

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



**EFFECTOS DE UNA ESTRATEGIA VENTILATORIA
ULTRAPROTECTORA SOBRE VEGF, Y SU IMPACTO EN LA
PERMEABILIDAD VASCULAR Y EL DAÑO PULMONAR, EN
UN MODELO DE SDRA ASISTIDO CON SOPORTE VITAL
EXTRACORPÓREO. UN ESTUDIO PILOTO**

PATRICIO HERNÁN GARCÍA VALDÉS

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN CIENCIAS
MÉDICAS Y BIOLÓGICAS, MENCIÓN FISIOPATOLOGÍA**

Director de Tesis: Prof. Dr. Rodrigo Cornejo Rosas
Co-Director de Tesis: Prof. Dr. Alejandro Bruhn

2016

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE MAGISTER

**Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina,
que la Tesis de Magister presentada por el candidato:**

Patricio Hernán García Valdés

**ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para
optar al Grado de Magister en Ciencias Médicas y Biológicas con mención en
Fisiopatología en el Exámen de Defensa de Tesis rendido el día 05 de agosto
del año 2016.**

**Prof. Dr. Rodrigo Cornejo Rosas
Director de Tesis
Facultad de Medicina U. de Chile**

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dr. Marcelo Cano

Prof. Dr. Luis Michea

**Prof. Dra. Julia Guerrero
Presidente Comisión**

DEDICATORIA

*A mi esposa Karina y a mi hijo Rafael
por su amor y apoyo incondicional*

AGRADECIMIENTOS

Debo mi agradecimiento a mi Director y Co-Director de Tesis, Dr. Rodrigo Cornejo y Dr. Alejandro Bruhn, al Bioquímico Dr. Dagoberto Soto, al candidato a Doctor en Ciencias Biomédicas Joaquín Araos, a la Directora del Magister en Fisiopatología Dra. Gina Sánchez, a mis profesores correctores Dra. Julia Guerrero, Dr. Marcelo Cano, Dr. Luis Michea, a mis amigos por su apoyo y preocupación constante, y por supuesto a mi familia que soportó muchas horas de ausencia en especial mi esposa e hijo, Karina y Rafael. Todos han contribuido de una u otra forma a mi crecimiento no solo profesional, sino también personal. A todos ellos muchas gracias.

ÍNDICE

	Pág.
1. RESUMEN	7
2. ABSTRACT	9
3. INTRODUCCIÓN	11
3.1 Lesión pulmonar aguda: Síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA); ventilación mecánica (VM) protectora y VM ultraprotectora.....	11
3.2 Factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF).....	13
3.3 VEGF y síndrome de distrés respiratorio agudo.....	14
3.4 Propósito.....	17
3.5 Hipótesis.....	18
4. OBJETIVOS	18
4.1 Objetivo general.....	18
4.2 Objetivos específicos.....	19
5. METODOLOGÍA	19
5.1 Animales, anestesia y monitorización.....	19
5.2 Grupos (diseño).....	21
5.3 Inducción del daño pulmonar.....	21
5.4 Soporte pulmonar extracorpóreo.....	22
5.5 Muestras de lavado broncoalveolar (LBA) y plasma	22
5.6 Eutanasia y muestras de tejido pulmonar.....	23
5.7 Eliminación de desechos.....	23
5.8 Medición de VEGF.....	23
5.9 Permeabilidad vascular (proteína total del LBA).....	24
5.10 Edema pulmonar.....	24
5.11 Daño pulmonar (histopatología).....	24
5.12 Análisis estadístico.....	25
6. RESULTADOS	25
7. DISCUSIÓN	35
8. CONCLUSIÓN	46
9. ANEXOS	54
9.1 Esquema diseño del estudio.....	54
9.2 Control de carga de Western Blot.....	54

9.3 Contribuciones al estudio.....	56
9.4 Certificado comité de ética.....	57

1. RESUMEN

Introducción: varios estudios experimentales han mostrado que la ventilación mecánica puede inducir lesión pulmonar aún en pulmones previamente sanos, pero cuando estos presentan un síndrome de distrés respiratorio agudo de cualquier origen, parecen particularmente sensibles a los efectos nocivos de la ventilación mecánica.

Por otra parte, factores de crecimiento angiogénicos como el factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF) pueden modular la permeabilidad endotelial. Los procesos biológicos que median el aumento de la permeabilidad vascular posterior a un daño pulmonar inducido por la ventilación mecánica, y por ende el desarrollo de edema pulmonar, no son completamente conocidos. No existen estudios que hayan evaluado el impacto de la estrategia ventilatoria sobre los niveles de VEGF, ni su posible rol en el aumento de permeabilidad y el desarrollo de edema pulmonar.

Objetivo: Determinar en un modelo de lesión pulmonar aguda, si comparado con animales sanos, existe alteración en los niveles de VEGF en plasma, tejido pulmonar y lavado broncoalveolar; si estos cambios se asocian a alteraciones de permeabilidad vascular, lesión y edema pulmonar; y si estas alteraciones pueden ser revertidas al emplear una estrategia ventilatoria ultraprotectora (volumen corriente 2 ml/kg de peso corporal) asociada a soporte vital extracorpóreo, comparado con una ventilación no protectora (volumen corriente 10 ml/kg de peso corporal).

Resultados: no se observó diferencias en los niveles relativos de VEGF en el grupo de animales con lesión pulmonar aguda ventilados con una estrategia convencional y ultraprotectora más soporte vital extracorpóreo, en plasma al tiempo 0, 3 y 24 horas, y en el homogeneizado de tejido pulmonar, en comparación al grupo control ($p < 0.05$). No se observó una asociación entre los niveles relativos de VEGF en el grupo de animales con lesión pulmonar aguda ventilados con una estrategia convencional y ultraprotectora más soporte vital extracorpóreo, en plasma (tiempo 0, 3 y 24 horas) y homogeneizado de tejido pulmonar, y los cambios en la concentración de proteínas en el lavado broncoalveolar, tasa peso húmedo/seco y daño pulmonar histológico ($p < 0.05$). No se observó niveles relativos de VEGF, evaluados con la técnica de Western blot, en las muestras de lavado broncoalveolar.

Conclusiones: la estrategia ventilatoria empleada no altera los niveles relativos del factor de crecimiento endotelio vascular en plasma y tejido pulmonar, en un modelo de cerdos con

lesión pulmonar aguda inducida por lavados con solución salina repetidos y ventilación mecánica con alto volumen corriente. Además, los cambios observados en la permeabilidad vascular, daño y edema pulmonar no tienen una asociación con los niveles relativos del factor de crecimiento endotelio vascular en el plasma y tejido pulmonar.

Sin embargo, existe un número importante de limitaciones técnicas que deben ser consideradas al momento de interpretar estos resultados, y que hacen necesario continuar investigando y desarrollando la metodología de trabajo para documentar resultados confiables, y que permitan un constructo teórico en relación a VEGF en este modelo de lesión pulmonar aguda.

2. ABSTRACT

Introduction: several experimental studies have shown that mechanical ventilation can induce lung injury even in previously healthy lungs, but when they have an acute respiratory distress syndrome of any origin, seem particularly sensitive to the harmful effects of mechanical ventilation.

On the other side, angiogenic growth factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF) can modulate endothelial permeability. The biological processes that mediate increased vascular permeability subsequent to pulmonary damage induced by mechanical ventilation, and therefore the development of pulmonary edema, are not completely known. There are no studies that have evaluated the impact of ventilatory strategy over the VEGF levels, nor their possible role in increment of permeability and the development of pulmonary edema.

Objective: to determinate a model of acute lung injury, if compared to healthy animals, there altered levels of VEGF in plasma, bronchoalveolar lavage and lung tissue; If these changes are associated with alterations in vascular permeability, pulmonary edema and damage; and if these changes can be reversed by using an ultra-protective ventilatory strategy (tidal volume 2 ml/kg body weight) associated with extracorporeal life support, compared to a non-protective ventilation (tidal volume 10 ml/kg body weight).

Results: no differences in the relative levels of VEGF was observed in the group of animals with acute lung injury ventilated with a conventional strategy and ultra-protective most extracorporeal life support in plasma at time 0, 3 and 24 hours and the homogenate lung tissue, compared to the control group ($p < 0.05$). No association was observed between the relative levels of VEGF in the group of animals with acute lung injury ventilated with a conventional strategy and ultra-protective most extracorporeal life support in plasma (time 0, 3 and 24 hours) and homogenized lung tissue, and changes in protein concentration in bronchoalveolar lavage, rate wet/dry weight and histological lung injury ($p < 0.05$). No relative levels of VEGF was observed, evaluated with the Western blot technique, in bronchoalveolar lavage samples.

Conclusions: the ventilatory strategy employed does not alter the relative levels of vascular endothelial growth factor over plasma and lung tissue, in a model with acute lung injury pigs induced by repeated saline solution lavages and high tidal volume mechanical ventilation. In addition, the observed changes in vascular permeability, pulmonary edema and damage have no

association with the relative levels of vascular endothelial growth factor in plasma and lung tissue.

However, there are a significant number of technical limitations that must be considered when these results are interpreted, and they do need to continue researching and developing the work methodology for documenting reliable results, allowing a theoretical construct in relation to VEGF in this acute lung injury model.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Síndrome de distrés respiratorio agudo, ventilación mecánica protectora y ventilación mecánica ultraprotectora

El Síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA) es una forma aguda y difusa de daño pulmonar inflamatorio, que ocurre posterior a un deterioro de la membrana alvéolo capilar, y es caracterizado por la acumulación de edema pulmonar rico en proteínas (1). Sus características morfológicas son daño alveolar difuso, con edema alveolar e intersticial, inflamación y la formación de membranas hialinas. Clínicamente se manifiesta por hipoxemia de inicio rápido, infiltrados pulmonares bilaterales y disminución de la distensibilidad pulmonar (2).

Durante la pasada década, el SDRA se ha convertido en uno de los principales problemas de salud en los cuidados críticos. En Estados Unidos son 190.600 los casos por año, con 74.500 muertes y 3.6 millones de días de hospitalización (3). No existen datos en Chile, aunque se estima que entre un 20 a 30% de las admisiones a unidades de cuidados intensivos (UCI) en nuestro país son debido a SDRA (4, 5). Varios estudios señalan que la mortalidad persiste sobre un 40% (6-8), y quienes sobreviven pueden desarrollar complicaciones a largo plazo que comprometen su calidad de vida (9).

Los reportes sugieren que tanto la incidencia como la mortalidad de pacientes hospitalizados con SDRA han ido en disminución (10, 11). Las razones para este declive en la mortalidad probablemente sean multifactoriales; entre ellas se cuentan: la implementación de estrategias para reducir las infecciones intrahospitalarias, la disminución en el uso de transfusiones sanguíneas y la limitación en el uso de volúmenes corrientes durante la ventilación mecánica (VM) (1).

Limitar el volumen corriente (V_t) y las presiones inspiratorias, para evitar la sobredistensión, y mantener un nivel de presión positiva al final de la espiración (PEEP) para evitar el reclutamiento-desreclutamiento (R/D), se han convertido en las características distintivas de esta aproximación denominada VM protectora (12, 13).

Aunque la ventilación mecánica es el soporte terapéutico más importante en pacientes con SDRA, actualmente es bien aceptado que puede inducir o empeorar el daño pulmonar (14, 15). Varios estudios experimentales han mostrado que la VM puede inducir lesión pulmonar aún en pulmones previamente sanos (16), y cuando estos presentan un SDRA establecido,

independiente del origen, parecen particularmente sensibles a los efectos nocivos de la VM (15). Como los pulmones con SDRA tienen menos unidades pulmonares para el intercambio gaseoso y ventilación alveolar, un nivel de volumen corriente desproporcionalmente alto para las unidades pulmonares disponibles puede inducir excesivo estrés y strain en ellas, mecanismo de daño denominado sobredistensión. Además, varias unidades pulmonares se vuelven inestables en pulmones con SDRA, las que pueden abrirse durante la inspiración pero colapsan nuevamente durante la espiración, sufriendo ciclos repetitivos de R/D, el cual ha sido demostrado como inductor de daño pulmonar (17). Ambos mecanismos, sobredistensión y R/D cíclicos, inducen una respuesta biológica denominada biotrauma, caracterizada por inflamación pulmonar y sistémica (18).

Sin embargo, se ha demostrado que un mayor V_t no sólo induce sobredistensión, sino que también es el principal determinante de R/D cíclico (19), particularmente en pacientes con SDRA severo (20-22), sugiriendo que en estos últimos la posibilidad de mantener un intercambio gaseoso aceptable y tener una ventilación efectivamente protectora es inviable, por lo que la opción de soporte pulmonar extracorpóreo (ELS: por sus siglas en inglés) parece una alternativa razonable. Esto permite emplear V_t mínimos (< 2 ml/kg de peso corporal ideal) y menores frecuencias respiratorias para “hacer reposar los pulmones” y evitar así un mayor daño pulmonar con la consecuente respuesta inflamatoria, confiando la oxigenación y eliminación de dióxido de carbono (CO_2) al ELS, estrategia denominada ventilación mecánica ultraprotectora.

El soporte pulmonar extracorpóreo consiste en el uso de circulación extracorpórea prolongada que permita un intercambio gaseoso adecuado para garantizar un soporte vital temporal en pacientes con falla pulmonar. ELS puede proporcionar soporte total cuando se emplean altos flujos sanguíneos (> 50 ml/kg/min) en cuyo caso se emplea el término oxigenación de membrana extracorpóreo (ECMO) (23).

La racionalidad de implementar una estrategia ventilatoria ultraprotectora se sustenta en la posibilidad de reducir al mínimo los mecanismos relacionados con el daño inducido por la VM y permitir el reposo pulmonar, esto considerando que sobrevivir al SDRA requiere la recuperación de la integridad de la membrana alvéolo capilar. Para tal efecto, se requiere la respuesta coordinada de una serie de procesos moleculares complejos, incluyendo la proliferación de células epiteliales alveolares tipo 2. La reabsorción del edema y proteínas

alveolares debe continuar con la eventual normalización de la estructura alveolar, aunque déficits de la función respiratoria pueden persistir (1).

Si bien existe un amplio conocimiento de los mecanismos físicos implicados en el daño pulmonar inducido por la ventilación mecánica, los procesos biológicos que median la fase exudativa del SDRA, que se caracteriza por un aumento de la permeabilidad vascular con exudado de fluido proteínico y migración de células inflamatorias desde el compartimento vascular al intersticio y espacio alveolar, no son completamente conocidos.

A la fecha existen reportes en la literatura, tanto de estudios celulares como en humanos, que han mostrado una reducción de los niveles del factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF) intrapulmonar en la fase precoz del SDRA, asociado a una elevación de los niveles plasmáticos de VEGF y normalización de ambos durante la recuperación (24-26), factores que permiten plantear que cambios en la biodisponibilidad de VEGF puede jugar un rol en la patogénesis de la fase temprana del SDRA.

Queda por dilucidar si la estrategia ventilatoria empleada puede modular los niveles de VEGF, y si ello puede influir en la resolución del edema y el daño pulmonar durante la fase aguda del SDRA.

3.2 Factor de crecimiento endotelio vascular

El factor de crecimiento endotelio vascular es una glicoproteína cuyo rol es crítico en la organogénesis de todos los órganos. El pulmón es la fuente predominante de VEGF en adultos, donde ejerce una función importante manteniendo una estructura pulmonar normal (27-30).

La superfamilia de proteínas relacionadas a VEGF incluyen VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E y el factor de crecimiento placental (PIGF), donde VEGF-A (sólo como VEGF en lo sucesivo) resulta esencial para la normal organogénesis y angiogénesis tanto en humanos como en animales, y la delección de un solo alelo ha sido asociada con letalidad en ratas (27, 28). Su señalización es a través de los receptores de superficie celular tirosina kinasa VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3 (31).

El uso de diferentes ligandos de VEGF e inhibidores de los receptores VEGF, han mostrado que VEGFR-2 es el mediador de la permeabilidad vascular in vivo (31, 32). Pero, además de aumentar la permeabilidad, VEGF también induce vasodilatación resultando en un

aumento del flujo sanguíneo hacia los tejidos. VEGFR-2 (kinasa hepática fetal (Flk-1) o receptor dominio kinasa inserto (KDR)) es un receptor kinasa transmembrana tipo III, que consiste de una región extracelular compuesta de siete dominios tipo inmunoglobulinas (Ig), un dominio transmembrana corto, y una región intracelular que contiene un dominio tirosina kinasa. La unión del ligando al receptor induce la dimerización y autofosforilación (31).

