

## Protección de la lesión pulmonar aguda debida a la exposición al oxígeno con N-acetilcisteína y surfactante exógeno en ratas. Estudio comparativo

Dr. Alfonso Estrada Gutiérrez,\* Dr. Francisco Guadarrama Quijada,\* Dra. Diana Cortés Aguilar,\* Dr. Juvenal Franco Granillo,\* Dr. José J Elizalde González,\* Dr. Jesús Martínez Sánchez\*

### RESUMEN

**Objetivo:** Estudiar el papel del efecto protector de la N-acetilcisteína y el surfactante exógeno sobre la lesión pulmonar aguda (LPA) inducida por oxígeno.

**Diseño:** Estudio prospectivo, comparativo y descriptivo.

**Lugar:** UCI de un hospital de enseñanza de México.

**Sujetos:** Doce ratas macho.

**Intervenciones:** Los animales se asignaron aleatoriamente a tres grupos de tratamiento por vía transtraqueal: el grupo I recibió N-acetilcisteína 40 mg/200 g, el grupo II (grupo control) se trató con 2 mL de solución salina y el grupo III recibió surfactante exógeno 200 mg/kg, previa exposición al oxígeno (FIO<sub>2</sub>, 1.0) durante ocho horas. Al final del experimento se obtuvo un lóbulo pulmonar. Un patólogo experto analizó los tejidos y clasificó la LPA de acuerdo a fases (I-VII) y el grado de severidad de la misma (0-4 puntos).

**Resultados:** El porcentaje de ratas lesionadas fue similar en los tres grupos al inicio (I-III) y al final (V, VII) de las fases. El grado de severidad de la lesión fue de 2.5, 3.7 y 2.2 puntos para los grupos I, II y III respectivamente en la fase Ib ( $p < 0.05$ ). Se observó una diferencia significativa en la fase VII entre los grupos II y III (3.5 vs. 1 puntos, respectivamente);  $p = 0.01$ .

**Conclusión:** Los efectos benéficos de la N-acetilcisteína y el surfactante exógeno no fueron concluyentes en este estudio.

**Palabras clave:** Lesión pulmonar aguda, N-acetilcisteína, surfactante exógeno, exposición al oxígeno, ratas.

### SUMMARY

**Objective:** To study the role of the protective effect of N-acetylcysteine and exogenous surfactant on the acute pulmonary injury (API) induced by oxygen.

**Design:** Prospective, comparative and descriptive study.

**Setting:** ICU of a teaching hospital of Mexico.

**Subjects:** Twelve male rats.

**Interventions:** All the animals were treated by transtracheal route and were aleatory assigned to three groups: group I received N-acetylcysteine 40 mg/200 g, group II (control) was treated with saline solution 2 mL and group III received exogenous surfactant 200 mg/kg, previous exposure to oxygen (FIO<sub>2</sub>, 1.0) during eight hours. At the end of the experiment a pulmonary lobe was obtained. An expertise pathologist analyzed the tissues and classified APL according the lesion stage (I-VII) and the degree of severity injury (0-4 points).

**Results:** The percentage of injured rats was similar for the three groups at the initial (I-III) and at the end (V, VII) stages. The degree of severity injury was 2.5, 3.7 and 2.2 points for I, II and III groups respectively, in stage Ib ( $p < 0.05$ ). A significant difference was observed in stage VII between group II and III (3.5 vs. 1 points respectively);  $p = 0.01$ .

**Conclusion:** The salutary effects of N-acetylcysteine and surfactant are not conclusive in this study.

**Key words:** Acute pulmonary injury, N-acetylcysteine exogenous surfactant, oxygen exposure, rats.

Cuando existe disrupción tisular, se altera la comunicación célula a célula, produciéndose migración de proteínas y activación de leucocitos. Esto aumenta la sensibilidad de las neumocitos tipo I a la hipoxia cuando se exponen a concentraciones de

\* Departamento de Medicina Crítica «Dr. Mario Shapiro», Hospital ABC, México, D.F.

oxígeno mayores al 60%.<sup>1</sup> Por otro lado los neumocitos tipo II son resistentes a la hiperoxia y juegan un papel importante en la reversión de los procesos de lisis.<sup>1</sup>

