals però aquest no és l'únic mecanisme patogènic, doncs els pacients neutropènics també poden desenvolupar LPA.

L'acúmul intrapulmonar de neutròfils justifica que el valor de la mieloperoxidasa, enzim procedent de la degranulació dels neutròfils, fos significativament superior al del grup control. Per altra banda, l'increment de proteïnes en el BAL respecte les del grup control; reflexa un increment de la permeabilitat vascular en el grup que va rebre endotoxina.

Amb la mateixa finalitat d'estudiar la integritat de la barrera endotelial, en els treballs com el de Kennet et al i el de Pittet et al, cateteritzen el conducte limfàtic eferent a nivell toràcic i mesuren el flux limfàtic pulmonar i el seu aclariment de proteïnes de manera continua al llarg de tot l'estudi^{8,16,142}. L'augment del flux limfàtic i de l'aclariment de proteïnes que aquests autors observen en els seus respectius estudis, es correlaciona amb l'augment de la permeabilitat microvascular a proteïnes i amb la formació d'edema pulmonar. Aquests fenòmens en el treball de Pittet et al són molt més evidents en el grup d'animals que rebien les dosis més altes de LPS. Ambdós procediments són per tant reflex, directe o indirecte, de la integritat de l'endoteli pulmonar.

La lesió pulmonar es va confirmar en l'estudi anatomopatològic de les mostres de teixit pulmonar obtingudes al final de l'estudi per toracotomia. En el grup d'animals que havien rebut endotoxina, es va evidenciar una inflamació difusa amb augment dels neutròfils intraalveolars i en l'espai intersticial, i edema pulmonar.

El model de LPA per endotoxina presentat en aquest estudi, es caracteritza fonamentalment per HTP i hipoxèmia severa com a conseqüència de la vasoconstricció i de l'augment de permeabilitat vascular, que origina extravassació de proteïnes, infiltració i degranulació de neutròfils. Per tant és un bon model per avaluar l'efecte de diferents fàrmacs com a tractament o profilaxi d'aquesta entitat.

Així, el **segon objectiu** d'aquest estudi va ser esbrinar el possible efecte profilàctic de l'administració de iNO, de PG nebulitzades i d'ambdós alhora, sobre aquest model de LPA, estudiant els efectes sobre l'hemodinàmica sistèmica i pulmonar i sobre

l'intercanvi de gasos. Els nostres resultats van demostrar que l'administració **profilàctica de iNO a dosis de 10 ppm** iniciada 20 minuts abans de l'administració d'endotoxina va mantenir estables els valors de l'hemodinàmica sistèmica; evitant la davallada del DC i atenuant l'increment de les RVS produïts per l'administració de LPS. Aquest efecte és concordant amb la majoria d'estudis reportats a la literatura, però el grau d'estabilitat hemodinàmica sistèmica, observat en aquest estudi és superior al de la majoria dels precedents. Atribuïm aquest major efecte al fet d'administrar el iNO de manera profilàctica és a dir, abans de l'inici de la perfusió de LPS. Mentre que l'administració d'endotoxina va disminuir el DC i va incrementar les RVS, amb l'administració prèvia de iNO ambdós paràmetres van tenir un comportament similar al del grup control.

S'ha reportat un estudi realitzat per Middelveld et al en porcs, en el que també el iNO (20 ppm) s'administra abans de l'endotoxina. En aquest, el iNO no evita la disminució de la PAm, que passa de 80 a 60 mmHg al llarg de les 4 hores de l'estudi, la caiguda del DC, ni la reducció de les RVS¹⁴³. De manera que l'hemodinàmica sistèmica del grup al que se li administra iNO de manera profilàctica és pràcticament idèntica a la del grup tractat únicament amb endotoxina.

Aquesta divergència de resultats entre el treball de Middelveld i el nostre podrien explicar-se per les diferències en el model emprat. Per una banda la dosi total de LPS administrada és de 300.000 η g en l'estudi de Middelveld, versus 60.500 η g en el present estudi. Per d'altra banda, l'animal d'experimentació és el porc que té una vasoreactivitat diferent a la de la ovella. L'administració de LPS en l'ovella va produir una marcada disminució de les RVS, que no s'observa en la resta de models. El iNO s'ha mostrat efectiu evitant les alteracions hemodinàmiques que acompanyen la LPA quan aquest s'administra un cop iniciat l'insult.

En altres estudis com el de Bjertnaes et al per exemple, el iNO s'administra 2,5 hores després d'haver-se iniciat l'administració d'endotoxina¹⁴⁴. En ell s'observa que el

iNO manté estable el valor de la PAm respecte del grup endotoxina, i evita l'augment de les RVS i el descens del DC.

En un altre estudi realitzat en ovelles per Kirov et al els resultats de l'administració de iNO són parcialment similars als del present estudi. Kirov et al assagen simultàniament 40 ppm de iNO i una perfusió de LPS. En aquest cas s'observa que la inhalació de iNO atenua el pic inicial de les RVS i els animals que reben iNO també es recuperen més aviat de la disminució del DC que els animals del grup control ¹⁴⁵. Malgrat això, el iNO no evita la disminució de les RVS, del dèbit cardíac, ni de la PAm, que apareix a les 8 hores de l'estudi. En el mateix estudi, hi ha un tercer grup d'animals als que s'administra a més de iNO, blau de metilè, un inhibidor de la síntesi endògena de NO, i en aquests sí que s'observa una estabilitat de la PAm. Això suggereix que la producció endògena de NO està relacionada amb la vasodilatació que acompanya l'estat de sepsis hiperdinàmica, (fase que assoleixen els animals al final de l'estudi i que no s'observa en el present donada la durada inferior del mateix), de manera que resulta més efectiva la inhibició de la síntesi endògena de NO que l'administració via inhalatòria del mateix.

Un altra explicació al fet que observéssim una major efectivitat en mantenir l'estabilitat hemodinàmica amb l'administració de iNO profilàctic, és que en aquest cas l'administració d'endotoxina no va produir canvis tant marcats en l'hemodinàmica sistèmica comparat amb els estudis reportats, ja sigui per les dosis emprades, el model animal o la durada de l'estudi. En qualsevol cas, el més significatiu de l'acció del iNO en tots els models descrits i també en el present, és l'atenuació de l'increment de les RVS i de la davallada del DC. L'atenuació de l'increment de les RVS que apareix en l'hora posterior a l'administració d'endotoxina es relaciona probablement amb un millor equilibri en la síntesi de substàncies endògenes vasoconstrictores/vasodilatadores. És poc probable que sigui per efecte vasodilatador sobre la circulació sistèmica atès que com és conegut, el iNO és un vasodilatador pulmonar selectiu i la seva administració està exempta d'efectes sistèmics o al menys així s'accepta en dosis inferiors a 100 ppm

¹⁴⁶. De ser així, s'observaria una disminució progressiva de les mateixes al llarg de l'estudi, acompanyada d'una hipotensió arterial sistèmica mantinguda.

Tot i que està descrita en humans la hipotensió arterial dosi dependent per administració de iNO a 80 ppm ¹⁴⁷, els múltiples estudis clínics realitzats amb la finalitat de millorar la HTP i la hipoxèmia, posen de manifest la manca d'efecte sistèmic del mateix ¹⁴⁸.

L'efecte del iNO sobre l'estabilitat del DC en el present estudi és superior al de la resta d'estudis comentats. Mentre que en aquests atenua la disminució del mateix, en el present evita la davallada de manera significativa. Pel que fa a l'estudi de Bjertnaes et al però, l'acció del iNO sobre el DC no es tant valorable, donat que la seva administració s'inicia a les 2,5 hores de l'inici de la perfusió de LPS, i la davallada del DC succeeix dins l'hora posterior a l'administració d'endotoxina¹⁴⁴.

De tota manera no hi ha evidència de que el iNO millori el DC *per se*, i el seu efecte sobre la funció ventricular es creu secundari al que exerceix sobre la vasculatura pulmonar. En aquest sentit s'ha comprovat la utilitat del iNO per reduir les RVP i millorar el treball del ventricle dret en el trasplantament de pulmó en humans¹⁴⁹.

En un estudi realitzat per Roissant et al amb 10 pacients amb SDRA en el que es va assajar 18 i 36 ppm de iNO, tampoc es va observar variació en el DC, però si que va objectivar un augment de la fracció d'ejecció del ventricle dret¹⁴⁸ a expenses de la reducció de les RVP. De manera similar succeeix en el present estudi en el que paral·lelament al manteniment de la funció ventricular, s'observa una reducció significativa de la HTP amb l'administració de iNO.

En canvi en l'estudi de Kirov et al també s'observa una reducció de les RVP amb l'administració de iNO, però no va acompanyada d'una preservació de la funció ventricular, suggerint que aquest no és l'únic factor determinant del manteniment del DC. Aquest efecte es potència si s'inhibeix simultàniament la síntesi endògena de NO amb blau de metilè. En relació a aquest fenomen s'ha reportat un estudi realitzat en

cèl·lules musculars cardíques, que demostra que el NO endogen pot estar implicats amb la depressió miocàrdica en el xoc sèptic¹⁵⁰. Aquesta podria ser l'explicació pel qual l'administració conjunta de blau de metilè és més efectiva. També els resultats de Middelveld et al reforcen aquest supòsit, al objectivar-se una reducció de les RVP que no va acompanyada d'una preservació de la funció cardíaca.

Tenint en compte totes aquestes dades i assumint que gran part de l'efectivitat del iNO per mantenir el DC en el nostre estudi, es reflex de la reducció de la postcàrrega del ventricle dret (disminució de les RVP), es possible que l'administració profilàctica del mateix, hagi pogut disminuir la síntesi del NO endogen i el consegüent efecte negatiu d'aquest sobre la contractilitat miocàrdica. De tota manera i en la pràctica clínica, l'administració de iNO no està indicada en els casos de insuficiència cardíaca descompensada ⁸⁹ donat que provoca augment del flux pulmonar i per tant, augment de la precàrrega del ventricle esquerra insuficient.

Pel que fa a l'hemodinàmica pulmonar, en aquest estudi el iNO administrat de manera profilàctica va evitar l'increment de la PAPm i de les RVP causat per l'endotoxina. La PAPm i les RVP eren similars a les del grup control i idèntiques als valors basals.

Com s'exposa anteriorment, en aquest model de lesió pulmonar, s'observa un increment de la PAPm bifàsic, mostrant un pic als 20-40 min després de l'administració de LPS, per mantenir-se posteriorment per sobre del nivell basal però amb tendència a seguir augmentant fins al final de l'estudi. L'administració de iNO va atenuar el pic inicial, de manera que als 30 minuts la PAPm va augmentar de 14 ± 3 a 20 ± 5 mmHg, mentre que en el grup endotoxina va arribar fins 25 ± 4 mmHg. També va evitar l'increment progressiu i sostingut observat posteriorment, de manera que al final de l'estudi la PAPm dels animals que van rebre iNO va ser de 16 ± 5 mmHg en comparació als 25 ± 3 mmHg del grup LPS.

En la majoria d'estudis en els que l'administració de iNO és posterior a la d'endotoxina, aquest es mostra efectiu reduint la PAPm amb un perfil similar: el pic inicial de la PAPm és atenuat però en cap d'ells neutralitzat, mentre que l'increment posterior de la PAPm que produeix l'administració d'endotoxina, s'arriba pràcticament a normalitzar. Fins i tot en l'estudi de Bjertnaes et al, en el que s'inicia l'administració de iNO a les 2,5 hores de l'inici de LPS, aquest és efectiu reduint les RVP fins al nivell basal¹⁴⁴.

Les dosis de iNO administrades són molt variables en els diferents estudis. En el present estudi es van administrar 10 ppm, mentre que altres estudis han assajat dosis superiors, fins 40 ppm. Per exemple, Middelveld et al assaja 0,2 i 20 ppm de iNO i observa que la reducció de la PAPm es dona amb 20 ppm però no amb 0,2 ppm de iNO. Això concorda amb un estudi realitzat prèviament que demostra que la dosi eficaç de iNO per disminuir la PAPm és a partir de 2 ppm ¹⁴³.

Si s'utilitzen les dosis adients i tenint en compte que la HTP en el model de LPA per endotoxina és bifàsic, s'evidencia que el iNO és més efectiu reduint la PAPm en la segona fase que en la fase inicial. Doncs el iNO té un efecte sobre la reducció de l'activitat simpàtica ¹⁵¹ i la inhibició de la síntesi de TxA₂ i TxB₂. L'efecte sobre la síntesi de tromboxà s'ha demostrat en diferents animals: ovelles, porcs i gossos, i amb varis models experimentals: sepsis, embolisme aeri ¹⁵¹⁻¹⁵³. Malgrat això, aquesta acció és insuficient per contrarestar el seu efecte vasoconstrictor, mentre que en la segona fase de la HTP s'afegeix l'efecte de vasodilatació pulmonar selectiva i l'efecte antiinflamatori. Això fa que aquest sigui més efectiu evitant l'increment de la PAPm en aquest segon període.

L'efectivitat superior del iNO en aquest estudi en evitar l'increment de les RVP pot atribuir-se al fet d'haver-lo administrat de manera profilàctica, és a dir abans d'iniciar-se la lesió pulmonar, potenciant així els seus efectes antiinflamatoris. Malgrat que d'entre tots els mecanismes que contribueixen a reduir les RVP i la PAPm en

aquest segon període la més determinant és la capacitat vasodilatadora, com es comprova en l'estudi de Bjertnaes i cols.¹⁴⁴.

L'administració de iNO no va modificar el valor de la PCP malgrat l'administració d'endotoxina. El iNO afavoreix la reabsorció de l'edema hidrostàtic perquè a més d'evitar l'increment de la PAPm és més vasodilatador venós que arterial. En aquest estudi, l'administració de iNO resulta efectiva evitant l'increment de la PCP, fenomen que no s'observa en la resta d'estudis experimentals esmentats, tant en els que el iNO s'administra amb intenció profilàctica com terapèutica. Es possible que aquest resultat estigui en relació amb la preservació del DC i amb el fet de que el iNO evités en major grau l'increment de les RVS.

En quan a l'efecte del iNO sobre l'intercanvi de gasos, la inhalació de 10 ppm des de 20 minuts abans de l'inici de l'administració d'endotoxina, va evitar la disminució de la PaO₂ observada en aquest model de lesió pulmonar aguda. La PaO₂ es va mantenir estable al llarg de les 4 hores de l'estudi, éssent de 227±38 mmHg a l'inici, i de 219±54 mmHg al final del mateix, de manera pràcticament igual a com va succeir en el grup control. En l'estudi de Middelveld et al, l'únic en el que el iNO s'administra també de manera profilàctica es va mantenir estable la PaO₂/FiO₂¹⁴³ a dosis de 20 ppm, efecte que no es va observar amb 0,2 ppm.

Tot i que en la majoria de casos en els que s'ha reportat l'administració de iNO aquesta ha estat útil per disminuir la PAPm i augmentar l'oxigenació, hi han excepcions. Hausen et al també van assajar l'administració profilàctica de iNO a dosis de 20 ppm a les rates donants en un model experimental d'isquèmia-reperfusió en trasplantament de pulmó. En aquest model el iNO no va ser útil en disminuir les RVP, la diferència alveoloarterial d'oxigen, ni millorant la qualitat de preservació de l'empelt¹⁵⁴. En canvi les PG administrades de manera endovenosa (sistèmica) sí que van ser efectives.

Un altra excepció és el model animal d'embolisme aeri en gossos, en el que es van assajar 3 i 40 ppm de iNO, sense observar millora de l'oxigenació amb cap de les dues

dosos ^{152,153}. L'explicació a aquesta discordança en els resultats pot ser la diferència fisiopatològica de l'origen de la hipoxèmia entre la LPA i l'embolisme aeri. Mentre que en el primer cas la hipoxèmia es secundària a l'existència d'àrees ben perfoses i insuficientment ventilades (efecte xunt), en el segon és deguda a àrees ben ventilades amb un dèficit de perfusió (existència d'espai mort). En aquest segon cas el iNO és efectiu reduint la PAPm al reduir les RVP, però no evita la hipoxèmia al no restablir la perfusió.

En el model realitzat per Kirov et al l'administració de iNO millora la PaO₂ però no de manera significativa ¹⁴⁵; si ho fa en canvi quan s'administra juntament amb blau de metilè, el qual inhibeix la síntesi de NO endogen i per tant restableix la vasoconstricció pulmonar hipòxica, disminuint l'efecte xunt. El NO endogen exerceix una acció vasodilatadora no selectiva i per tant no resulta beneficiós per l'intercanvi de gasos, al contrarestar el fenomen de la vasoconstricció pulmonar hipòxica. D'aquí que, un dels beneficis de l'administració de blau de metilè és la millora de la PaO₂ per reducció de l'efecte xunt.