Entender los mecanismos subyacentes involucrados en las respuestas fisiológicas asociadas a VEGF es esencial para proporcionar información de condiciones patológicas relacionadas a VEGF y el desarrollo de terapias específicas (33).

3.3 VEGF y Síndrome de distrés respiratorio agudo

Estudios durante la última década han sugerido que el epitelio respiratorio es el principal responsable para mantener una barrera efectiva que previene la salida de fluidos y solutos dentro del pulmón, inhibiendo el paso de agua, electrolitos y péptidos a la vía aérea y alvéolos bajo condiciones fisiológicas (34). Menos atención ha recibido el rol de la barrera endotelial, por varias razones. Poros paracelulares a través de la superficie endotelial son significativamente mayores que los poros epiteliales y esto permite el libre paso de solutos hidrofílicos como pequeños azúcares, electrolitos y otras partículas cargadas bajo condiciones basales. Además, el coeficiente de reflexión estimado para proteínas a través del endotelio capilar pulmonar es significativamente menor que el del epitelio (35). A pesar de esto, la pérdida de la integridad de la barrera endotelial es claramente prerrequisito para el desarrollo de edema intersticial, lo que está asociado con un marcado aumento en la permeabilidad vascular en modelos experimentales y puede gatillar respuestas tipo daño pulmonar agudo (1).

A su vez, factores de crecimiento angiogénicos como VEGF pueden modular la permeabilidad endotelial. Así por ejemplo, la expresión de VEGF mediada por adenovirus dentro del pulmón genera edema pulmonar (36). El alvéolo es el principal sitio de producción de VEGF y la compartimentalización de altos niveles en el fluido de recubrimiento epitelial alveolar ha sido descrita en sujetos normales. En un pulmón sano la concentración de VEGF a nivel pulmonar (fluido de recubrimiento epitelial) es 500 veces superior (compartimentalización) a las concentraciones plasmáticas. Además, el pulmón tiene receptores VEGFR1 y VEGFR2 presentes en células epiteliales alveolares tipo I y II, así como en macrófagos alveolares y células endoteliales (1).

Durante la fase aguda del SDRA (1-2 días) disminuye la concentración de VEGF a nivel pulmonar (descompartamentación), disminuye la expresión alveolar de VEGFR2 y aumentan los niveles plasmáticos de VEGF. Todo ello asociado a aumento de la permeabilidad vascular, daño de células epiteliales tipo I, edema alveolar, reclutamiento de neutrófilos y disrupción de la membrana alvéolo capilar (24, 25, 37). Por otra parte, durante la fase tardía y de recuperación existe restauración de los niveles alveolares y plasmáticos de VEGF, sobre-regulación de los receptores VEGFR1 y VEGFR2 a nivel del epitelio alveolar, macrófagos alveolares y endotelio, proliferación de células epiteliales tipo II, reparación de células epiteliales tipo I y membrana alvéolo capilar (1) (figura 1).

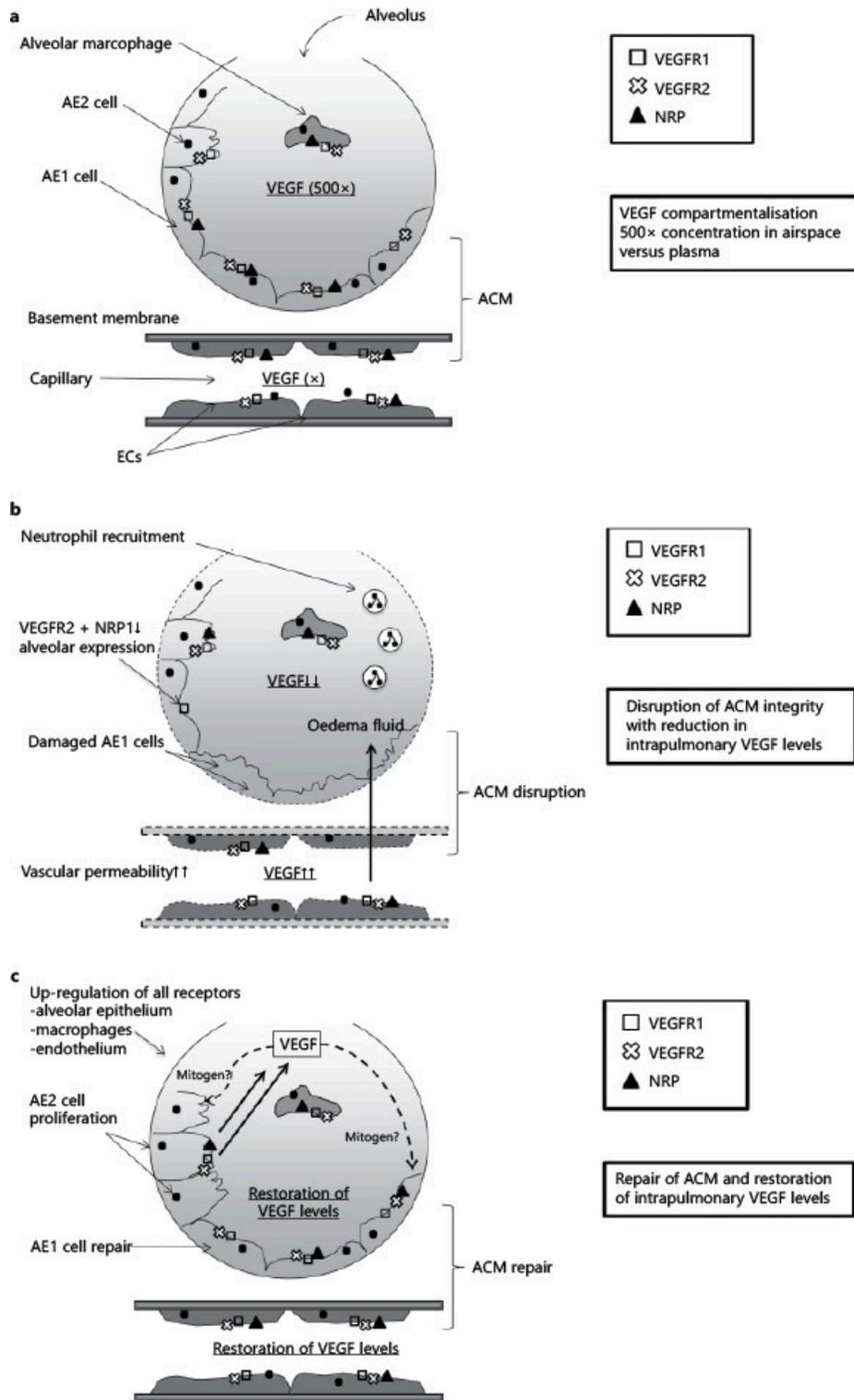


Figura 1. S. Barratt, A.R. Medford, A.B. Millar. Respiration 2014; 87: 329–342

Sin embargo, los procesos biológicos que median el aumento de la permeabilidad vascular posterior a un daño pulmonar inducido por la VM, y por ende el desarrollo de edema pulmonar, no son completamente conocidos. El estudio de niveles diferenciales de VEGF al emplear una estrategia ventilatoria ultraprotectora versus ventilación convencional puede aportar importantes antecedentes, por ser VEGF un potente factor de permeabilidad vascular. A la fecha, el rol de VEGF en el SDRA ha sido evaluado en modelos animales murinos de daño pulmonar, con resultados contradictorios; ninguno de los cuales ha sido dirigido a comparar los niveles diferenciales de VEGF al emplear una estrategia ventilatoria que genere daño (V_t 10 ml/kg de peso corporal) versus una estrategia ultraprotectora ($V_t \leq 2$ ml/kg de peso corporal).

3.4 Propósito

La VM es el principal soporte terapéutico en el SDRA, pero ésta puede ser perjudicial, por lo que proveer una ventilación protectora reduciendo el V_t es un estándar de manejo. Aún más, el disminuir el V_t con el objetivo de permitir el reposo pulmonar se ha planteado como una estrategia de rescate en pacientes con falla respiratoria severa. Disminuir el V_t a niveles que permitan el reposo pulmonar implica el confiar la oxigenación y ventilación a un sistema de oxigenación de membrana externo que reemplace la función pulmonar (ELS) (23, 37, 38).

La mejoría en la sobrevida reportada al utilizar estrategias ventilatorias ultraprotectoras parece venir de la mano de varios factores que contribuirían a ello, uno de los cuales es permitir el reposo pulmonar, lo que induce menor estrés sobre la barrera alvéolo capilar y por ende permitir la recuperación de la estructura y función pulmonar.

Aunque existen escasos datos de la participación de factores biológicos en la modulación de la permeabilidad vascular pulmonar en el SDRA, es probable que cumplan un rol significativo en la formación de edema intersticial y alveolar (1), lo que perpetúa la reducción de la capacidad residual funcional, y por ende el estrés mecánico inducido por la VM.

El pulmón es la principal fuente de VEGF, el cual dentro de sus funciones puede modular la permeabilidad vascular. Alteraciones en la biodisponibilidad de VEGF (por pérdida de la compartimentalización) se han descrito en modelos experimentales animales y en humanos durante el SDRA, y su asociación a mayor daño, permeabilidad vascular y edema pulmonar (1). El aplicar una estrategia ventilatoria ultraprotectora (versus una estrategia convencional: 10 ml/kg de peso corporal), por menor estrés mecánico y por lo tanto de daño de la estructura

alvéolo capilar, podría determinar la existencia de niveles diferenciales de VEGF a nivel de tejido pulmonar, plasma y lavado broncoalveolar (LBA), y por ende grados variables de modulación de la permeabilidad vascular pulmonar.

Que los niveles de VEGF difieran de acuerdo a la estrategia ventilatoria empleada, y ello se asocie al desarrollo de daño, permeabilidad y edema pulmonar, convertiría a VEGF en un atractivo factor adicional a la estrategia ventilatoria empleada, factible de ser modulado. Por eso investigamos a este factor biológico, con el fin de proporcionar un objetivo terapéutico deseable en los pacientes con SDRA, que limite aún más el desarrollo de edema pulmonar.

3.5 Hipótesis

Existe un aumento de los niveles de VEGF plasmáticos y disminución de los niveles de VEGF en el tejido pulmonar y LBA, en un modelo de cerdos con lesión pulmonar aguda (LPA) “doble lesión”, inducido por lavados pulmonares con solución salina y 2 horas de ventilación mecánica con V_t de 35-40 ml/kg de peso corporal, que se asocia a un aumento de la permeabilidad vascular, desarrollo de daño y edema pulmonar. Esta alteración de los niveles de VEGF (plasmáticos, tejido pulmonar y LBA) es de menor magnitud, cuando posterior a la inducción de la LPA se aplica una estrategia ventilatoria ultraprotectora versus una estrategia ventilatoria convencional.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar en un modelo de cerdos con lesión pulmonar aguda si comparado con animales sanos existe alteración en los niveles relativos de VEGF en plasma, en tejido pulmonar y en lavado broncoalveolar; si estos cambios se asocian a alteraciones de permeabilidad vascular, lesión y edema pulmonar; y si estas alteraciones pueden ser revertidas al emplear una estrategia ventilatoria ultraprotectora (V_t 2 ml/kg de peso corporal) asociada a ELS, comparado con una ventilación no protectora (V_t 10 ml/kg de peso corporal).

4.2 Objetivos específicos

1. Determinar la concentración total de proteínas en LBA, tasa peso húmedo/seco y daño pulmonar histológico, en cerdos sin lesión pulmonar aguda ventilados con una estrategia ventilatoria convencional, y en cerdos con lesión pulmonar aguda ventilados con una estrategia ventilatoria convencional y ultraprotectora.
2. Determinar los niveles relativos de VEGF en plasma, lavado broncoalveolar y tejido pulmonar en cerdos sin lesión pulmonar aguda ventilados con una estrategia ventilatoria convencional, y en cerdos con lesión pulmonar aguda ventilados con una estrategia ventilatoria convencional y ultraprotectora.
3. Comparar los niveles relativos de VEGF en el plasma, lavado broncoalveolar y tejido pulmonar de cerdos con lesión pulmonar aguda ventilados con una estrategia ventilatoria convencional versus cerdos con lesión pulmonar aguda ventilados con una estrategia ventilatoria ultraprotectora.
4. Determinar si los niveles relativos de VEGF en el plasma, lavado broncoalveolar y tejido pulmonar se asocian a variaciones de la permeabilidad vascular, edema y daño pulmonar, en cerdos sin lesión pulmonar aguda ventilados con una estrategia ventilatoria convencional, y en cerdos con lesión pulmonar aguda ventilados con una estrategia ventilatoria convencional y ultraprotectora.

5. METODOLOGÍA

5.1 Animales, anestesia y monitorización

18 Cerdos (*Sus scrofa domestica*) con edad de desarrollo de 3 a 6 meses, obtenidos en NEOVET S.A. (Empresa proveedora de cerdos de investigación), ubicada en calle El Trovador 4280, oficina 1011, Las Condes, Santiago (lugar de mantención de los cerdos: NEOVET S.A., ubicada en Colonia Kennedy, comuna de Paine), fueron utilizados para este estudio (*pertenecientes al proyecto Fondecyt Regular 1130428, dirigido por el Dr. Alejandro Bruhn*). Fueron trasladados al centro de investigación médica (CIM) de la Pontificia Universidad Católica de Chile la noche anterior a la realización del experimento. No recibieron alimentación desde 24 horas antes, pero tuvieron libre acceso a agua.

Fueron premedicados con Ketamina 20 mg/Kg + Xilavet 2 mg/Kg + Atropina 0.05 mg/kg i.m. Para lograr dicho procedimiento, se acercó al animal una bolsa plástica que contenía una compresa empapada de isofluorano, con lo cual se logró en breves segundos que el animal se durmiera para proceder a inyectar la pre-anestesia.

Al dormirse, fueron trasladados (envueltos en paños de pabellón), hasta el pabellón de cirugía experimental (ubicado en el 4° piso del CIM). Cuando era necesario, el animal fue bañado con agua tibia para sacar el resto de fecas que contenían en sus extremidades.

Después de insertar una vía intravenosa periférica (i.v.) e inyectar 5 mg/kg de tiopental, se colocaron electrodos de monitorización cardíaca, parámetro que tuvo un valor promedio de 85.7 ± 25.5 pulsaciones por minuto. Además se instaló un oxímetro de pulso adherido al extremo de la oreja o lengua del cerdo, parámetro que tuvo un valor de $97.4 \pm 2,2\%$. La temperatura central se mantuvo en 36.2 ± 1 °C mediante una frazada radiante.

Inmediatamente después, los cerdos fueron intubados y conectados a un ventilador mecánico en modo volumen control (VCV; Servo 900C, Siemens-Elcoma-Sweden) con PEEP de 5 cmH₂O, volumen tidal (V_t) de 10 ml/kg de peso corporal y una relación I:E 1:2. La frecuencia respiratoria (FR) fue inicialmente programada en 16-18/min y ajustada para mantener una PaCO₂ entre 35-45 mmHg, mientras que la fracción inspirada de oxígeno permaneció en 100% durante todo el experimento. La anestesia fue mantenida con infusión continua de midazolam 1 mg/ml, fentanyl 20 µg/ml y Ketamina 20 mg/ml, programada a 0.5 ml/kg/h durante los procedimientos invasivos e inducción de la lesión pulmonar aguda, y posteriormente a 0.25 ml/kg/h hasta el final del experimento. La parálisis muscular se mantuvo con infusión continua de bromuro de pancuronio 0.25 mg/kg/h durante todo el experimento.

Al momento de la instrumentalización, 1 gramo de cefazolina fue administrado vía i.v. y luego cada 8 horas. Bajo condiciones estériles estrictas, la arteria carótida izquierda y la vena yugular izquierda fueron quirúrgicamente expuestas para la inserción de un catéter. Un catéter de arteria pulmonar se colocó guiado por curvas de presión. Durante el experimento, fueron monitoreados cada hora el electrocardiograma, presión sanguínea arterial, presión de arteria pulmonar, presión de oclusión de arteria pulmonar, gasto cardíaco, frecuencia cardíaca, saturación de oxígeno de pulso y temperatura corporal.

