



11224
4
2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

THE AMERICAN BRITISH COWDRAY MEDICAL CENTER

*N-acetilcisteina vs. Factor Surfactante Exógeno vs.
Placebo como Protector de la Lesión Pulmonar Aguda
(LPA) Inducida por Oxígeno.*

T E S I S

Que para obtener el título de médico especialista en
"Medicina del Enfermo en Estado Crítico" presenta el

Dr. Alfonso Estrada Gutiérrez

Dr. Jesús Martínez Sánchez
Profesor Titular del curso

Dr. José J. Elizalde González
Profesor Adjunto del Curso
Asesor de Tesis



0271629

MEXICO

1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**N-acetilcisteína vs. Factor
Surfactante Exógeno vs. Placebo como
Protector de la Lesión Pulmonar Aguda
(LPA) Inducida por Oxígeno**

Dedicada a mis maestros:

Dr Jesús Martínez Sánchez

Dr José J. Elizalde González

Dr Juvenal Franco Granillo

"GRACIAS"

Dedicada a mis compañeros, porque sigamos en la lucha de ser mejores médicos cada día.

A todos los pacientes que tanto nos ha enseñado.

Dedicada:

A Martha Por no poner limites al amor y ser motivo de mi superación constante

A Mis Padres Por haberme apoyado durante tantos años de estudio y guiarme por un camino digno

A Mis Abuelos por su gran cariño

A Francisco, Dolores, Gustavo, Araceli por su apoyo constante

A Todos mis maestros por haberme enseñado, y a estudiar, por lo que se.

A Todos los pacientes que me enseñaron que nota la medicina se encuentra en los libros

INDICE

Introducción	1
Planteamiento del problema	9
Hipótesis y Objetivos	9
Metodología	10
Resultados	18
Discusión	22
Conclusiones	27
Bibliografía	28

Introducción

La comunicación célula a célula puede alterarse cuando existe disrupción tisular, liberándose nuevas señales (1), la expresión a la adhesión de nuevas moléculas a nivel intracelular (2), incluye migración de proteínas, unión y activación de leucocitos lo que conlleva a un incremento de la sensibilidad de las células epiteliales alveolares tipo I a la hiperoxia (la exposición a concentraciones de oxígeno mayores del 60%) (3). Por otro lado los neumocitos tipo II son resistentes a la hiperoxia jugando un papel importante en la reversión del proceso lítico (4).

La síntesis de moléculas de adhesión intracelular (ICAM-I) ha sido demostrada solo en dos trabajos aunque su lugar de síntesis no ha sido determinado aún, estas moléculas se han relacionado como mediadores de la respuesta inflamatoria (5). Probablemente el sitio de síntesis sea el neumocito tipo II. Se ha observado que después de 72 hrs de exposición al O₂ a 100% en ratones adultos se observó incremento de la síntesis

de ICAM-I, pudiendo tener relación directa con la reparación de daño pulmonar (6).

En el síndrome de insuficiencia respiratoria progresiva del adulto (SIRPA), se ha observado que una de las principales alteraciones fisiológicas es la inhibición del factor surfactante. El edema pulmonar incrementa la $PaCO_2$ y disminuye la PaO_2 , además de afectar la distensibilidad pulmonar (7). En la lesión pulmonar aguda (LPA) secundaria a fracciones inspiradas de oxígeno (FiO_2) elevadas, existe además alteración en las concentraciones de fosfolípidos, fosfatidil colina y fosfatidilglicerol (8).

La producción de radicales libres por células fagocíticas y la disminución del factor surfactante ha sido involucrado en la producción de la lesión pulmonar aguda, habiéndose propuesto la administración de surfactante como prevención del daño pulmonar, aunque todavía su mecanismo de acción como modulador de la respuesta no ha sido completamente

establecido, así como su impacto sobre la evolución pulmonar. El surfactante puede inhibir la producción de anión superóxido de los macrófagos por su acción sobre los receptores formilmetionilleucilfenilalanina (FMLP) y forbol-miristato-acetato (9). Su efecto sobre la disminución en la producción de $O_2\cdot$ por los PMN ha sido demostrada (10).