En l'estudi de Bjertnaes et al l'administració de 37 ppm de iNO s'inicia a les 2,5 hores de l'inici de la perfusió d'endotoxina, quan la resposta inflamatòria que origina la LPA ja està instaurada ¹⁴⁴. En aquest estudi, el iNO s'administra al llarg d'una hora, durant la qual s'observa una millora de la PaO₂, i a la seva retirada reapareix un increment de les RVP i de la hipoxèmia. Aquesta reversibilitat d'ambdós paràmetres confirma que el component vascular, té també en aquest cas un pes específic més determinant que el component inflamatori, el qual és òbviament molt menys reversible.

En els estudis realitzats en clínica, l'augment en la PaO₂ en els casos d'hipoxèmia per lesió pulmonar aguda, és variable i no millora la supervivència ni disminueix els dies de ventilació mecànica^{155,156 47 157 158}. Però no tots aquests estudis tenen la potència estadística suficient com per detectar diferències en el pronòstic i a més hi ha molta heterogeneïtat en els criteris d'inclusió dels mateixos (diferents graus de severitat de LPA), motiu que dificulta la interpretació de les dades. D'aquesta manera, una anàlisi

post hoc realitzada sobre l'assaig clínic de Dellinger et al al 1998 ¹⁵⁹ mostra una reducció dels dies de ventilació mecànica en el grup de pacients que rebien 5 ppm de iNO, comparat amb el grup control. Els resultat d'una recent meta-anàlisi dels diferents assaigs realitzats indica que seria raonable utilitzar el iNO com a teràpia de rescat en els casos de hipoxèmia refractària¹⁶⁰, però no com a tractament convencional o de rutina.

La principal diferència entre els estudis reportats i el presentat aquí radica en que mentre que en aquests l'administració de iNO millora la hipoxèmia en grau variable, en el present l'administració profilàctica evita l'aparició de la mateixa, mantenint la PaO₂ en els mateixos valors que els animals que no van rebre LPS. Atribuïm aquest efecte a l'acció vasodilatadora del iNO, i a les seves propietats antiinflamatòries i de reducció de l'edema alveolar, les quals creiem potenciades pel fet d'haver-lo administrat abans de l'insult amb endotoxina.

Però no en totes les ocasions en les que el iNO ha estat administrat profilàcticament, com hem vist, ha mostrat un efecte sobre la PaO₂ tant beneficiós com en aquest estudi. En el model de Tanus et al d'embolisme aeri, no va resultar efectiu¹⁵², i en el de Middelveld et al sí que va ser-ho¹⁴³, però en menor grau. És possible que el model experimental i l'animal d'experimentació tinguin relació amb aquests resultats.

Valorant els resultats obtinguts des del punt de vista hemodinàmic, d'intercanvi de gasos, de mecànica pulmonar i dels paràmetres que valoren la LPA, el màxim benefici d'administrar iNO de manera profilàctica l'hem obtingut en evitar la davallada de la PaO₂.

La retirada del iNO produeix un efecte rebot comprovat en estudis precedents i que també es repeteix en aquest estudi. Els paràmetres que varien significativament amb la retirada del iNO són la PAPm, que passa de 16±5 a 23±6 mmHg i la PaO₂ que disminueix de 219±54 a 167±54 mmHg als 20 minuts d'haver aturat l'administració de iNO.

En l'estudi de Kirov et al també es va observar una davallada de la PaO₂ i un increment de la PAPm al retirar el iNO, de manera similar a com passa en l'estudi de Bjertnaes et al¹⁴⁴. Aquest efecte ja reportat amb l'administració de iNO, s'explica pel fet que aquest inhibeix la producció de NO endògena, la qual té un efecte regulador del to vasomotor, i la retirada del tractament suposa un desequilibri amb predomini de l'acció vasoconstrictora. L'efecte rebot a la retirada del NO també s'ha relacionat amb els productes de la ciclooxigenasa. S'ha observat que la inhalació de NO durant la endotoxèmia, augmenta l'expressió de la forma constitutiva d'aquest enzim (COX) i també, dels nivells de prostanoids (TxB2 i PGF2 α) circulants. En porcs sèptics, l'administració de iNO conjuntament amb inhibidors de la ciclooxigenasa, bloqueja tots aquests canvis i evita l'efecte rebot.

Si bé la retirada del iNO té repercussió sobre l'hemodinàmica pulmonar i l'intercanvi de gasos, l'administració de iNO en condicions basals, abans d'iniciar la perfusió d'endotoxina no va produir cap variació en l'hemodinàmica, l'intercanvi de gasos, ni en la mecànica pulmonar, tal i com es recull en el primer temps de l'estudi. En l'estudi de Middelveld et al l'administració de iNO als animals sans tampoc va alterar cap dels paràmetres esmentats ¹⁴³.

Aquests resultats experimentals són corroborats en la clínica, doncs està àmpliament documentada la manca d'efecte del iNO sobre l'arbre vascular pulmonar de voluntaris sans, però prevé de la vasoconstricció pulmonar si aquests són sotmesos a una barreja hipòxica d'oxigen. En el mateix sentit, l'administració de inhibidors de la òxid nítric sintetasa, augmenten la resposta a la vasoconstricció pulmonar hipòxica. Això és deu a que la producció endògena de NO regula el to vasomotor afavorint la vasodilatació ¹⁶¹.

En aquest estudi no vàrem observar variacions de la mecànica pulmonar amb l'administració de iNO, de la mateixa manera que tampoc es van observar en l'estudi de Middelveld et al¹⁴³. En canvi en un estudi prèviament realitzat per aquest autor però en un altre model el iNO augmenta la compliància estàtica i disminueix les resistències de

la via aèria. Això podria ser degut a l'efecte del iNO sobre la musculatura llisa dels bronquis. En l'estudi aquí presentat la pressió plateau pràcticament no va variar respecte de la del grup endotoxina, però la compliància estàtica va disminuir encara que de manera no significativa, durant l'administració de iNO.

Per tal d'avaluar els possibles efectes tòxics del iNO, vàrem determinar els nivells de metahemoglobinèmia al final de l'experiment en tots els animals que van rebre iNO i la combinació iNO+PGneb. Els que van rebre únicament iNO mostraven un nivell de metahemoglobinèmia de $0,4 \pm 0,2\%$. Nivells que no es consideren tòxics. En cap estudi s'ha demostrat toxicitat directa atribuïble al iNO. El seu ús a dosi de 20 ppm, origina quantitats pràcticament imperceptibles de NO₂ i metahemoglobinèmia⁸⁹. De tota manera es recomana la monitorització d'ambdós paràmetres en tractaments perllongats (més de 5 dies), a partir de 10 ppm. S'accepten com segures les dosis de 1,5 a 40 ppm. Amb més de 80 ppm els nivells de metahemoglobinèmia són de 2,5% i els de NO₂ de 1,5 ppm; aquestes xifres segueixen considerant-se segures^{48,162}.

Per tal de verificar que el fàrmac arribava a l'alvèol i produïa el seu efecte vàrem mesurar els nivells de GMPc, missatger a través del qual actua el NO; vàrem observar que aquest metabolit augmenta al llarg de l'estudi i que aquest increment és superior en sang venosa mixta que en sang arterial, com era d'esperar doncs la seva acció succeeix bàsicament a nivell pulmonar. Els nivells de AMPc, no van mostrar variació al llarg de l'estudi.

En resum, l'administració profilàctica de iNO va evitar la HTP, la disminució del DC i la hipoxèmia, observats amb l'administració d'endotoxina, sense mostrar variació en els paràmetres ventilatoris. També vam observar una tendència a l'increment en els nivells de GMPc. Aquests resultats són diametralment oposats als obtinguts amb l'administració profilàctica de PGneb, que tot seguit comentarem.

L'administració **profilàctica de PGneb a dosi de 10 ng/kg/min** en aquest model de LPA, no va produir canvis significatius a nivell de l'hemodinàmica sistèmica,

de manera que tant les RVS i el DC es van mantenir estables durant les 4 hores d'estudi i sense diferències significatives respecte del grup que va rebre endotoxina.

Les PG administrades de manera endovenosa produeixen hipotensió arterial dosi-dependent i augment del DC. En alguns casos l'augment del DC compensa la disminució de les resistències vasculars ¹⁶³ de manera que la PAm queda inalterable; però la hipotensió sistèmica és el factor limitant d'aquesta via d'administració¹⁶⁴, de manera similar a com passa amb el nitroprussiat endovenos¹⁶⁵.

L'objectiu d'administrar PG de manera inhalatòria és que el seu efecte vasodilatador es limiti a les àrees ventilades del territori pulmonar (acció doblement selectiva, de manera similar a com passa amb el iNO), evitant la seva acció vasodilatadora a nivell sistèmic, causant de la hipotensió arterial. De totes maneres, la incidència de hipotensió arterial, encara que baixa, és superior amb les PGneb que amb el iNO ⁵⁷. Això succeeix perquè com ja es conegut, les PGneb no s'inactiven a nivell pulmonar sinó que s'hidrolitzen espontàniament a pH fisiològic i es metabolitzen en el fetge. La seva vida mitja de 3 minuts limita però no impedeix, un fenomen de "*spillover*" o pas del fàrmac a la circulació sistèmica. Bo i així l'administració de PGneb, en la majoria d'estudis clínics i experimentals reportats, està exempta d'efectes sistèmics ⁵⁴.

En estudis experimentals com el de Bund et al, que fa servir un model de ventilació unipulmonar en porcs, s'administren PGneb a dosis de 4, 8, i 16 $\eta\text{g}/\text{kg}/\text{min}$, sense observar variacions en les RVS ni en la PAm ¹⁶³.

En clínica, les PGneb (Iloprost) s'administren com a tractament de la HTP crònica a dosis entre 50 i 200 $\mu\text{g}/\text{dia}$, sense observar-se efecte sistèmic ^{112,166}. L'administració de PGneb a nadons amb HTP secundària a cardiopatia congènita, tampoc no mostra cap efecte sobre la PAm ^{167 54}.

Per altra banda, hi ha estudis en els que l'administració de PGneb mostra efecte sistèmic, com és el cas d'un estudi realitzat per Walmrath et al, en el que en un dels tres pacients amb LPA que va rebre PG en aerosol a dosis de 17 i 50 $\eta\text{g}/\text{kg}/\text{min}$, va

mostrar una reducció de la PAm ⁵⁷. En aquest pacient sí que les PGneb van tenir efecte a nivell pulmonar al reduir les RVP en un 30% i millorar l'índex d'oxigenació. La nebulització de PG en l'estudi de Walmrath et al es va dur a terme mitjançant un sistema *jet* ⁵⁷. Shoeder et al que va assajar l'ús intraoperatori de PGneb a dosis de 30 η g/kg/min en 4 pacients amb HTP i va observar una disminució de les RVS en un 23% ¹⁶⁴.

No s'han reportat casos d'hipotensió arterial severa amb l'administració de PGneb, però hi ha un estudi randomitzat que avalua els efectes pulmonars i sistèmics del iNO i de les PGneb, en el que s'observa un comportament similar sobre l'hemodinàmica pulmonar per ambdós, i una millora de la perfusió esplànica amb l'administració de PGneb ¹⁶⁸, la qual cosa posa de manifest el pas d'aquestes a la circulació sistèmica.

En el present estudi l'administració profilàctica de PGneb no va modificar les RVS malgrat l'administració d'endotoxina. Aquest fenomen suggereix un possible efecte sistèmic de les PGneb.

Un dels punts de controvèrsia són les dosis amb les quals l'administració nebulitzada de PG mostra repercussió sistèmica. S'accepta que a dosis terapèutiques no estan exemptes d'aquest efecte, de la mateixa manera que s'han assajat dosis superiors a les habituals, que no han provocat hipotensió arterial. En un estudi clínic realitzat per Vernon van Heerden et al, es titulen diferents dosis fins 50 η g/kg/min. sense que aparegui repercussió sistèmica, aconsellant-se assajar de manera individual en cada pacient la dosi òptima de PGneb que tingui efecte selectiu sobre la vasculatura pulmonar¹¹⁰. En el present estudi es va assajar (en dos animals no inclosos en l'estudi) l'administració de 20 η g/kg/min de PGneb observant-se amb aquesta dosis hipotensió arterial sistèmica. Però a la dosi emprada (10 η g/kg/min) no vam observar aquest efecte.

Un altre factor a considerar en relació a l'acció sistèmica de les PGneb és el sistema de nebulització. En el cas reportat per Walmrath et al es va fer servir un nebulitzador *jet* (que nebulitzava partícules de diàmetre inferior a 3,5 μ). En el present estudi vàrem fer servir un sistema nebulitzador ultrasònic que administra partícules de diàmetre mig de 4 μ , superior a les administrades per sistema *jet*; cap la possibilitat de que l'arribada de les mateixes a l'alvèol de l'ovella sigui parcial o insuficient de manera que aquestes s'absorbeixin durant el trajecte, a nivell traqueal i/o bronquial. Amb els sistemes de nebulització estàndard acceptats, el 68% de les partícules produïdes tenen menys de 4 μ . Vam emprar aquest sistema perquè en un estudi realitzat previament vàrem administrar PGneb a 5 pacients amb LPA mitjançant aquest mètode i observant una reducció de la PAPm i una millora de la oxigenació sense mostrar efectes sistèmics; acceptant que amb aquest sistema d'administració arriba suficient PGneb per obtenir l'efecte terapèutic.

La dosi que arriba a l'alvèol amb el sistema d'administració nebulitzat és desconeguda; hi ha estudis que diuen que està entre el 10-20% de la dosi administrada, altres entre el 5-10%⁵⁷. En el present estudi, una nebulització deficient explicaria l'absorció de les PGneb a nivell traqueobronquial i el pas de les mateixes a la circulació sistèmica, amb repercussió doble: acció sobre les RVS i manca d'efecte sobre les RVP (per la insuficient arribada del fàrmac a l'alvèol) i per tant sobre l'intercanvi de gasos.

S'ha reportat que en els casos de LPA la capacitat pulmonar d'extracció de PGneb és menor per lesió del propi òrgan, i per tant hi ha més metabolit lliure actiu. Així s'observa almenys en el cas de la PGE1 administrada en pacients amb HTP per substitució de la vàlvula mitral, que a més tenen una LPA¹⁶⁹

Es conegut l'efecte de les PGneb millorant el DC i la funció ventricular tant dreta com esquerra. S'accepta que la millora de la funció del ventricle dret és secundària a la reducció de la postcàrrega, al disminuir les RVP.

L'ús intraoperatori de PGneb en pacients amb HTP produeix un increment de l'índex cardíac del 26%¹⁶⁴. L'iloprost, un anàleg sintètic de les prostaglandines, emprat en el tractament de la HTP crònica, produeix un augment del debit cardíac ¹⁷⁰. Però també s'han reportat estudis experimentals i clínics en els que l'administració de prostaglandines inhalades no tenen cap efecte sobre el DC ^{57,163}.

La millora de la funció del ventricle dret per les PGneb s'explica per la disminució de la postcàrrega secundària a la vasodilatació pulmonar i justificaria l'ús de les mateixes en els casos de HTP aguda i crònica associada a insuficiència ventricular dreta. Però també s'ha demostrat un efecte indirecte a través de l'activació del reflex simpàtic, per augment del volum telediastòlic ^{164 171} i un altre directe a través de l'increment de AMPc, que augmenta la concentració de calci intracel.lular. En el treball aquí presentat, on la PVC i la PCP es mantenen estables al llarg de tot l'estudi, aquest segon mecanisme podria ser el responsable del manteniment del DC malgrat l'administració d'endotoxina.

L'administració profilàctica de PGneb en el present estudi, no va evitar les alteracions de l'hemodinàmica pulmonar provocades per l'administració de LPS. Tant la PAPm com en les RVP van tenir un increment similar al del grup que va rebre únicament endotoxina. És a dir que s'objectiva una diferència estadísticament significativa entre la PAPm i les RVP del grup que va rebre PGneb i el grup que va rebre iNO. Per tant les PGneb no van tenir cap efecte profilàctic sobre les alteracions hemodinàmiques pulmonars causades per endotoxina. Aquests resultats són clarament discordants amb la majoria d'estudis reportats en els que les PGneb són assajades com a tractament de la LPA. No s'ha reportat cap estudi experimental ni clínic en el que les PGneb s'administrin de manera profilàctica.

