

Puesta al día en Medicina Intensiva:
síndrome de distrés respiratorio agudo

Mecanismos biofísicos, celulares y
modulación de la lesión pulmonar inducida
por la ventilación mecánica*

E.A. VENTRICE^a, O. MARTÍ-SISTAC^b, R. GONZALVO^b, A. VILLAGRÁ^b, J. LÓPEZ-AGUILAR^b
Y L. BLANCH^b

^aHospital Sanatorio Otamendi y Miroli. Buenos Aires. Argentina.

^bCentro de Críticos. Corporación Sanitaria Parc Taulí. Instituto Universitario Parc Taulí. Esfera UAB.
Sabadell. Barcelona. España.

La lesión pulmonar inducida por la ventilación mecánica (VILI) se asocia a una elevada tasa de mortalidad y a un importante impacto social. La ventilación mecánica induce alteraciones estructurales y ultraestructurales en todas las tipologías celulares que conforman el pulmón, que pueden derivar en la transducción de señales intracelulares, así como en cambios en la expresión de genes, en lo que se conoce como mecanotransducción. Entre los procesos implicados están la inflamación y/o coagulación, apoptosis/necrosis que pueden derivar en la propagación de la lesión fuera del pulmón, llegando a la afectación multiorgánica. La VILI puede ser modulada mediante intervenciones diversas como el uso de modalidades ventilatorias protectoras, abordajes terapéuticos basados en fármacos vasoactivos, antioxidantes, y más recientemente tratamientos basados en el uso de sustancias reparadoras del surfactante como los poloxámeros entre otros. El conocimiento de los mecanismos implicados en la VILI es definitivo para el abordaje de esta patología.

*Éste es el octavo de 9 artículos de la Puesta al día en Medicina Intensiva: síndrome de distrés respiratorio agudo.

Financiado: FIS 04/2365, RETICS G03/063, FIS99/3091 y Programa I2 ISCIII (JLA), MEC BFU2006-07124/BFI.

Correspondencia: Dr. Lluís Blanch.
Centro de Críticos. Corporación Sanitaria Parc Taulí.
Instituto Universitario Parc Taulí. Esfera UAB.
C/ Parc Taulí, s/n.
08208 Sabadell, Barcelona, España.
Correo electrónico: lblanch@cspt.es

Manuscrito aceptado el 13-XI-2006.

PALABRAS CLAVE: lesión pulmonar, ventilación mecánica, estiramiento cíclico, biotrauma, deformación celular.

**MOLECULAR AND BIOPHYSICAL MECHANISMS
AND MODULATION OF VENTILATOR-INDUCED
LUNG INJURY**

Ventilator-induced lung injury (VILI) is associated to a high rate of mortality with an important social impact. Mechanical ventilation induces structural and ultrastructural alterations in all cell types of the lung and can derive in the transduction of intracellular signals, as well as in changes in the expression of genes, a process known as mechanotransduction. Some of the conditions involved, such as inflammation and/or coagulation, apoptosis/necrosis can lead to the propagation of the injury outside the lung, resulting in multiorganic failure. VILI can be modulated by means of diverse interventions as the use of protective ventilatory modes, therapeutic approaches based on vasoactive and antioxidative drugs, and more recently treatments based on the use of repairing substances of the surfactant like poloxamers among others. Knowledge of the mechanisms involved in VILI is definitive for a better approach to this condition.

KEY WORDS: lung injury, mechanical ventilation, cyclic stretching, biotrauma, cell deformation.

INTRODUCCIÓN

La lesión pulmonar aguda (LPA) representa un importante impacto en la salud pública y es una de las principales causas de indicación de ventilación

mecánica en las Unidades de Cuidados Críticos¹. La lesión pulmonar inducida por la ventilación mecánica (VILI) se asocia en muchos casos a una respuesta inflamatoria descontrolada y a una elevada tasa de mortalidad²⁻⁷.

La ventilación mecánica se asocia a la liberación de mediadores inflamatorios a nivel local y sistémico, así como con alteraciones a nivel de células alveolares y endoteliales, y con cambios en la expresión de genes o en la transducción de señales por estiramiento cíclico, aun en ausencia de lesión pulmonar previa. Diversos estudios multicéntricos han demostrado que el uso de estrategias ventilatorias protectoras contribuye a la reducción de la mortalidad en pacientes con LPA o síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA)^{7,8}.

En esta revisión se pretende analizar los mecanismos más íntimos que operan a nivel celular y molecular en la VILI, y sus posibles implicaciones terapéuticas futuras.

ESTRUCTURA E HISTOLOGÍA PULMONAR

El pulmón es un órgano dinámico que cambia de tamaño con cada ciclo respiratorio⁹⁻¹¹. El alveolo junto con el capilar pulmonar integran la interfase hematogaseosa, cuya finalidad es el intercambio gaseoso para la oxigenación de los tejidos¹²⁻¹⁵. La interdependencia alveolar previene el colapso pulmonar a bajos volúmenes pulmonares. La red de colágeno y la elastina son responsables del mantenimiento de la estructura, contribuyendo a la dureza y a la extensibilidad, respectivamente, junto con el surfactante y el tejido conectivo¹⁶⁻¹⁸. En los alveolos se genera una fuerza contráctil elástica que se denomina tensión superficial¹¹. El tamaño alveolar depende del equilibrio entre fuerzas de superficie y el tejido. El surfactante disminuye la tensión superficial de la interfase aire-líquido para evitar el colapso proporcionando una mayor compliancia pulmonar, aunque su función fisiológica exacta aún permanece en discusión³.