El surfactante liposomal encapsula a la superóxido dismutasa y catalasa, incrementando la actividad antioxidante de los neumocitos tipo II y protegiendo a las células de la LPA (11). El uso conjunto de factor surfactante y óxido nítrico ha disminuido la cantidad de pacientes neonatales que requieren ECMO (12).

En infantes (< 1000gr) que han desarrollado síndrome de dificultad respiratoria (SDR) y que han requerido de niveles altos de PEEP, el uso de factor surfactante ha demostrado ser eficaz y seguro, mejorando la evolución del SDR por un lado y disminuyendo la exposición a FiO_2 elevadas y los días de hospitalización por el otro, habiéndose observado además una

disminución de la mortalidad al recibir dos dosis profilácticas de factor surfactante (13).

El epitelio alveolar del tracto respiratorio inferior es expuesto continuamente a agentes dañinos y a radicales de O₂ libres. El neumocito tipo II juega un rol importante para la función normal del pulmón, pues este es el sitio responsable de la síntesis de surfactante.

Componentes del material tensoactivo-pulmonar *

Componentes químicos	%
Lípido	85
Proteína	13.1
Hexosa	1.7
Acidonucleico	0.7
Esfingomielina	2.1
Hexosamina	0.5

Fracciones lipídicas	%
Fosfatidil colina	75
Lípido neutro	9.0
Colesterol	6.6
Fosfatidiletanolamina	6.3
Lísolecitina	0.9

Componentes del material tensoactivo-pulmonar * (continua)

Componentes de fosfatidil colina	%
Palmitato	71
Miristato	6.1
Estearato	3.6
Palmitoleato	11
Oleato	3.9
No identificado	3.6

Cuadro1 componentes del factor surfactante

*Am. J. Physiol. 223:707,1972.

Se ha observado que la LPA puede ser prevenida al utilizar Glutati3n o N-acetilcisteina (NAC), cuando existe exposici3n al per3xido de hidrogeno (H_2O_2) o al 3cido hipocloroso. El resultado puede ser interpretado como una menor disminuci3n en reservas de ATP (14).

La N acetil cisteina es un aminoacido individual que se caracteriza por tener dos moleculas en cadenas polipepticas vecinas que se combinan por sus grupos tioles formando un residuo de cisteina, la agregación de un grupo acetil en la porción amino lo convierte en N-acetil-L-cisteina (ver adelante).

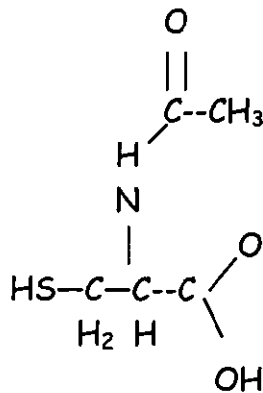


Figura 1: Estructura química de la N acetilcisteina

Los componentes de la cisteina son los siguientes: albúmina, ribonucleasa, lisozima, insulina, histona, protámina, miosina y colágena (15).

El efecto de la N-acetilcisteína sobre la evolución de la LPA no ha sido estudiado plenamente, pero probablemente el mecanismo de protección de la N-acetilcisteína se encuentre relacionado con sus propiedades antioxidantes, al actuar directamente sobre enzimas como la superóxido dismutasa, catalasa, etc; favoreciendo un menor daño celular y por lo tanto conservando la función celular como por ejemplo, la producción de factor surfactante. Sin embargo aún no se ha comprobado el beneficio de su utilización en este grupo de pacientes (16,17).

Nosotros valoraremos ambos medicamentos (N-acetil-L-cisteína vs surfactante) en la evolución de la LPA.

Planteamiento del problema:

El uso de $FiO_2 >60\%$ induce daño al epitelio alveolar por la producción secundaria de radicales libres, mediadores como citocinas y edema pulmonar, al agregarse una respuesta inflamatoria grave que lleva incluso hasta el SIRPA.

Hipótesis:

El efecto de la N-acetilcisteína como protector de la LPA inducida por oxígeno es similar a la protección que se obtiene con el Factor Surfactante exógeno (5).

Objetivos:

1) Determinar cual de los medicamentos disminuye más la LPA inducida por oxígeno.

Metodología:

Diseño: Prospectivo, longitudinal, experimental, doble ciego.

Lugar: Brimex II, Laboratorio de Cirugía Experimental del Hospital ABC.