Se ha demostrado que existe síntesis de moléculas de adhesión intracelular (ICAM-I) probablemente en el neumocito II; en los ratones prematuros se ha reportado que después de la exposición a oxígeno al 100% por 72 horas, se incrementa la síntesis de ICAM-I, que está relacionado probablemente con la reparación del daño pulmonar.<sup>2</sup> En los pacientes con SIRPA una de las principales alteraciones que se observan es la disminución de la síntesis del factor surfactante, lo que junto con el edema pulmonar que acompaña a esta entidad, produce retención de CO<sub>2</sub>, hipoxemia y disminución de la distensibilidad pulmonar.<sup>3</sup> En la lesión pulmonar aguda (LPA) debida a la exposición a concentraciones elevadas de oxígeno, se han descrito alteraciones de las concentraciones de fosfolípidos, fosfatidilcolina y fosfatidilglicerol.<sup>4</sup> También se ha involucrado a la producción de radicales libres en la génesis de la LPA y se ha propuesto la administración de surfactante para prevenir el daño pulmonar, aunque su mecanismo de acción no ha sido completamente establecido, así como su impacto en la evolución de la lesión pulmonar.<sup>3,5</sup> El surfactante puede inhibir la producción de anión superóxido por lo macrófagos por su acción sobre el receptor formilmetilmetionilleucifenilalanina (FMLP) y disminuir la producción de oxígeno por los polimorfonucleares.<sup>5</sup> El surfactante liposomal encapsula a la superóxido dismutasa y catalasa lo que incrementa la actividad antioxidante de los neumocitos tipo II y protege a las células de la LPA.<sup>3,5</sup> En neonatos de menos de 1,000 gramos de peso con síndrome de dificultad respiratoria y que han requerido de niveles altos de PEEP, el uso de surfactante exógeno ha permitido disminuir los días de ventilación mecánica, la FIO<sub>2</sub>, y los días de estancia, y ha demostrado ser eficaz y seguro.<sup>6</sup> El uso conjunto de factor surfactante y óxido nítrico ha permitido disminuir la utilización de ECMO en este tipo de pacientes.<sup>3,6</sup>

Actualmente también se ha demostrado que el uso de glutatión y de N-acetilcisteína pueden disminuir el daño del neumocito tipo II y por lo mismo el decremento del ATP intracelular.<sup>7</sup>

Los estudios sobre el efecto de la N-acetilcisteína sobre la evolución de la LPA no han sido plenamente estudiados y no se ha comprobado el beneficio de su utilización en este grupo de pacientes, sin embargo, se ha descrito que se puede prevenir

la LPA con glutatión o N-acetilcisteína (NAC) después de que el tejido pulmonar ha sido expuesto a dosis subletales de peróxido de hidrógeno y ácido hipocloroso.<sup>7</sup>

El objetivo de este trabajo, fue comparar la utilidad de la N-acetilcisteína y del surfactante exógeno en la protección de la lesión pulmonar inducida por oxígeno a elevadas concentraciones en ratas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio prospectivo, observacional, experimental, doble ciego en el Laboratorio de Cirugía Experimental del Hospital ABC de enero a junio de 1998 en doce ratas adultas, machos de la cepa Wistar de 200 a 1,250 g de peso, que se expusieron a concentraciones elevadas de oxígeno. Se excluyeron a las que tuvieran infección durante su estancia en el bioterio, que murieran durante la inducción anestésica o que no cumplieran con un tiempo mínimo de exposición al oxígeno al 100%. Se formaron tres grupos cada uno constituido por cuatro ratas distribuidas en forma aleatoria que se colocaron en una caja de acrílico.