5.2 Grupos (diseño)

Todos los experimentos tomaron aproximadamente cinco horas para la preparación de los animales e inducción de la lesión pulmonar aguda, y luego 24 horas de una fase intervencional para evaluar los efectos de las diferentes estrategias ventilatorias en los niveles relativos plasmáticos, tejido pulmonar y lavado broncoalveolar de VEGF, y su asociación a variaciones de la permeabilidad vascular, desarrollo de daño y edema pulmonar.

Los animales fueron aleatoriamente divididos en 3 grupos:

Grupo 1: control (sin lesión pulmonar aguda), seguido de 24 horas de ventilación mecánica convencional (VM)* (n=6).

Grupo 2: inducción de lesión pulmonar aguda, seguido de 24 horas de ventilación mecánica convencional + ELS (VM)* (n=6).

Grupo 3: inducción de lesión pulmonar aguda, seguido de 24 horas de ventilación mecánica ultraprotectora (Vt 2 ml/kg de peso corporal + ELS) # (n=6).

* VM convencional: ventilación volumen control (VCV), Vt 10 ml/kg de peso corporal, PEEP= 5 cmH₂O, FR= 20/min (ajustada a PaCO₂ 50±5 mmHg), I:E= 1:2; # VM ultraprotectora, ventilación presión control (PCV) 10 cmH₂O, ajustada para lograr un Vt ≤ 2 ml/kg de peso corporal, FR= 5/min, PEEP 5 cmH₂O, relación I:E= 1:1.

5.3 Inducción de lesión pulmonar aguda (depleción de surfactante + ventilación con Vt 35-40 ml/kg de peso corporal)

Se desarrollaron lavados pulmonares salinos (30 ml/kg, a 39°C) en posición supina y prona utilizando una secuencia predeterminada. La VM entre lavados fue con VCV, Vt= 10 ml/kg de peso corporal, PEEP= 5 cmH₂O, FIO₂= 100%. Con un analizador de gases en sangre portátil (i-STAT®-1 immunoready), se midió gasometría en sangre arterial cada 3 lavados. Cuando la tasa de presión parcial de oxígeno en sangre arterial/fracción inspirada de oxígeno (PaO₂/FiO₂) fue inferior a 250, se inició la ventilación a Vt de 35-40 ml/kg de peso corporal, primero en posición prono con PCV, PEEP= 0 cmH₂O, PIP= 35-40 cmH₂O (para lograr Vt de 35-40 ml/kg de peso corporal), FR= 10/min, I:E= 1:1, por 60 min, y luego 60 min en posición supina.

5.4 Soporte pulmonar extracorpóreo

ELS fue proporcionado a través de un sistema veno-venoso. Este sistema estaba compuesto de un oxigenador de fibra hollow HILITE® 7000LT, 1.9 m² (MEDOS, Stolberg, Germany), cánulas reforzadas oxygenatorwire (Bio-Medicus®, Medtronic, MN, USA), y tubuladuras y conectores de cloruro de polivinilo, todos recubiertos de heparina (Carmeda AB). Una bomba centrífuga magnética Medtronic Bio-Medicus® 540, (Eden Prairie, MN, USA) fue utilizada en el bypass del circuito extracorpóreo. El sistema ELS fue cebado con 450 ml de solución salina (NaCl 0.9%). La vena yugular derecha se expuso quirúrgicamente para la colocación de una cánula de drenaje y retorno doble lumen (de 23 French).

La anticoagulación fue inducida con bolos de heparina (100 u/kg i.v.), seguida de infusión continua con un blanco de tiempo de coagulación activada (ACT) de 180-220 segundos (Hemochron® Response, ITC, USA).

Las cánulas fueron conectadas justo antes de iniciar la circulación extracorpórea. El flujo de gas inicial (FiO₂ 100%) del oxigenador fue seteado a 1:1 con el flujo sanguíneo, y luego titulada para mantener una PaCO₂ arterial entre 50 ± 5 mmHg. La evaluación de parámetros hemodinámicos sistémicos (frecuencia cardíaca, presión sanguínea arterial, presión de arteria pulmonar y presión de oclusión de arteria pulmonar), respiratorios e intercambio gaseoso, fueron evaluados al basal, después de inducir la lesión pulmonar (tiempo 0) y cada 3 horas. Gases sanguíneos arteriales fueron analizados.

5.5 Muestras de LBA y plasma

Para obtener fluido de recubrimiento epitelial se desarrollaron lavados broncoalveolares repetidos no broncoscópicos, con 0,5 ml/kg de peso corporal de solución salina caliente (39°C), después de inducida la lesión pulmonar aguda (tiempo 0), y luego a las 3 y 24 horas de iniciada la fase intervencional. En cada tiempo se obtuvieron muestras sanguíneas (3 ml). Las alícuotas permitieron por centrifugación a 4000 rpm, por 10 minutos, la separación del plasma.

Las muestras de plasma y fluido del lavado broncoalveolar, fueron refrigerados a -80°C para el posterior análisis. Además, después de la eutanasia de los animales al final de las 24 horas, se obtuvieron muestras de tejido para evaluar los niveles de VEGF en el homogeneizado pulmonar.

5.6 Eutanasia y muestras de tejido

Al final de la fase intervencional (24 horas) a los animales se les realizó eutanasia bajo anestesia profunda (Tiopental: 2 gramos dosis total, endovenosa), por una inyección de cloruro de potasio 30 meq i.v., para posteriormente desarrollar una toracotomía. El pulmón fue escindido en bloque.

Muestras de tejido pulmonar representativas de cada lóbulo del pulmón derecho fueron disecadas. De cada lóbulo, un fragmento fue separado y fijado en formalina por 24 horas y sumergidos en parafina, mientras que otros fragmentos se almacenaron a -80°C para su posterior análisis.

5.7 Eliminación de desechos

Se rigieron de acuerdo a las normas de bioseguridad del CIM de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Los animales fueron depositados dentro de bolsas con rótulo de material contaminado, siendo retirados por personal de aseo e higiene para su posterior cremación por una empresa externa.

5.8 Medición de VEGF (Western Blot)

El tejido pulmonar congelado fue cortado, homogeneizado y centrifugado, mientras que las muestras de LBA y plasma fueron procesadas como se describe en el punto 4.5, para luego determinar la concentración de proteínas (sobrenadante) mediante el método descrito en el punto 4.9 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif). El tejido pulmonar se homogeneizó en 3 ml de buffer de lisis [150 mM NaCl, 1.0% Nonidet P-40 (NP-40), 50 mM Tris-Cl, ajustado a un pH 7.4], transferido a un tubo eppendorff y colocado en hielo durante 15 minutos. Los tubos fueron centrifugados a 14.000 rpm durante 10 min a 4° C y el sobrenadante fue rápidamente congelado.

El lisado celular, así como las muestras de LBA y plasma fueron resueltas en un gel de poliacrilamida (con buffer de carga al 2x), y se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa (eBlot™, Protein Transfer System). Posteriormente la membrana de nitrocelulosa fue bloqueada en leche semidescremada al 5% durante una hora, para luego realizar 3 lavados de 10 minutos cada uno con *wash buffer* (PBS 1x + Nonidet P 40 al 0,1%). Acto seguido la membrana fue incubada con el anticuerpo primario (anticuerpo policlonal VEGF; dilución 1:1000) durante toda la noche, para al día siguiente volver a realizar 3 lavados con *wash buffer*

de 10 minutos cada uno, y luego incubar con el anticuerpo secundario por 1 hora (anti *Rabbit* para VEGF, dilución 1:10000); anti *mouse* para GADPH, dilución 1:5000), y nuevamente 3 lavados de 10 minutos cada uno con *wash buffer*.

Los inmunoblots se desarrollaron por aumentos de la quimioluminiscencia (CCD Digital Imaging).

5.9 Permeabilidad vascular pulmonar (proteína total del LBA)

La concentración total de proteínas en el LBA se determinó con el Kit de ensayo de proteínas Bio-Rad Dc (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif). Este ensayo está basado en el método de Bradford, para el cual se prepararon 5 diluciones de solución estándar de proteína (albúmina suero bovino: BSA), las que eran representativas de la solución de proteínas evaluadas. Luego, se agregaron 100 µl de cada solución estándar y muestras de LBA en tubos de ensayo, para posteriormente agregar 100 µl del colorante reactivo *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (azul brillante de Coomassie G-250) a cada tubo y agitarlo en un vortex. Se incubaron a temperatura ambiente por 5 minutos y subsecuentemente se midió la absorbancia a 595 nm con un espectrofotómetro (39, 40).

5.10 Edema pulmonar (tasa peso húmedo/seco pulmonar)

Fragmentos de cada lóbulo del pulmón izquierdo fueron pesados y luego mantenidos por 3 días a 50°C, para calcular el edema pulmonar gravimétrico (tasa peso húmedo/seco) (39).

5.11 Daño pulmonar (histopatología)

En cada muestra de tejido pulmonar, después de la tinción con hematoxilina eosina, 5 campos seleccionados aleatoriamente fueron magnificados a 200x y analizados por un patólogo ciego al grupo animal.

Cinco variables histológicas de lesión pulmonar fueron evaluadas: a) infiltrados de neutrófilos intra-alveolar, b) infiltrado de neutrófilos intersticial, c) infiltrados de neutrófilos peri-venosos, d) congestión pulmonar y e) hemorragia intra-alveolar. Cada variable fue graduada desde 0 a 3 (score total 0-1) (39).

5.12 Análisis estadístico

El presente trabajo es parte de un proyecto más amplio (Fondecyt 1130428), que se desarrolla desde el año 2013 a la fecha. En dicho proyecto el número de animales por grupo se calculó en base a la diferencia esperada para interleuquina-8 (IL-8) en lavado broncoalveolar. Aunque se reportan valores variables en la literatura de acuerdo a las características particulares del modelo, la desviación estándar de IL-8 en muestras de lavado broncoalveolar generalmente corresponde a 15-25% de la media. Para detectar diferencias de 33% en los valores de la media entre los grupos, considerando una desviación estándar de 20% de la media, y asumiendo una tasa de error tipo I de 5% y una potencia estadística de 80%, se calculó que 6 animales serían requeridos por grupo. Al no disponer de valores de VEGF en cerdos con lesión pulmonar aguda, no es posible calcular la potencia estadística para encontrar diferencias en este marcador, y en esa perspectiva el presente proyecto enfocado en VEGF puede considerarse un piloto.

El análisis estadístico y confección de los gráficos se realizó con el programa GraphPad Prism ® para windows versión 6.01. La normalidad de los datos para las variables numéricas se determinó con la prueba Shapiro Wilk, y la homogeneidad de varianzas con el test de Levene.

Los resultados para las variables numéricas se expresan en medias \pm desviación estándar. Para la comparación intra grupos de las variables numéricas se utilizó Anova para medidas repetidas, y Anova para muestras independientes para la comparación entre grupos (prueba de comparación múltiple de Tukey). Para la comparación entre grupos de la variable numérica que representa un score, se utilizó la prueba de Kruskal Wallis (prueba de comparación múltiple de Dunn). Para determinar la asociación de variables (numéricas-numéricas) se utilizó la correlación muestral de Pearson.

Un $p < 0.05$ es considerado como estadísticamente significativo.

6. RESULTADOS

Animales – grupos

Seis cerdos machos y doce cerdos hembra, con edad de desarrollo de 3 a 6 meses, fueron aleatoriamente divididos a uno de los siguientes grupos: sin LPA y VM con Vt de 10 ml/kg de peso corporal (G1), inducción de LPA y VM con Vt de 10 ml/kg de peso corporal + ELS (G2),

e inducción de LPA y VM con Vt de 2 ml/kg de peso corporal + ELS (G3). Sus características basales se resumen en la tabla 1.

	Sin LPA VM Vt 10 Grupo 1 (n: 6)	LPA – VM Vt 10 + ELS Grupo 2 (n: 6)	LPA – VM Vt 2 + ELS Grupo 3 (n: 6)
Peso (kg)	33 ± 5,8	31,3 ± 2,9	28,8 ± 1,2
Frecuencia cardíaca (lpm)	102,8 ± 28,2	68,2 ± 23,4	88,8 ± 14,8
Presión arterial media (mmHg)	94 ± 24	102 ± 16,5	94,7 ± 15,4
Saturación O ₂ de pulso (%)	96,8 ± 1,3	99,5 ± 0,6 *	95,7 ± 2 #
Temperatura (°C)	36,5 ± 0,95	36,3 ± 1,1	35,7 ± 1,1
Fracción inspirada de O ₂ (%)	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
PaO ₂ (mmHg)	379,7 ± 91,7	368,2 ± 71,7	383,7 ± 144,3
PaCO ₂ (mmHg)	34,4 ± 1,9	39 ± 5	42,3 ± 8,5
pH	7,58 ± 0,1	7,53 ± 0,1	7,5 ± 0,1
BIC real (mEq/l)	32,1 ± 2,2	32,5 ± 3,1	32,6 ± 2,6
Exceso de bases (mEq/l)	10,3 ± 3,2	9,7 ± 4,1	9,5 ± 2,9
Lactato (mmol/l)	1,5 ± 0,4	1,4 ± 0,3	1,1 ± 0,1
Hematocrito (%)	27 ± 1,7	21 ± 5,6	22 ± 3,9
Hemoglobina (gr/dl)	9,2 ± 0,6	7,2 ± 1,9	7,5 ± 1,3
Sodio (mEq/l)	140,7 ± 0,6	140,2 ± 2,8	144 ± 5,1
Potasio (mEq/l)	3,5 ± 0,1	3,4 ± 0,3	3,5 ± 0,4
Gasto cardíaco (lt/min)	-	3 ± 0,6	2,3 ± 0,3
Presión media arteria pulmonar (mmHg)	21 ± 2,5	21,2 ± 2,1	17,8 ± 3,4

Tabla 1. Características basales por grupo. * Diferencia G2 versus G1 (p=0.0012), #Diferencia G3 versus G2 (p=0.0009). LPA: lesión pulmonar aguda, VM: ventilación mecánica, Vt: volumen corriente. Los datos están en medias ± Desviación estándar (DS)

Al basal, la saturación de oxígeno era significativamente menor en el grupo 1 y 3, en comparación al grupo 2 (p=0.0012; p=(0.0009) (G1: 96,8 ± 1,3%; G2: 99,5 ± 0,6%; G3: 95,7 ± 2%) (Tabla 1).

Luego de la inducción de la LPA, el porcentaje de sobrevivida de los cerdos que completan el tiempo total de intervención del experimento para el grupo 1 fue de 100%, grupo 2 66% y grupo 3 100% (Figura 2).

Porcentaje de supervivencia: supervivencia de G1, G2 y G3

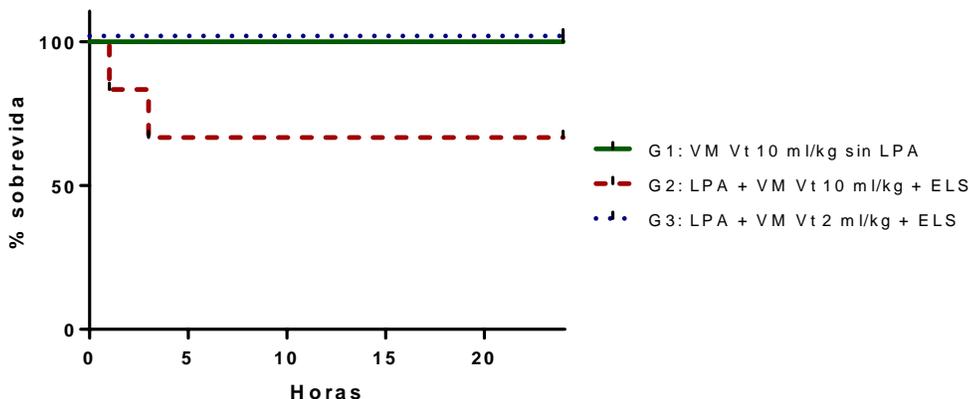


Figura 2. Curvas Kaplan Meier. Supervivencia de los animales del grupo 1, 2 y 3 durante el período de intervención

Permeabilidad vascular pulmonar (concentración total de proteínas en LBA)

En la comparación intragrupos no se observan diferencias en la concentración de proteínas en LBA para los grupos 1 y 3 entre los tiempos 0, 3 y 24 horas. Para el grupo 2 se observan diferencias en la concentración de proteínas en LBA en los tiempos 3 y 24 horas versus el tiempo 0 ($p=0.0003$; $p=0.0416$) (G2 T0: $13,5 \pm 10,1$ mg/ml; G2 T3: $65,3 \pm 39,3$ mg/ml; G2 T24: $55,1 \pm 28,5$ mg/ml) (Figura 3).