Universo:

12 ratas Wistar adultas

Criterios de inclusión de la población:

- 1) Ratas sanas cepa Wistar
- 2) Sexo machos
- 3) Peso 200 a 250 gm.

Criterios de exclusión:

- 1) Datos de infección durante su permanencia en el bioterio
- 2) Muerte durante la inducción anestésica
- 3) No cumplir mínimo con 8 hrs de exposición al FiO₂ al 100%

Grupos:

Se formaron 3 grupos que consistieron de 4 ratas cada uno, distribuidas en forma aleatoria.

Método:

Material

Se diseñó una caja de acrílico con capacidad para 12 ratas, con un orificio de 1 cm de diámetro en su parte superior, donde se administró oxígeno (O_2) a 15 litros por minuto (LPM), por la parte lateral de la caja se introdujo un sensor de O_2 (Teledyne, electronics devices, percent oxygen, TED60T) para medir la fracción inspirada.

La FiO_2 se mantuvo durante 8 hrs al 100%

Anestesia

Se realizó inducción anestésica con pentobarbital sódico a una dosis de 2.5 cc/kg por vía intraperitoneal, sin llegar a tener paro respiratorio.

Posteriormente bajo anestesia general más anestesia local con xilocaína a dosis de 30 mg /kg se realizó la disección del cuello por planos hasta llegar a la tráquea, misma que se puncionó con una aguja # 22, retirándole posteriormente esta y dejando un catéter conectado a un sistema que consistía en un adaptador del jelco al ambú; se inyectó el medicamento de acuerdo al grupo asignado y de acuerdo a lo abajo mencionado, se insufló con el ambú en 3 ocasiones para distribuir el medicamento. Posteriormente se cerró por planos hasta la piel utilizando una seda 00. Se marcó la rata en la oreja según el grupo asignado:

Grupo N.- N acetilcisteina transtraqueal a 0.2 cc/200gm

Un corte en oreja derecha.

Grupo P.- Placebo 0.2 cc/200gm de sol. fisiológica transtraqueal.

Un corte en la oreja Izquierda

Grupo S.-: Factor surfactante exógeno transtraqueal a dosis de 1cc/1000gm.

Sin corte

Posteriormente se colocaron en la caja de acrílico y se expusieron al oxígeno a 15 litros por minuto con una FiO_2 100% monitorizada por un sensor de O_2 .

Se mantuvo una temperatura constante de $38^\circ C$ con 2 focos de 100 watts a una distancia de 60 cm.

Posteriormente de haber cumplido las 8 hrs, se sacrifico a los animales mediante la administración 5 cc de pentobarbital sódico, hasta la presentación de paro cardiorespiratorio. En

ese momento se extrajo un lóbulo pulmonar de cada espécimen a través de una toracotomía media.

Se colocó la muestra pulmonar en frascos con formol de 20 cc previamente indentificados y rotulados para cada grupo

Se deshidrató el tejido obtenido en alcohol por técnica manual, pasando por alcohol desde un 65%, 70%, 75% hasta llegar al 100% durante un periodo aproximado de 12 hrs. Posteriormente se hizo el montaje de la pieza en parafina y se realizaron 2 cortes por pieza.

Se realizó una tinción de Hematoxilina-Eosina.(agradecemos al técnico R. Dávila, el montaje de las muestras)

Se realizó un análisis microscópico a 40X y 100X por un patólogo experto, quien otorgó una puntuación con escala del 0 a 4 puntos (mencionadas abajo) a cada fase de LPA observada (13).

FASES OBSERVADAS:

1) Infiltración leucocitaria

a) PMN

b) Mononucleares

2) Edema intersticial e intraalveolar.

3) Exudación de fibrina.

4) Formación de membranas hialinas (líquido rico en proteínas y fibrina).

5) Atelectasias

6) Hemorragia focal intraalveolar.

7) Proliferación del neumocito tipo II.

Se evaluaron los acinos (bronquiolo respiratorio, conducto alveolar y saco alveolar). No se analizaron fenómenos de remodelación vascular.

Se asignó un grado de lesión, que consistió en un puntaje de 0 a 4 (ver abajo) a cada una de las fases observadas con el siguiente puntaje:

0) sin lesión

1) lesión mínima

2) lesión moderada

3) lesión severa

4) lesión muy severa

Esto fue realizado y valorado según la experiencia del patólogo experto, además se sumo el puntaje por grupo para finalmente hacer la comparación estadística en cada una de las fases.