El principal efecte de l'administració de PGneb és la disminució de les RVP ^{57 163}; tot i que no sempre s'acompanya d'una disminució significativa de la PAPm donat que l'increment del DC sovint compensa la disminució de les RVP ¹⁶⁴. Hi ha varis els estudis experimentals realitzats en diferents models en els que l'administració de PGneb

és efectiva disminuint les RVP i la PAPm ^{108,172 173 107,54 174 109} Però per contra, igual que passava amb el iNO, no s'han mostrat efectives revertint la vasoconstricció pulmonar induïda per anàlegs del tromboxà en gossos, encara que sí en ovelles ¹⁷⁵.

A nivell clínic, i ha des de casos clínics ^{167 176-178}, fins estudis prospectius ^{179,180,181 168 112} demostrant que la inhalació de PG resulta efectiva reduint el grau de HTP. En tots ells s'observa una disminució de la PAPm entre un 9-19% i de les RVP de un 29-38%. Les PGneb (iloprost) s'han mostrat efectives en el tractament de la hipertensió pulmonar crònica secundària a fibrosi pulmonar ^{182,182}, i en el tractament de la HTP idiopàtica ^{183,184}. De tota manera l'únic tractament que ha demostrat augmentar la supervivència d'aquests pacients és l'administració endovenosa d'epoprostenol, un altre anàleg sintètic de les PG, a dosis de 20-40 ng/kg/min. Les PGneb també són efectives en el tractament de la HTP secundària a les cardiopaties congènites dels nadons ^{54 167}.

Les PGneb milloren l'intercanvi de gasos per redistribució del flux pulmonar, vasodilatant les àrees millor ventilades. En el present estudi però, la seva administració profilàctica no va ser efectiva en evitar la hipoxèmia severa causada per l'administració d'endotoxina. El valor de la PaO₂ inicial era de 227±24 mmHg i després de 4 hores va disminuir fins 67±33 mmHg; aquest comportament de la PaO₂ és molt similar al del grup d'animals que va rebre únicament LPS, i diferent de manera significativa (p<0,05) respecte del grup que va rebre iNO.

Les PGneb han estat àmpliament utilitzades amb l'objectiu de millorar la PaO₂, efecte basat en la seva capacitat de vasodilatació pulmonar selectiva. Però si bé hi ha estudis en els que l'administració de PGneb és efectiva millorant la PaO₂, també en altres aquesta no resulta efectiva en el tractament de la hipoxèmia.

La via d'administració més eficaç de les PG per millorar la PaO₂ és la inhalada, doncs a nivell pulmonar resulta doblement selectiva, al vasodilatar sobretot les àrees millor ventilades i mantenir el fenomen de la vasoconstricció pulmonar hipòxica. L'administració endovenosa no té aquesta selectivitat i al vasodilatar la vasculatura

pulmonar de manera homogènia (amb independència del grau de ventilació) afavoreix la hipoxèmia per xunt.

En aquest estudi la manca d'efecte de les PGneb en evitar la disminució de la PaO₂ pot estar en relació a diferents factors: a) l'arribada insuficient de les mateixes a l'alvèol, que impedeix la vasodilatació pulmonar selectiva b) l'absorció a nivell traqueobronquial afavorint la vasodilatació i edema de la mucosa bronquial, i c) en aquest model concret van actuar potenciant la pròpia LPA (edema i infiltrat inflamatori alvèol-intersticial) observat en els animals d'aquests grup.

La LPA en tots els animals que van rebre PGneb va ser notablement superior a l'observada en la resta (incloent els que únicament van rebre endotoxina), com ho demostra l' estudi anatomopatològic dels pulmons. És a dir, que l'administració profilàctica de PGneb en aquest cas va potenciar la lesió pulmonar produïda per LPS.

S'ha vist que la resposta hemodinàmica i gasomètrica a l'administració de PGneb varia en funció de la fisiopatologia de la LPA. Aquesta és diferent si la causa de la LPA és pulmonar o extrapulmonar. Quan la causa es extrapulmonar hi ha colapse pulmonar heterogèniament distribuït, de predomini en les zones paravertebrals i basals, i el dany és més intersticial. L'administració de PGneb com a tractament de la LPA té diferent efectivitat en funció de si la causa de la mateixa és pulmonar o extrapulmonar. En un estudi realitzat per Domenighetti et al amb 15 pacients, es va observar que en aquells en els que la causa de la LPA era pulmonar, hi havia una disminució de la PaO₂ i de l'índex d'oxigenació amb la inhalació de PG, mentre que en aquells en els que la LPA era d'etiologia extrapulmonar, la inhalació de PG augmentava l'oxigenació i disminuïa la PAPm ¹⁸⁵ La mitjana de dosi emprada en aquest treball era de 34±9 ηg/kg/min, i entre els pacients responedors les dosis de PGneb amb les que la resposta era òptima, eren superiors en els afectes de LPA de causa pulmonar.

L'efecte potenciador de la LPA amb l'administració de PGneb explica els efectes sobre la mecànica pulmonar, la qual mostra una tendència a l' increment progressiu de

les pressions pic i plateau, amb una reducció paral·lela de la compliància o distensibilitat pulmonar. L'edema i l'acúmulo de cèl·lules inflamatòries en els espais intersticial i alveolar són responsables de la reducció de la distensibilitat pulmonar. Aquesta alteració de la mecànica pulmonar és la pròpia i característica de la LPA; malgrat això crida l'atenció que no vam trobar diferències estadísticament significatives en la mecànica pulmonar entre el grup control i el grup que va rebre endotoxina. En canvi, sí que hi havia un increment estadísticament significatiu de les pressions pic i plateau en el grup que va rebre PGneb.

El grup que va rebre PGneb va mostrar un increment no significatiu dels valors de AMPc a les 4 hores de l'estudi tant en sang arterial com en sang venosa mixta; la qual cosa reflexa que el fàrmac administrat, va arribar a nivell alveolar. Hi ha que tenir en compte que per motius tècnics només es van determinar els nivells plasmàtics de AMPc de dos dels cinc animals d'aquest grup.

En termes generals, l'administració profilàctica de PGneb no va ser efectiva en el tractament de la LPA en aquest model experimental, al no evitar l'aparició de HTP i hipoxèmia severes que caracteritzen aquesta entitat.

Finalment, l'administració **profilàctica de iNO i de PGneb conjuntament**, va evitar l'increment de la PAPm i de les RVP de manera significativa, però no va evitar la hipoxèmia produïda per l'administració de LPS.

L'administració profilàctica de iNO+PGneb no va fer variar significativament els paràmetres de l'hemodinàmica sistèmica, de manera que la PAm i el DC van mantenir-se estables al llarg de les 4 hores d'estudi sense canvis significatius respecte del grup endotoxina. A diferència del grup que va rebre iNO sol en el qual el dèbit cardíac es va mantenir estable malgrat l'administració de LPS. Per tant l'associació iNO+PGneb fa que el iNO perdi el seu efecte sobre el DC.

Hi ha disparitat de dades respecte l'efectivitat de l'administració conjunta de iNO+PGneb; però són varis els estudis experimentals i clínics en els que aquesta és

més efectiva que l'administració d'ambdós fàrmacs per separat, en molts dels quals s'identifica la potenciació dels respectius mecanismes d'acció com motiu de l'efectivitat superior respecte de l'administració de cadascun d'ells per separat.

En la majoria dels estudis experimentals descrits adreçats a estudiar l'efecte del iNO+PGneb sobre l'hemodinàmica pulmonar, l'administració conjunta de iNO+PGneb no mostra repercussió sobre l'hemodinàmica sistèmica. En un estudi experimental realitzat per Laureen et al en rates amb l'objectiu d'avaluar l'eficàcia de la combinació de iNO±PGneb en el tractament de la HTP crònica induïda per monocrotalina, no es va observar variacions en els paràmetres de l'hemodinàmica sistèmica amb l'administració conjunta d'ambdós fàrmacs ¹⁷². Per d'altra banda, la combinació de iNO i PG endovenoses no va alterar la PAm ni el DC en un model experimental d'hipertensió pulmonar aguda i crònica en rates. ¹⁸⁶.

En qualsevol cas els models de HTP induïda per vasoconstrictors és força diferent des del punt de vista fisiopatològic. En ells es provoca un increment aïllat de les RVP i està adreçat a valorar de manera exclusiva l'efecte del iNO i de les PG (nebulitzades o endovenoses) sobre la vasculatura pulmonar, mentre que en model de LPA per l'administració d'endotoxina a més de induir HTP, provoca un trastorn en l'hemodinàmica sistèmica (increment de les RVS i disminució del dèbit cardíac) que no s'observa amb els models de hipertensió pulmonar induïda farmacològicament avans esmentats.

Pel que fa als estudis clínics, l'administració conjunta de iNO±PGneb assajat en el trasplantament de pulmó, tampoc fa variar la PAm ni el DC ¹⁸⁷ dels pacients que reben aquesta combinació.

Si bé no s'observa repercussió sistèmica quan es combina iNO+PGneb, no passa el mateix quan les PG s'administren via endovenosa. L'administració de 10 ppm de iNO juntament amb 4 η g/kg/min de PG administrades per via sistèmica a un pacient amb LPA, va produir una disminució de les RVS i un increment del DC, mantenint

estable la PAPm ¹⁸⁸. Aquesta repercussió sistèmica es va observar també amb l'administració de PG endovenosa únicament.

També s'ha assajat la combinació de beraprost, un anàleg de la PG oral, amb iNO en el tractament de la HTP del nadó¹¹⁷, observant un augment de l'efecte respecte de l'administració de cada fàrmac per separat. En aquest cas descrit per Ichida et al, l'administració de PG oral no va tenir repercussió sistèmica probablement per la curta vida mitja del beraprost i per un important efecte de primer pas pel fetge, que evita que aquest arribi directament i en la seva totalitat a la circulació general.

Es sabut que les PG administrades de forma endovenosa fan una vasodilatació no selectiva a nivell pulmonar (a diferència del iNO), motiu pel qual sovint produeixen disminució de les RVS i hipotensió arterial malgrat ser administrades a dosis terapèutiques, de manera que la màxima selectivitat d'acció de les PG es dona quan aquestes són administrades de manera inhalada.

L'administració profilàctica de iNO+PGneb si que va ser efectiva evitant les alteracions de l'hemodinàmica pulmonar pròpies de l'administració de LPS. La combinació d'ambdós fàrmacs alhora va evitar l'increment de la PAPm i de les RVP provocat per LPS.

Laureen et al, va trobar que amb l'administració conjunta de 20 ppm de iNO i 5-10-20 i 80µg/ml de PGneb en rates, la reducció de la PAPm era superior a l'administració de iNO i PGneb per separat. També va obtenir un resultat positiu l'estudi fet per Aranda en el que l'associació de iNO a vasodilatadors amb diferent mecanisme d'acció del GMPc com les PG endovenosa i l'adenosina (que actuen a través del AMPc), potenciava els seus efectes sobre la pressió pulmonar, mentre que si se l'administrava conjuntament amb nitroprussiat endovenós (que igual que el iNO actua via GMPc) no s'observava un efecte vasodilatador addicional. Aquestes dades suggereixen un efecte sinèrgic entre els mecanismes d'acció AMP i GMP cíclic ¹⁸⁶.

Dins els estudis clínics reportats en la literatura, hi ha l'estudi de Della Roca et al en trasplantament de pulmó en el que l'administració conjunta de iNO±PGneb també va resultar més efectiva reduint la PAPm que l'administració de iNO sol ¹⁸⁹. Kuhlen et al publica que la combinació de 10 ppm de iNO i 4 µg/kg/min de PG endovenosa en un pacient amb LPA va aconseguir reduir les RVP i la PAPm en grau superior a l'observat amb l'administració de iNO i PG endovenosa per separat ¹⁸⁸. L'administració endovenosa de PG però, no va estar exempta de repercussió sistèmica.

També s'han reportat casos clínics en els que l'associació d'ambdós fàrmacs no ha resultat ser més efectiva que l'administració de cadascun d'ells per separat. L'associació de iNO±PGneb endovenosa assajada a 8 pacients amb HTP primària i secundària per exemple, no va resultar més efectiva reduint la PAPm que l'administració sola de PGneb ¹⁹⁰.

La combinació iNO+PGneb en el present estudi tampoc va resultar efectiva evitant l'empitjorament de l'intercanvi de gasos que provoca l'administració d'endotoxina; doncs la PaO₂ va disminuir de manera similar a la del grup endotoxina, sense mostrar variació amb la retirada de tractament.

Els casos clínics reportats en els que s'associen ambdós fàrmacs tenen resultats dispers. En el treball de Della Roca et al¹⁸⁷ en canvi, l'administració conjunta de iNO+PGneb sí que va resultar efectiva millorant la PaO₂/FiO₂ en el trasplantament de pulmó en humans i en grau superior a l'administració de iNO sol. Per contra, en el cas reportat per Kuhlen et al ¹⁸⁸, en el que es combina iNO i PG endovenoses en un pacient amb LPA, l'administració conjunta d'ambdós fàrmacs no va millorar la PaO₂ en un grau superior al del iNO administrat sol. En aquest cas la vasodilatació pulmonar no selectiva produïda per l'administració endovenosa de les PG va produir un efecte xunt que empitjorava l'oxigenació disminuint la PaO₂.

Pel que fa a la mecànica pulmonar en el present estudi destaca la tendència a l'augment de les pressions pic i plateau i la reducció de la compliància estàtica o

distensibilitat en els animals que van rebre aquesta combinació. Aquests resultats són similars als obtinguts en el grup PGneb i endotoxina, i diferents als del grup iNO.

No hi ha molts estudis que combinin l'administració de iNO+PGneb, essent el més habitual la combinació de iNO+PG endovenosa, tant a nivell experimental com clínic. En qualsevol cas, en la majoria de casos en els que s'ha reportat aquesta associació els resultats obtinguts han estat superiors als observats amb l'administració de cadascun dels dos fàrmacs per separat.

Com a principi farmacològic general, l'administració conjunta de dos fàrmacs que actuen produint el mateix efecte per mecanismes diferents (AMP i GMP cíclic en aquest cas) té efectes additius; el benefici de l'administració conjunta de iNO i PGneb radica en una disminució de la dosi a administrar de cada fàrmac i per tant, en una reducció dels principals efectes secundaris, que en aquest cas són la metahemoglobinèmia i la hipotensió arterial sistèmica.

La síntesi endògena de NO i de PG pot estar modulada per l'administració exògena de PG i NO, respectivament. Hi han estudis *in vitro* que demostren que hi ha una interacció entre la via del AMPc i la del GMPc, descrivint-se mecanismes de retroalimentació positiva i negativa entre ambdós. Entre els primers està un estudi que demostra que el NO estimula l'enzim COX, responsable de la síntesi de PG, en macròfags i cèl·lules musculars, augmentant la seva síntesi¹⁹¹. En el mateix sentit, un treball realitzat amb cèl·lules musculars d'artèria pulmonar humana tractades amb LPS s'observa que l'administració de NO estimula la producció de PGI₂ i que aquest increment en la síntesi és a conseqüència tant del NO administrat com del NO endogen induït per LPS¹⁹². Un altre exemple el trobem en la circulació cerebral on el AMPc pot incrementar els nivells de GMPc de manera directa augmentant la síntesi, o indirecta inhibint la hidròlisi^{193, 194}. S'observa una potenciació dels efectes vasodilatadors de les PGI₂ en presència de NO en artèries coronàries de porc. De Wit et al, en un model experimental en arterioles de hámster observa que l'administració conjunta de vasodilatadors que augmenten el AMPc i el GMPc (que en el seu estudi procedeixen de

les PGI₂ i del NO respectivament) actuen sinèrgicament *in vitro* ¹⁹⁵. *In vivo*, en el ja esmentat model d'Aranda et al es reporta que l'administració de iNO mostra un efecte de vasodilatació pulmonar addicional quan es combina amb fàrmacs el mecanisme d'acció dels quals es independent del GMPc¹⁸⁶. També en clínica, Rich et al troba efecte additiu amb l'administració de iNO, després d'una derivació cardiopulmonar, en pacients que reben nitrats ⁶².