En la comparación entregupos se observan diferencias en la concentración de proteínas en LBA para los tiempos 3 y 24 horas entre los grupos 1 y 2 ($p=0.0009$; $p=0.0100$) (G1 T3: $1 \pm 0,4$ mg/ml; G1 T24: $5,8 \pm 2,4$ mg/ml; G2 T3: $65,3 \pm 39,3$ mg/ml; G2 T24: $55,1 \pm 28,5$ mg/ml) (Figura 3).

Concentración de proteínas LBA

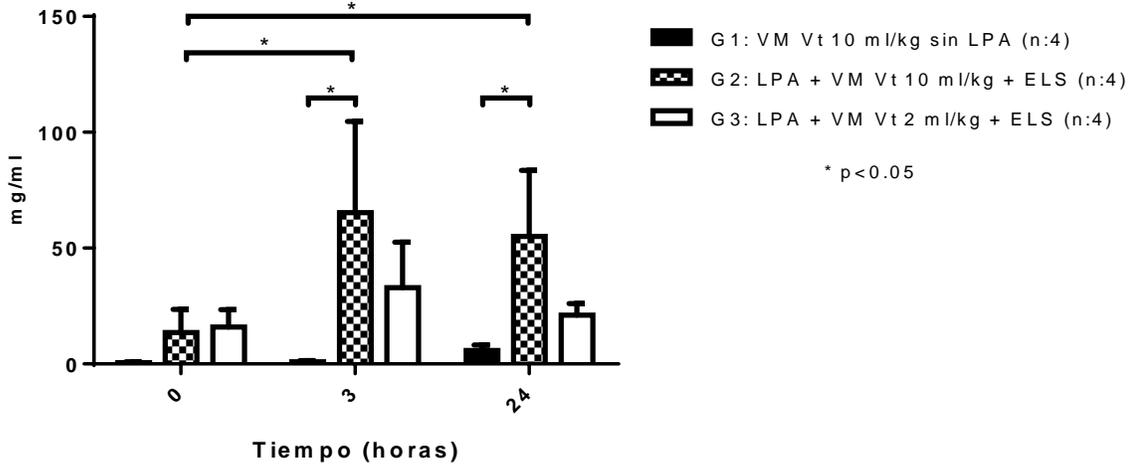


Figura 3. Concentración de proteínas en el lavado broncoalveolar (LBA) para los grupos 1, 2 y 3 en los tiempos 0, 3 y 24 hrs. Los datos están en medias \pm Desviación estándar (DS)

Edema pulmonar (tasa peso húmedo/seco pulmonar)

En la comparación entregrupos, la tasa peso húmedo/seco del pulmón izquierdo aumenta significativamente en comparación al grupo 1 en los grupos 2 y 3 ($p=0.0072$) (G1: $5 \pm 1,3$; G2: $7,2 \pm 0,5$; G3: $7,3 \pm 1,1$), sin diferencias entre los grupos 2 y 3 (Figura 4).

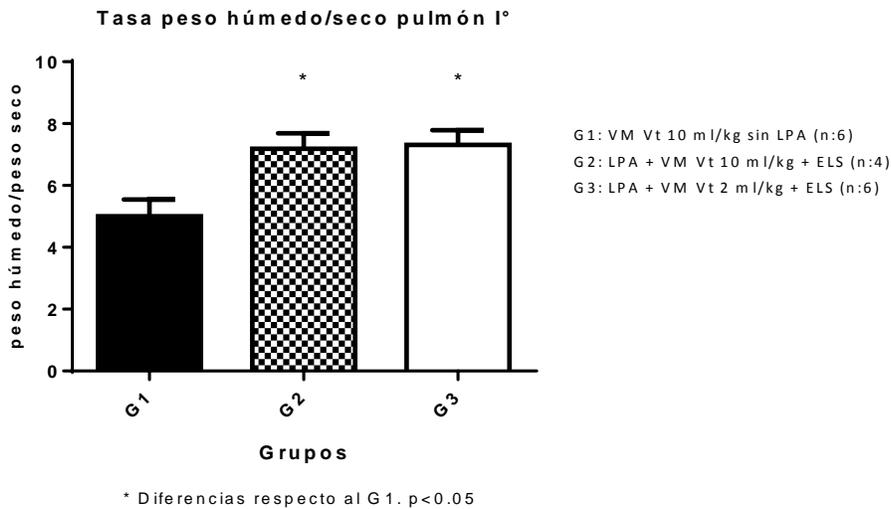
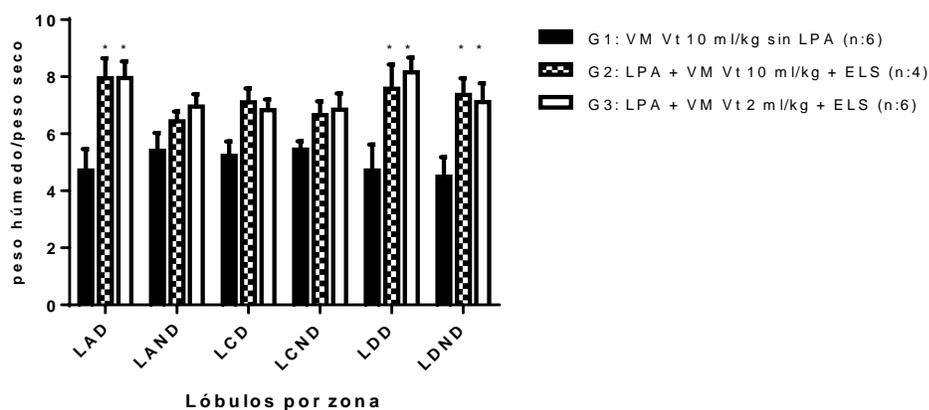


Figura 4. Tasa peso húmedo/seco del pulmón izquierdo para los grupos 1, 2 y 3. Los datos están en medias \pm Desviación estándar (DS)

En la comparación entregrupos, la tasa peso húmedo/seco por lóbulos y zonas (dependiente y no dependiente) del pulmón izquierdo aumenta significativamente en comparación al grupo 1 en los grupos 2 y 3, en los lóbulos apical zona dependiente (LAD) ($p < 0.0001$), y diafragmático zonas dependiente (LDD) ($p < 0.0001$) y no dependiente (LDND) ($p < 0.0001$) (LAD. G1: $4,7 \pm 1,8$; G2: $7,9 \pm 0,7$; G3: $8 \pm 1,3$; LDD. G1: $4,7 \pm 2,2$; G2: $7,6 \pm 0,8$; G3: $8,2 \pm 1,2$; LDND. G1: $4,5 \pm 1,7$; G2: $7,4 \pm 0,6$; G3: $7,1 \pm 1,5$) (Figura 5).

Tasa peso húmedo/seco por lóbulos del pulmón I°



* Diferencias respecto al G1, para el mismo lóbulo y por zona. $p < 0.05$

LAD: lóbulo apical zona dependiente; LAND: lóbulo apical zona no dependiente; LCD: lóbulo cardíaco zona dependiente; LCND: lóbulo cardíaco zona no dependiente; LDD: lóbulo diafragmático zona dependiente; LDND: lóbulo diafragmático zona no dependiente.

Figura 5. Tasa peso húmedo/seco del pulmón izquierdo por lóbulos para los grupos 1, 2 y 3. Los datos están en medias \pm Desviación estándar (DS)

Daño pulmonar (histopatología)

En la comparación entregrupos, el score de daño pulmonar del lóbulo cardíaco dependiente del pulmón izquierdo aumenta significativamente en comparación al grupo 1 en los grupos 2 y 3 ($p = 0.0003$) (G1: $0,2 \pm 0,2$; G2: $0,9 \pm 0,1$; G3: $0,6 \pm 0,2$), sin diferencias entre los grupos 2 y 3 (Figura 6B).

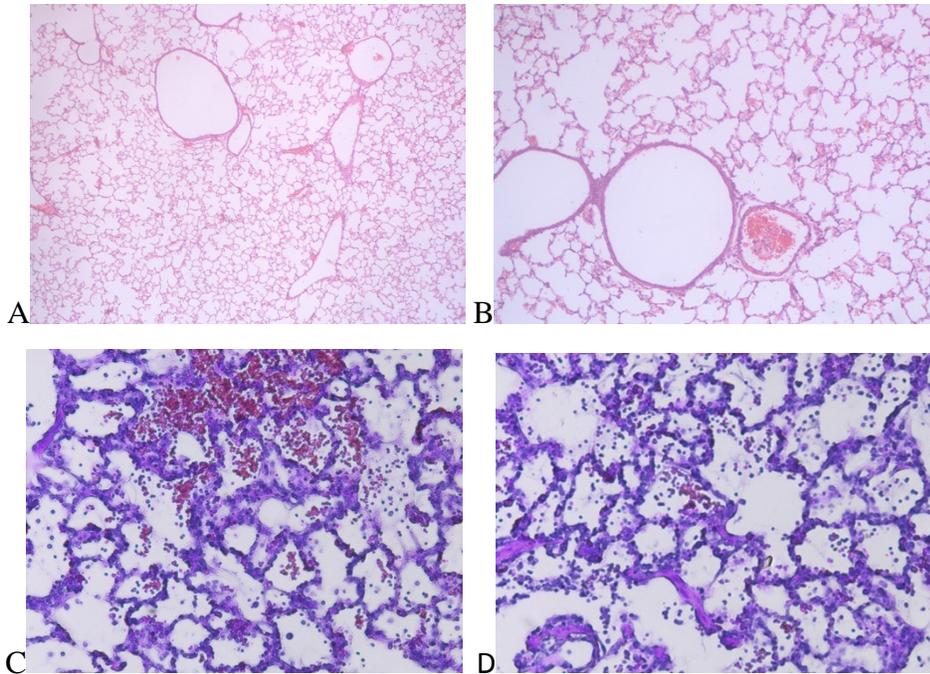


Figura 6A. Histología de pulmón (lóbulo cardíaco dependiente) de un animal del grupo 1 (imagen A y B) y grupo 2 (imagen C y D). En la imagen C es posible apreciar la hemorragia alveolar (flecha), y en la imagen D la formación de membranas hialinas (flecha)

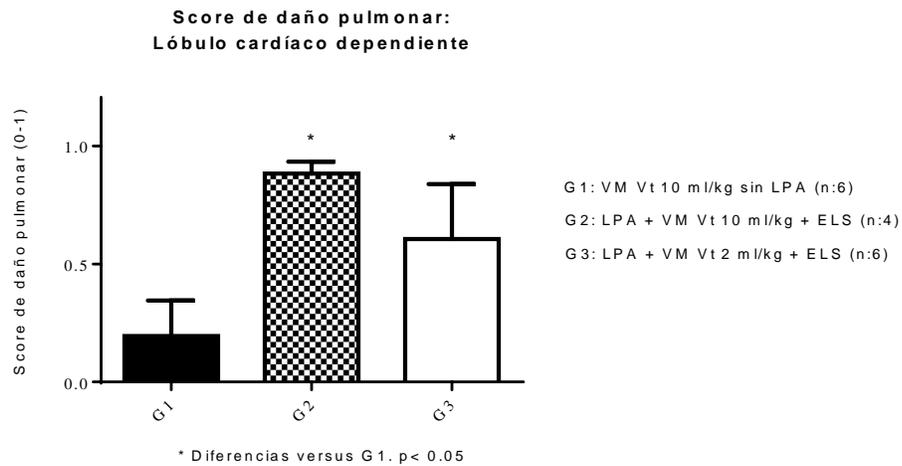


Figura 6B. Score de daño pulmonar histológico del lóbulo cardíaco dependiente para los grupos 1, 2 y 3. Los datos están en medias \pm Desviación estándar (DS)

En la comparación entregupos, el score de daño pulmonar del lóbulo cardíaco no dependiente del pulmón izquierdo aumenta significativamente en comparación al grupo 1 en los grupos 2 y 3 ($p=0.0068$) (G1: $0,2 \pm 0,1$; G2: $0,6 \pm 0,1$; G3: $0,6 \pm 0,2$), sin diferencias entre los grupos 2 y 3 (Figura 7).

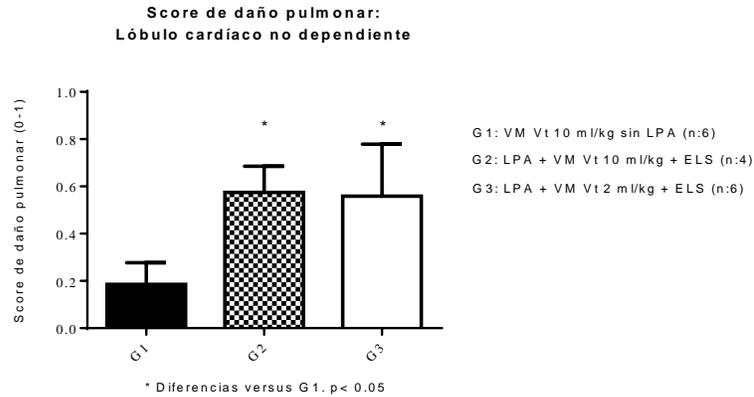


Figura 7. Score de daño pulmonar histológico del lóbulo cardíaco no dependiente para los grupos 1, 2 y 3. Los datos están en medias \pm Desviación estándar (DS)

VEGF plasmático (Western Blot)

En la comparación entre grupos, los niveles relativos plasmáticos de VEGF al tiempo 0 no presentan diferencias significativas entre los grupos 1, 2 y 3 (normalizados al grupo 1; G2: $1,1 \pm 0,1$; G3: $1 \pm 0,3$) (Figura 8A).

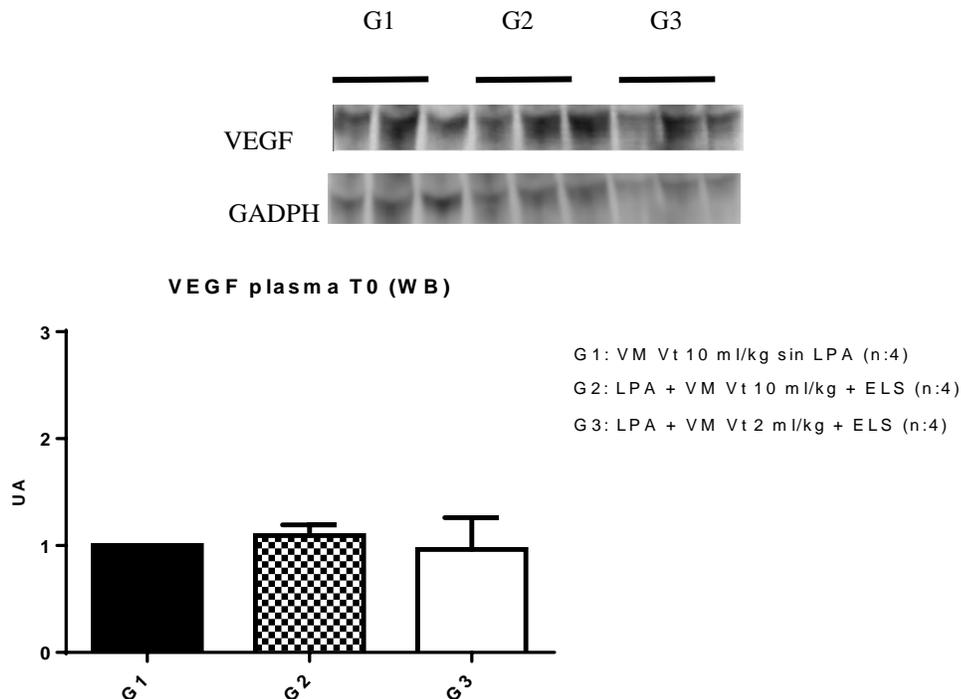


Figura 8A. Western blot de VEGF plasmático al tiempo 0 (T0) para los grupos 1, 2 y 3. Los niveles de VEGF para los grupos 2 y 3 están expresados según la variación relativa en comparación al grupo 1 (promedio del análisis de 4 animales por grupo). Los datos están en medias \pm Desviación estándar (DS). UA: unidades arbitrarias; GADPH (Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa): control de carga.