La interfase hematogaseosa ocupa una enorme superficie. Los capilares pulmonares ocupan el segmento medio de la circulación pulmonar recibiendo la influencia directa de la presión alveolar, mientras que los vasos extraalveolares contribuyen en mayor proporción a la resistencia vascular pulmonar (RVP)^{13,15}, los «vasos corner» se localizan en las uniones de 3 o más septos alveolares y regulan el flujo alveolar.

El epitelio pulmonar lo conforman neumocitos tipo I y II. Los primeros tapizan casi por completo la superficie alveolar y ejercen una función estructural. Los neumocitos tipo II son muy activos metabólicamente, producen el surfactante y, en caso de lesión, se transforman en neumocitos tipo I. En el epitelio pulmonar también coexisten macrófagos alveolares, cuya misión es la defensa ante la lesión, y fibroblastos encargados de la síntesis de colágeno y elastina, componentes de la matriz extracelular (MEC) (fig. 1)^{9,10}.

Los capilares pulmonares están constituidos por células endoteliales, son permeables al agua y a

muchas moléculas e iones, en contraste con el epitelio alveolar, que en general impide el paso de iones, por ello es muy vulnerable a ciertos insultos químicos, mecánicos o humorales que pueden vulnerar la permeabilidad capilar pulmonar. Su integridad funcional y estructural es esencial para una adecuada homeostasis cardiovascular, pulmonar y sistémica¹⁹.

El endotelio capilar pulmonar posee numerosas funciones fisiológicas e inmunológicas, entre ellas la síntesis y liberación de agentes vasoactivos como: angiotensina II, prostaciclina, tromboxano A2, óxido nítrico (NO) y endotelinas, que regulan el tono vascular y la vasoconstricción pulmonar hipóxica. Además, el endotelio es capaz de producir enzimas (enzima convertidora de la angiotensina [ECA], NO sintetasa, lipoproteinlipasas y nucleotidasas), receptores, moléculas transductoras de señales intracelulares y moléculas de adhesión celular. A su vez segrega factores de crecimiento, citoquinas, especies reactivas del oxígeno (ROS), entre otros, e interviene en la regulación de la coagulación y la trombólisis, favoreciendo la hemofluidéz (fig. 1)^{19,20}.

La MEC ocupa el espacio existente entre el epitelio alveolar y el endotelio capilar, del lado del capilar consiste esencialmente en una fusión de membranas basales de las capas epitelial y endotelial¹⁰, del otro lado la MEC es más ancha e incluye fibrillas de colágeno. El lado de más grosor se encuentra principalmente vinculado con el intercambio de líquidos a través del endotelio, mientras que el más delgado es responsable de la mayor parte del intercambio gaseoso. El tejido intersticial se encuentra en todo el pulmón y es la vía de drenaje desde los capilares hacia los vasos linfáticos^{9,10}.

La resistencia al estrés de la barrera hematogaseosa la proporciona la membrana basal (MB) alveolar y endotelial que contiene grandes cantidades de colágeno tipo IV. El incremento de superficie de la MB que acompaña a la ventilación impone cambios en las adherencias entre células alveolares y endoteliales, pudiendo producir la reorganización del citoesqueleto de la célula alveolar²¹.

Los componentes moleculares de la MB están organizados en dominios específicos hacia adentro y afuera de la célula. Las integrinas son receptores de adhesión a través de los cuales las células alveolares interactúan entre ellas proporcionando una dinámica bidireccional entre el citoesqueleto y la MEC²¹. Las integrinas se encuentran en los llamados sitios focales de adhesión, que favorecen la unión intercelular y proveen medios para el control direccional de locomoción y forma celular (fig. 1). Se activan mediante ligandos que al unirse transducen señales bioquímicas al interior de la célula a través de asociaciones estructurales con proteínas que incluyen, GTPasas, tirosín-kinasas y fosfatidilinositol. Otras moléculas, tales como las cadherinas desempeñan también un papel en la transmisión de señales hacia las células alveolares y son objetivo de deformación, induciendo alteraciones en la función de barrera epitelial y endotelial²¹.