Per contrapartida, s'han descrit estudis que indiquen una retroalimentació negativa entre els dos mecanismes d'acció. Amb cèl·lules d'endoteli pulmonar s'ha demostrat que baixes concentracions de NO condueixen a un augment de PGI₂, mentre que altes produccions de NO endogen disminueixen la síntesi de PG. També en estudis realitzats amb cultius de cèl·lules d'endoteli coronari s'ha observat que el NO inhibeix la síntesi de PG, inhibint l'enzim COX, i que aquest efecte és via GMPc; la inhibició de la síntesi de PG per part del NO també s'ha observat amb endoteli d'aorta. De manera similar, l'efecte inhibitori sobre la síntesi de PG per l'exposició aguda, endògena o exògena, de NO pot atenuar la vasorelaxació induïda per les PGI₂ ¹⁹⁶.

Finalment, també hi ha estudis que no mostren cap interacció amb l'administració conjunta de NO i PG. Zegne et al en un model fetal d'ovella, observa que l'administració de inhibidors de la COX i de la NOS administrats conjuntament, no tenen efecte additiu.¹⁹⁷. Zou i Ullrich demostren que la síntesi de PG no es veu afectada pel NO ¹⁹⁸.

En l'estudi que presentem nosaltres no vam observar un efecte profilàctic additiu amb l'administració conjunta d'ambdós vasodilatadors, i a més va resultar menys efectiva que l'administració profilàctica de iNO sol. Per tal de documentar el mecanisme d'acció, vàrem determinar els nivells en artèria i en sang venosa mixta de AMP i GMP cíclics. Com era d'esperar el grup d'animals que va rebre iNO tenia uns nivells de GMPc superiors a la resta de grups, mentre que el grup que va rebre PGneb mostrava una tendència a l'increment en els nivells de AMPc. Però en el grup que va rebre la combinació d'ambdós fàrmacs els nivells de GMP i de AMP cíclics estaven per

sota dels determinats amb l'administració per separat de iNO i les PGneb respectivament. Podem especular que la interacció negativa entre els dos mecanismes d'acció que va resultar en una disminució dels nivells dels segons missatgers, podria justificar l'absència d'efecte additiu amb l'administració conjunta de iNO i PGneb. En el mateix context, el nivell de GMPc superior en el grup que va rebre únicament iNO comparat amb el que va rebre iNO+PGneb explicaria el fet que l'administració de iNO sigui més eficaç quan aquest s'administra sol. No obstant aquestes possibles interaccions no han estat clarament objectivades en el present estudi ja que no va haver-hi diferències estadísticament significatives en els nivells plasmàtics de AMP i GMPc entre els diferents grups, ja sigui pel tamany de la mostra o per la gran variabilitat observada. Caldria estudis posteriors per esbrinar-ho.

Com s'ha comentat previament hi ha molts treballs que comparen els efectes hemodinàmics i gasomètrics d'ambdós fàrmacs administrats de manera separada amb diferent resultat en funció sobretot, del model d'*estudi experimental* emprat.

En un model que estudia la *hipertensió pulmonar* per tancament del ductus en fetus d'ovella, el iNO ha demostrat tenir més capacitat vasodilatadora que la PGI2 ¹⁹⁷. Per contra, en un estudi de HTP crònica realitzat amb rates, es demostra que les PGneb a dosis de 80 µg/ml, és més efectiva per reduir la PAPm que el NO.

En el model experimental de Max et al, ni l'administració de iNO a dosis de 20 ppm, ni la de PGneb a dosis de 10 η/Kg/min, no produeixen disminució significativa de les RVS ni de la PAPm en porcs amb VPH, i aquest efecte és dosi independent. ¹¹⁵. També en un model de vasoconstricció pulmonar hipòxica en ovelles en el que es compara l'efecte sobre la PAPm de les PGneb (10 i 20 µg/min) amb el NO (20-50-100 ppm), s'observa que ambdós fàrmacs són selectius a nivell pulmonar. De totes maneres amb les PGneb es va observar menys vasodilatació que amb iNO a altes dosis, i el seu màxim efecte fou comparable a l'obtingut amb 20 ppm de NO. Per d'altra banda el grup d'animals que rebia 20 µg/min de PGneb mostrava una tendència a la disminució

de les RVS, cosa que indica pas a la circulació sistèmica del fàrmac i pèrdua de la selectivitat pulmonar ¹⁰⁷.

En un model de trasplantament de pulmó en gossos, el NO (10 i 40 ppm) redueix més les RVP que les PG (25 i 50 µg/ml/min), durant la primera hora de l'estudi, però cap dels dos fàrmacs aconseguix normalitzar la pressió pulmonar ni augmentar la supervivència de l'empelt ¹⁹⁹.

El iNO (50 ppm) també ha resultat ser més efectiu disminuint la PAPm i les RVP, que les PGneb (10 µg/ml) les quals no exerceixen un efecte vasodilatador significatiu, en un model experimental de HTP per microembolisme en gossos ²⁰⁰.

En un model experimental de trasplantament de pulmó en rates, les PG endovenoses a dosi de 35 micrograms redueixen les RVP, milloren l'intercanvi de gasos i la mecànica pulmonar en grau superior a 20 ppm de iNO, a més de disminuir la lesió pulmonar secundària a la reperfusió i millorar la supervivència de l'empelt ¹⁵⁴.

Finalment, en un model de HTP hipòxica en gossos en el que s'assagen diferents dosis de NO i PG per separat, s'observa que ambdós fàrmacs són eficaços reduint les RVP, de manera dosi independent, sense produir efectes sistèmics; 10 µg/Kg/min de PG són equipotents a 20 ppm de NO.

Pel que fa al tractament de la *hipoxèmia*, en un estudi en el que s'avaluen les PG endovenoses comparades amb PGneb i amb iNO, en un model de HTP per rentat pulmonar en porcs, s'observa una millora de l'oxigenació amb el iNO en grau superior al de les PGneb, mentre que les PG endovenoses no resulten efectives al fer vasodilatació sistèmica i hipoxèmia per xunt ¹⁰⁹.

De manera similar, en el model de HTP en gossos per microembolisme, les PGneb no milloren l'intercanvi de gasos, mentre que el NO si augmenta la PaO₂ /FiO₂ ²⁰⁰.

En canvi, ni les PGneb ni el NO milloren la PaO₂ en el model de hipertensió pulmonar hipòxica en porcs.¹¹⁵, de manera que tots dos fàrmacs són igualment inefectius i tampoc tenen cap efecte sobre la oxigenació en un model de trasplantament pulmonar en porcs¹⁹⁹.

Pel que fa al *DC*, tant el iNO com les PGneb han mostrat ser efectius millorant el treball ventricular però en general s'accepta que les PG són més efectives en aquest aspecte al reduir més la postcàrrega.

En un model de vasoconstricció pulmonar hipòxica en gossos, Zwissler et al comparen l'efecte de les PGneb vs iNO sobre la funció ventricular dreta. Observen que tant les PGneb (1ηg/Kg/min), com el NO (50 ppm), redueixen la postcàrrega del ventricle dret, i per tant la demanda d'oxigen, millorant l'eficàcia de la contracció. La fracció d'ejecció però, només es veu augmentada per l'administració de iNO i no per la de PGneb²⁰⁰.

En un model experimental de hipertensió pulmonar hipòxica en porcs, realitzat per Max et al, en el que es compara l'administració de PGneb vs iNO (a dosis similars a les nostres) el iNO millora més el DC que les PG¹¹⁵.

En quan als *estudis clínics* s'observa una efectivitat similar del iNO i de les PGneb en el tractament de la *hipertensió pulmonar* i la *hipoxèmia*, sense objectivar-se hipotensió arterial sistèmica, fenomen que es descriu més sovint amb l'administració de prostaglandines endovenosa^{55 166 201}.

El iNO i les PGneb administrats, també per separat, a 8 pacients amb SDRA sí que van augmentar la PaO₂²⁰¹. Aquests autors van observar que la dosi òptima de PGneb per augmentar la PaO₂ és de 10 ηg/Kg/min; aquesta dosi coincideix amb l'administrada en altres estudis realitzats en pacients amb LPA, mentre que 1ηg/Kg/min no va resultar efectiva. En general s'accepta que es requereix una mínima dosi de 2 ηg/Kg/min de PGneb per produir algun efecte sobre l'oxigenació, quan s'administra a pacients amb insuficiència respiratòria aguda. En aquest estudi però, el iNO resulta més

efectiu augmentant la PaO₂ que les PG (PaO₂ 160 vs 120 mmHg), i això s'atribueix a que possiblement, donat que les PGneb tenen una vida mitja més llarga que el iNO, tenen una absorció bronquial i vasodilaten àrees pulmonars que no estan ben ventilades augmentant així el xunt.

En quant a les dosis de iNO requerides per pacients que tenen LPA complicat amb sepsis, s'ha vist que aquestes són superiors a les requerides en els pacients no sèptics. Dosis de 10 ppm de NO són necessaris per augmentar la PaO₂ en pacients sèptics, mentre que 1 ppm no tenen cap efecte. En l'estudi de Zwissler et al ²⁰¹, els pacients sèptics requerien al menys 4 ppm de NO per obtenir alguna millora en la PaO₂, i l'administració de iNO era del tot ineficaç per millorar la PAPm i les RVP en els mateixos, a diferència dels que tenien LPA no complicat amb sepsis.

En un estudi realitzat per Roissant et al, en que es compara l'efecte del iNO i de les PG endovenoses sobre el treball ventricular dret, s'observa que ambdós fàrmacs milloren la funció del ventricle dret però, només les PG endovenoses milloren el DC.¹⁴⁸: Per altra banda, en un estudi clínic amb 8 pacients amb LPA d'etiologia diversa l'administració per separat de iNO i de PGneb, no té cap efecte sobre el DC.²⁰¹.

En resum segons els nostres resultats, l'administració profilàctica de iNO±PGneb va ser efectiva evitant l'increment de la PAPm i de les RVP de manera significativa, i no ho va ser evitant la hipoxèmia produïda per LPA.

El **tercer objectiu** d'aquest estudi anava adreçat a investigar si l'administració profilàctica de iNO, de PGneb i d'ambdós alhora evita l'increment de permeabilitat, la migració i l'activació dels neutròfils polimorfonuclears a nivell vascular pulmonar.

Tal i com hem demostrat en el primer objectiu d'aquest estudi, l'administració endovenosa d'endotoxina produeix una LPA caracteritzada per una disrupció de la barrera endotelial. Per evaluar el grau de la mateixa s'han fet servir diferents paràmetres en els diferents estudis publicats. La majoria d'estudis tenen com a objectiu mesurar el

grau de permeabilitat vascular i l'acúmulo de cèl·lules inflamatòries així com els productes derivats de la seva activació.

En el estudi presentat vàrem fer servir el recompte de cèl·lules procedents del BAL al finalitzar l'estudi; mesurant el percentatge de macròfags, linfòcits i neutròfils. També vam mesurar la quantitat de proteïnes del BAL així com el nivell de mieloperoxidasa (enzim procedent de la degranulació dels neutròfils) tant en el BAL com en el teixit pulmonar. També es va fer recompte de leucòcits en sang perifèrica. Finalment, vàrem avaluar els canvis anatomopatològics en una mostra de teixit pulmonar.

El **iNO** va evitar la migració de neutròfils a l'espai alveolar i la leucopènia perifèrica observada amb l'administració d'endotoxina; doncs el percentatge de neutròfils aïllats en el BAL i la leucopènia perifèrica en el grup que va rebre iNO van ser estadísticament inferiors als del grup que va rebre LPS.

La mieloperoxidasa del BAL així com la quantificació de proteïnes del BAL, van mostrar una tendència a la disminució en el grup que rebia iNO, que malgrat no ser significativa ens sembla una dada a tenir en compte.

L'anatomia patològica de les mostres obtingudes per toracotomia al final del present estudi va mostrar, amb tinció d'hematoxilina-eosina, menys fenòmens inflamatoris amb absència de neutròfils als espais alveolars i una menor infiltració intersticial de neutròfils.

Arrel d'aquestes dades interpretem que l'administració profilàctica de iNO va evitar en gran mesura la disrupció de la barrera endotelial i per tant la LPA per endotoxina. Podem relacionar l'efectivitat del iNO en evitar la HTP i la hipoxèmia, amb aquesta acció antiinflamatòria i de profilaxi sobre la LPA pròpiament dita.

En relació al possible efecte antiinflamatori del iNO s'han reportat estudis amb resultats diferents. En l'estudi experimental de Middelveld et al en que també

s'administra iNO de manera profilàctica, aquest no és útil per disminuir el nombre de proteïnes del BAL. Tampoc disminueix els nivells de citokines (IL-8 i TNF α) en el BAL ni en el plasma. Des del punt de vista clínic però, l'administració profilàctica de iNO sí que va evitar l'increment de la PAPm i la hipoxèmia¹⁴³, de manera similar al nostre estudi.

En l'estudi de Kirov et al en canvi, l'administració terapèutica de iNO va ser útil per reduir l'edema i la permeabilitat capil·lar a les proteïnes¹⁴⁵, i la traducció clínica en aquest cas va ser l'atenuació de la HTP i la millora de l'intercanvi de gasos.

Resultats similars s'observen en el model de Bjertnaes et al²⁰² en el que l'administració de iNO a les 2,5 hores de l'insult amb LPS també va reduir la pressió hidrostàtica, la permeabilitat microvascular a proteïnes i va evitar parcialment la leucopènia perifèrica. Això es va traduir en una reducció de la HTP i una millora de la PaO₂.

Altres estudis realitzats en ovelles i en porcs, demostren que l'administració de iNO és eficaç disminuint l'edema i el segrest pulmonar de leucòcits durant la sepsis per endotoxina^{203 204}. En un altre model experimental, l'administració de 40 ppm de iNO en rates amb sepsis per perforació intestinal, va resultar útil disminuint la infiltració per leucòcits i la mieloperoxidasa del teixit pulmonar, però no la permeabilitat vascular a proteïnes.

Els resultats obtinguts en els estudis experimentals no sempre es confirmen en la clínica. En un estudi randomitzat amb 84 pacients sotmesos a trasplantament de pulmó, l'administració de iNO de manera profilàctica no va millorar els indicadors de lesió pulmonar ni va millorar el pronòstic dels pacients²⁰⁵.

L'efecte del iNO millorant la hipoxèmia i la hipertensió pulmonar en la LPA està àmpliament documentat però la seva acció antiinflamatòria està menys estudiada. S'ha vist que el iNO té capacitat per inhibir l'adhesivitat leucocitària, la proliferació de la musculatura llisa i l'oxidació dels àcids grassos lliures, accions totes elles independents

del GMPc. També s'han atribuït al iNO propietats antiagregants plaquetars que depenen del GMPc ²⁰⁶. L'acció antileucocitària, s'observa de manera més constant acceptant-se diferents mecanismes d'inhibició sobre els neutròfils, reducció de l'expressió de molècules d'adhesió, alteració de la deformabilitat i disminució de la seva activitat.

En canvi la reducció de la permeabilitat microvascular a proteïnes, fet que s'observa amb menys freqüència, constitueix un fenomen de primera transcendència en la fisiopatologia de la LPA donat que és multifactorial implicant diferents mecanismes immunològics modulats via AMP i GMP cíclics. Probablement un dels motius pels quals en el present treball l'administració de iNO és eficaç evitant la LPA, podria ser que aquest mostra alhora una acció antileucocitària, al disminuir la migració i la degranulació dels neutròfils i de protecció de la membrana alvèol-capil·lar. Per contraposició a aquesta idea, en un estudi realitzat per Razavi et al s'ha observat que el iNO en pulmons sans pot lesionar la barrera alvèol-capil·lar augmentant la permeabilitat vascular a proteïnes de manera similar a com ho fa la lesió per endotoxina; els autors suggereixen que aquest fenomen podria justificar la ineficàcia del iNO en la millora del pronòstic de la LPA en humans ²⁰⁷. De tota manera aquest fet podria ser degut més a la inhalació de NO₂ (producte de la reacció del NO amb l'oxigen) o a altres espècies reactives resultants com el peroxinitrit o altres, que no pas a la pròpia inhalació de NO. Aquestes diferències en els resultats poden atribuir-se al tipus de model experimental, circumstància clínica en la que s'assaja el iNO i per altra banda, al moment en el que s'administra en el decurs de la LPA.