En la comparación entre grupos, los niveles relativos plasmáticos de VEGF al tiempo 3 no presentan diferencias significativas entre los grupos 1, 2 y 3 (normalizados al grupo 1; G2: $0,8 \pm 0,3$; G3: $0,7 \pm 0,3$) (Figura 8B).

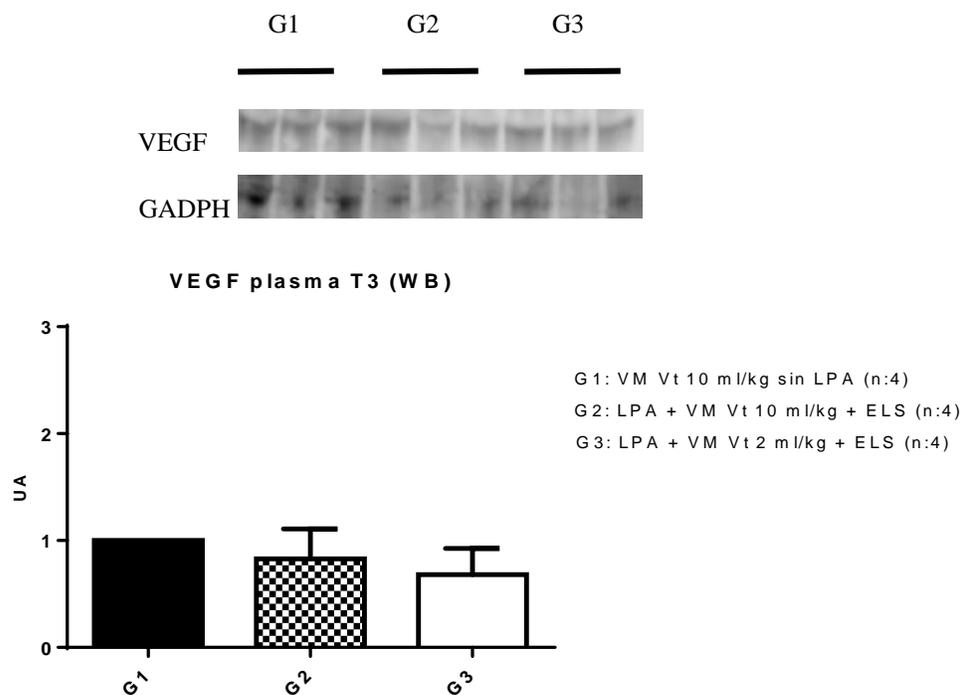


Figura 8B. Western blot de VEGF plasmático al tiempo 3 (T3) para los grupos 1, 2 y 3. Los niveles de VEGF para los grupos 2 y 3 están expresados según la variación relativa en comparación al grupo 1 (promedio del análisis de 4 animales por grupo). Los datos están en medias \pm Desviación estándar (DS). UA: unidades arbitrarias; GADPH (Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa): control de carga.

En la comparación entre grupos, los niveles relativos plasmáticos de VEGF al tiempo 24 no presentan diferencias significativas entre los grupos 1, 2 y 3 (normalizados al grupo 1; G2: $1,4 \pm 0,5$; G3: $1,3 \pm 0,6$) (Figura 8C).

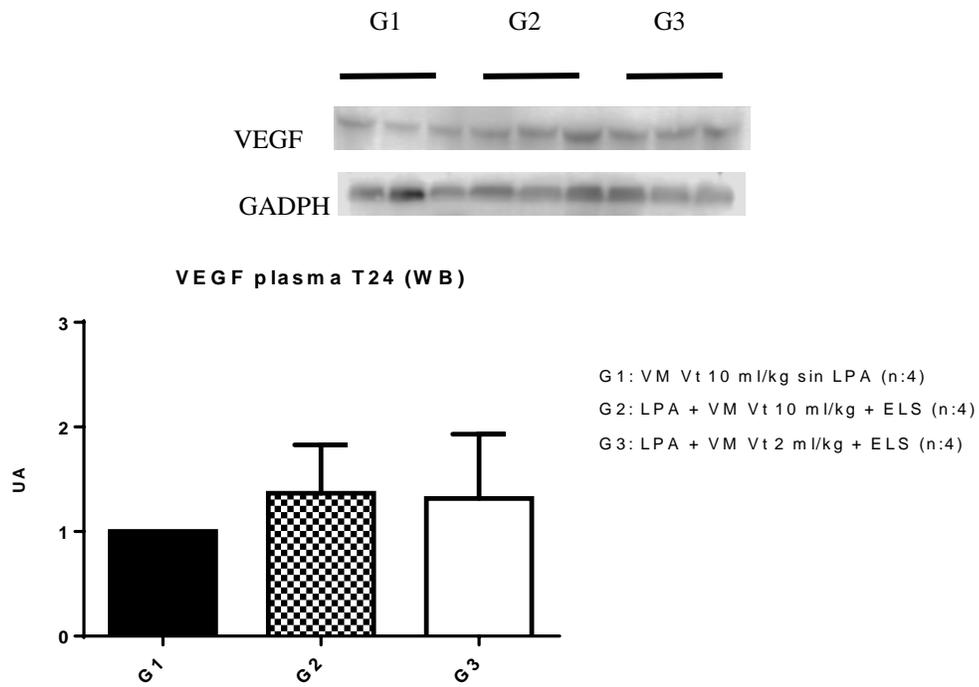
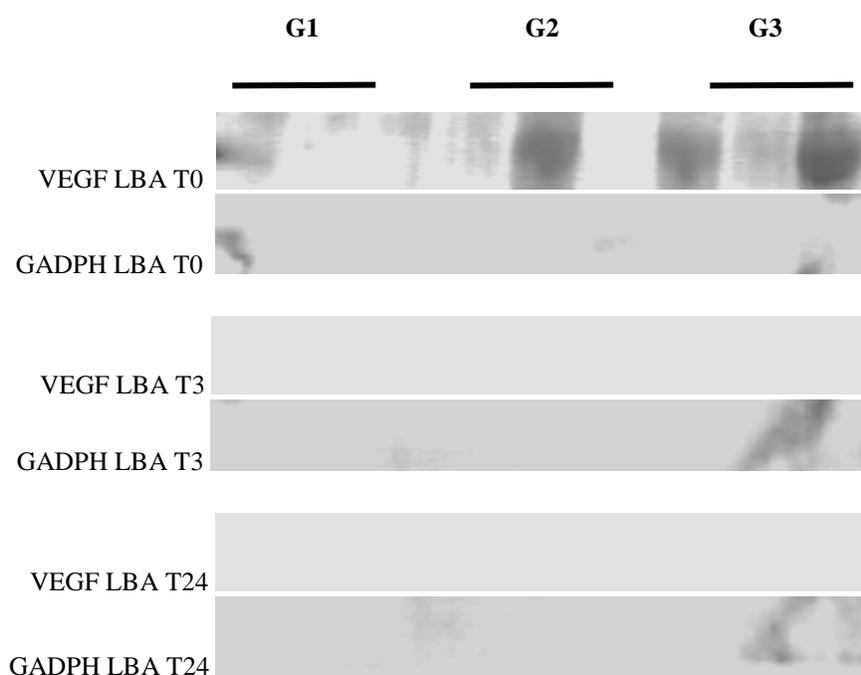


Figura 8C. Western blot de VEGF plasmático al tiempo 24 (T24) para los grupos 1, 2 y 3. Los niveles de VEGF para los grupos 2 y 3 están expresados según la variación relativa en comparación al grupo 1. Los datos están en medias \pm Desviación estándar (DS). UA: unidades arbitrarias; GADPH: control de carga.

VEGF LBA (Western Blot)

En las muestras de lavado broncoalveolar (miniLBA) no se obtuvo señal a través de la técnica de Western Blot para ninguno de los tiempos evaluados (T0, T3 y T24).



Western blot de VEGF en el lavado broncoalveolar (LBA) al tiempo 0 (T0), 3 (T3) y 24 horas (T24) para los grupos 1, 2 y 3.

VEGF en el homogeneizado de pulmón (Western Blot)

En la comparación entre grupos, los niveles relativos de VEGF en el homogeneizado de pulmón del lóbulo cardíaco no dependiente no presentan diferencias significativas entre los grupos 1, 2 y 3 (normalizados al grupo 1; G2: $0,8 \pm 0,2$; G3: $0,5 \pm 0,1$) (Figura 9).

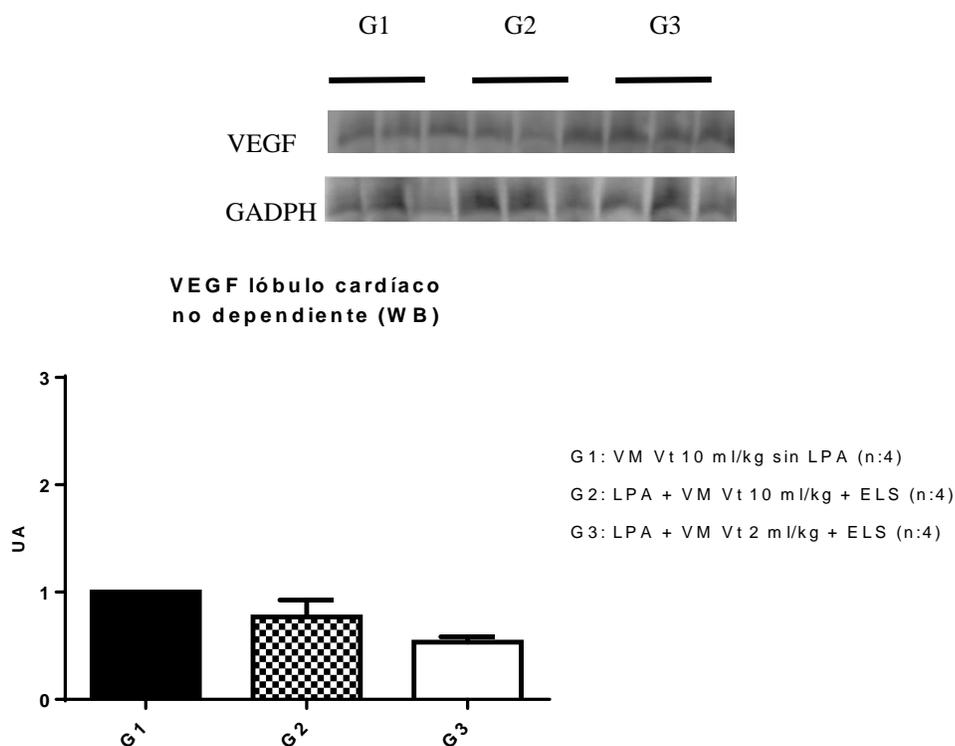


Figura 9. Western blot de VEGF en el homogeneizado de tejido pulmonar del lóbulo cardíaco no dependiente para los grupos 1, 2 y 3. Los niveles de VEGF para los grupos 2 y 3 están expresados según la variación relativa en comparación al grupo 1. Los datos están en medias \pm Desviación estándar (DS). UA: unidades arbitrarias; GADPH: control de carga.

Asociación niveles de VEGF y variaciones de la permeabilidad vascular, edema y daño pulmonar

No se observó una asociación entre los niveles relativos de VEGF plasmáticos (tiempos 0, 3 y 24 horas), homogeneizado de tejido pulmonar del lóbulo cardíaco zona no dependiente, y concentración de proteínas en LBA, tasa peso húmedo/seco del pulmón izquierdo, y score de daño pulmonar histológico, para los grupos 1, 2 y 3 respectivamente ($p < 0.05$).

7. DISCUSIÓN

Modelo de lesión pulmonar aguda, permeabilidad vascular, edema y daño pulmonar

En el presente estudio se observó un porcentaje de supervivencia de 66% en el grupo de cerdos con lesión pulmonar aguda ventilados con una estrategia ventilatoria convencional más ELS, mientras que en los grupos de cerdos sin LPA y VM convencional, y cerdos con LPA ventilados con una estrategia ventilatoria ultraprotectora más ELS, el 100% de los animales

completó el período total de estudio (24 horas). Los animales que fallecieron desarrollaron hipoxemia severa una vez finalizada la inducción de la lesión pulmonar, disfunción circulatoria progresiva con aumento en los requerimientos de drogas vasoactivas e hiperlactatemia. Si bien no existió una causa clara para el desarrollo del *Shock*, es posible que una baja capacidad de transporte de oxígeno, dado el bajo nivel de hematocrito y hemoglobina basal en estos cerdos (Hematocrito: 18% y 17%; Hemoglobina: 6,1 y 5,8 mg/dl respectivamente), determinara una caída en la capacidad de transporte de oxígeno, que sumada a la severa alteración del intercambio gaseoso (hipoxemia) contribuyeran a la caída del aporte de O₂ a los tejidos. Además, los animales en los cuales se indujo LPA y fueron ventilados con una estrategia ventilatoria convencional sin ELS, el 66% falleció antes de completar el período total de estudio (4 animales), por lo que la conexión a un sistema externo de oxigenación y remoción de CO₂ permitió mejorar la sobrevida de estos animales en un 33%. Es por ello que se incluye finalmente en este estudio un grupo de cerdos con inducción de LPA ventilados con una estrategia ventilatoria convencional más ELS, ya que el número de animales que logró sobrevivir al período total de intervención es mayor (4 versus 2) (Figura 10).

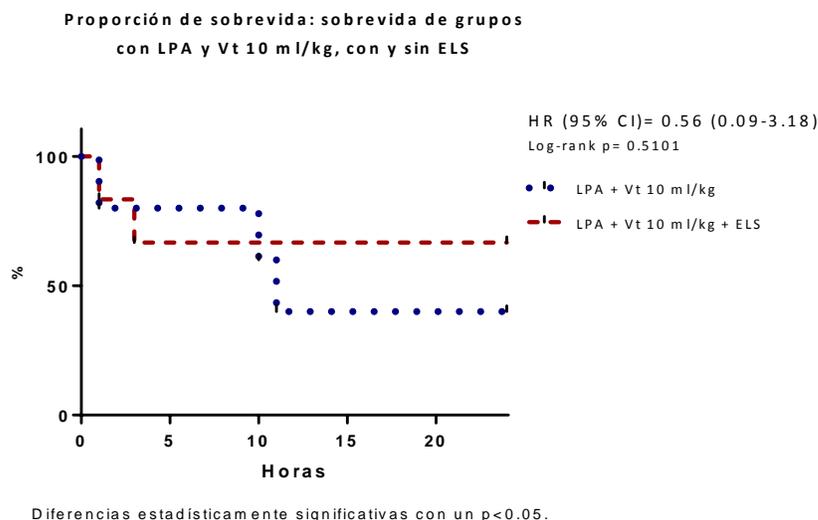


Figura 10. Curvas Kaplan Meier. Sobrevida de los animales del grupo con inducción de LPA y VM convencional sin ELS, y grupo con inducción de LPA y VM convencional más ELS durante el período de intervención

Sin embargo, para el análisis de los niveles relativos de VEGF en plasma, LBA y tejido pulmonar, se utilizaron muestras de solo 4 animales por grupo, debido a la disponibilidad de cada una de ellas por uso para otros estudios.

Por otra parte, se observó un aumento significativo de la concentración de proteínas en el lavado broncoalveolar en los grupos de cerdos con lesión pulmonar aguda ventilados con una estrategia ventilatoria convencional, en comparación al grupo control, en los tiempos 3 y 24 horas post inducción de la lesión. A su vez, este mismo grupo de cerdos presentó un aumento significativo en la concentración de proteínas en el LBA en los tiempos 3 y 24 horas versus el tiempo 0, datos que dan cuenta que en dicho grupo existió un aumento de la permeabilidad vascular pulmonar en comparación al grupo control y grupo con LPA ventilados con una estrategia ultraprotectora más ELS. Además, los grupos de cerdos con LPA ventilados con una estrategia convencional y ultraprotectora más ELS, presentaron una tasa peso húmedo/seco mayor en comparación al grupo control, resultados que sugieren la presencia de edema pulmonar. Cuando se realiza el análisis por lóbulos y zonas (dependiente y no dependiente) se aprecia una tendencia al aumento tanto en los lóbulos apical, cardíaco y diafragmático, siendo significativa esta diferencia en los lóbulos apical zona dependiente, y diafragmático zonas dependiente y no dependiente. A su vez, en comparación al grupo control, los grupos de cerdos con lesión pulmonar aguda ventilados con una estrategia convencional y ultraprotectora más ELS, presentaron un mayor score de daño pulmonar histológico en el lóbulo cardíaco del pulmón izquierdo, zonas dependiente y no dependiente, evidenciando formación de membranas hialinas, hemorragia alveolar e infiltrado celular inflamatorio. Clínicamente, estos animales experimentaron al tiempo 0 una caída significativa de la oxigenación (hipoxemia severa), alteración del intercambio gaseoso (tasa PaO_2/FiO_2) y distensibilidad pulmonar versus el grupo control (Figuras 11 y 12), mientras que la conexión al sistema ELS permitió una mejoría de la oxigenación (aumento de la PaO_2) y eliminación de CO_2 .