Análisis estadístico: Se calculo la media, desviación estándar, T de student y analisis varianza multivariado, la P se le asignó como significativa con valores ≤ 0.01 .

Resultados:

Se estudiaron un total de 12 ratas.

Porcentaje de lesión

No existió diferencia entre el grupo N (N-acetilcisteína), C (Control) y S (Factor Surfactante) para la presencia de infiltrados leucocitarios fase Ia, polimorfonucleares (PMN) y Ib, mononucleares (MNC que corresponden a infiltración leucocitaria e histioide). La fase II (edema intersticial e intralaveolar) y III (exudación de fibrina) con 25% de presencia de la lesión en cada uno de los grupos I,II y III. En la fase IV (formación de membranas hialinas) podemos observar que el grupo II presentó mayor porcentaje en su formación, comparado con el grupo I con un 25% y 0 % para el grupo III. La fase V (atelectasias) se caracterizó por presentarse en el 100% de todos los grupos. En cuanto al grupo VI (hemorragia focal intra-alveolar) fue menor en el

grupo I, con un 50% comparado con el 100% del grupo II y del grupo III.

Finalmente la proliferación de neumocitos tipo II se presentó en el 100% de los tres grupos.

Cuadro 2. Porcentaje de ratas que tuvieron la lesión

Fases	Ia	Ib	II	III	IV	V	VI	VII
Grupo	%	%	%	%	%	%	%	%
N	100	100	25	25	25	100	50	100
P	100	100	25	25	50	100	100	100
S	100	100	25	25	0	100	100	100

N= N acetil cisteina

P= Placebo

S= Factor surfactante

Puntaje de severidad de la lesión

Se puede observar que en la fase Ib, el grupo N tuvo un valor de lesión de 2.5 ± 0.4 vs grupo P con un valor de lesión de 3.7 ± 0.4 Donde existió diferencia estadísticamente significativa, con una $P < 0.01$. En las fases Ia, II, III, IV, V, VI y VII no se encontró diferencia estadísticamente significativa para ambos grupos.

Al comparar el grupo S vs P en la fase Ib, existió una grado de lesión de 2.2 ± 0.4 para el primero vs 3.7 ± 0.4 que mostró diferencia estadísticamente significativa, con una $p < 0.01$. Observamos además en la fase VII un nivel de lesión para el grupo S de 1 ± 0.4 vs 3.5 ± 0.6 para el grupo P. Donde existió diferencia estadísticamente significativa, con una $p < 0.01$. En las fases Ia, II, III, IV, V y VI no se observó diferencia estadísticamente significativa al comparar ambos grupos.

Al comparar el grupo N vs S en las fases Ia, Ib, II, III, IV, V y VI no se encontró diferencia estadísticamente significativa.

En la figura 2.0 se muestran los valores asignados por puntaje por grupo para cada una de las fases.

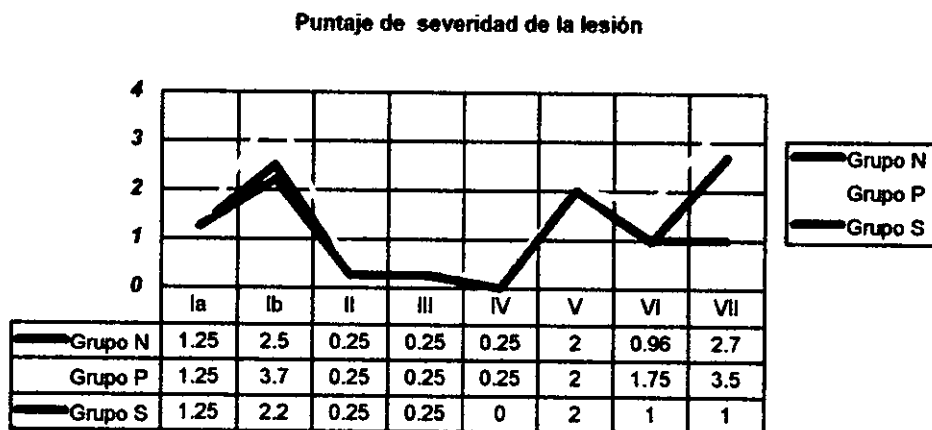


Figura 2.0 Severidad de la lesión pulmonar aguda

Al calcular la significancia estadística podemos observar los siguiente valores Cuadro No. 3.0