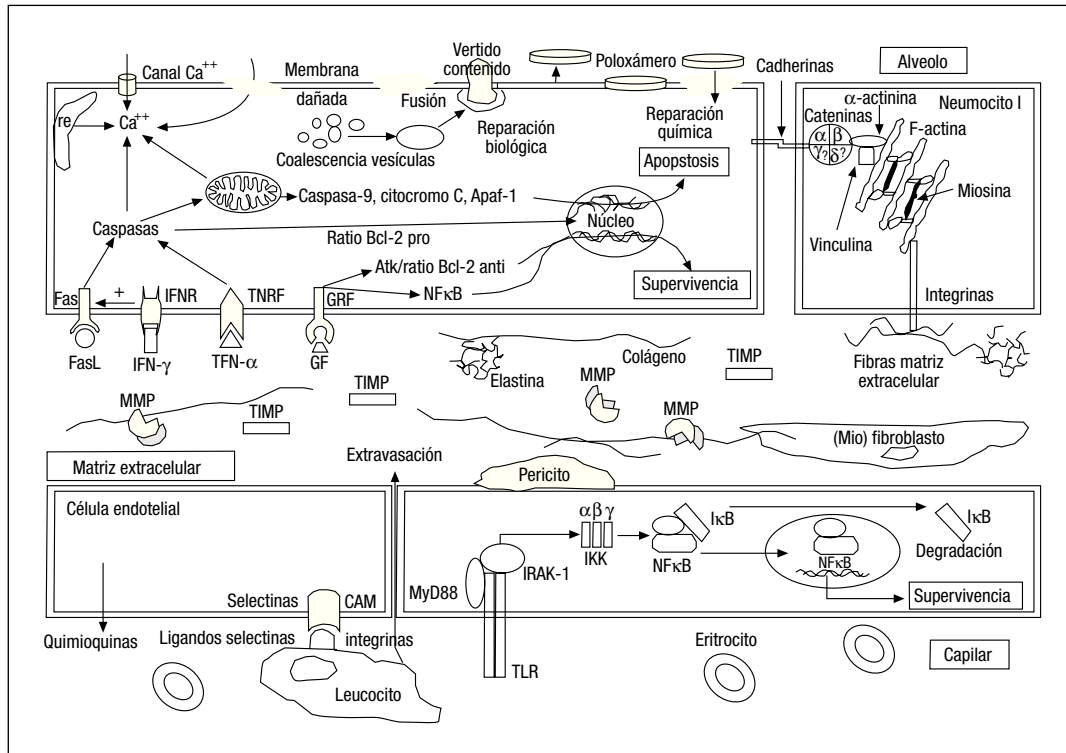


Figura 1. Esquema simplificado de algunos de los elementos celulares y moleculares de la barrera hematógena, que no se muestran a escala. Atk: protein-quinasa B; MMP: metaloproteinasas; TIMP: inhibidores de MMP, IFN- γ e IFNR: interferón-gamma y su receptor; TNF- α y TNFR: factor de necrosis tumoral-alfa y su receptor; FasL y Fas: ligando Fas y su receptor; GF y GFR: factor de crecimiento y su receptor; CAM: moléculas de adhesión celular; TLR: receptores toll-like; MyD88: proteína adaptadora de TLR, IRAK-1: kinasa-1 de IKK; IKK: kinasas de I κ B; I κ B: inhibidores de NF κ B; NF κ B: factor nuclear de transcripción kappa B; re: retículo endoplásmico.

LESIÓN INDUCIDA POR LA VENTILACIÓN MECÁNICA (VILI)

La ventilación mecánica puede conllevar la aparición de lesión pulmonar (VILI) incluso en pulmones previamente sanos^{2,3}. La VILI se ha estudiado a lo largo de varias décadas, tanto desde el punto de vista clínico como en modelos animales, y es histológicamente indistinguible de la LPA/SDRA. La VILI engloba varios conceptos: a) barotrauma, lesión por altas presiones sinónimo de aire extraalveolar; b) volutrauma, lesión por altas presiones transpulmonares y sobredistensión; c) atelectrauma, colapso de alveolos inestables secundario al cierre/apertura cíclicos con estiramiento de regiones sanas, y d) bio-trauma, por alteración humoral (fig. 2).

Cambios estructurales

La ventilación mecánica somete al pulmón a fuerzas que alteran su estructura y sus propiedades elásticas. En pulmones normales la fuerza de distensión alveolar es igual a la presión transpulmonar, en los lesionados el patrón de inflación es heterogéneo y la fuerza de distensión alveolar puede alcanzar hasta 140 cmH₂O, aun con presiones transpulmonares de

30 cmH₂O, siendo susceptibles al daño cíclico por fuerzas de cizallamiento resultantes del colapso y sobredistensión repetitivos. Estas fuerzas afectan a todos los tipos celulares del pulmón y pueden contribuir a la VILI³.

Al aumentar la presión alveolar durante la inflación cae la presión intersticial y se incrementa la presión transmural de los vasos adyacentes. En los vasos intraalveolares ocurre lo contrario, con el aumento de volumen pulmonar se comprimen y hay cese circulatorio, modificando la RVP²², contribuyendo a la heterogeneidad. El modelo de West basado en tres zonas influenciadas por la gravedad¹³ es poco común en la práctica, ya que a lo largo del mismo plano transversal coexisten gran variedad de estados de perfusión. El incremento de la permeabilidad vascular puede llevar a la formación de edema alveolar comprometiendo el intercambio gaseoso¹⁵.

Cambios ultraestructurales y fallo capilar por estrés

West et al²³ describieron la existencia de cambios ultraestructurales, atribuidos a fallo por estrés mecánico, en pulmones de conejos cuyos capilares pulmonares eran expuestos a altas presiones transmura-