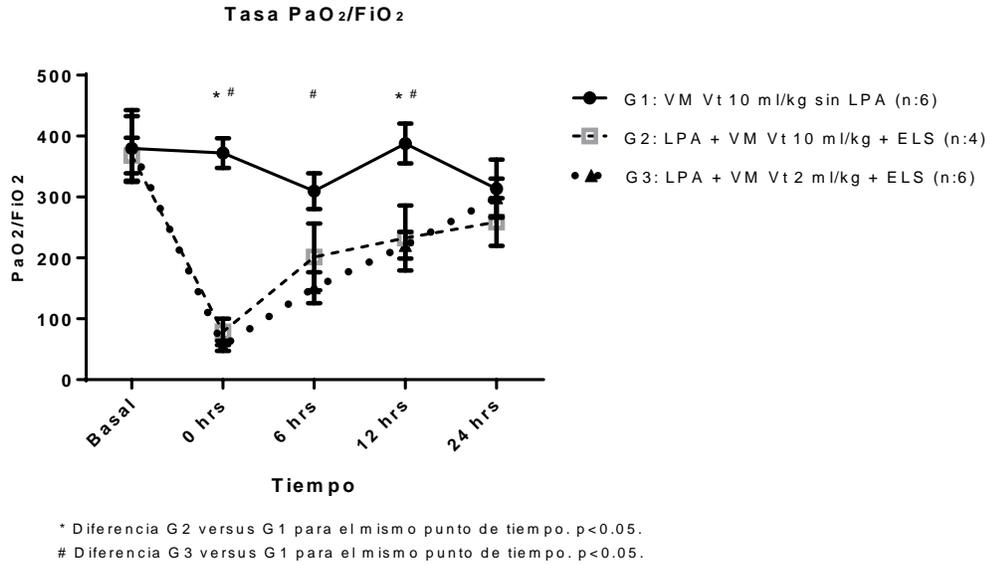


Figura 11. Tasa PaO₂/FiO₂ de los animales del grupo 1, 2 y 3 al basal y tiempos 0, 6, 12 y 24 horas

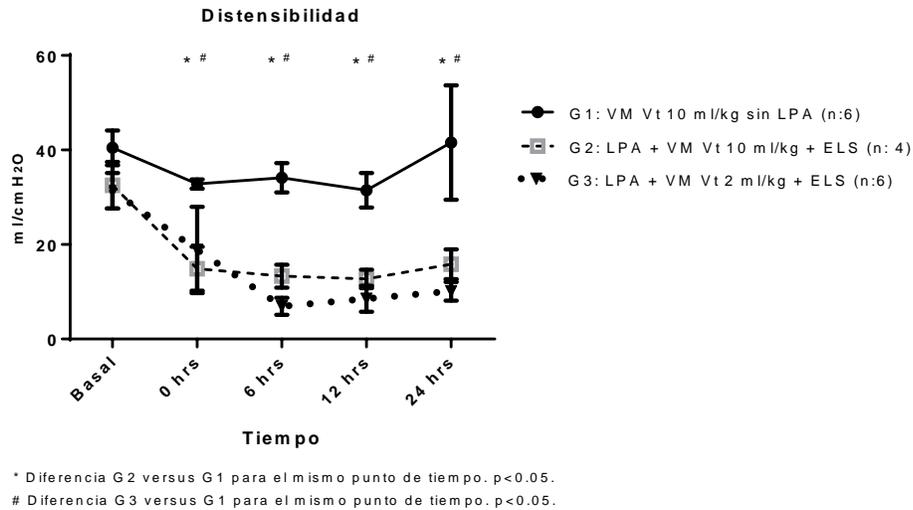


Figura 12. Distensibilidad del sistema respiratorio de los animales del grupo 1, 2 y 3 al basal y tiempos 0, 6, 12 y 24 horas

Estos resultados reflejan que este modelo de inducción de lesión pulmonar aguda no solo altera el intercambio gaseoso y la mecánica respiratoria, sino que sugieren que existe aumento de la permeabilidad vascular, edema y daño pulmonar, evidenciado por los aumentos de la concentración de proteínas en LBA, tasa peso húmedo/seco pulmonar y daño pulmonar histológico.

Varios modelos animales de SDRA han sido desarrollados, pero ninguno de ellos es capaz de reproducir completamente las características del SDRA humano. Los modelos más validados son con lavados repetidos, ácido oleico y endotoxina. Sin embargo, varias limitaciones son comunes a todos los modelos de SDRA (41, 42). Los modelos de lavados con solución salina, al inactivar el surfactante y promover atelectasias, induce hipoxemia rápida y disminución de la distensibilidad. Su principal limitación es que induce muy pocos cambios en la permeabilidad o inflamación pulmonar. No obstante, cuando es seguida por una ventilación que es capaz de generar daño, el pulmón patológico exhibe marcada inflamación y lesión tisular (41). En la presente propuesta se aplicó a los modelos de lavado salino una ventilación con V_t de 35-40 ml por kilo de peso corporal y bajo PEEP (0-5 cmH₂O). Además, modelos en animales grandes tienen gran potencial traslacional clínico debido a la habilidad de medir el intercambio gaseoso y la hemodinamia sistémica y pulmonar. Para este propósito se utilizó un modelo de cerdos, ya que han sido el animal preferido para evaluar los efectos de la VM sobre la función pulmonar en el SDRA (43-49). A su vez, este modelo experimental animal es más adecuado para estudiar el impacto de la VM ultraprotectora, la cual requiere ir asociada al empleo de técnicas de soporte vital extracorpóreo. Realizar estas técnicas en animales más pequeños es tremendamente complejo y más caro por la necesidad de recurrir a equipos miniaturizados. Adicionalmente, en los animales más pequeños existen limitaciones para poder mantener un monitoreo fisiológico avanzado (50).

Niveles relativos de VEGF

En nuestro estudio no observamos diferencias en los niveles relativos de VEGF en plasma y homogenizado de tejido pulmonar, evaluados mediante Western blot, en los grupos de cerdos con LPA ventilados con una estrategia ventilatoria convencional y ultraprotectora más ELS, en comparación al grupo control, mientras que en las muestras de LBA no obtuvimos señal de VEGF evaluado con esta técnica. La propuesta original incluía medir los niveles de VEGF en las muestras ya señaladas mediante la técnica de test ELISA, la que desarrollamos sin obtener resultados, además de que los niveles medidos en un escaso número de muestras se encontraban en los límites bajos de detección, siendo por ende poco confiables. Como este es un estudio piloto en un modelo de cerdos con los objetivos ya señalados, el cual como tal no está descrito ni protocolizado en la literatura, y considerando la costo efectividad para encontrar una señal

que justifique continuar la investigación en esta área, es que se decidió utilizar otra técnica para evaluar ahora los niveles relativos de VEGF en los distintos compartimentos.

Estudios clínicos observacionales en humanos han confirmado una elevación de los niveles plasmáticos de VEGF y una disminución en los niveles en el fluido de recubrimiento epitelial en estados tempranos de SDRA, con normalización de ambos durante la recuperación del daño pulmonar (1). Varias teorías han sido propuestas en la literatura para explicar las diferencias de niveles de VEGF en los distintos compartimentos, siendo la más plausible la teoría de la descompartimentalización producto de la disrupción de la membrana alvéolo capilar, que crearía un gradiente transepitelial de VEGF (1). El no encontrar diferencias en los niveles de VEGF plasmáticos en comparación al grupo control, en los grupos de animales ventilados con una estrategia ventilatoria convencional y ultraprotectora más ELS, descarta en este modelo la teoría de liberación de VEGF desde el compartimento intrapulmonar (51), a pesar de que existió evidente daño pulmonar histológico en los grupos de cerdos con LPA. Por otra parte, como fuente predominante, la lesión directa y pérdida de las células epiteliales tipo 2 puede reducir la producción de VEGF, ya que la reducción de la celularidad debido a apoptosis ha sido observada en SDRA (52, 53). Sin embargo, en nuestro modelo tampoco existió diferencias en los niveles relativos de VEGF en el homogenizado de tejido pulmonar en los cerdos con LPA ventilados con una estrategia convencional y ultraprotectora más ELS, en comparación al grupo control.

Como no existen diferencias en los niveles relativos de VEGF en las muestras de plasma y homogeneizado de tejido pulmonar en los distintos grupos, no es posible atribuir los cambios evidenciados en la concentración de proteínas en el LBA y tasa peso húmedo/seco pulmonar a VEGF en el presente modelo de lesión pulmonar aguda.

Una de las limitaciones del presente estudio está relacionada probablemente a las técnicas empleadas, ya que en las muestras de LBA no detectamos señal de VEGF para ninguno de los grupos, lo que consideramos podría en parte estar determinado por la dilución de las muestras obtenidas por técnica de miniBAL, una limitación inherente a esta última (54). A través de la técnica de miniBAL se obtienen muestras de lavado broncoalveolar por succión y recuperación de la solución salina (0,5 ml/kg de peso) infundida a través del tubo orotraqueal, la cual se realiza de manera ciega, sin visión broncoscópica. Por lo tanto, no es posible asegurar el sitio de obtención de la muestra ni cuánto es efectivamente, del volumen total recuperado,

fluido de recubrimiento epitelial alveolar. Ello es corroborado por el elevado factor de dilución de nuestras muestras, obtenido por la tasa de urea plasmática/urea LBA (Factor de dilución: 5-6). Apoya además nuestra teoría que al realizar un Dot blot de una muestra de plasma del tiempo 0 de un cerdo del grupo 3 (LPA + VM ultraprotectora + ELS) y sus respectivas diluciones (x10, x100, x1000), se observó una disminución progresiva de la señal (Dot blot) a medida que se diluía la muestra, hasta desaparecer cuando ésta era x1000 (Figura 13).

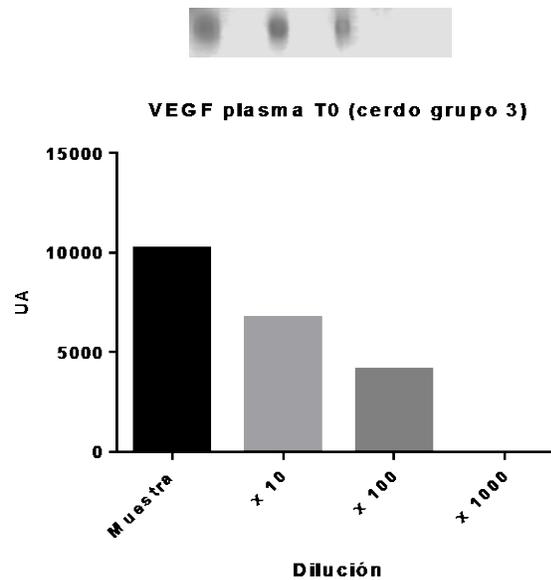


Figura 13. Dot blot de una muestra de plasma al tiempo 0 de un animal del grupo 3 y sus diluciones x10, x100 y x1000. UA: unidades arbitrarias

Otra posible explicación para dichos resultados puede ser la degradación de VEGF por proteasas y células inflamatorias en el espacio alveolar (55, 56), ya que nuestras muestras no se almacenaron con aditivos preservantes. Apoya este hecho el no haber detectado señal en las muestras de LBA al realizar el Western blot, señal que si estaba presente al realizar un Dot blot (Figura 14). Como en el Western blot la resolución de las proteínas en el gel de poliacrilamida fue por peso molecular, la degradación de VEGF puede haber dado lugar a la resolución en el gel en sitios distintos al esperado para visualizar VEGF (pesos moleculares más bajos). En cambio, al realizar un Dot blot, la aplicación directa de las muestras sobre una membrana de nitrocelulosa permite visualizar la señal esperada para VEGF, ya que aunque se encuentre degradada la proteína los fragmentos estarán en un punto único, y por ende es posible obtener la señal suficiente para ser visualizada por quimioluminiscencia.

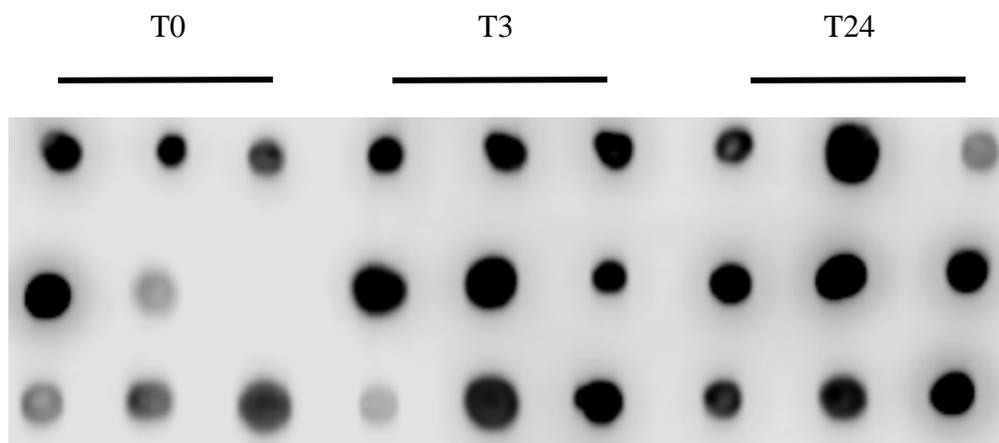


Figura 14. Dot blot de muestras de LBA al tiempo 0, 3 y 24 horas de cerdos del grupo 1 (línea superior), 2 (línea media) y 3 (línea inferior)

Sin embargo, no podemos descartar como limitación la sensibilidad de la técnica de Western blot para detectar señal de VEGF en este modelo, a pesar de que ha sido utilizada en otros estudios con muestras de LBA (39).

Rol de VEGF en el desarrollo de edema y permeabilidad vascular

Algunos autores han señalado que VEGF puede ejercer un rol en el desarrollo de edema y aumento de la permeabilidad vascular pulmonar, por ej. Kohei Ashina et al. determinó que VEGF produce hiperpermeabilidad vascular acompañada por un aumento del flujo sanguíneo y disrupción de la formación de barrera endotelial in vivo, lo que favorece la formación de edema y aumento de la permeabilidad vascular, y que el inhibir la síntesis de óxido nítrico (molécula río abajo en la señalización de VEGF) abolía el aumento en el flujo sanguíneo e hiperpermeabilidad vascular inducida por VEGF, sin afectar la integridad de la barrera endotelial (32). La dilatación de los vasos conduce a un aumento local en el flujo sanguíneo, y estos autores mostraron a través de imágenes intravital, que la estimulación con VEGF dilata rápidamente arterias de la piel en orejas de ratón (32). Concluyen que un aumento del flujo sanguíneo conduce a hiperpermeabilidad a través de alteraciones de la presión hidrostática, lo que además estaría asociado a fosforilación de VE-cadherina alterando la barrera endotelial, lo que conduce a la fuga de componentes plasmáticos hacia el extravascular (57).

Aunque es difícil de disociar claramente las contribuciones del flujo sanguíneo y la integridad de la barrera endotelial in vivo, estas observaciones ponen de relieve el papel del

cambio del flujo sanguíneo en la modulación de la permeabilidad vascular. De acuerdo con estas observaciones, varios grupos han informado de una relajación vascular inducida por VEGF. Mientras Ku et al. originalmente señaló que VEGF induce relajación vascular, óxido nítrico (ON) dependiente, de las arterias coronarias caninas aisladas (58), otros investigadores también han corroborado estos hallazgos (en la aorta de ratas y arteria mamaria interna de humanos) (59-61). En resumen, Estos resultados indican que VEGF aumenta el flujo sanguíneo local de las arterias, a través de la relajación vascular probablemente dependiente de ON.