Se realizó inducción anestésica con pentobarbital sódico a dosis de 2.5 mL/kg de peso por vía intraperitoneal. Posteriormente, bajo anestesia general y anestesia local con lidocaína (30 mg/kg), se efectuó disección de los tejidos adyacentes a la tráquea. A continuación se puncionó la misma y se colocó un catéter del No. 22 que se conectó a un sistema de ambú pediátrico y se cerró la herida por planos. Se identificó a cada rata con un corte en la oreja, según el grupo asignado: grupo I, un corte en la oreja derecha; grupo II, corte en la oreja izquierda; grupo III, sin corte. El grupo I recibió N-acetilcisteína transtraqueal 40 mg/200 g, al grupo II se le administró 2 mL de solución salina al 0.9% por la misma vía y al grupo III se le trató con surfactante exógeno transtraqueal 200 mg/kg de peso. Para distribuir los fármacos se hicieron tres insuflaciones con una bolsa de ambú pediátrico.

Terminados los procedimientos anteriores, se colocaron en la caja de acrílico; se expusieron al oxígeno que se administró a través de un orificio de la parte superior de la caja, a concentración del 100% (corroborada mediante un sensor de oxígeno) y flujo de 15 litros/minuto, durante ocho horas; y se mantuvo una temperatura constante de 38 °C con dos focos de 100 wats. Al final del experimento, se les sacrificó mediante la administración de pentobarbital sódico. Posteriormente se efectuó

una toracotomía media y se obtuvo un lóbulo pulmonar de cada espécimen. La muestra pulmonar se colocó en formol en frascos de 20 mL y se envió al Departamento de Patología, donde se deshidrató el tejido obtenido por técnica manual con alcohol. Luego se hizo el montaje de la pieza en parafina y se tiñó con hematoxilina y eosina. Se estudió cada una de las muestras por un patólogo experto, asignándose una puntuación de 0 a 4 puntos para evaluar el grado de LPA: 0) sin lesión, I lesión mínima, II lesión moderada, III lesión severa, IV lesión muy severa. Las fases de la lesión observadas se clasificaron de la manera siguiente:

I) infiltración leucocitaria (a por polimorfonucleares, b por mononucleares), II) edema intersticial e intraalveolar, III) exudación de fibrina, IV) formación de membranas hialinas, V) atelectasias, VI) hemorragia focal intraalveolar, VII) proliferación del neumocito tipo II.

*Análisis estadístico.* Se calculó la media, desviación estándar, t de Student y análisis de varianza multivariada; p se consideró significativa si fuese menor 0.05.

## RESULTADOS

Fases de la lesión pulmonar aguda. En el *cuadro I* se describen las fases de lesión pulmonar. Se observó que en los tres grupos de estudio fue igual el comportamiento en las tres primeras fases. Llama la atención que el 25% de las ratas de los tres grupos tuvieron edema intersticial e intraalveolar (fase

II) y exudación de fibrina (fase III). En la fase IV (formación de membranas hialinas) se encontró que en el grupo II hubo más animales afectados (50%) comparado con el grupo I (25%) y el grupo III (0%). En las fases V-VII, el 100% de los casos estuvieron afectados, excepto en la fase VI, donde se observó la lesión en un 50% de los casos correspondientes al grupo I.

En la *figura 1*, se observa la evolución del grado de severidad de la lesión pulmonar en cada una de las fases de los tres grupos; hubo más daño en el grupo II en comparación con los restantes, en todas las fases, pero especialmente en la Ib (3.7 puntos) y en la VII (3.5 puntos). El grupo II tuvo mayor afectación en las fases Ib, IV y VII. Las ratas tratadas con surfactante exógeno (grupo III) tuvieron menos lesiones que aquéllas que recibieron N-acetilcisteína o solución salina y el mayor grado de severidad de la lesión pulmonar se observó en las fases 1b (2.2 puntos) y V (2 puntos). El grado de severidad de la lesión fue de 2.5, 3.7 y 2.2 puntos para los grupos I, II y III respectivamente en la fase Ib ( $p < 0.05$ ). Se observó una diferencia significativa en la fase VII entre los grupos II y III (3.5 vs. 1 puntos, respectivamente);  $p = 0.01$  (*cuadro II*).