Grupos	Ia	Ib	II	III	IV	V	VI	VII
N vs P	1	0.01*	1	1	0.53	1	0.15	0.24
N vs S	1	0.5	1	1	0.39	1	0.64	0.22
P vs N	1	0.01*	1	1	0.18	1	0.22	0.01*

• * $p < 0.01$

Cuadro No. 3.0 Valor de p para los diferentes grupos.

Discusión:

Este estudio demostró que la utilización de factor surfactante a dosis de 200 mg/kg disminuye la infiltración leucocitaria, característicos de la lesión pulmonar inducida por oxígeno (al 100%) además al compararse con la N-acetilcisteína a dosis de 40mg/200mg y demostró que se disminuye la infiltración leucocitaria, aunque en menor grado que con el factor surfactante.

Los estudios de experimentación en animales han demostrado que la evolución de la lesión pulmonar aguda deteriora el intercambio de gases por acumulación de líquido dentro del alvéolo lo que finalmente lleva a falla respiratoria (15). Donde el daño inicial es a las células del endotelio y es seguida a las células del epitelio, estos fenómenos inician principalmente por una condensación de la cromatina seguido de fragmentación del DNA, mismos que forman parte de la apoptosis celular (16).

Estudios previos han referido la disminución del edema pulmonar inducido en diferentes modelos de experimentación usando factor surfactante no así N-acetilcisteína (pues los resultados han sido controversiales). Las dosis de factor surfactante han sido utilizadas desde 50 hasta 400 mg/Kg pero la dosis habitualmente recomendada es de 200 mg/kg (12).

El incremento del nivel de proteínas en la LPA se ha relacionado con los cambios de la permeabilidad en la barrera alvéolo capilar, lo que indica que el endotelio es el responsable primario de los cambios a través de los capilares junto con la infiltración leucocitaria y a partir de este momento continúe la progresión de la LPA (9).

Cabe suponer que el mecanismo de la N-acetilcisteína probablemente lleve a una vía alterna de disminución de la LPA como puede ser por su efecto antioxidante, y aún más probablemente la asociación de la N-acetilcisteína con el

factor surfactante mejore de manera sinérgica la función pulmonar en los pacientes críticos.

Cabe por lo tanto pensar que las enzimas antioxidantes tales como la catalasa, la oxidoreductasa o la misma dismutasa, forme parte del sitio donde podrá actuar la N acetil cisteina y muy probablemente esta sea la forma en que son inhibidos los productos generadores de daño celular.

La inestabilidad de las vías aéreas pequeñas se ha relacionado al edema alveolar, la disminución del edema alveolar con la N-acetilcisteina o factor surfactante probablemente se relacione con el mantenimiento de la relación lípidos-proteínas (7,9,12).

A pesar de encontrarse atelectasia en todos los pacientes observados en los grupos S, N y P. Alguna de las técnicas mencionadas por los patólogos sostienen que antes de realizar un corte pulmonar debe de insuflarse el pulmón con formol para que no existan microatelectasias (17), dado este

concepto en nuestro estudio, no se insufló el pulmón por lo tanto las atelectasias no deben relacionarse directamente a la LPA sino pueden ser secundarias a colapso alveolar de otra etiología.

N-acetilcisteína utilizada en pacientes con LPA o SIRPA pudiera disminuir la cascada de mediadores por un lado citoquinas y por otro la liberación de radicales libres y evitar así un daño sinérgico pulmonar por un lado la patología de fondo aunada a la administración de fracciones altas de oxígeno con el fin de mantener una adecuada oxigenación a diferentes tejidos (cerebro principalmente).

La respuesta inflamatoria manifestada por acúmulos de leucocitos se reduce con la N acetilcisteína, y muy probablemente no tenga una relación directa sobre la quimiotaxis de los macrófagos, pero sí con una menor respuesta inflamatoria que estará asociada principalmente con un menor daño celular inducido por radicales libres.

Faltan aun más estudios que puedan validar estas teorías tanto a nivel experimental como clínico.