Por otra parte, Li-Fu Li et al. demostraron en un modelo experimental murino, que la ventilación mecánica con V_t de 30 ml/kg de peso, induce un aumento de la permeabilidad vascular pulmonar, influjo de neutrófilos, expresión de ARNm y proteínas VEGF en el tejido pulmonar y apoptosis de la célula epitelial, sin elevación significativa de los niveles de VEGF en el lavado broncoalveolar, siendo quizás lo más relevante de resaltar de este estudio que estos cambios fueron atenuados con la inhibición farmacológica de VEGF y que la ventilación con alto V_t induce cambios en su expresión (39).

La función de barrera endotelial es también un importante regulador de la permeabilidad vascular. Algunos estudios han demostrado que VEGF interrumpe la barrera endotelial in vivo e in vitro. Esser et al. demostró que VEGF interrumpe la barrera endotelial mediante la fosforilación de VE-cadherina, en células endoteliales de la vena umbilical de humanos (62), mientras que Chen et al. mostró que la fosforilación de β -catenina inducida por VEGF, disocia el complejo VE-cadherina/ β -catenina, dando como resultado alteración de la barrera endotelial en ratones (63). Por lo tanto, la alteración de la barrera endotelial es presumiblemente un factor crucial en la hiperpermeabilidad vascular inducida por VEGF.

El óxido nítrico es también un conocido regulador de la integridad de la barrera endotelial. La fosforilación de VE-cadherina inducida por ON, interrumpe la barrera microvascular en células endoteliales dérmicas humanas (64), y la S-nitrosilación de β -catenina inducida por ON, tiene un efecto similar en células endoteliales aórticas bovinas (65). Kohei Ashina et al. demostró que VEGF aumenta la fosforilación de eNOS en el residuo Ser1177 en las orejas de ratón, lo que indica la producción de ON (32). En resumen y dado lo señalado en la literatura, VEGF aumenta la permeabilidad vascular aumentando el flujo sanguíneo e interrumpiendo la barrera endotelial in vivo.

Sin embargo, en nuestro estudio si bien existió un aumento de la tasa peso húmedo/seco y aumento de la concentración de proteínas en LBA, lo que sugiere edema y aumento de la permeabilidad vascular pulmonar en el grupo de cerdos con LPA ventilados con una estrategia ventilatoria mecánica convencional, no le podemos atribuir un rol a VEGF en dichos fenómenos, ya que no se observaron diferencias en los niveles relativos de VEGF en comparación al grupo control, y no existió correlación entre los niveles relativos de VEGF y la tasa peso húmedo/seco del pulmón, así como con la concentración de proteínas en LBA. Si bien podrían existir otros procesos moleculares no evaluados en el presente estudio que expliquen dichos cambios, una teoría interesante para el aumento de la permeabilidad vascular y desarrollo de edema probablemente sea el aumento de la presión hidrostática a nivel del capilar pulmonar, explicada por la ley de Frank Starling. La ley de Frank Starling permite predecir la presión de filtración neta para un determinado líquido en los capilares, y depende del coeficiente de filtración, que expresa la permeabilidad de la pared capilar para los líquidos, la presión hidrostática capilar, presión hidrostática intersticial, y el coeficiente de reflexión. Ello tiene un importante número de implicaciones fisiológicas, especialmente cuando los procesos patológicos alteran de forma considerable una o más de estas variables, determinando el flujo de agua desde o hacia los capilares (66).

Además, las extensas áreas con cortocircuito intrapulmonar y disminución de la relación ventilación/perfusión, características del SDRA, no solo determinan una disminución de la distensibilidad pulmonar, sino también una caída de la oxigenación producto de una alteración severa del intercambio gaseoso, y la presencia de vasoconstricción hipóxica que aumenta la resistencia vascular pulmonar y por ende la presión hidrostática a nivel capilar (14). Esto último fue observado en nuestro estudio reflejado por un aumento de la presión media de arteria pulmonar, evaluada a través de un catéter de Swan Ganz (Figura 15), principalmente las primeras horas desde la inducción de la LPA.

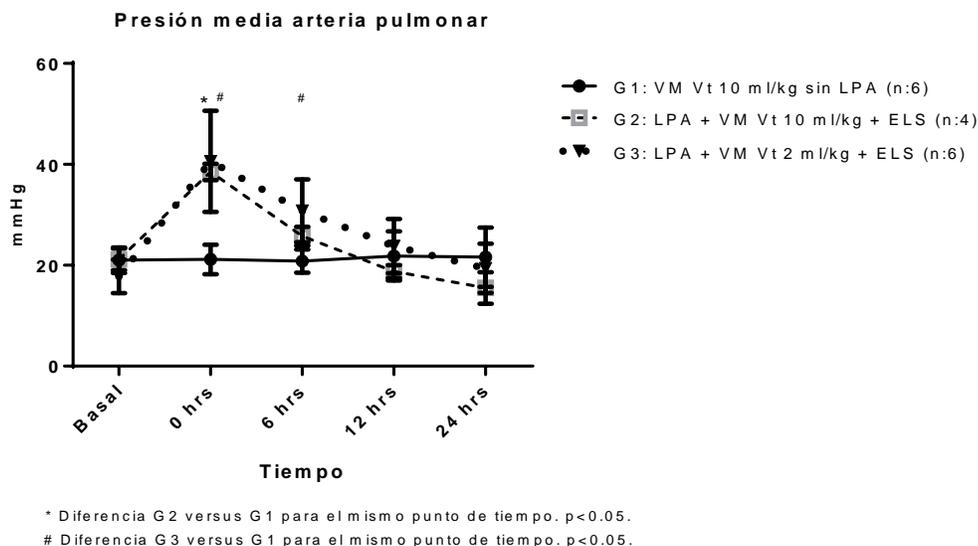


Figura 15. Presión media de arteria pulmonar de los animales del grupo 1, 2 y 3 al basal y tiempos 0, 6, 12 y 24 horas

Por otra parte, si bien este modelo de inducción de LPA produce aumento de la tasa peso húmedo/seco, concentración de proteínas en LBA y evidente daño pulmonar histológico, no es posible asegurar que sea el modelo más idóneo para evaluar variaciones en los niveles de VEGF dependiendo de la estrategia ventilatoria utilizada. Si bien existen datos que sugieren a VEGF como inductor del aumento de la permeabilidad vascular pulmonar en diferentes modelos animales de LPA, ninguno de ellos reproduce totalmente las características del SDRA humano.

Otro aspecto no evaluado en el presente estudio es el vínculo entre inflamación y VEGF, ya que se ha reportado un aumento en la expresión de ARNm de VEGF en respuesta al estímulo con interleuquina 1 (IL-1), IL-6, IL-8, factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y factor de crecimiento transformante β (TGF- β) (67). En esta línea, puede que el modelo de inducción de LPA no desencadenara una respuesta inflamatoria suficientemente intensa para inducir cambios en los niveles relativos de VEGF, y que las variaciones que se esperarían encontrar en un modelo de estas características obedezcan a un estímulo inflamatorio más que mecánico como la teoría propuesta de descompartmentalización.

8. CONCLUSIÓN

En un modelo de cerdos con LPA inducida por lavados con solución salina repetidos más 2 horas de ventilación mecánica con alto Vt, seguidos del empleo de una estrategia ventilatoria convencional y ultraprotectora más ELS, existe un aumento de la permeabilidad vascular, desarrollo de edema y daño pulmonar. Sin embargo, no existen diferencias en los niveles plasmáticos relativos de VEGF en los tiempos 0, 3 y 24 horas post inducción de LPA y en el homogenizado de tejido pulmonar, evaluados con la técnica de Western blot, en comparación con cerdos sin inducción de lesión pulmonar aguda ventilados con una estrategia convencional.

Además, no existe una asociación entre el aumento de la permeabilidad vascular, desarrollo de edema y daño pulmonar en el grupo de cerdos con LPA ventilados con una estrategia convencional más ELS, y los niveles plasmáticos relativos de VEGF en los tiempos 0, 3 y 24 horas post inducción de la lesión pulmonar y en el homogeneizado de tejido pulmonar. Por ello, no es posible atribuir los cambios en la concentración de proteínas en el LBA y tasa peso húmedo/seco pulmonar a variaciones en los niveles de VEGF en relación a la estrategia ventilatoria empleada.

En resumen, la estrategia ventilatoria empleada no altera los niveles relativos de VEGF en plasma y tejido pulmonar, en un modelo de cerdos con lesión pulmonar aguda inducida por lavados con solución salina repetidos y ventilación mecánica con alto volumen corriente. Además, los cambios observados en la permeabilidad vascular, daño y edema pulmonar no tienen una asociación con los niveles relativos de VEGF en el plasma y tejido pulmonar.

Sin embargo, existe un número importante de limitaciones técnicas que deben ser consideradas al momento de interpretar estos resultados, y que hacen necesario continuar investigando y desarrollando la metodología de trabajo para documentar resultados confiables, y que permitan un constructo teórico en relación a VEGF en este modelo de lesión pulmonar aguda.

REFERENCIAS

1. S. Barratt, A.R. Medford, A.B. Millar. Vascular endothelial growth factor in acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Respiration* 2014; 87: 329–342.
2. Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2000; 342 (18): 1334-1349.
3. Rubenfeld GD, Caldwell E, Peabody E, et al. Incidence and outcomes of acute lung injury. *N Engl J Med* 2005; 353 (16): 1685-1693.
4. Esteban A, Anzueto A, Frutos F, et al. Characteristics and outcomes in adult patients receiving mechanical ventilation: a 28-day international study. *JAMA* 2002; 287 (3): 345-355.
5. Tobar E, Bugeo G, Andresen M, et al. Characteristics and impact of sedation, analgesia, and neuromuscular blockage in critical patients undergoing prolonged mechanical ventilation]. *Med Intensiva* 2009; 33 (7): 311-320.
6. Villar J, Blanco J, Anon JM, et al. The ALIEN study: incidence and outcome of acute respiratory distress syndrome in the era of lung protective ventilation. *Intensive Care Med* 2011; 37 (12): 1932-1941.
7. Fialkow L, Vieira SR, Fernandes AK, et al. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome at the intensive care unit of a general university hospital in Brazil. An epidemiological study using the American-European Consensus Criteria. *Intensive Care Med* 2002; 28 (11): 1644-1648.
8. Agarwal R, Aggarwal AN, Gupta D, et al. Etiology and outcomes of pulmonary and extrapulmonary acute lung injury/ARDS in a respiratory ICU in North India. *Chest* 2006; 130 (3): 724-729.
9. Herridge MS, Cheung AM, Tansey CM, et al. One-year outcomes in survivors of the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2003; 348 (8): 683-693.
10. Li G, Malinchoc M, Cartin-Ceba R, Venkata CV, Kor DJ, Peters SG, Hubmayr RD, Gajic O: Eight-year trend of acute respiratory distress syndrome: a population-based study in Olmsted County, Minnesota. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183: 59–66.
11. Toy P, Gajic O, Bacchetti P, Looney MR, Gropper MA, Hubmayr R, Lowell CA, Norris PJ, Murphy EL, Weiskopf RB, Wilson G, Koenigsberg M, Lee D, Schuller R, Wu P, Grimes B, Gandhi MJ, Winters JL, Mair D, Hirschler N, Sanchez Rosen R, Matthay MA: Transfusion-related acute lung injury: incidence and risk factors. *Blood* 2012; 119: 1757–1767.

12. Dreyfuss D, Saumon G. Ventilator-induced lung injury: lessons from experimental studies. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157 (1): 294-323.
13. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. The acute respiratory distress syndrome network. *N Engl J Med* 2000; 342 (18): 1301-1308.
14. Bruhn A. Daño pulmonar inducido por la ventilación mecánica. In: Andresen M, Bugeo G, Diaz O, Tomicic V, editors. *Ventilación Mecánica*. 1st ed. Santiago: Editorial Mediterraneo; 2010. p. 196-206.
15. Dreyfuss D, Saumon G. Ventilator-induced lung injury: lessons from experimental studies. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157 (1): 294-323.
16. Peevy KJ, Hernandez LA, Moise AA, et al. Barotrauma and microvascular injury in lungs of nonadult rabbits: effect of ventilation pattern. *Crit Care Med* 1990; 18 (6): 634-637.
17. Tremblay LN, Slutsky AS. Ventilator-induced lung injury: from the bench to the bedside. *Intensive Care Med* 2006; 32 (1): 24-33.
18. Santos CC, Zhang H, Liu M, et al. Bench-to-bedside review: Biotrauma and modulation of the innate immune response. *Crit Care* 2005; 9 (3): 280-286.
19. Bruhn A, Bugeo D, Riquelme F, et al. Tidal volume is a major determinant of cyclic recruitment-derecruitment in acute respiratory distress syndrome. *Minerva Anestesiologica* 2011; 77 (4): 418-426.
20. Frank JA, Gutierrez JA, Jones KD, et al. Low tidal volume reduces epithelial and endothelial injury in acid-injured rat lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165 (2): 242-249.
21. Terragni PP, Rosboch G, Tealdi A, et al. Tidal hyperinflation during low tidal volume ventilation in acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175 (2): 160-166.
22. Terragni PP, DSL, Mascia L, Urbino R, Martin EL, Birocco A, Faggiano C, Quintel M, Gattinoni L, Ranieri VM. Tidal volume lower than 6 ml/kg enhances lung protection: role of extracorporeal carbon dioxide removal. *Anesthesiology* 2009; 111 (4): 826-835.
23. Brown, K., Haft, J., Bartlett, RH. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: extracorporeal life support and liquid ventilation for severe acute respiratory distress syndrome in adults. *Respiratory Critical Care Medicine* 2006; 27: 416-425.

24. Thickett DR, Armstrong L, Millar AB: A role for vascular endothelial growth factor in acute and resolving lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 1332–1337.
25. Maitre B, Boussat S, Jean D, Gouge M, Brochard L, Housset B, Adnot S, Delclaux C: Vascular endothelial growth factor synthesis in the acute phase of experimental and clinical lung injury. *Eur Respir J* 2001; 18: 100–106.
26. Azamfirei L, Gurzu S, Solomon R, Copotoiu R, Copotoiu S, Jung I, Tilinca M, Branzaniuc K, Corneci D, Szederjesi J, Kovacs J: Vascular endothelial growth factor: a possible mediator of endothelial activation in acute respiratory distress syndrome. *Minerva Anestesiol* 2010; 76: 609–616.
27. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A: Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996; 380: 435–439.
28. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O’Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW: Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 1996; 380: 439–442.
29. Monacci WT, Merrill MJ, Oldfield EH: Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in normal rat tissues. *Am J Physiol* 1993; 264: C995–C1002.
30. Berse B, Brown LF, Van de Water L, Dvorak HF, Senger DR: Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *Mol Biol Cell* 1992; 3: 211–220.
31. Katherine Holmes, Owain LI Roberts, Angharad M. Thomas, Michael J. Cross. Vascular endothelial growth factor receptor-2: Structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cellular Signalling* 19 (2007), 2003–2012.
32. Kohei Ashina, Yoshiki Tsubosaka, Koji Kobayashi, Keisuke Omori, Takahisa Murata. VEGF-induced blood flow increase causes vascular hyper-permeability in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 464 (2015) 590-595.
33. S.M. Weis, D.A. Cheresh. Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. *Nature* 437 (2005) 497-504.