Pel que fa als models d'estudi, no es pot comparar la isquèmia-reperfusió, en la que durant un període de temps s'acumulen metabolits tòxics que posteriorment s'alliberen, amb la LPA per endotoxina, en la que els fenòmens inflamatoris apareixen des de l'inici i es desenvolupen de manera exponencial, o a la lesió que provoca l'àcid oleic similar a una causticació, que destrueix les estructures funcionals pulmonars. L'administració profilàctica de iNO en el model d'isquèmia-reperfusió tindria sentit

per evitar la formació dels metabolits tòxics, no pas per evitar la redistribució dels mateixos; per tant aquesta hauria d'iniciar-se simultàniament al període d'isquèmia calenta. El concepte de que la vasodilatació en la fase precoç de la LPA en aquest model permet el pas de radicals tòxics generats per la isquèmia a àrees pulmonars protegides per la vasoconstricció, seria vàlida per explicar la ineficàcia de l'administració profilàctica de iNO en les rates donants abans de la reperfusió en el trasplantament de pulmó. En aquest model el iNO no únicament no prevé de la lesió pulmonar sinó que origina un augment de l'edema intersticial i del pes de l'òrgan i empitjora l'intercanvi de gasos.¹⁵⁴ De manera similar, en el treball de Eppinger et al l'administració de iNO en animals a l'inici de la reperfusió del trasplantament pulmonar incrementa la lesió pulmonar als 30 minuts, al combinar-se amb els radicals d'oxigen acumulats, efecte que pot evitar-se si es retarda l'administració 10 minuts. En canvi, administrat a les 4 hores reverteix la isquèmia post reperfusió i té efecte antiinflamatori reduint l'acúmulo i la toxicitat dels neutròfils ²⁰⁸.

Un altre model emprat és el de l'àcid oleic. En aquest cas l'administració de iNO hauria d'adreçar-se a tractar les conseqüències de la destrucció de la microvasculatura pulmonar i difícilment seria beneficiosa una administració precoç del mateix. Aquest és el cas de l'estudi experimental de Constanze et al ²⁰⁹ en el que es provoca una LPA per àcid oleic i s'assaja el pretractament amb iNO en un model pulmonar *ex vivo* de conill, observant que l'administració de iNO 20 minuts abans de l'insult pulmonar agreuja la LPA empitjorant la hipoxèmia i l'intercanvi de gasos. L'explicació que donen els autors és similar, argumentant que la vasodilatació produïda en la fase més precoç de la LPA fa arribar substàncies perjudicials a àrees pulmonars fins aleshores protegides per la vasoconstricció. El benefici real de l'administració de iNO en el decurs de la LPA radica en la capacitat de revertir la HTP i la hipoxèmia per xunt que la caracteritza.

Centrant-nos en el model de LPA per endotoxina que és l'utilitzat per nosaltres, i tenint en compte el moment en el que s'inicia l'administració de iNO, crida l'atenció el fet que aquesta sigui útil reduint la LPA en l'estudi de Bjertnaes et al ²⁰², en el que

s'administra a les 2,5 hores d'haver-se iniciat la perfusió d'endotoxina, i no ho sigui en l'estudi de Middelveld et al¹⁴³ en el que s'administra com en el nostre cas, de manera profilàctica. Pensem que l'administració de iNO abans de l'insult per endotoxina té més probabilitats d'atenuar la lesió pulmonar que l'administració en fases més tardanes quan el procés inflamatori està més instaurat, tal i com hem observat en el present estudi. Els resultats obtinguts per Middelveld et al no ho corroboren. És possible que la diferència de model d'animal, porcs en el cas de Middelveld, sigui en part responsable d'aquesta disparitat.

L'administració de nitroprussiat donador de NO, en un model experimental de LPA per administració de *Escherichia Coli* en ovelles, no redueix l'edema transvascular ni la permeabilitat a les proteïnes²¹⁰. Per contra, el pretractament amb nitroprussiat sòdic, sí que disminueix l'aigua pulmonar extravascular, millorant l'oxigenació i la HTP, provocada per l'administració d'àcid oleic en un model de pulmó aïllat²¹¹. La reducció de l'aigua pulmonar extravascular en aquest últim model, està en relació a la disminució de la pressió hidrostàtica, principal mecanisme d'edema en aquest cas, mentre que en models similars al nostre l'edema està en relació a l'increment de permeabilitat vascular. Això justifica que el iNO pugui tenir diferents graus d'efectivitat en funció del model emprat.

Deixant de banda l'acció antiinflamatòria del iNO *per se*, un altre punt important a considerar és la correlació entre l'efectivitat del iNO millorant els paràmetres de lesió pulmonar i la traducció clínica de la mateixa.

En la majoria d'estudis comentats, igual que en el present, la reducció de la resposta inflamatòria es correlaciona amb una millora de la HTP i de la hipoxèmia, per bé que en l'estudi de Middelveld et al, no s'observa així. S'ha trobat discordança al respecte en el treball de Ardehali et al, en el que el iNO administrat profilàcticament no evita la lesió per isquèmia-reperfusió en el trasplantament de pulmó però sí que disminueix el grau de hipoxèmia i de HTP en aquells pacients que la desenvolupen²¹². L'explicació a aquest fenomen podria ser que les propietats antiinflamatòries i les

proprietats vasodilatadores del iNO són dutes a terme per vies diferents i probablement la capacitat vasodilatadora del iNO es superior a la seva acció antiinflamatòria.

En resum podem dir que en el nostre model experimental l'administració profilàctica de iNO va resultar eficaç prevenint la LPA per endotoxina. A la vista d'altres estudis però, les propietats antiinflamatòries del iNO, que poden ser dependents o independents del GMPC, es presenten de manera variable i amb diferents resultats en funció del model experimental/clínic en el que aquest es emprat. L'ús potencial del iNO amb finalitat antiinflamatòria passa per assajar la seva administració en diferents moments d'evolució de la LPA, des del pretractament o profilaxi, fins fàrmacs donadors de NO o inhibidors de la seva degradació. També s'inclou la possibilitat de modular la producció endògena de NO com és el cas del pretractament amb L-NAME (inhibidor de la síntesi endògena del NO) que ha demostrat disminuir l'infiltrat de neutròfils i les citokines pulmonars, a més de millorar la supervivència en un model experimental de sepsis per cànida amb rates ²¹³.

En el present estudi, i contràriament a l'observat amb el iNO, l'administració de **PGneb** va afavorir la LPA provocada per l'administració d'endotoxina, al promoure la migració intraalvèolar dels neutròfils. La mieloperoxidasa procedent dels mateixos tant en el BAL com en el teixit pulmonar, així com la permeabilitat vascular a proteïnes també va mostrar una tendència a l'increment respecte els altres grups. L'anatomia patològica del teixit pulmonar va reflectir morfològicament aquestes dades, al mostrar un infiltrat leucocitari i un edema perivascular molt més marcat que en qualsevol altre grup, fins i tot el que va rebre únicament endotoxina. Aquests resultats concorden amb la clínica ja que no van evitar la hipertensió pulmonar ni la hipoxèmia.

En el nostre estudi, els prostanoids inhalats no mostren les propietats antiinflamatòries per les quals, juntament amb la seva acció vasodilatadora, són administrats en la sepsis associada a HTP severa i com a tractament de la hipertensió pulmonar ^{105,214}. S'han reportat estudis que mostren propietats proinflamatòries de les PG quan aquestes són administrades per via sistèmica. Un comportament similar es pot

veure amb la injecció intradèrmica de PGI₂ en rates, la qual un cop arriba a la circulació general incrementa el flux vascular i la permeabilitat a les proteïnes ²¹⁵. A aquest fet s'afegeix que la PGI₂, per ella sola, també potència els efectes proinflamatoris de la histamina, la bradiquinina i la interleuquina-1 ²¹⁶, que també actuarien en el mateix sentit.

En un altre estudi experimental realitzat amb pulmons de rates, es va observar que varies PG entre elles la PGI₂, són alliberades durant els estats inflamatoris, potenciant els efectes del tromboxà sobre la microvasculatura pulmonar i incrementant el coeficient de filtració capil·lar ²¹⁷.

En contraposició a aquests fenòmens, l'administració endovenosa de PG a les rates donants en un model de trasplantament de pulmó, aconsegueix disminuir la lesió pulmonar al reduir l'edema intersticial i el percentatge d'agregats de fosfolípids grans respecte pels petits (paràmetre indicador de lesió pulmonar). Això es va traduir en una millora hemodinàmica, gasomètrica i de la preservació de l'empelt ¹⁵⁴. Val a dir però, que en aquest cas l'administració profilàctica en les rates donants de PG nebulada si que evita la LPA, però aquest és un model de lesió pulmonar per isquèmia reperfusió, on l'edema té un origen inicialment vascular i en el que el component inflamatori no és, almenys d'entrada, el més important a diferència de com succeeix en el model de LPA per endotoxina.

Tenint en compte el mecanisme d'acció de les PG, hem de considerar que tant elles com tots els fàrmacs que augmenten els nivells de AMPc, pentoxifilina entre d'altres inhibeixen la fagocitosi i l'alliberament d'enzims lissosomals dels neutròfils²¹⁸⁻²²⁰. La capacitat d'adhesió dels neutròfils també es veu reduïda amb l'increment del AMPc ²²¹ S'ha vist que la perfusió de pentoxifilina iniciada abans de l'administració d'endotoxina, atenua la lesió pulmonar aguda en porcs disminuint el nombre de neutròfils del BAL.

De manera similar a com va succeir amb l'administració de PGneb, l'administració **conjunta de iNO i de PGneb** tampoc va evitar la lesió pulmonar aguda per endotoxina. A grans trets, el seu grau d'efectivitat podem situar-lo entre el de l'administració de iNO i de PGneb per separat, de manera que per una banda no van tenir l'efecte profilàctic observat amb l'administració de iNO sol, però tampoc es va potenciar la LPA com va succeir amb l'administració de PGneb.

En l'anatomia patològica del teixit pulmonar dels animals que van rebre iNO+PGneb s'hi veia un infiltrat linfocitari similar al del grup PGneb, però amb un grau d'edema perivascular molt inferior a aquest. El percentatge de neutròfils en el BAL del grup iNO+PGneb va ser el més elevat de tots els grups estudiats i de manera similar a com passava amb l'administració de PGneb soles la diferència entre aquest i el del grup iNO va ser significativa. Tenint en compte que els dos grups que van rebre prostaglandines van mostrar un percentatge de neutròfils en el BAL superior a la resta de grups, incloent al que va rebre només endotoxina, sorprèn que els nivells de mieloperoxidasa siguin els més baixos, similars fins i tot als del grup control. Això suggereix que si bé l'administració profilàctica de PGneb va promoure la migració intraalvèolar dels neutròfils, l'administració de iNO+PGneb podria haver inhibit la degranulació dels mateixos. De manera paral·lela, a l'administrar iNO juntament amb PGneb, vam observar una tendència a la disminució del grau de permeabilitat vascular a proteïnes respecte del grup que va rebre PGneb únicament. És a dir que, l'administració de iNO juntament amb PGneb va fer que aquestes últimes disminuïssin la seva acció proinflamatòria.

Com ja és sabut, el iNO actua a través del GMPc el qual s'inactiva per varies fosfodiesterases, essent la PDE V la més específica. El GMPc alhora, inhibeix l'activitat de la PDE III, que inactiva el AMPc, augmentant els nivells de AMPc²⁰⁶. Això significa que el GMPc pot incrementar els nivells de AMPc, de manera que hi ha un mecanisme de retroalimentació positiva entre el GPMc i el AMPc, que pot ser bidireccional.

En el nostre estudi, quan van administrar-se conjuntament iNO i PGneb, els nivells d'ambdós missatgers no van augmentar ni tan sols en la mesura en la que ho van fer quan l'administració de iNO i PGneb es va fer separatament. La disminució dels nivells de GMPc en el grup iNO+PGneb respecte al grup que va rebre iNO podria explicar la manca d'efecte profilàctic del iNO quan aquest es administrat conjuntament amb PG. En el mateix sentit, el fet que els nivells de AMPc fossin inferiors en el grup iNO+PGneb que en el grup en el que es van administrar PG soles, justificaria que l'efecte proinflamatori observat amb l'administració de les mateixes fos inferior a l'observat amb l'administració conjunta amb iNO. De totes maneres, la mesura dels nivells plasmàtics de AMPc i GMPc, no permet arribar a cap conclusió definitiva, doncs com ja s'ha comentat abans, no hi va haver cap diferència estadísticament significativa dels valors de AMPc i GMPc en cap dels grups estudiats, degut sobretot a la gran variabilitat en els resultats obtinguts.

A la vista dels resultats podem afirmar que l'administració de iNO+PGneb no és millor que la de iNO sol per evitar la LPA i que el seu efecte és intermitg entre el del iNO sol i les PGneb soles.

Recapitulant els resultats del nostre treball, la hipòtesis de que tant el iNO com les PGneb tindrien un efecte profilàctic sobre la lesió pulmonar aguda per endotoxina així com també que amb la seva administració conjunta s'obtindria un benefici addicional no s'ha pogut demostrar en aquest estudi. Si que hem demostrat clarament que només el iNO administrat profilàcticament evita el desenvolupament LPA. També hem demostrat que les PGneb tenen un efecte proinflamatori i que l'associació iNO+PGneb té una eficàcia profilàctica intermèdia.

En el present estudi experimental s'ha demostrat clarament que l'**òxid nítric inhalat** administrat profilàcticament **evita completament el desenvolupament de lesió pulmonar** per endotoxina. En canvi, la **prostaciclina nebulitzada** no té cap efecte profilàctic, sino tot el contrari, té un efecta proinflamatori sobre la mateixa.

Finalment, amb administració conjunta de **òxid nítric inhalat** i de **prostaciclina nebulitzada** no s'obté cap benefici addicional i l'eficàcia profilàctica es intermèdia.

L'aplicació a la pràctica clínica d'aquests resultats pot ser molt amplia. El iNO es fa servir des de fa poc més d'una dècada per el tractament de la hipoxèmia i de la hipertensió arterial de diverses causes. No obstant, no s'ha demostrat que millori la supervivència en cap assaig clínic controlat dels efectuats en pacients amb SDRA ja establert. Això ha fet que la teràpia amb iNO no tingui aprovada cap indicació en adults. Però es possible, que si el iNO s'administra abans de que es desenvolupi la lesió pulmonar i la hipoxèmia sigui més efectiu i al igual que l'estudi presentat eviti la lesió pulmonar i per tant augmenti la supervivència.

Les PGneb s'han utilitzat clínicament en pacients amb SDRA amb la mateixa finalitat que el iNO, millorar l'hemodinàmica pulmonar i l'intercanvi de gasos. A la vista dels resultats del present estudi no es recomanable però administrarles abans per prevenir la lesió pulmonar ni tampoc associarles amb iNO.

Per tant, els resultats d'aquest estudi impliquen una nova indicació per a la teràpia amb iNO com es la seva utilització com a agent profilàctic en pacients de risk de desenvolupar LPA i/o SDRA. En la pràctica clínica es poden incloure totes aquelles causes de SDRA d'origen extrapulmonar (sepsis, peritonitis, pancreatitis..), la lesió pulmonar causada per la circulació extracorpòrea, i els síndromes d'isquèmia-reperfusió en els trasplantaments. Aquesta tesi, deixa obertes doncs noves línies d'investigació.

8. CONCLUSIONS

En aquest estudi experimental de lesió pulmonar aguda per endotoxina podem concloure que:

1. L'administració d'endotoxina de *Escherichia Coli* produeix una lesió pulmonar aguda que es caracteritza per migració transendotelial i activació dels neutròfils, edema alveolar, hipertensió pulmonar i hipoxèmia severa.

2. L'administració profilàctica de 10 ppm d'òxid nítric inhalat prevé de l'aparició de hipertensió pulmonar i de hipoxèmia induïdes per l'endotoxina. Així mateix prevé la migració transendotelial dels neutròfils, amb una disminució significativa del nombre de neutròfils en el rentat broncoalveolar.

3. L'administració profilàctica de 10 η g/kg/min de **prostaciclina nebulitzada** no evita l'aparició de hipertensió pulmonar ni de hipoxèmia induïdes per l'endotoxina. Tampoc evita la migració transendotelial de neutròfils.

4. L'administració profilàctica de 10 ppm d'**òxid nítric inhalat** i de 10 η g/kg/min de **prostaciclina nebulitzada** conjuntament, si bé evita el desenvolupament de hipertensió pulmonar, no prevé la hipoxèmia. Tampoc evita l'augment de neutròfils en el rentat broncoalveolar i en el teixit pulmonar.

5. La lesió pulmonar aguda induïda per endotoxina d' *Escherichia. Coli* es prevé totalment amb l'administració d' **òxid nítric inhalat**, mentre que la **prostaciclina nebulitzada** no exerceix cap efecte profilàctic d'aquesta lesió pulmonar i la **l'associació d'ambdós** tractaments té només un efecte profilàctic parcial.