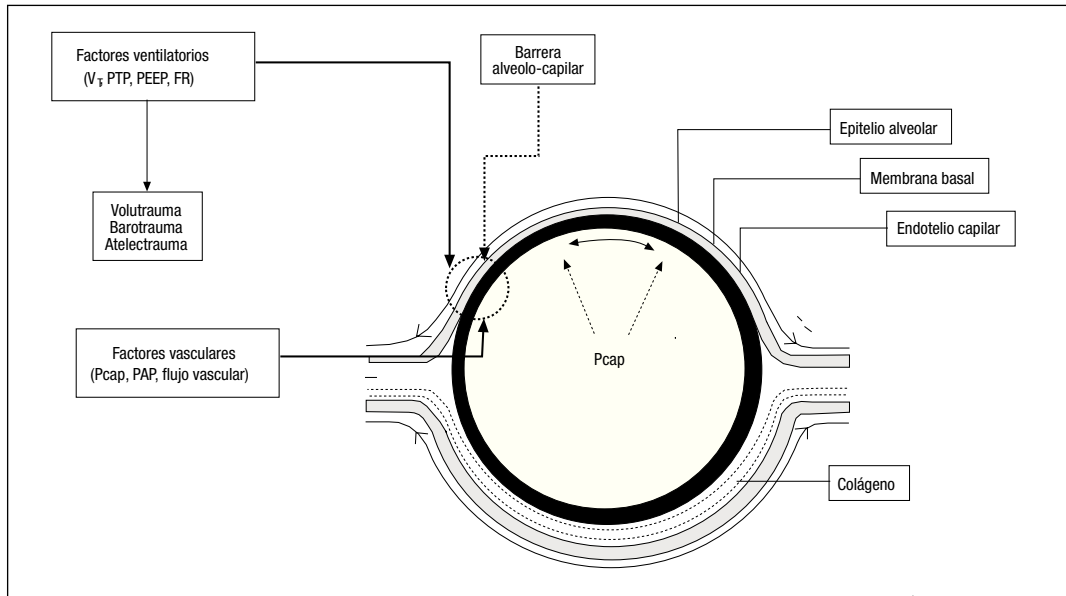


Figura 2. Factores implicados en el fallo de la barrera alveolo-capilar durante la ventilación mecánica. V_T : volumen corriente; PTP: presión transpulmonar; PEEP: presión positiva al final de la espiración; FR: frecuencia respiratoria; Pcap: presión capilar pulmonar; PAP: presión en arteria pulmonar.

les, observando la disrupción de la capa endotelial capilar, de la capa epitelial alveolar o ambas (fig. 3).

Posteriormente, Marini et al^{15,24} plantearon que además del edema y de la rotura vascular también aparecía fallo estructural de la barrera hematogaseosa. Sus experimentos han demostrado que fuerzas mecánicas intraalveolares pueden producir lesión hemorrágica en ausencia de inflamación preexistente. La lesión pulmonar se objetiva por la ruptura de la barrera endotelioepitelial con el consiguiente aumento de permeabilidad y formación de edema con o sin hemorragia (fig. 3).

El incremento de las presiones predispone a la rotura de la barrera, especialmente a frecuencias ventilatorias altas^{15,24,25}. Hotchkiss et al²⁵ demostraron que elevaciones fásicas de la presión arterial pulmonar (PAP) causan menos daño que las que ocurren durante la ventilación con presión positiva intermitente, atribuyendo un papel más importante en la génesis de VILI a los cambios en la presión perivascular extraalveolar que a los aumentos aislados del flujo pulmonar. Broccard et al²² demostraron una fuerte correlación entre los cambios en la presión vascular y los índices de lesión. En este modelo la intensidad

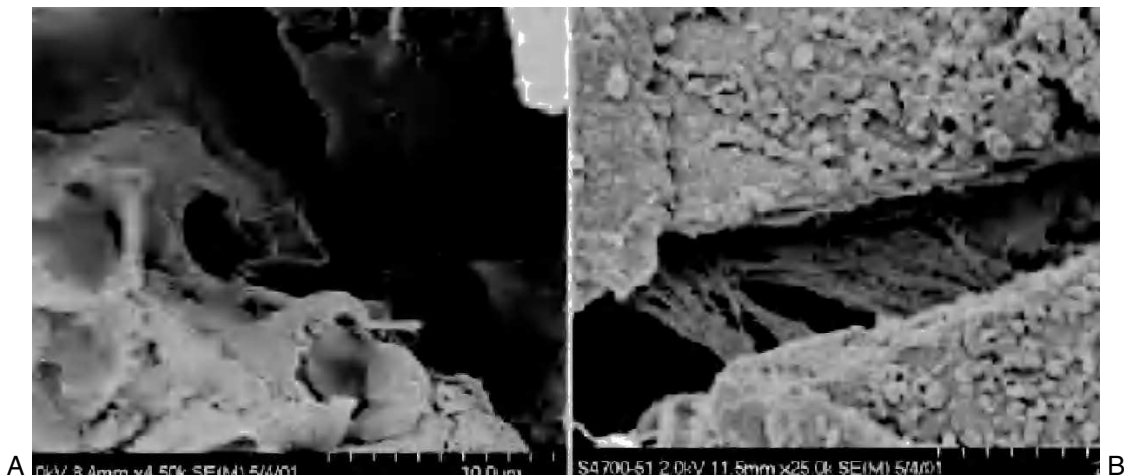


Figura 3. Imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de un pulmón de conejo sometido a elevadas presiones transpulmonares. A) Fractura capilar y extravasación de un eritrocito a la luz alveolar. B) Fibras de colágeno en el fallo capilar por estrés. Imágenes cedidas por el Dr. John R. Hotchkiss.

de la perfusión *per se* no incrementó la permeabilidad, concluyendo que la contribución de la perfusión a la lesión pulmonar depende del patrón ventilatorio usado. A idéntica tasa de perfusión, los pulmones ventilados con menores presiones transalveolares presentaron menos alteraciones de la estructura pulmonar. La distribución de la VILI hacia zonas dependientes del pulmón podría ser atribuible a las variaciones regionales de flujo y presión sanguínea, sin ser la intensidad de la perfusión en sí misma la responsable de la VILI, sino los cambios en las presiones vasculares producidos por la ventilación. Estos estudios sugieren que las interacciones entre la relación ventilación/perfusión pueden modular la gravedad de la lesión pulmonar durante la ventilación mecánica, mucho más que las presiones vasculares, y de los espacios aéreos en forma aislada.

En un trabajo más reciente, López-Aguilar et al evaluaron la contribución del flujo vascular en la VILI con independencia de las presiones vasculares alcanzadas usando un modelo de pulmón aislado de conejo. En este modelo el aumento del flujo contribuyó al desarrollo de lesión independientemente de la presión capilar y aun con presiones capilares se observó en el rango de la normalidad^{24,26}.

Estos hallazgos contribuyen a demostrar que la lesión pulmonar se magnifica si el flujo vascular elevado se combina con el estiramiento cíclico de las unidades alveolares durante la ventilación mecánica.