34. Walker DC, MacKenzie AL, Wiggs BR, Montaner JG, and Hogg JC. Assessment of tight junctions between pulmonary epithelial and endothelial cells. *J Appl Physiol* 64: 2348–2356, 1988.
35. Effros RM, Mason GR, Sietsema K, Hukkanen J, and Silverman P. Pulmonary epithelial sieving of small solutes in rat lungs. *J Appl Physiol* 65: 640–648, 1988.
36. Kaner RJ, Ladetto JV, Singh R, Fukuda N, Matthay MA, and Crystal RG. Lung overexpression of the vascular endothelial growth factor gene induces pulmonary edema. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22: 657–664, 2000.
37. Gattinoni L, Pesenti A, Mascheroni D, et al. Low-frequency positive-pressure ventilation with extracorporeal CO₂ removal in severe acute respiratory failure. *JAMA* 1986; 256 (7): 881-886.
38. Gattinoni L, Kolobow T, Agostoni A, et al. Clinical application of low frequency positive pressure ventilation with extracorporeal CO₂ removal (LFPPV-ECCO₂R) in treatment of adult respiratory distress syndrome (ARDS). *Int J Artif Organs* 1979; 2 (6): 282-283.
39. Li-Fu Li, Chung-Chi Huang, Yung-Yang Liu, Horng-Chyuan Lin, Kuo-Chin Kao, Cheng-Ta Yang and Shuen-Kuei Liao. Hydroxyethyl starch reduces high stretch ventilation-augmented lung injury via vascular endothelial growth factor. *Translational Research* 2011; 157: 293–305.
40. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7; 72: 248-54.
41. Ballard-Croft C, Wang D, Sumpter LR, et al. Large-animal models of acute respiratory distress syndrome. *Ann Thorac Surg* 2012; 93 (4): 1331-1339.
42. Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animal models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008; 295 (3): L379-399.
43. Iglesias M, Jungebluth P, Petit C, et al. Extracorporeal lung membrane provides better lung protection than conventional treatment for severe postpneumonectomy noncardiogenic acute respiratory distress syndrome. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008; 135 (6): 1362-1371.
44. Peek GJ, Scott R, Killer HM, et al. A porcine model of prolonged closed chest venovenous extracorporeal membrane oxygenation. *ASAIO J* 1999; 45 (5): 488-495.
45. Brederlau J, Muellenbach R, Kredel M, et al. The contribution of arterio-venous extracorporeal lung assist to gas exchange in a porcine model of lavage-induced acute lung injury. *Perfusion* 2006; 21 (5): 277-284.

46. Muellenbach RM, Kuestermann J, Kredel M, et al. Arteriovenous extracorporeal lung assist allows for maximization of oscillatory frequencies: A large-animal model of respiratory distress. *BMC Anesthesiol* 2008; 8: 7.
47. Nielsen ND, Kjaergaard B, Koefoed-Nielsen J, et al. Apneic oxygenation combined with extracorporeal arteriovenous carbon dioxide removal provides sufficient gas exchange in experimental lung injury. *ASAIO J* 2008; 54 (4): 401-405.
48. Sanchez-Lorente D, Go T, Jungebluth P, et al. Single double-lumen venous-venous pump-driven extracorporeal lung membrane support. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2010; 140 (3): 558-563.
49. Song J, Palmer K, Sun B. Effects of inhaled nitric oxide and surfactant with extracorporeal life support in recovery phase of septic acute lung injury in piglets. *Pulm Pharmacol Ther* 2010; 23 (2): 78-87.
50. Diaz F, Donoso A, Carvajal C, et al. Veno-arterial difference of carbondioxide as a predictor of low cardiac output in an experimental pediatric model. *Rev Med Chil* 2012; 140 (1): 39-44.
51. Mura M, dos Santos CC, Stewart D, Liu M: Vascular endothelial growth factor and related molecules in acute lung injury. *J Appl Physiol* 2004; 97: 1605–1617.
52. Bardales RH, Xie SS, Schaefer RF, Hsu SM: Apoptosis is a major pathway responsible for the resolution of type II pneumocytes in acute lung injury. *Am J Pathol* 1996; 149: 845–852.
53. Martin TR, Nakamura M, Matute-Bello G: The role of apoptosis in acute lung injury. *Crit Care Med* 2003; 31: S184–S188.
54. Max Andresen, Marcelo Mercado, Marcelo Zapata, Andrea Bustamante, Tomás Regueira. Resultados preliminares y factibilidad del mini lavado broncoalveolar en pacientes cursando falla respiratoria severa. *Revista Médica de Chile* 2011; 139: 1292-1297.
55. Azamfirei L, Gurzu S, Solomon R, Copotoiu R, Copotoiu S, Jung I, Tilinca M, Branzaniuc K, Corneci D, Szederjesi J, Kovacs J: Vascular endothelial growth factor: a possible mediator of endothelial activation in acute respiratory distress syndrome. *Minerva Anesthesiol* 2010; 76: 609–616.
56. Koehne P, Willam C, Strauss E, Schindler R, Eckardt KU, Buhner C. Lack of hypoxic stimulation of VEGF secretion from neutrophils and platelets. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279: H817–H824.

57. F.R. Curry, R.H. Adamson. Vascular permeability modulation at the cell, microvessel, or whole organ level: towards closing gaps in our knowledge. *Cardiovasc. Res.* 87 (2010) 218-229.
58. D.D. Ku, J.K. Zaleski, S. Liu, T.A. Brock. Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation in coronary arteries, *Am. J. Physiol.* 265 (1993) H586-H592.
59. B. Li, A.K. Ogasawara, R. Yang, W. Wei, G.W. He, T.F. Zioncheck, S. Bunting, A.M. de Vos, H. Jin. KDR (VEGF receptor 2) is the major mediator for the hypotensive effect of VEGF. *Hypertension* 39 (2002) 1095-1100.
60. W. Wei, H. Jin, Z.W. Chen, T.F. Zioncheck, A.P. Yim, G.W. He, Vascular endothelial growth factor-induced nitric oxide- and PGI₂-dependent relaxation in human internal mammary arteries: a comparative study with KDR and Flt-1 selective mutants, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 44 (2004) 615-621.
61. H. Ashrafpour, N. Huang, P.C. Neligan, C.R. Forrest, P.D. Addison, M.A. Moses, R.H. Levine, C.Y. Pang. Vasodilator effect and mechanism of action of vascular endothelial growth factor in skin vasculature. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 286 (2004) H946-H954.
62. S. Esser, M.G. Lampugnani, M. Corada, E. Dejana, W. Risau. Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J. Cell Sci.* 111 (Pt 13) (1998) 1853-1865.
63. X.L. Chen, J.O. Nam, C. Jean, C. Lawson, C.T. Walsh, E. Goka, S.T. Lim, A. Tomar, I. Tancioni, S. Uryu, J.L. Guan, L.M. Acevedo, S.M. Weis, D.A. Cheresh, D.D. Schlaepfer. VEGF-induced vascular permeability is mediated by FAK. *Dev. Cell* 22 (2012) 146-157.
64. A. Di Lorenzo, M.I. Lin, T. Murata, S. Landskroner-Eiger, M. Schleicher, M. Kothiya, Y. Iwakiri, J. Yu, P.L. Huang, W.C. Sessa. eNOS-derived nitric oxide regulates endothelial barrier function through VE-cadherin and Rho GTPases. *J. Cell Sci.* 126 (2013) 5541-5552.
65. S. Thibeault, Y. Rautureau, M. Oubaha, D. Faubert, B.C. Wilkes, C. Delisle, J.P. Gratton. S-nitrosylation of beta-catenin by eNOS-derived NO promotes VEGF-induced endothelial cell permeability. *Mol. Cell* 39 (2010) 468-476.
66. Woodcock, T.E., Woodcock, T.M. Revised Starling equation and the glycocalyx model of transvascular fluid exchange: an improved paradigm for prescribing intravenous fluid therapy. *British Journal of Anaesthesia* 108 (3): 384-394. January 2012.

67. James P. Maloney and Li Gao. Proinflammatory cytokines increase vascular endothelial growth factor expression in alveolar epithelial cells. *Mediators of Inflammation*. Volume 2015, Article ID 387842.

9. ANEXOS

9.1 Esquema del diseño de estudio

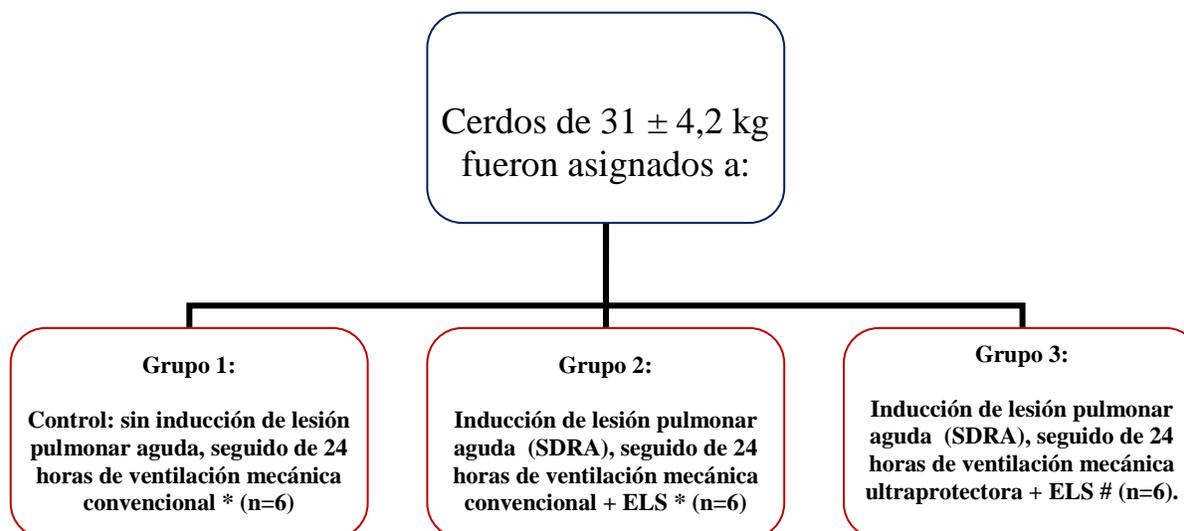


Figura 16. * VM convencional: ventilación volumen control (VCV), V_t 10 ml/kg de peso corporal, PEEP= 5 cmH₂O, FR= 20/min (ajustada a PaCO₂ 50 ± 5 mmHg), I:E= 1:2; # VM ultraprotectora, ventilación presión control (PCV) para lograr un $V_t \leq 2$ ml/kg de peso corporal, FR= 5/min, PEEP 10 cmH₂O, relación I:E= 1:1.

9.2 Control de carga Western blot

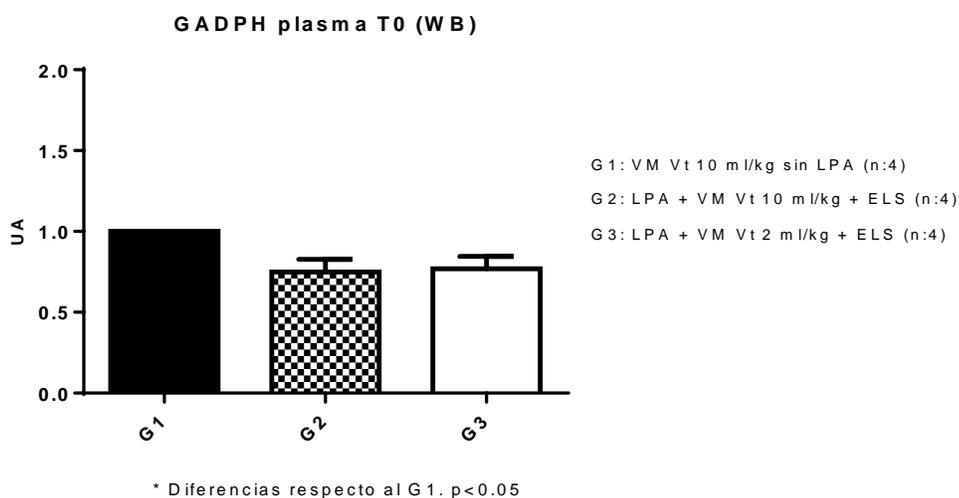


Figura 17A. Western blot de GADPH plasmático al tiempo 0 (T0) para los grupos 1, 2 y 3. Los niveles de GADPH para los grupos 2 y 3 están expresados según la variación relativa en comparación al grupo 1. Los datos están en medias ± Desviación estándar (DS). UA: unidades arbitrarias

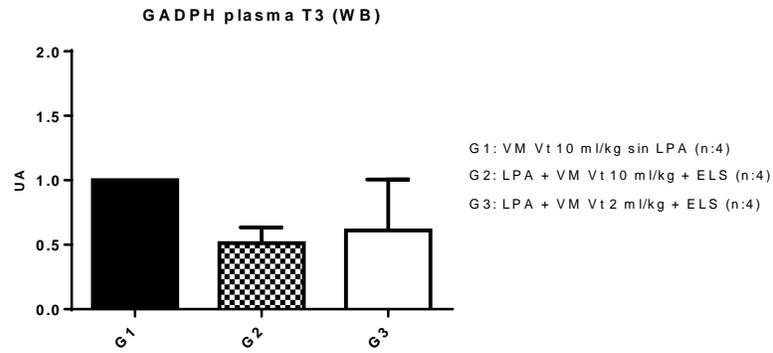


Figura 17B. Western blot de GADPH plasmático al tiempo 3 (T3) para los grupos 1, 2 y 3. Los niveles de GADPH para los grupos 2 y 3 están expresados según la variación relativa en comparación al grupo 1. Los datos están en medias \pm Desviación estándar (DS). UA: unidades arbitrarias

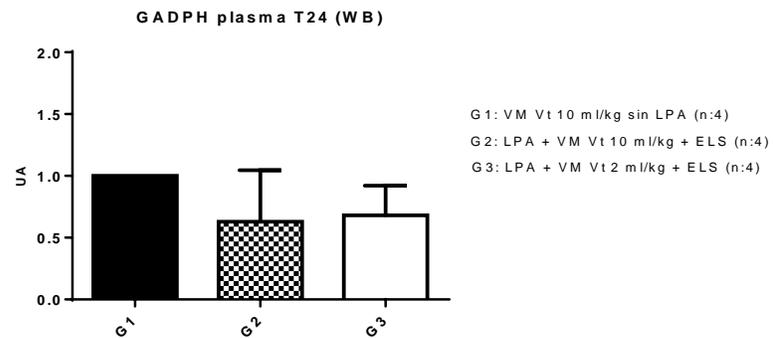


Figura 17C. Western blot de GADPH plasmático al tiempo 24 (T24) para los grupos 1, 2 y 3. Los niveles de GADPH para los grupos 2 y 3 están expresados según la variación relativa en comparación al grupo 1. Los datos están en medias \pm Desviación estándar (DS). UA: unidades arbitrarias

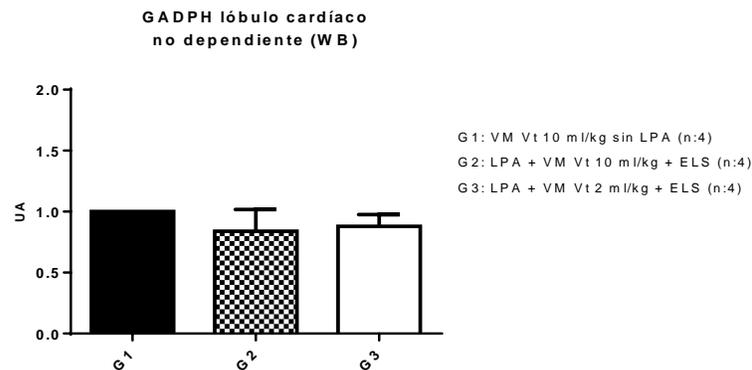


Figura 18. Western blot de GADPH en el homogeneizado de tejido pulmonar del lóbulo cardíaco no dependiente para los grupos 1, 2 y 3. Los niveles de GADPH para los grupos 2 y 3 están expresados según la variación relativa en comparación al grupo 1. Los datos están en medias \pm Desviación estándar (DS). UA: unidades arbitrarias

9.3 Contribuciones al estudio

Como alumno del Programa de Magister en Fisiopatología mis contribuciones al presente estudio fueron:

- Asistencia durante la intubación del animal y programación del ventilador mecánico.
- Registro de parámetros fisiológicos y mecánica respiratoria.
- Parte del equipo de inducción de la lesión pulmonar aguda por lavados repetidos con solución salina.
- Programación del ventilador mecánico para la inducción de la lesión pulmonar aguda.
- Obtención de muestras de LBA por técnica de miniBAL.
- Centrifugación, separación y almacenamiento de las muestras de plasma y LBA.
- Asistencia durante la eutanasia del animal y obtención de muestras de tejido.
- Determinación de VEGF con las técnicas de test ELISA, Western blot y Dot blot.
- Determinación de la concentración total de proteínas en LBA.
- Determinación de la tasa peso húmedo/seco pulmonar.
- Análisis estadístico y construcción de gráficos.
- Escritura del presente informe de Tesis.