9. BIBLIOGRAFIA

- 1 Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 1967; 2:319-323.
- 2 Murray JF. Editorial: The adult respiratory distress syndrome (may it rest in peace). *Am Rev Respir Dis* 1975; 111:716-718.
- 3 Abraham E, Matthay MA, Dinarello CA, Vincent JL, Cohen J, Opal SM et al. Consensus conference definitions for sepsis, septic shock, acute lung injury, and acute respiratory distress syndrome: time for a reevaluation. *Crit Care Med* 2000; 28:232-235.
- 4 Warren M, Zapol FL. Clinical Risks Associated with SDRA. In: Warren M, Zapol FL, editor. *Adult respiratory distress syndrome*. Macel Dekker, inc, 2005.
- 5 Squara P, Dhainaut JF, Artigas A, Carlet J. Hemodynamic profile in severe ARDS: results of the European Collaborative ARDS Study. *Intensive Care Med* 1998; 24:1018-1028.
- 6 Peracaula R. Fisiopatología del shock séptico. In: de Latorre FJ, León C, editors. *Sepsis y Shock Séptico*. MCR, 2005: 19.
- 7 Brigham KL, Bowers R, Haynes J. Increased sheep lung vascular permeability caused by *Escherichia coli* endotoxin. *Circ Res* 1979; 45:292-297.
- 8 Pittet JF, Mackersie RC, Martin TR, Matthay MA. Biological markers of acute lung injury: prognostic and pathogenetic significance. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155:1187-1205.
- 9 Harlan JM, Killen PD, Harker LA, Striker GE, Wright DG. Neutrophil-mediated endothelial injury in vitro mechanisms of cell detachment. *J Clin Invest* 1981; 68:1394-1403.
- 10 Kinoshita M, Mochizuki H, Ono S. Pulmonary neutrophil accumulation following human endotoxemia. *Chest* 1999; 116:1709-1715.
- 11 Tate RM, Repine JE. Neutrophils and the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1983; 128:552-559.
- 12 Lee CT, Fein AM, Lippmann M, Holtzman H, Kimbel P, Weinbaum G. Elastolytic activity in pulmonary lavage fluid from patients with adult respiratory-distress syndrome. *N Engl J Med* 1981; 304:192-196.
- 13 Suter PM, Suter S, Girardin E, Roux-Lombard P, Grau GE, Dayer JM. High bronchoalveolar levels of tumor necrosis factor and its inhibitors, interleukin-1, interferon, and elastase, in patients with adult respiratory distress syndrome after trauma, shock, or sepsis. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145:1016-1022.

- 14 Cross CE, Forte T, Stocker R, Louie S, Yamamoto Y, Ames BN et al. Oxidative stress and abnormal cholesterol metabolism in patients with adult respiratory distress syndrome. *J Lab Clin Med* 1990; 115:396-404.
- 15 Quinlan GJ, Lamb NJ, Evans TW, Gutteridge JM. Plasma fatty acid changes and increased lipid peroxidation in patients with adult respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 1996; 24:241-246.
- 16 Pittet JF, Morel DR. Imbalance between plasma levels of thromboxane B2 and 6-keto-prostaglandin F1 alpha during subacute endotoxin-induced hyperdynamic sepsis or multiple organ failure syndrome in sheep. *Circ Shock* 1991; 35:65-77.
- 17 Till GO, Johnson KJ, Kunkel R, Ward PA. Intravascular activation of complement and acute lung injury. Dependency on neutrophils and toxic oxygen metabolites. *J Clin Invest* 1982; 69:1126-1135.
- 18 Barbas CS, de Matos GF, Pincelli MP, da Rosa BE, Antunes T, de Barros JM et al. Mechanical ventilation in acute respiratory failure: recruitment and high positive end-expiratory pressure are necessary. *Curr Opin Crit Care* 2005; 11:18-28.
- 19 Amato MB, Barbas CS, Medeiros DM, Schettino GP, Lorenzi FG, Kairalla RA et al. Beneficial effects of the "open lung approach" with low distending pressures in acute respiratory distress syndrome. A prospective randomized study on mechanical ventilation. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152:1835-1846.
- 20 Brower RG, Lanken PN, MacIntyre N, Matthay MA, Morris A, Ancukiewicz M et al. Higher versus lower positive end-expiratory pressures in patients with the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2004; 351:327-336.
- 21 Richard JC, Maggiore SM, Mercat A. Clinical review: bedside assessment of alveolar recruitment. *Crit Care* 2004; 8:163-169.
- 22 Blanch L, Mancebo J, Perez M, Martinez M, Mas A, Betbese AJ et al. Short-term effects of prone position in critically ill patients with acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med* 1997; 23:1033-1039.
- 23 Douglas WW, Rehder K, Beynen FM, Sessler AD, Marsh HM. Improved oxygenation in patients with acute respiratory failure: the prone position. *Am Rev Respir Dis* 1977; 115:559-566.
- 24 Chatte G, Sab JM, Dubois JM, Sirodot M, Gaussorgues P, Robert D. Prone position in mechanically ventilated patients with severe acute respiratory failure. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155:473-478.
- 25 Gattinoni L, Pelosi P, Vitale G, Pesenti A, D'Andrea L, Mascheroni D. Body position changes redistribute lung computed-tomographic density in patients with acute respiratory failure. *Anesthesiology* 1991; 74:15-23.

- 26 Vieira SR, Nieszkowska A, Lu Q, Elman M, Sartorius A, Rouby JJ. Low spatial resolution computed tomography underestimates lung overinflation resulting from positive pressure ventilation. *Crit Care Med* 2005; 33:741-749.
- 27 Pappert D, Rossaint R, Slama K, Gruning T, Falke KJ. Influence of positioning on ventilation-perfusion relationships in severe adult respiratory distress syndrome. *Chest* 1994; 106:1511-1516.
- 28 Papazian L, Bregeon F, Gaillat F, Thirion X, Gannier M, Gregoire R et al. Respective and combined effects of prone position and inhaled nitric oxide in patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:580-585.
- 29 Jolliet P, Bulpa P, Ritz M, Ricou B, Lopez J, Chevrolet JC. Additive beneficial effects of the prone position, nitric oxide, and almitrine bismesylate on gas exchange and oxygen transport in acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 1997; 25:786-794.
- 30 Gillart T, Bazin JE, Cosserant B, Guelon D, Aigouy L, Mansoor O et al. Combined nitric oxide inhalation, prone positioning and almitrine infusion improve oxygenation in severe ARDS. *Can J Anaesth* 1998; 45:402-409.
- 31 Chiumello D, Pelosi P, Calvi E, Bigatello LM, Gattinoni L. Different modes of assisted ventilation in patients with acute respiratory failure. *Eur Respir J* 2002; 20:925-933.
- 32 Carlon GC, Kahn R, Howland WS, Baron R, Ramaker J. Acute life-threatening ventilation-perfusion inequality: an indication for independent lung ventilation. *Crit Care Med* 1978; 6:380-383.
- 33 Gattinoni L, Pesenti A, Mascheroni D, Marcolin R, Fumagalli R, Rossi F et al. Low-frequency positive-pressure ventilation with extracorporeal CO₂ removal in severe acute respiratory failure. *JAMA* 1986; 256:881-886.
- 34 Keogh BF, Hunter DN, Morgan CJ, Evans TW. The management of adult respiratory distress syndrome: 2. *Br J Hosp Med* 1990; 43:26-4.
- 35 Kinsella JP, Abman SH. High-frequency oscillatory ventilation augments the response to inhaled nitric oxide in persistent pulmonary hypertension of the newborn: Nitric Oxide Study Group. *Chest* 1998; 114:100S.
- 36 Kinsella JP, Truog WE, Walsh WF, Goldberg RN, Bancalari E, Mayock DE et al. Randomized, multicenter trial of inhaled nitric oxide and high-frequency oscillatory ventilation in severe, persistent pulmonary hypertension of the newborn. *J Pediatr* 1997; 131:55-62.
- 37 Hill JD, O'Brien TG, Murray JJ, Dontigny L, Bramson ML, Osborn JJ et al. Prolonged extracorporeal oxygenation for acute post-traumatic respiratory failure

- (shock-lung syndrome). Use of the Bramson membrane lung. *N Engl J Med* 1972; 286:629-634.
- 38 Tutuncu AS, Akpir K, Mulder P, Erdmann W, Lachmann B. Intratracheal perfluorocarbon administration as an aid in the ventilatory management of respiratory distress syndrome. *Anesthesiology* 1993; 79:1083-1093.
 - 39 Hirschl RB, Pranikoff T, Wise C, Overbeck MC, Gauger P, Schreiner RJ et al. Initial experience with partial liquid ventilation in adult patients with the acute respiratory distress syndrome. *JAMA* 1996; 275:383-389.
 - 40 Puybasset L, Rouby JJ, Mourgeon E, Stewart TE, Cluzel P, Arthaud M et al. Inhaled nitric oxide in acute respiratory failure: dose-response curves. *Intensive Care Med* 1994; 20:319-327.
 - 41 Bigatello LM, Hurford WE, Kacmarek RM, Roberts JD, Jr., Zapol WM. Prolonged inhalation of low concentrations of nitric oxide in patients with severe adult respiratory distress syndrome. Effects on pulmonary hemodynamics and oxygenation. *Anesthesiology* 1994; 80:761-770.
 - 42 Channick RN, Hoch RC, Newhart JW, Johnson FW, Smith CM. Improvement in pulmonary hypertension and hypoxemia during nitric oxide inhalation in a patient with end-stage pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149:811-814.
 - 43 Lu Q, Mourgeon E, Law-Koune JD, Roche S, Vezinet C, Abdennour L et al. Dose-response curves of inhaled nitric oxide with and without intravenous almitrine in nitric oxide-responding patients with acute respiratory distress syndrome. *Anesthesiology* 1995; 83:929-943.
 - 44 Lawson SM, Rich GF, McArdle PA, Jaidev J, Morris GN. The response to varying concentrations of inhaled nitric oxide in patients with acute respiratory distress syndrome. *Anesth Analg* 1996; 82:574-581.
 - 45 Mourgeon E, Puybasset L, Law-Koune JD, Lu Q, Abdennour L, Gallart L et al. Inhaled nitric oxide in acute respiratory distress syndrome with and without septic shock requiring norepinephrine administration: a dose-response study. *Crit Care (Lond)* 1997; 1:25-39.
 - 46 Rossaint R, Falke KJ, Lopez F, Slama K, Pison U, Zapol WM. Inhaled nitric oxide for the adult respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1993; 328:399-405.
 - 47 Lundin S, Mang H, Smithies M, Stenqvist O, Frostell C. Inhalation of nitric oxide in acute lung injury: results of a European multicentre study. The European Study Group of Inhaled Nitric Oxide. *Intensive Care Med* 1999; 25:911-919.
 - 48 Dellinger RP, Zimmerman JL, Taylor RW, Straube RC. Placebo and inhaled nitric oxide mortality the same in ARDS clinical trial. *Crit Care Med* 1998; 26:619.

- 49 Meadow W, Rudinsky B, Bell A, Hipps R. Effects of nebulized nitroprusside on pulmonary and systemic hemodynamics during pulmonary hypertension in piglets. *Pediatr Res* 1998; 44:181-186.
- 50 Ichinose F, Adrie C, Hurford WE, Zapol WM. Prolonged pulmonary vasodilator action of inhaled nitric oxide by Zaprinast in awake lambs. *J Appl Physiol* 1995; 78:1288-1295.
- 51 Thusu KG, Morin FC, III, Russell JA, Steinhorn RH. The cGMP phosphodiesterase inhibitor zaprinast enhances the effect of nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152:1605-1610.
- 52 Kinsella JP, Torielli F, Ziegler JW, Ivy DD, Abman SH. Dipyridamole augmentation of response to nitric oxide. *Lancet* 1995; 346:647-648.
- 53 Ziegler JW, Ivy DD, Wiggins JW, Kinsella JP, Clarke WR, Abman SH. Effects of dipyridamole and inhaled nitric oxide in pediatric patients with pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158:1388-1395.
- 54 Zwissler B, Rank N, Jaenicke U, Schurle B, Welte M, Reichart B et al. Selective pulmonary vasodilation by inhaled prostacyclin in a newborn with congenital heart disease and cardiopulmonary bypass. *Anesthesiology* 1995; 82:1512-1516.
- 55 Walmrath D, Schneider T, Schermuly R, Olschewski H, Grimminger F, Seeger W. Direct comparison of inhaled nitric oxide and aerosolized prostacyclin in acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153:991-996.
- 56 Pappert D, Busch T, Gerlach H, Lewandowski K, Radermacher P, Rossaint R. Aerosolized prostacyclin versus inhaled nitric oxide in children with severe acute respiratory distress syndrome. *Anesthesiology* 1995; 82:1507-1511.
- 57 Walmrath D, Schneider T, Pilch J, Grimminger F, Seeger W. Aerosolised prostacyclin in adult respiratory distress syndrome. *Lancet* 1993; 342:961-962.
- 58 Roberts JD, Polaner DM, Lang P, Zapol WM. Inhaled nitric oxide in persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Lancet* 1992; 340:818-819.
- 59 Puybasset L, Rouby JJ, Mourgeon E, Cluzel P, Souhil Z, Law-Koune JD et al. Factors influencing cardiopulmonary effects of inhaled nitric oxide in acute respiratory failure. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152:318-328.
- 60 Pepke-Zaba J, Higenbottam TW, Dinh-Xuan AT, Stone D, Wallwork J. Inhaled nitric oxide as a cause of selective pulmonary vasodilatation in pulmonary hypertension. *Lancet* 1991; 338:1173-1174.
- 61 Berger JI, Gibson RL, Redding GJ, Standaert TA, Clarke WR, Truog WE. Effect of inhaled nitric oxide during group B streptococcal sepsis in piglets. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147:1080-1086.

- 62 Rich GF, Murphy GD, Jr., Roos CM, Johns RA. Inhaled nitric oxide. Selective pulmonary vasodilation in cardiac surgical patients. *Anesthesiology* 1993; 78:1028-1035.
- 63 Rich GF, Roos CM, Anderson SM, Urich DC, Daugherty MO, Johns RA. Inhaled nitric oxide: dose response and the effects of blood in the isolated rat lung. *J Appl Physiol* 1993; 75:1278-1284.
- 64 Stamler JS, Loh E, Roddy MA, Currie KE, Creager MA. Nitric oxide regulates basal systemic and pulmonary vascular resistance in healthy humans. *Circulation* 1994; 89:2035-2040.
- 65 Radermacher P, Santak B, Becker H, Falke KJ. Prostaglandin E1 and nitroglycerin reduce pulmonary capillary pressure but worsen ventilation-perfusion distributions in patients with adult respiratory distress syndrome. *Anesthesiology* 1989; 70:601-606.
- 66 Leff JA, Baer JW, Kirkman JM, Bodman ME, Shanley PF, Cho OJ et al. Liposome-entrapped PGE1 posttreatment decreases IL-1 alpha-induced neutrophil accumulation and lung leak in rats. *J Appl Physiol* 1994; 76:151-157.
- 67 Eierman DF, Yagami M, Erme SM, Minchey SR, Harmon PA, Pratt KJ et al. Endogenously opsonized particles divert prostanoid action from lethal to protective in models of experimental endotoxemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:2815-2819.
- 68 Abraham E, Baughman R, Fletcher E, Heard S, Lamberti J, Levy H et al. Liposomal prostaglandin E1 (TLC C-53) in acute respiratory distress syndrome: a controlled, randomized, double-blind, multicenter clinical trial. TLC C-53 ARDS Study Group. *Crit Care Med* 1999; 27:1478-1485.
- 69 Rovira I, Gallart L. Oxido Nítrico. *Tratado de Anestesiología y Reanimación*. 2005: 1045-1071.
- 70 Goldman AP, Tasker RC, Hosiasson S, Henrichsen T, Macrae DJ. Early response to inhaled nitric oxide and its relationship to outcome in children with severe hypoxemic respiratory failure. *Chest* 1997; 112:752-758.
- 71 Miller OI, Celermajer DS, Deanfield JE, Macrae DJ. Very-low-dose inhaled nitric oxide: a selective pulmonary vasodilator after operations for congenital heart disease. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994; 108:487-494.
- 72 McIntyre RC, Jr., Pulido EJ, Bensard DD, Shames BD, Abraham E. Thirty years of clinical trials in acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 2000; 28:3314-3331.
- 73 Davreux CJ, Soric I, Nathens AB, Watson RW, McGilvray ID, Suntres ZE et al. N-acetyl cysteine attenuates acute lung injury in the rat. *Shock* 1997; 8:432-438.