Algunos de los cambios ultraestructurales pueden ser reversibles, ya que las células pueden desplazarse a lo largo de su MB y juntarse nuevamente cuando las presiones se reducen²³. Fenómenos similares se dan en el epitelio alveolar, donde células tipo I que aparecen separadas conservan su MB intacta. El hecho de que la MB permanezca intacta sugirió que las células podrían ser capaces de reunirse al disminuir la presión, y que la membrana podría resistir gracias a la presencia de colágeno tipo IV, que confiere resistencia a la barrera hematogaseosa. Al romperse la barrera se forma edema alveolar de alto contenido proteico con material granular en el espacio alveolar, se observa expansión de la MEC y se evidencian diferentes estadios de lesión a lo largo de las capas epiteliales, con paso de eritrocitos al espacio intersticial (fig. 3). En algunos casos la MB permanece intacta en función de su tamaño y estructura y tiene capacidad de adaptación cuando se somete a una fuerza. Hotchkiss et al²⁵ hallaron resultados similares, evidenciando que se obtenía menor lesión al reducir la frecuencia y amplitud del estímulo lesivo.

BIOFÍSICA PULMONAR

Determinantes biofísicos del estrés mecánico

Las interacciones entre las células y su MEC son importantes para prevenir el compromiso de la estructura celular o su muerte por estrés²⁷. Mediante tecnologías de alta resolución se han podido definir los micromecanismos²¹ como las fuerzas de tensión,

deformación, estiramiento y rozamiento (del inglés: *stress*, *strain*, *stretch* y *shear*, respectivamente), que operan sobre el parénquima pulmonar sometido a ventilación mecánica.

Algunos modelos de micromecánica y el análisis morfométrico del parénquima pulmonar han demostrado que la red de colágeno y la elastina le confieren la resistencia. Margulies²⁸⁻³⁰ observó la MB de las paredes alveolares, mediante microscopía electrónica de barrido, estimando el cambio en el área de superficie alveolar según el volumen y la presión aplicada, evidenciando un aumento aproximado del 35% en el área de la MB a capacidad inspiratoria máxima, que corresponde con un estiramiento celular del 15%, lo que sugiere que con la ventilación los septos alveolares se estiran para resistir la deformación. Imágenes microscópicas, obtenidas a través de una ventana subpleural, de los cambios en el volumen alveolar durante una ventilación normal en un modelo canino, muestran que los acinos se expanden de forma heterogénea y su volumen cambia poco; esta falta de uniformidad podría tener que ver con la interdependencia alveolar²¹.

Los pulmones lesionados son más susceptibles a la lesión que los sanos²¹, su heterogeneidad genera fuerzas de cizallamiento entre unidades colindantes que operan a diferentes volúmenes, con incremento del estrés local. Al reducir el área alveolar ventilable (*baby lung*) se produce más heterogeneidad ante el estrés, también se observan lesiones generadas por el cierre y reapertura cíclicos y por la disipación de energía durante la disgregación del surfactante, que se imponen con cada ciclo ventilatorio. Se desconoce la contribución relativa de los distintos mecanismos de lesión en diferentes síndromes y modelos de enfermedad y no se han podido demostrar las circunstancias bajo las cuales alguno de estos mecanismos prevalece³.

Fallo celular por estrés

Gajic et al³¹ demostraron que el número de células subpleurales con defectos de membrana aumentaba con el uso de volúmenes corrientes altos y con la duración de la exposición al estrés deformante, esta lesión celular se correlacionaba bien con otros marcadores de lesión. Más adelante, otros estudios experimentales confirmaron que la ventilación mecánica lesiva producía fallo por estrés de la MB capilar y de sus células adheridas, aunque no quedaba claro si esto mismo lleva al fallo por estrés de la célula epitelial alveolar. Experimentos más recientes en células endoteliales de la microvasculatura pulmonar de rata sugieren que el fallo capilar conlleva lesión mecánica y fallo celular, porque interfiere en la adhesión célula-célula, disminuyendo la expresión de una proteína de unión celular llamada beta-catenina²¹.

La ventilación mecánica induce remodelación celular y tisular, comprometiendo a las proteínas del citoesqueleto y de la MEC, que intervienen induciendo respuestas profibróticas por activación de los

fibroblastos (fig. 1). Las fuerzas de compresión disparan señales autocrinas mediante ligandos de la familia del factor de crecimiento epidérmico. Por vía paracrina, la remodelación se inicia a través de la fibronectina, colágeno y metaloproteasas de la MEC y de factores de crecimiento como el fibroblástico o factor de crecimiento transformante B1 (TGF B1), que se activan por el estrés de la pared vascular. Estas moléculas participan de la remodelación celular y tisular, independientemente de cuál sea el evento que dispara su expresión²¹.

Fallo de la membrana plasmática por estrés

La remodelación celular derivada del estrés durante la ventilación también compromete el tráfico lipídico en ambos sentidos de la membrana plasmática (MP). Este tráfico lipídico sirve como regulador de la superficie celular y la tensión de la MP, y contribuye a prevenir el fallo por estrés de la MP, en este fenómeno intervienen señales proinflamatorias y/o muerte celular³.

Morris³² describió cómo la regulación del tamaño celular tenía que ver con su composición lipídica. Cambios en la tensión de la bicapa podrían alterar la conductividad de membrana y consecuentemente llevar a cambios del volumen celular. Las células más especializadas tienen mecanismos de control para regular el flujo de moléculas y la disipación de energía. La célula censa el flujo mediante mecanismos propios como: endocitosis, exocitosis, proteínas de canal o actividades de bomba, y la tasa de polimerización de las redes del citoesqueleto. La tensión de la MP es crucial para el control de todos estos mecanismos, los cambios en la tensión de la MP (fig. 1) no solamente afectan la conductividad de la misma a iones y al agua, sino también a las tasas de endo- y exocitosis. El estrés deformante puede inducir tráfico lipídico hacia la MP para incrementar su área y volverla más resistente. Aunque endo- y exocitosis están intrínsecamente ligados, para regular la tensión también se pueden disparar respuestas endocíticas de lípidos de la superficie de la membrana. Cuando los pulmones sufren edema pulmonar intersticial moderado los microdominios lipídicos de la MP de las células pulmonares experimentan una reorganización sustancial.