## DISCUSIÓN

Las células del epitelio alveolar del tracto respiratorio inferior están expuestas continuamente a múltiples agentes nocivos y esto incluye a los radicales libres de oxígeno.<sup>1</sup>

**Cuadro I. Porcentaje de aparición de las fases por grupo.**

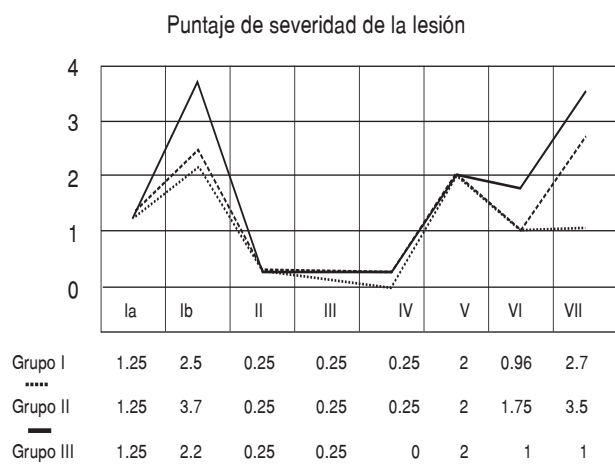
Fases Grupo	Ia %	Ib %	II %	III %	IV %	V %	VI %	VII %
N	100	100	25	25	25	100	50	100
P	100	100	25	25	50	100	100	100
S	100	100	25	25	0	100	100	100

N = N-acetilcisteína, P = Placebo, S = Factor surfactante.

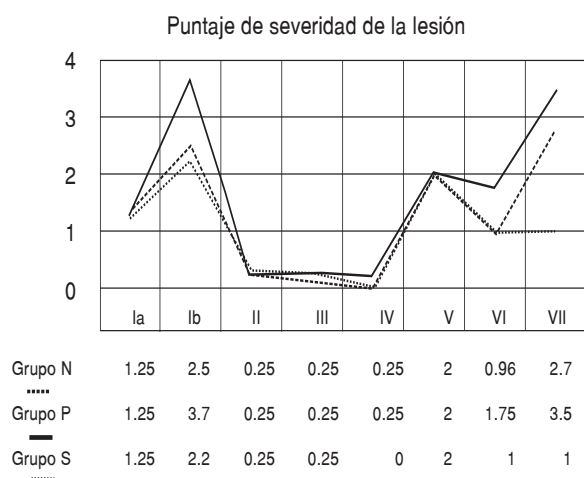
**Cuadro II. Valor de p para los diferentes grupos.**

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*

\*  $p < 0.01$ .



**Figura 1.** Severidad de la lesión pulmonar aguda.



**Figura 2.** Severidad de la lesión pulmonar aguda.

Cuando existe disrupción tisular aumenta la sensibilidad de las células epiteliales tipo I a la hiperoxia;<sup>1,2</sup> la exposición a elevadas concentraciones de oxígeno ocasiona lesión pulmonar aguda que se acompañan de alteraciones de los fosfolípidos y proteínas pulmonares.<sup>3,4</sup> En la lesión pulmonar aguda disminuyen los niveles de surfactante que se acompaña de alteraciones del intercambio gaseoso.<sup>4,5</sup> Otros estudios han demostrado alteraciones del surfactante en pacientes con SIRPA y edema agudo pulmonar cardiogénico.<sup>8</sup> En estudios experimentales se ha descrito que la administración de surfactante exógeno inhibe la síntesis del anión superóxido en animales expuestos a elevadas con-

centraciones de oxígeno y en el tratamiento del SIRPA experimental después de la inducción de sepsis.<sup>1,2,4,5,9</sup> También se ha utilizado con éxito en el tratamiento del síndrome de insuficiencia respiratoria aguda en neonatos de bajo peso.<sup>6</sup>