- 74 Jepsen S, Herlevsen P, Knudsen P, Bud MI, Klausen NO. Antioxidant treatment with N-acetylcysteine during adult respiratory distress syndrome: a prospective, randomized, placebo-controlled study. *Crit Care Med* 1992; 20:918-923.
- 75 Suter PM, Domenighetti G, Schaller MD, Laverriere MC, Ritz R, Perret C. N-acetylcysteine enhances recovery from acute lung injury in man. A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study. *Chest* 1994; 105:190-194.
- 76 Bernard GR, Wheeler AP, Arons MM, Morris PE, Paz HL, Russell JA et al. A trial of antioxidants N-acetylcysteine and procysteine in ARDS. The Antioxidant in ARDS Study Group. *Chest* 1997; 112:164-172.
- 77 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; 12:177-182.
- 78 Bernard GR, Luce JM, Sprung CL, Rinaldo JE, Tate RM, Sibbald WJ et al. High-dose corticosteroids in patients with the adult respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1987; 317:1565-1570.
- 79 Lefering R, Neugebauer EA. Steroid controversy in sepsis and septic shock: a meta-analysis. *Crit Care Med* 1995; 23:1294-1303.
- 80 Meduri GU, Headley S, Kohler G, Stentz F, Tolley E, Umberger R et al. Persistent elevation of inflammatory cytokines predicts a poor outcome in ARDS. Plasma IL-1 beta and IL-6 levels are consistent and efficient predictors of outcome over time. *Chest* 1995; 107:1062-1073.
- 81 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; 280:159-165.
- 82 Fort P, Farmer C, Westerman J, Johannigman J, Beninati W, Dolan S et al. High-frequency oscillatory ventilation for adult respiratory distress syndrome--a pilot study. *Crit Care Med* 1997; 25:937-947.
- 83 Gallart L, Lu Q, Puybasset L, Umamaheswara Rao GS, Coriat P, Rouby JJ. Intravenous almitrine combined with inhaled nitric oxide for acute respiratory distress syndrome. The NO Almitrine Study Group. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158:1770-1777.
- 84 Frostell C, Fratacci MD, Wain JC, Jones R, Zapol WM. Inhaled nitric oxide. A selective pulmonary vasodilator reversing hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Circulation* 1991; 83:2038-2047.
- 85 Rossaint R, Gerlach H, Schmidt-Ruhnke H, Pappert D, Lewandowski K, Steudel W et al. Efficacy of inhaled nitric oxide in patients with severe ARDS. *Chest* 1995; 107:1107-1115.

- 86 Miller OI, Tang SF, Keech A, Celermajer DS. Rebound pulmonary hypertension on withdrawal from inhaled nitric oxide. *Lancet* 1995; 346:51-52.
- 87 Kurrek MM, Castillo L, Bloch KD, Tannenbaum SR, Zapol WM. Inhaled nitric oxide does not alter endotoxin-induced nitric oxide synthase activity during rat lung perfusion. *J Appl Physiol* 1995; 79:1088-1092.
- 88 Macrae DJ, Field D, Mercier JC, Moller J, Stiris T, Biban P et al. Inhaled nitric oxide therapy in neonates and children: reaching a European consensus. *Intensive Care Med* 2004; 30:372-380.
- 89 Germann P, Braschi A, Della RG, Dinh-Xuan AT, Falke K, Frostell C et al. Inhaled nitric oxide therapy in adults: European expert recommendations. *Intensive Care Med* 2005; 31:1029-1041.
- 90 Radomski MW, Moncada S. Regulation of vascular homeostasis by nitric oxide. *Thromb Haemost* 1993; 70:36-41.
- 91 Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88:4651-4655.
- 92 Granger DN, Kubes P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J Leukoc Biol* 1994; 55:662-675.
- 93 Granger DN, Kubes P. Nitric oxide as antiinflammatory agent. *Methods Enzymol* 1996; 269:434-442.
- 94 Hickey MJ, Kubes P. Role of nitric oxide in regulation of leucocyte-endothelial cell interactions. *Exp Physiol* 1997; 82:339-348.
- 95 Bloomfield GL, Holloway S, Ridings PC, Fisher BJ, Blocher CR, Sholley M et al. Pretreatment with inhaled nitric oxide inhibits neutrophil migration and oxidative activity resulting in attenuated sepsis-induced acute lung injury. *Crit Care Med* 1997; 25:584-593.
- 96 Chollet-Martin S, Gatecel C, Kermarrec N, Gougerot-Pocidallo MA, Payen DM. Alveolar neutrophil functions and cytokine levels in patients with the adult respiratory distress syndrome during nitric oxide inhalation. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153:985-990.
- 97 Barbera JA, Roger N, Roca J, Rovira I, Higenbottam TW, Rodriguez-Roisin R. Worsening of pulmonary gas exchange with nitric oxide inhalation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 1996; 347:436-440.
- 98 Rovira I, Gallart L. Oxido Nítrico. *Tratado de Anestesiología y Reanimación*. 1995: 1045-1071.

- 99 Hugod C. Effect of exposure to 43 ppm nitric oxide and 3.6 ppm nitrogen dioxide on rabbit lung. A light and electron microscopic study. *Int Arch Occup Environ Health* 1979; 42:159-167.
- 100 Dahlem P. Combination of inhaled nitric oxide and intravenous prostacyclin for successful treatment of severe pulmonary hypertension in a patient with ARDS. *Intensive Care Med* 1999; 25:1474-1475.
- 101 Radermacher P, Santak B, Wust HJ, Tarnow J, Falke KJ. Prostacyclin and right ventricular function in patients with pulmonary hypertension associated with ARDS. *Intensive Care Med* 1990; 16:227-232.
- 102 Melot C, Lejeune P, Leeman M, Moraine JJ, Naeije R. Prostaglandin E1 in the adult respiratory distress syndrome. Benefit for pulmonary hypertension and cost for pulmonary gas exchange. *Am Rev Respir Dis* 1989; 139:106-110.
- 103 Wensel R, Opitz CF, Ewert R, Bruch L, Kleber FX. Effects of iloprost inhalation on exercise capacity and ventilatory efficiency in patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation* 2000; 101:2388-2392.
- 104 Olschewski H, Ghofrani HA, Schmehl T, Winkler J, Wilkens H, Hoyer MM et al. Inhaled iloprost to treat severe pulmonary hypertension. An uncontrolled trial. German PPH Study Group. *Ann Intern Med* 2000; 132:435-443.
- 105 Galie N, Torbicki A, Barst R, Darteville P, Haworth S, Higenbottam T et al. Guidelines on diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension. The Task Force on Diagnosis and Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2004; 25:2243-2278.
- 106 Yang G, Chen G, Wang D. Effects of prostaglandins and leukotrienes on hypoxic pulmonary vasoconstriction in rats. *J Tongji Med Univ* 2000; 20:197-199.
- 107 Booke M, Bradford DW, Hinder F, Harper D, Brauchle RW, Traber LD et al. Effects of inhaled nitric oxide and nebulized prostacyclin on hypoxic pulmonary vasoconstriction in anesthetized sheep. *Crit Care Med* 1996; 24:1841-1848.
- 108 Kleen M, Habler O, Hofstetter C, Pusch R, Mueller M, Welte M et al. Efficacy of inhaled prostanoids in experimental pulmonary hypertension. *Crit Care Med* 1998; 26:1103-1109.
- 109 Zobel G, Dacar D, Rodl S, Friehs I. Inhaled nitric oxide versus inhaled prostacyclin and intravenous versus inhaled prostacyclin in acute respiratory failure with pulmonary hypertension in piglets. *Pediatr Res* 1995; 38:198-204.
- 110 van Heerden PV, Barden A, Michalopoulos N, Bulsara MK, Roberts BL. Dose-response to inhaled aerosolized prostacyclin for hypoxemia due to ARDS. *Chest* 2000; 117:819-827.

- 111 Abraham E, Baughman R, Fletcher E, Heard S, Lamberti J, Levy H et al. Liposomal prostaglandin E1 (TLC C-53) in acute respiratory distress syndrome: a controlled, randomized, double-blind, multicenter clinical trial. TLC C-53 ARDS Study Group. *Crit Care Med* 1999; 27:1478-1485.
- 112 Olschewski H, Walmrath D, Schermuly R, Ghofrani A, Grimminger F, Seeger W. Aerosolized prostacyclin and iloprost in severe pulmonary hypertension. *Ann Intern Med* 1996; 124:820-824.
- 113 Dembinski R, Max M, Lopez F, Kuhlen R, Kurth R, Rossaint R. Effect of inhaled prostacyclin in combination with almitrine on ventilation-perfusion distributions in experimental lung injury. *Anesthesiology* 2001; 94:461-467.
- 114 Hardy CC, Bradding P, Robinson C, Holgate ST. Bronchoconstrictor and antibronchoconstrictor properties of inhaled prostacyclin in asthma. *J Appl Physiol* 1988; 64:1567-1574.
- 115 Max M, Kuhlen R, Dembinski R, Rossaint R. Effect of aerosolized prostacyclin and inhaled nitric oxide on experimental hypoxic pulmonary hypertension. *Intensive Care Med* 1999; 25:1147-1154.
- 116 Rimensberger PC, Spahr-Schopfer I, Berner M, Jaeggi E, Kalangos A, Friedli B et al. Inhaled nitric oxide versus aerosolized iloprost in secondary pulmonary hypertension in children with congenital heart disease: vasodilator capacity and cellular mechanisms. *Circulation* 2001; 103:544-548.
- 117 Ichida F, Uese K, Tsubata S, Hashimoto I, Hamamichi Y, Fukahara K et al. Additive effect of beraprost on pulmonary vasodilation by inhaled nitric oxide in children with pulmonary hypertension. *Am J Cardiol* 1997; 80:662-664.
- 118 Eiznhamer DA, Flavin MT, Jesmok GJ, Borgia JF, Nelson DJ, Burhop KE et al. Effective attenuation of endotoxin-induced acute lung injury by 2,3-diacetyloxybenzoic acid in two independent animal models. *Pulm Pharmacol Ther* 2004; 17:105-110.
- 119 Raveh Y, Ichinose F, Orbach P, Bloch KD, Zapol WM. Radical scavengers protect murine lungs from endotoxin-induced hyporesponsiveness to inhaled nitric oxide. *Anesthesiology* 2002; 96:926-933.
- 120 Julien M, Hoeffel JM, Flick MR. Oleic acid lung injury in sheep. *J Appl Physiol* 1986; 60:433-440.
- 121 Perlman MB, Johnson A, Malik AB. Ibuprofen prevents thrombin-induced lung vascular injury: mechanism of effect. *Am J Physiol* 1987; 252:H605-H614.
- 122 Barie PS, Minnear FL, Malik AB. Increased pulmonary vascular permeability after bone marrow injection in sheep. *Am Rev Respir Dis* 1981; 123:648-653.

- 123 Wenger H, Wong C, Demling RH. Pulmonary dysfunction secondary to soft-tissue endotoxin. *Arch Surg* 1985; 120:159-165.
- 124 Lewis JF, Jobe AH. Surfactant and the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147:218-233.
- 125 Jesmok G, Borgia J. Acute cardiopulmonary manifestations of smooth and rough strain lipopolysaccharide infusion in the conscious sheep. *Circ Shock* 1985; 17:285-300.
- 126 Jesmok GJ, Aono F, Simpson J, Borgia J. Effect of ibuprofen on components of an acute systemic inflammatory response evoked by intravenous endotoxin administration in the conscious sheep. *Prog Clin Biol Res* 1987; 236A:333-346.
- 127 Wong C, Fox R, Demling RH. Effect of hydroxyl radical scavenging on endotoxin-induced lung injury. *Surgery* 1985; 97:300-307.
- 128 Demling RH, Wenger H, Hechtman H, Wong C. Role of subcutaneous tissue endotoxin in the production of prostanoid-induced lung injury: comparison with intravenous endotoxin response. *Circ Shock* 1985; 17:147-161.
- 129 Mullen PG, Windsor AC, Walsh CJ, Blocher CR, Fisher BJ, Leeper-Woodford SK et al. Combined ibuprofen and monoclonal antibody to tumor necrosis factor-alpha attenuate hemodynamic dysfunction and sepsis-induced acute lung injury. *J Trauma* 1993; 34:612-620.
- 130 Johnson J, Meyrick B, Jesmok G, Brigham KL. Human recombinant tumor necrosis factor alpha infusion mimics endotoxemia in awake sheep. *J Appl Physiol* 1989; 66:1448-1454.
- 131 Palder SB, Wong C, Hood I, Wenger H, Mannick JA, Demling RH. Chemotactic activity of plasma and lung lymph in sheep with endotoxemia: effect of hydroxyl radical scavengers. *J Surg Res* 1985; 38:162-172.
- 132 Jesmok GJ, Gunther RA. In vivo biology of recombinant interleukin-2 infusion in sheep: cardiopulmonary manifestations of an intravascular immune-inflammatory response. *Inflammation* 1989; 13:267-284.
- 133 Johnson J, Brigham KL, Jesmok G, Meyrick B. Morphologic changes in lungs of anesthetized sheep following intravenous infusion of recombinant tumor necrosis factor alpha. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144:179-186.
- 134 Hudak BB, Terry PB, Menkes HA, Jones MD, Jr., Traystman RJ. Hypocapnia does not alter collateral ventilation in sheep. *J Appl Physiol* 1990; 68:503-507.
- 135 Woolcock AJ, Macklem PT. Mechanical factors influencing collateral ventilation in human, dog, and pig lungs. *J Appl Physiol* 1971; 30:99-115.

- 136 Cremona G, Wood AM, Hall LW, Bower EA, Higenbottam T. Effect of inhibitors of nitric oxide release and action on vascular tone in isolated lungs of pig, sheep, dog and man. *J Physiol* 1994; 481:185-195.
- 137 Wheeler AP, Hardie WD, Bernard G. Studies of an antiendotoxin antibody in preventing the physiologic changes of endotoxemia in awake sheep. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142:775-781.
- 138 Wheeler AP, Jesmok G, Brigham KL. Tumor necrosis factor's effects on lung mechanics, gas exchange, and airway reactivity in sheep. *J Appl Physiol* 1990; 68:2542-2549.
- 139 Winn R, Harlan J, Nadir B, Harker L, Hildebrandt J. Thromboxane A2 mediates lung vasoconstriction but not permeability after endotoxin. *J Clin Invest* 1983; 72:911-918.
- 140 Huttemeier PC, Watkins WD, Peterson MB, Zapol WM. Acute pulmonary hypertension and lung thromboxane release after endotoxin infusion in normal and leukopenic sheep. *Circ Res* 1982; 50:688-694.
- 141 Huttemeier P, Eliassen K, Mogensen T, Bell M, Sorensen JN, Qvist J. Effects of a thromboxane antagonist (BM 13.177) during endotoxin-induced pulmonary vasoconstriction in sheep. *Clin Physiol* 1986; 6:415-422.
- 142 Heflin AC, Jr., Brigham KL. Prevention by granulocyte depletion of increased vascular permeability of sheep lung following endotoxemia. *J Clin Invest* 1981; 68:1253-1260.
- 143 Middelveld RJ, Alving K. Endotoxin-induced shock in the pig--limited effects of low and high concentrations of inhaled nitric oxide. *Acta Physiol Scand* 2003; 179:203-211.
- 144 Bjertnaes LJ, Koizumi T, Newman JH. Inhaled nitric oxide reduces lung fluid filtration after endotoxin in awake sheep. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158:1416-1423.
- 145 Kirov MY, Evgenov OV, Bjertnaes LJ. Combination of intravenously infused methylene blue and inhaled nitric oxide ameliorates endotoxin-induced lung injury in awake sheep. *Crit Care Med* 2003; 31:179-186.
- 146 Hart CM. Nitric oxide in adult lung disease. *Chest* 1999; 115:1407-1417.
- 147 Quezado ZM, Natanson C, Karzai W, Danner RL, Koev CA, Fitz Y et al. Cardiopulmonary effects of inhaled nitric oxide in normal dogs and during *E. coli* pneumonia and sepsis. *J Appl Physiol* 1998; 84:107-115.
- 148 Rossaint R, Slama K, Steudel W, Gerlach H, Pappert D, Veit S et al. Effects of inhaled nitric oxide on right ventricular function in severe acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med* 1995; 21:197-203.