La verdadera consecuencia funcional de la remodelación de la membrana permanece aún inexplorada. Las modificaciones han sido asociadas con cambios en el fenotipo celular y, por inferencia, con cambios en la susceptibilidad de la célula a la lesión mecánica. Por ejemplo, la remodelación de la MP por tráfico de lípidos como el colesterol resulta en la formación de microdominios especializados que aceleran la transdiferenciación del fenotipo celular tipo II al tipo I, que posee diferentes propiedades mecánicas, ya que el tipo II podría necesitar dividirse y diferenciarse en un ambiente rico en colesterol durante la lesión. Aún se desconocen los mecanismos y sus potenciales consecuencias²¹.

Los cambios en la composición de lípidos y proteínas de la MP influyen en la función celular. Así, un cambio de forma celular impuesto externamente está asociado con el alargamiento de la MP, la tensión lateral ejercida por el alargamiento de la MP incrementa y agrupa las proteínas de canales iónicos, que sufren un cambio conformacional y se produce un incremento del flujo de iones, principalmente calcio, hacia la célula. La tensión deformante depende de la tasa de carga, implicando esto un proceso cinético, así la probabilidad de fallo por estrés varía con la frecuencia y amplitud de la deformación aplicada. Intervenciones que desorganicen el citoesqueleto o al tráfico vesicular incrementan la susceptibilidad de la célula a la lesión, porque empeoran su capacidad de remodelación²¹.

MECANOTRANSDUCCIÓN

La mecanotransducción se define como la conversión de un estímulo mecánico en alteraciones bioquímicas y moleculares a nivel celular/tisular que se asocian con la VILI mediante tres mecanismos: canales sensibles al estiramiento, cambios en la integridad de la MP y un cambio conformacional directo en las moléculas asociadas a la membrana³. Sin embargo, la exactitud de cómo las señales bioquímicas se inician mediante el estímulo mecánico permanece desconocida.

Datos recientes han establecido un nuevo mecanismo de mecanotransducción, el estiramiento cíclico y las fuerzas de cizallamiento inducirían distintos patrones de expresión genética, que llevarían a liberación de citoquinas y otras sustancias a nivel pulmonar y sistémico (fig. 1). La respuesta de la célula depende de la capacidad de censar y transducir los estímulos, por ello las proteínas que unen la MEC con el citoesqueleto celular desempeñan un rol clave en la recepción y mecanotransducción de estas señales³³.

Disrupciones en la MP conllevan exocitosis de vesículas dependiente de calcio que facilitan la reparación del daño. El tráfico vesicular compromete en sí misma a la miosina y es sensible a disrupciones del citoesqueleto de actina. Un aumento en los niveles de calcio del citosol puede promover la coalescencia de las endomembranas de las vesículas que son transportadas como «parches» al lugar dañado donde se fusionan con la membrana, con la consiguiente liberación del contenido vesicular a la MEC. La entrada de calcio a la célula generaría la activación de genes de respuesta al estrés celular, y si es masiva puede directamente inducir necrosis y/o apoptosis a través de distintos mecanismos. El balance entre apoptosis y necrosis puede ser relevante no solamente para restablecer la función de barrera alveolo-capilar, sino para restaurar la función pulmonar normal y su arquitectura²¹. Una de las vías apoptóticas más estudiada en la VILI es el sistema Fas/FasL (fig. 1). Las células alveolares expresan Fas en su superficie, que se incrementa en respuesta a mediadores inflamatorios. En pacientes con SDRA

la FasL está incrementada y se correlaciona con la mortalidad. Los inhibidores específicos de la FasL anulan el efecto apoptótico en el lavado broncoalveolar (BALF) de pacientes con SDRA, indicando que la estimulación del sistema Fas/FasL causa apoptosis de células alveolares y lesión pulmonar, viéndose también implicada esta vía en la apoptosis de órganos distales^{3,34}.

A pesar de que las vías de transducción de señales que unen deformación con respuestas genéticas comienzan a estar caracterizadas en detalle, continúa siendo difícil discernir cómo se inicia una respuesta proinflamatoria mediada por genes en respuesta a VILI. Observaciones en cultivos celulares sugieren que las fuerzas deformantes pueden disparar la liberación de citoquinas proinflamatorias en ausencia de lesión celular aparente. Al lesionarse la MP se produce la translocación del factor de transcripción nuclear kappa-B (NFκB) al núcleo, seguida de la activación transcripcional de genes de respuesta precoz al estrés, y más aún, cuya inducción podría ser amplificada, transmitiéndose a las células no lesionadas sólo por contacto (fig. 1). En este contexto las lesiones de la MP dispararían el evento crítico que inicia y propaga la respuesta inflamatoria al resto del órgano. La activación del NFκB es una de las dianas intracelulares común de diversas vías de transducción de señales que van desde la superficie celular hasta el núcleo, y existen numerosos inductores implicados en su activación, incluyendo citoquinas, factores de crecimiento, productos virales y bacterianos y ROS¹⁹. La regulación redox del NFκB es compleja y específica del tipo celular, la activación del NFκB puede ser inhibida *in vivo* por el tratamiento con antioxidantes, corticoides o la inducción de tolerancia a la endotoxina. Investigaciones recientes también han relacionado la de la ECA del endotelio pulmonar con la lesión y reparación celular, ya que ésta actúa como transductora de señales desde y hacia la célula endotelial y se encuentra en altas concentraciones en los capilares pulmonares. Se ha observado poca actividad de la ECA soluble en humanos con SDRA, y se reduce como primer signo de LPA en varios modelos animales. Todo ello se ha relacionado con la sobreproducción de ROS, que causa daño celular y molecular y señales que conducen a la inhibición de su síntesis^{3,19,21,35}.