En el presente estudio se observó que la exposición al oxígeno a concentraciones elevadas, produjo alteraciones en los animales de experimentación en todas las fases analizadas y la utilización de surfactante a dosis de 200 mg/kg disminuyó la severidad de la lesión pulmonar inducida por oxígeno. Estudios previos ya han descrito que disminuye el edema pulmonar inducido en diferentes modelos de experimentación con el uso de surfactante a dosis de 50 a 400 mg/kg de peso, aunque la dosis recomendada habitualmente es de 200 mg/kg de peso.<sup>5</sup> El incremento del nivel de proteínas en los casos de lesión pulmonar aguda, se ha relacionado con los cambios de la permeabilidad en la barrera alveolocapilar, lo que sugiere que el endotelio es el responsable primario de los cambios a través de los capilares;<sup>8</sup> la inestabilidad de las vías aéreas pequeñas se ha relacionado al edema alveolar.<sup>3,5,8</sup> El empleo de surfactante o de N-acetilcisteína en estos casos disminuye la atracción molecular del agua y la producción del anión superóxido.<sup>5</sup> Sin embargo, en el estudio actual nos llamó la atención que su efecto protector sobre la lesión pulmonar fue nulo en las fases V a VII, por lo que habrá que cuestionarse si se requiere emplear una dosis más alta. No obstante que en estas lesiones lo habitual es encontrar atelectasias, es conveniente considerar que los patólogos recomiendan insuflar el pulmón antes de realizar un corte, lo que no se llevó a cabo en nuestro estudio y por esta razón las atelectasias no necesariamente están relacionadas con la LPA.

La N-acetilcisteína a dosis de 40 mg/200 de peso ha demostrado también disminuir el grado de lesión pulmonar aguda por su efecto antioxidante, aunque en grado menor grado que el surfactante.<sup>7,8</sup> Además la N-acetilcisteína no disminuye el edema pulmonar inducido en los modelos de experimentación.<sup>7</sup> En este estudio se encontró que la N-acetilcisteína disminuye la severidad de la lesión pulmonar aguda inducida por oxígeno a concentraciones elevadas y tiene como ventajas su bajo costo y la facilidad para administrarla debido al tamaño pequeño de su molécula. En teoría podría emplearse en pacientes con LPA o SIRPA para tratar de frenar la cascada de mediadores como citoquinas y radicales libres (cuyo efecto sumado a la lesión pulmo-

nar debida a la patología de fondo y a las concentraciones elevadas de oxígeno, indispensables en este tipo de pacientes) podría agravar el daño pulmonar, sin embargo en este trabajo fue menos efectivo que el surfactante.

Este pequeño estudio no es concluyente, consideramos que es necesario realizar otros estudios con mayor profundidad y con series más grandes tanto a nivel experimental como clínico para conocer el valor real de la N-acetilcisteína y el surfactante exógeno en el tratamiento de la lesión pulmonar aguda.

#### BIBLIOGRAFÍA

1. Piedoeuf B. In vivo expression of intracellular molecule-1 in type II pneumocytes during hyperoxia. *AM J Resp Cell Mol Biol* 1996;15:71-77.
2. Walther FJ. Antioxidant-surfactant mitigate hyperoxic lung injury in premature rabbits. *Am J Physiol* 1995;18:598-602.
3. Moller JC. Treatment of severe non-neonatal ARDS in children with surfactant and nitric oxide in a pre-ECMO situation. *Int J Artif Org* 1995;(18):598-602.
4. Godínez MH. Inspired oxygen concentration alters the phospholipids and protein content in bronchoalveolar lavage accessible space. *Crit Care Med* 1996;24:862-869.
5. Serje J. Exogenous surfactant preserve lung function and reduces alveolar Evans blue dye in flux in a rat model of ventilation-induced lung injury. *Anesthesiology* 1998;89:464-474.
6. Corbbet A. Double-blind, randomized trial of one versus three prophylactic dose 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;309 (pt II):551-555.
7. 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;310:133-137.
8. Doyle IR. Serum surfactant protein-A levels in patients with acute cardiogenic pulmonary edema and adult respiratory distress syndrome. *Am J Repts Crit Care Med* 1995;152:7-17.
9. Nieman GF. Surfactant replacement in the treatment of sepsis-induced adult respiratory distress syndrome in pigs. *Crit Care Med* 1996;24:1025-1033.

Correspondencia:  
Departamento de Medicina Crítica  
«Dr. Mario Shapiro» Hospital ABC  
Sur 136 No. 116, Col. Las Américas  
C.P. 01120, México, D.F.  
Teléfono (5) 2-30-80-00, Ext. 8590