- 149 Myles PS, Leong CK, Currey J. Endogenous nitric oxide and low systemic vascular resistance after cardiopulmonary bypass. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 1997; 11:571-574.
- 150 Kumar A, Brar R, Wang P, Dee L, Skorupa G, Khadour F et al. Role of nitric oxide and cGMP in human septic serum-induced depression of cardiac myocyte contractility. *Am J Physiol* 1999; 276:R265-R276.
- 151 Weitzberg E, Rudehill A, Lundberg JM. Nitric oxide inhalation attenuates pulmonary hypertension and improves gas exchange in endotoxin shock. *Eur J Pharmacol* 1993; 233:85-94.
- 152 Tanus-Santos JE, Moreno H, Jr., Moreno RA, Martins ML, Pereira R, de Nucci G. Inhaled nitric oxide improves hemodynamics during a venous air infusion (VAI) in dogs. *Intensive Care Med* 1999; 25:983-989.
- 153 Tanus-Santos JE, Moreno H, Jr., Zappellini A, de Nucci G. Small-dose inhaled nitric oxide attenuates hemodynamic changes after pulmonary air embolism in dogs. *Anesth Analg* 1999; 88:1025-1029.
- 154 Hausen B, Muller P, Bahra M, Ramsamooj R, Hewitt CW. Donor pretreatment with intravenous prostacyclin versus inhaled nitric oxide in experimental lung transplantation. *Transplantation* 1996; 62:1714-1719.
- 155 Gerlach H, Keh D, Semmerow A, Busch T, Lewandowski K, Pappert DM et al. Dose-response characteristics during long-term inhalation of nitric oxide in patients with severe acute respiratory distress syndrome: a prospective, randomized, controlled study. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167:1008-1015.
- 156 Taylor RW, Zimmerman JL, Dellinger RP, Straube RC, Criner GJ, Davis K, Jr. et al. Low-dose inhaled nitric oxide in patients with acute lung injury: a randomized controlled trial. *JAMA* 2004; 291:1603-1609.
- 157 Michael JR, Barton RG, Saffle JR, Mone M, Markewitz BA, Hillier K et al. Inhaled nitric oxide versus conventional therapy: effect on oxygenation in ARDS. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:1372-1380.
- 158 Troncy E, Collet JP, Shapiro S, Guimond JG, Blair L, Ducruet T et al. Inhaled nitric oxide in acute respiratory distress syndrome: a pilot randomized controlled study. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:1483-1488.
- 159 Dellinger RP, Zimmerman JL, Taylor RW, Straube RC, Hauser DL, Criner GJ et al. Effects of inhaled nitric oxide in patients with acute respiratory distress syndrome: results of a randomized phase II trial. Inhaled Nitric Oxide in ARDS Study Group. *Crit Care Med* 1998; 26:15-23.
- 160 Sokol J, Jacobs SE, Bohn D. Inhaled nitric oxide for acute hypoxemic respiratory failure in children and adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2000:CD002787.

- 161 Hart CM. Nitric oxide in adult lung disease. *Chest* 1999; 115:1407-1417.
- 162 Dellinger RP, Zimmerman JL, Taylor RW, Straube RC, Hauser DL, Criner GJ et al. Effects of inhaled nitric oxide in patients with acute respiratory distress syndrome: results of a randomized phase II trial. Inhaled Nitric Oxide in ARDS Study Group. *Crit Care Med* 1998; 26:15-23.
- 163 Bund M, Henzler D, Walz R, Rossaint R, Piepenbrock S, Kuhlen R. [Aerosolized and intravenous prostacyclin during one-lung ventilation. Hemodynamic and pulmonary effects]. *Anaesthesist* 2004; 53:612-620.
- 164 Schroeder RA, Wood GL, Plotkin JS, Kuo PC. Intraoperative use of inhaled PGI(2) for acute pulmonary hypertension and right ventricular failure. *Anesth Analg* 2000; 91:291-295.
- 165 Weston MW, Isaac BF, Crain C. The use of inhaled prostacyclin in nitroprusside-resistant pulmonary artery hypertension. *J Heart Lung Transplant* 2001; 20:1340-1344.
- 166 Olschewski H, Ghofrani HA, Walmrath D, Schermuly R, Temmesfeld-Wollbruck B, Grimminger F et al. Inhaled prostacyclin and iloprost in severe pulmonary hypertension secondary to lung fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:600-607.
- 167 Soditt V, Aring C, Groneck P. Improvement of oxygenation induced by aerosolized prostacyclin in a preterm infant with persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Intensive Care Med* 1997; 23:1275-1278.
- 168 Eichelbronner O, Reinelt H, Wiedeck H, Mezody M, Rossaint R, Georgieff M et al. Aerosolized prostacyclin and inhaled nitric oxide in septic shock--different effects on splanchnic oxygenation? *Intensive Care Med* 1996; 22:880-887.
- 169 Kunimoto F, Arai K, Isa Y, Koyano T, Kadoi Y, Saito S et al. A comparative study of the vasodilator effects of prostaglandin E1 in patients with pulmonary hypertension after mitral valve replacement and with adult respiratory distress syndrome. *Anesth Analg* 1997; 85:507-513.
- 170 Opitz CF, Wensel R, Bettmann M, Schaffarczyk R, Linscheid M, Hetzer R et al. Assessment of the vasodilator response in primary pulmonary hypertension. Comparing prostacyclin and iloprost administered by either infusion or inhalation. *Eur Heart J* 2003; 24:356-365.
- 171 Kisch-Wedel H, Kemming G, Meisner F, Flondor M, Kuebler WM, Bruhn S et al. The prostaglandins epoprostenol and iloprost increase left ventricular contractility in vivo. *Intensive Care Med* 2003; 29:1574-1583.
- 172 Hill LL, Pearl RG. Combined inhaled nitric oxide and inhaled prostacyclin during experimental chronic pulmonary hypertension. *J Appl Physiol* 1999; 86:1160-1164.

- 173 Welte M, Zwissler B, Habazettl H, Messmer K. PGI₂ aerosol versus nitric oxide for selective pulmonary vasodilation in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Eur Surg Res* 1993; 25:329-340.
- 174 Walmrath D, Schermuly R, Pilch J, Grimminger F, Seeger W. Effects of inhaled versus intravenous vasodilators in experimental pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 1997; 10:1084-1092.
- 175 Welte M, Zwissler B, Habler O, Kleen M, Messmer K. Prostacyclin aerosol and inhaled nitric oxide fail to reverse pulmonary vasoconstriction induced by thromboxane analogue in dogs. *Acta Physiol Scand* 1995; 154:395-405.
- 176 Webb SA, Stott S, van Heerden PV. The use of inhaled aerosolized prostacyclin (IAP) in the treatment of pulmonary hypertension secondary to pulmonary embolism. *Intensive Care Med* 1996; 22:353-355.
- 177 Santak B, Schreiber M, Kuen P, Lang D, Radermacher P. Prostacyclin aerosol in an infant with pulmonary hypertension. *Eur J Pediatr* 1995; 154:233-235.
- 178 Bindl L, Fahnenstich H, Peukert U. Aerosolised prostacyclin for pulmonary hypertension in neonates. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1994; 71:F214-F216.
- 179 Mikhail G, Gibbs J, Richardson M, Wright G, Khaghani A, Banner N et al. An evaluation of nebulized prostacyclin in patients with primary and secondary pulmonary hypertension. *Eur Heart J* 1997; 18:1499-1504.
- 180 Zwissler B, Kemming G, Habler O, Kleen M, Merkel M, Haller M et al. Inhaled prostacyclin (PGI₂) versus inhaled nitric oxide in adult respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154:1671-1677.
- 181 van Heerden PV, Blythe D, Webb SA. Inhaled aerosolized prostacyclin and nitric oxide as selective pulmonary vasodilators in ARDS--a pilot study. *Anaesth Intensive Care* 1996; 24:564-568.
- 182 Olschewski H, Seeger W. [Treatment of pulmonary artery hypertension]. *Pneumologie* 2000; 54:222-224.
- 183 Opitz CF, Wensel R, Bettmann M, Schaffarczyk R, Linscheid M, Hetzer R et al. Assessment of the vasodilator response in primary pulmonary hypertension. Comparing prostacyclin and iloprost administered by either infusion or inhalation. *Eur Heart J* 2003; 24:356-365.
- 184 Hoeper MM, Schwarze M, Ehlerding S, Adler-Schuermeier A, Spiekerkoetter E, Niedermeyer J et al. Long-term treatment of primary pulmonary hypertension with aerosolized iloprost, a prostacyclin analogue. *N Engl J Med* 2000; 342:1866-1870.
- 185 Domenighetti G, Stricker H, Waldspuehl B. Nebulized prostacyclin (PGI₂) in acute respiratory distress syndrome: impact of primary (pulmonary injury) and secondary

- (extrapulmonary injury) disease on gas exchange response. *Crit Care Med* 2001; 29:57-62.
- 186 Aranda M, Bradford KK, Pearl RG. Combined therapy with inhaled nitric oxide and intravenous vasodilators during acute and chronic experimental pulmonary hypertension. *Anesth Analg* 1999; 89:152-158.
- 187 Della RG, Coccia C, Costa MG, Pompei L, Di Marco P, Vizza CD et al. Inhaled aerosolized prostacyclin and pulmonary hypertension during anesthesia for lung transplantation. *Transplant Proc* 2001; 33:1634-1636.
- 188 Kuhlen R, Walbert E, Frankel P, Thaden S, Behrendt W, Rossaint R. Combination of inhaled nitric oxide and intravenous prostacyclin for successful treatment of severe pulmonary hypertension in a patient with acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med* 1999; 25:752-754.
- 189 Della RG, Coccia C, Costa MG, Pompei L, Di Marco P, Vizza CD et al. Inhaled aerosolized prostacyclin and pulmonary hypertension during anesthesia for lung transplantation. *Transplant Proc* 2001; 33:1634-1636.
- 190 Mikhail G, Gibbs J, Richardson M, Wright G, Khaghani A, Banner N et al. An evaluation of nebulized prostacyclin in patients with primary and secondary pulmonary hypertension. *Eur Heart J* 1997; 18:1499-1504.
- 191 Inoue T, Fukuo K, Morimoto S, Koh E, Ogihara T. Nitric oxide mediates interleukin-1-induced prostaglandin E2 production by vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 194:420-424.
- 192 Wen F, Watanabe K, Yoshida M. Nitric oxide enhances PGI(2) production by human pulmonary artery smooth muscle cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2000; 62:369-378.
- 193 Pelligrino DA, Wang Q. Cyclic nucleotide crosstalk and the regulation of cerebral vasodilation. *Prog Neurobiol* 1998; 56:1-18.
- 194 Shimokawa H, Flavahan NA, Lorenz RR, Vanhoutte PM. Prostacyclin releases endothelium-derived relaxing factor and potentiates its action in coronary arteries of the pig. *Br J Pharmacol* 1988; 95:1197-1203.
- 195 de Wit C, von Bismarck P, Pohl U. Synergistic action of vasodilators that increase cGMP and cAMP in the hamster cremaster microcirculation. *Cardiovasc Res* 1994; 28:1513-1518.
- 196 Marcelin-Jimenez G, Escalante B. Functional and cellular interactions between nitric oxide and prostacyclin. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2001; 129:349-359.

- 197 Zenge JP, Rairigh RL, Grover TR, Storme L, Parker TA, Kinsella JP et al. NO and prostaglandin interactions during hemodynamic stress in the fetal ovine pulmonary circulation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 281:L1157-L1163.
- 198 Zou MH, Ullrich V. Peroxynitrite formed by simultaneous generation of nitric oxide and superoxide selectively inhibits bovine aortic prostacyclin synthase. *FEBS Lett* 1996; 382:101-104.
- 199 Vainikka TL, Heikkila LJ, Kukkonen S, Toivonen HJ. Inhaled NO and prostacyclin during porcine single lung transplantation. *Ann Thorac Surg* 2001; 72:1892-1897.
- 200 Zwissler B, Welte M, Messmer K. Effects of inhaled prostacyclin as compared with inhaled nitric oxide on right ventricular performance in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 1995; 9:283-289.
- 201 Zwissler B, Kemming G, Habler O, Kleen M, Merkel M, Haller M et al. Inhaled prostacyclin (PGI₂) versus inhaled nitric oxide in adult respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154:1671-1677.
- 202 Bjertnaes LJ, Koizumi T, Newman JH. Inhaled nitric oxide reduces lung fluid filtration after endotoxin in awake sheep. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158:1416-1423.
- 203 Stubbe HD, Westphal M, Van Aken H, Hucklenbruch C, Lauer S, Jahn UR et al. Inhaled nitric oxide reduces lung edema during fluid resuscitation in ovine acute lung injury. *Intensive Care Med* 2003; 29:1790-1797.
- 204 Dahm PL, Blomquist S, De Robertis E, Jonson B, Myhre E, Svantesson C et al. Effects of NO inhalation on pulmonary leukocyte sequestration and blood volume in porcine endotoxaemia. *Intensive Care Med* 2000; 26:336-343.
- 205 Meade M, Granton JT, Matte-Martyn A, McRae K, Cripps PM, Weaver B et al. A randomized trial of inhaled nitric oxide to prevent reperfusion injury following lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2001; 20:254-255.
- 206 Gewaltig MT, Kojda G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. *Cardiovasc Res* 2002; 55:250-260.
- 207 Razavi HM, Werhun R, Scott JA, Weicker S, Wang IF, McCormack DG et al. Effects of inhaled nitric oxide in a mouse model of sepsis-induced acute lung injury. *Crit Care Med* 2002; 30:868-873.
- 208 Eppinger MJ, Ward PA, Jones ML, Bolling SF, Deeb GM. Disparate effects of nitric oxide on lung ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 1995; 60:1169-1175.
- 209 Rayhrer CS, Edmisten TD, Cephas GA, Tribble CG, Kron IL, Young JS. Nitric oxide potentiates acute lung injury in an isolated rabbit lung model. *Ann Thorac Surg* 1998; 65:935-938.

- 210 Foulke GE, Fisher CJ, Jr., Demling RH. Effect of nitroprusside on pulmonary hypertension and lung fluid balance after E. coli endotoxin. *Crit Care Med* 1982; 10:427-431.
- 211 Young JS, Rayhrer CS, Edmisten TD, Cephas GA, Tribble CG, Kron IL. Sodium nitroprusside mitigates oleic acid-induced acute lung injury. *Ann Thorac Surg* 2000; 69:224-227.
- 212 Ardehali A, Hughes K, Sadeghi A, Esmailian F, Marelli D, Moriguchi J et al. Inhaled nitric oxide for pulmonary hypertension after heart transplantation. *Transplantation* 2001; 72:638-641.
- 213 Nagata K, Iwasaki Y, Takemura Y, Harada H, Yokomura I, Fushiki S et al. Effect of inhaled NG-nitro-L-arginine methyl ester on Candida-induced acute lung injury. *Chest* 2003; 124:2293-2301.
- 214 Grimminger F, Rose F, Ghofrani HA, Schermuly RT, Weissmann N, Olschewski H et al. [Inhalative strategies for improvement of pulmonary hemodynamics and gas exchange in sepsis and severe pulmonary hypertension]. *Z Kardiol* 2000; 89:477-484.
- 215 Williams TJ. Prostaglandin E2, prostaglandin I2 and the vascular changes of inflammation. *Br J Pharmacol* 1979; 65:517-524.
- 216 Williams TJ, Jose PJ, Wedmore CV, Peck MJ, Forrest MJ. Mechanisms underlying inflammatory edema: the importance of synergism between prostaglandins, leukotrienes, and complement-derived peptides. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 1983; 11:33-7.:33-37.
- 217 Wright JK, Kim LT, Rogers TE, Turnage RH. Prostaglandins potentiate U-46619-induced pulmonary microvascular dysfunction. *J Appl Physiol* 2000; 88:1167-1174.
- 218 Cox JP, Karnovsky ML. The depression of phagocytosis by exogenous cyclic nucleotides, prostaglandins, and theophylline. *J Cell Biol* 1973; 59:480-490.
- 219 May CD, Levine BB, Weissmann G. Effects of compounds which inhibit antigenic release of histamine and phagocytic release of lysosomal enzyme on glucose utilization by leukocytes in humans. *Proc Soc Exp Biol Med* 1970; 133:758-763.
- 220 Bessler H, Gilgal R, Djaldetti M, Zahavi I. Effect of pentoxifylline on the phagocytic activity, cAMP levels, and superoxide anion production by monocytes and polymorphonuclear cells. *J Leukoc Biol* 1986; 40:747-754.
- 221 Boxer LA, Allen JM, Baehner RL. Diminished polymorphonuclear leukocyte adherence. Function dependent on release of cyclic AMP by endothelial cells after stimulation of beta-receptors by epinephrine. *J Clin Invest* 1980; 66:268-274.