Asimismo, la ventilación mecánica se asocia al incremento de los niveles de citoquinas en el pulmón y en la circulación sistémica. Estudios en cultivos de macrófagos humanos y preparaciones *ex vivo* de pulmones de rata y ratón sometidos a ventilación lesiva han demostrado una *upregulation* de la respuesta de citoquinas, que puede originar también una respuesta sistémica *in vivo*. Ranieri et al³⁶ fueron los primeros en demostrar en humanos que la ventilación mecánica *per se* puede relacionarse con los niveles pulmonares y sistémicos de citoquinas en pacientes con SDRA. Dichos autores asocian la ventilación mecánica convencional de pacientes con SDRA con una respuesta inflamatoria local y sistémica sostenida durante 36 horas, esta respuesta pue-

de ser atenuada por estrategias ventilatorias dirigidas a minimizar la VILI. Observaron una reducción significativa de los niveles de citoquinas en el BALF y en plasma, así como del número de polimorfonucleares en los pacientes que fueron ventilados con estrategias protectoras. Las citoquinas producidas en el pulmón provienen principalmente de los macrófagos alveolares, así como también de las células endoteliales y alveolares activadas³⁷. Las células endoteliales microvasculares de pacientes con SDRA presentan *upregulation* del receptor del factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) y aumento en la producción de interleucina (IL)-6 e IL-8 comparadas con los controles, sugiriendo una intensa activación de la célula endotelial durante el proceso agudo, o que las células endoteliales de la microvasculatura pulmonar son constitutivamente más reactivas en aquellos sujetos que subsiguientemente desarrollan SDRA^{19,20}.

DESDE EL FALLO POR ESTRÉS A LA DISFUNCIÓN ORGÁNICA

Vlahakis et al³⁸ demostraron que la ventilación controlada por presión causaba liberación de citoquinas y proteasas de los macrófagos alveolares y que el estiramiento cíclico incrementaba la expresión de IL-8 y TNF-α en células alveolares y bronquiales. La mayoría de los genes activados pertenecen a dos procesos biológicos, la inflamación y/o la coagulación, como por ejemplo: IL-1β, IL-6, quimioquina-2, ciclooxigenasa-A₂ y activador del plasminógeno tipo 1, factor tisular y urokinasa. Esta respuesta inflamatoria y procoagulante amplificada sería la responsable de la propagación de la lesión hacia la totalidad del pulmón y su diseminación sistémica guiaría la disfunción orgánica múltiple secundaria (MODS) que llevaría a la muerte de los pacientes con LPA/SDRA. La pérdida de la apropiada inmunomodulación y/o lesión inflamatoria persistente contribuiría a la disfunción orgánica^{19,21}.

En síntesis, Dos Santos y Slutsky³ postulan que los mecanismos principales por los que la VILI puede inducir MODS son: a) fallo por estrés de la barrera endotelial y epitelial alveolar (decompartimentalización), b) fallo por estrés de la MP (necrosis/apoptosis), c) alteraciones en la estructura del citoesqueleto sin daño ultraestructural (mecanotransducción), d) efectos en la vasculatura independientes del estiramiento o la ruptura y, el más recientemente propuesto, e) estiramiento cíclico, que ha sido implicado en el fallo del proceso de regeneración epitelial³. Independientemente de los mecanismos precisos de liberación de mediadores, las consecuencias clínicas pueden ser devastadoras.

REVERSIBILIDAD Y/O MODULACIÓN DEL FALLO POR ESTRÉS

La capacidad de restauración tras la pérdida de la integridad de la membrana alveolo-capilar es esencial para la supervivencia celular²¹. La reparación de

la MP está gobernada por transporte de membrana dependiente de calcio y eventos de fusión, mediados por proteínas-quinasa dependientes de adenosín monofosfato cíclico (AMPC) (fig. 1)³⁹. La fusión vesicular está catalizada por diversas proteínas que median el reconocimiento inicial de las membranas que están destinadas a la fusión. Las células «autorreparan» sus membranas por varios mecanismos que implican el desplazamiento lateral de los lípidos de membrana, sin consumo energético, que sirve para reparar pequeños defectos, y también, mediante la fusión de endosomas y la coalescencia de organelas vesiculares.

En síntesis, si las elevaciones del calcio intracelular son marcadas y sostenidas en el tiempo llevarán a la necrosis celular. La lesión y posterior reparación celular dispara también la translocación del NFκB e inicia tanto mecanismos antiapoptóticos como una cascada proinflamatoria, que en algún caso puede terminar en apoptosis^{21,27}.