El modelo experimental utilizado fue con 4 ratas lo que llevar a un error beta, además el tiempo de exposición al oxígeno de 8 horas se asignó porque a este tiempo se observa el inicio de la LPA. Una publicación reciente analiza los cambios histológicos en un pulmón expuesto a FiO_2 elevadas por diferentes periodos de tiempo nos sugiere que la exposición al O_2 debe ser mayor para valorar adecuadamente los cambios en la evolución de la LPA (18).

Conclusiones:

- 1) Se logró producir lesión pulmonar aguda en el modelo experimental diseñado.
- 2) La mayor lesión pulmonar se encontró en el grupo Control.
- 3) A pesar de que la N-acetilcisteína disminuye algunos aspectos del daño pulmonar, el factor surfactante es el medicamento que da mayor protección en la LPA inducida por oxígeno.
- 4) De estas observaciones aún falta comprobar el beneficio clínico en paciente con LPA o SIRPA.
- 5) Pensamos que la muestra debe ser mayor y ampliar el tiempo de exposición al oxígeno para tener conclusiones más firmes.

Bibliografía:

- 1) Piedboeuf B. and cols In vivo expression of intracellular adhesion molecule-1 en type II pneumocytes during hyperoxia. *Am J respir cell mol biol.* 1996. 15(1).71-7.
- 2) Nieman GF. An cols. Surfactant replacement in the tratment of sepsis-induced adult respiratory diestress syndrome in pigs. *Crit care med* 1996, 24(6), 1025-33.
- 3) Godinez MH. Inspired oxigen concentration alters the phospholipids and protein content in the bronchoalveolar lavage-accessible space. *Crit care med* 1996, 24(5). 862-9.
- 4) Ahuja a. and cols. Inhibition of the human neutrophils respirartory berst by native and syntetic surfactant.
- 5) Chao W. Inhibitory effect of porcine surfactant on the respiratory burst oxidase in human neutrophils. Attenuation of p47 phox membrane translocation as the mechanism. *J. Clin invest* 1995,96(6) 2654-60.

- 6) Walther FJ y cols. Antioxidant-surfactant liposomes mitigate hyperoxic lung injury in premature rabbits. *Am J Physiol.* 1995 269: 613-7.
- 7) Moller JC. And cols. Treatment of severe non-neonatal ARDS in children with surfactant and nitric oxide in a pre-ECMO situation. *Int J Artif Organs.* 1995 18(10) 598-602.
- 8) Pach ER. Prevention of intracellular adenosine triphosphate depletion after sublethal oxidant injury to rat type II alveolar epithelial cells with exogenous glutathione and N-acetylcysteine. *Am J Med Sci.* 1995 310(4) 133-7.
- 9) Doyle IR; And cols. Serum surfactant protein-A levels in patients with acute cardiogenic pulmonary edema and adult respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995 152 (1). 7-17.
- 10) Corbrbet A and cols. Double-blind, randomized trial of one versus three prophylactic doses of synthetic surfactant in 826 neonates weighing 700 to 100 grams, effects on mortality rate. *American exosurf neonatal*

study groups I and IIa. *Biochem J* 1995 15 309(pt 2) 551-5.

- 11) Smith Thier. *Fisiopatologia*. 1993. Edit interamericana.
- 12) Serje J, Exogenous surfactant preserve lung function and reduces alveolar Evans blue dye influx in a rat model of ventilation-induced lung injury. *Anesthesiology*, 1998;89:467-74
- 13) Canstance Barazzone y cols Oxigen toxiciti in mouse lung. *Am J Respir, Cell Mol Biol* 19:573-581
- 14) Deiss y cols. Cathepsin D protease mediate programmed cell death induced by interferon gamma *EMBO J* 15: 3861-3870
- 15) Mundle y cols. The two in situ techniques do not differentiate between apoptosis and necrosis but rather reveal distinct patterns of DNA fragmentation in apoptosis. *Lab Invest* 72:611-613
- 16) Janssen y cols. Cell and tissue response to oxidative damage. *Lab Invest* 60:261-274
- 17) Koshland D and cols. The catalytic properties of enzymes. *Annual review of biochemistry*. 1968.37:359-410.

-
- 18) King and Clements. Factor surfactante .Am. J. Physiol.
223:707,1972.