Ventilación protectora

La institución de estrategias destinadas a evitar ciclos de colapso y reapertura y sobredistensión de unidades alveolares mediante el uso de volúmenes circulantes bajos y presión positiva al final de la espiración (PEEP) resulta beneficiosa para atenuar la VILI³. Estudios realizados en grandes poblaciones de pacientes han demostrado el impacto en la mortalidad del uso de VT bajo en pacientes con LPA/SDRA^{7,8,40}. La estabilización del alveolo mediante el uso de PEEP moderada/alta reduce la interdependencia, pero la controversia continúa en torno al nivel de PEEP ideal. Los resultados de los diferentes estudios son diversos y han llevado a diferentes autores como Eichacker, Dreyfuss y Saumon a cuestionar la protocolización de los mismos^{41,42}. Estudios posteriores han mostrado que el valor de la presión meseta es un factor independiente, asociado a mortalidad a volumen circulante constante⁴³, recomendando el uso de patrones ventilatorios protectores en pacientes con SDRA, evitar el volumen circulante elevado, mantener la presión meseta en el rango más bajo, la aplicación de PEEP moderada o alta, sin descuidar la adecuación de la ventilación mecánica a las características mecánicas del sistema respiratorio. Los parámetros se deben ajustar según las particularidades de cada paciente, no sólo en aquellos que presentan patología respiratoria aguda.

Modulación del biotrauma

Diversos estudios sugieren que el uso de una estrategia protectora que disminuya la VILI se asocia con descenso de los niveles de citoquinas proinflamatorias^{34,36}. Esta correlación sugiere una posible titulación de la ventilación mecánica basada en los niveles de mediadores sistémicos, que pueden correlacionar específicamente con el grado de disrupción de la membrana alveolo-capilar, y utilizarse como marcadores precoces del síndrome de respuesta inflamato-

ria sistémica (SIRS) y contribuir a reducir la lesión pulmonar iatrogénica^{3,36} y la MODS. Se están poniendo en práctica varias intervenciones terapéuticas relacionadas con los mediadores vasoactivos derivados del endotelio, en un esfuerzo por mejorar la oxigenación arterial y tratar la hipertensión pulmonar inherente al SDRA. En este sentido, se han obtenido resultados discordantes de la administración de prostaglandina-I₂ (PGI₂) inhalada o intravenosa y de NO inhalado. También se han utilizado agentes antioxidantes como la n-acetilcisteína, el ketoconazol (inhibidor de la tromboxano sintetasa), agentes moduladores de factores de transcripción, como el NFκB, y anticuerpos contra TNF-α y anti-IL-1β. Por otra parte, se está estudiando el empleo de agentes de uso clínico habitual en otras patologías, como antagonistas del receptor 1 de endotelinas (ET-1), inhibidores de la fosfodiesterasa e inhibidores de la ECA, que podrían tener efectos beneficiosos^{19,35,44}. Investigaciones recientes han puesto de manifiesto la existencia de células endoteliales pulmonares heterogéneas que podrían contribuir a la patogénesis de la LPA, el mecanismo propuesto implicaría la adhesión de neutrófilos a células endoteliales a través de las moléculas de adhesión intracelular 1 (ICAM-1), conllevando cambios en el citoesqueleto de estas células endoteliales pulmonares microvasculares, pero no en células endoteliales de arteria pulmonar¹⁹. La entrada de calcio a las células promueve el estado proinflamatorio de los capilares vecinos. Las células endoteliales pulmonares afectadas de manera específica podrían ser objetivo de terapia génica o de otro tipo en el futuro, ya que la disfunción de las mismas desempeña un papel clave en la LPA. Recientemente se ha trabajado en la identificación de genes que predisponen individualmente a incrementar la susceptibilidad, no solamente al SDRA, sino también a la VILI^{45,46}. El futuro pasa por poder anticipar qué paciente será más susceptible a la lesión pulmonar para propiciar el inicio de un tratamiento precoz o preventivo³.

Modulación del fallo celular y de la membrana plasmática

Muchas manifestaciones de la VILI, tales como edema, inflamación, remodelación tisular y fibrosis, se agrupan bajo el epígrafe «fallo por estrés de las membranas celulares»²¹. Los mecanismos que modulan las fuerzas intercelulares, el estiramiento celular, la interacción gas-tensión y el efecto de la reparación celular permanecen en estudio. En este sentido, algunos fármacos como beta-adrenérgicos, ya ampliamente usados en terapéutica, han sido testados en pequeñas cohortes para el tratamiento de la VILI, ya que preservan las propiedades de barrera de pulmones lesionados por el ventilador. Su efecto beneficioso vendría mediado por el AMPC del citoesqueleto de la célula endotelial, aunque su papel permanece en estudio.

El enfoque orientado hacia el fallo celular y de la MP en la patogenia de la VILI ha sugerido nuevos

objetivos de tratamiento, que incluyen moléculas involucradas en la regulación de la deformación, remodelación del citoesqueleto, tráfico lipídico y reparación de membrana. En esta línea se sitúan trabajos como el de McVerry et al, donde se explora el uso de esfingosina 1-fosfato (Sph 1-P) para reducir la disfunción de barrera alveolar y vascular en un modelo murino y canino de LPA por estrés mecánico excesivo y por lipopolisacárido bacteriano (LPS)⁴⁷. La Sph 1-P es un lípido biológicamente activo y señalizador intracelular antiapoptótico, que al interactuar con receptores de determinados factores de crecimiento da lugar a ceramida y ésta a esfingosina, que paradójicamente son pro-apoptóticas. La Sph1-P al unirse en superficie a las células endoteliales inicia una reorganización del citoesqueleto con estabilización y mayor adherencia intercelular y con la MEC, que mejora la función de barrera endotelial *in vitro*. La Sph1-P atenuó la formación de edema pulmonar en un modelo murino de VILI y disminuyó el fallo capilar regional en un modelo canino de VILI por LPS⁴⁷, mejoró la oxigenación y también el *shunt* a las 5,5 horas. En ratas el efecto protector se mantuvo durante 24 horas, y en el modelo canino se evidenció a las 2,5 horas y se mantuvo al menos durante 8 horas.

Estos estudios se basan en trabajos que examinan el efecto potencialmente beneficioso de un surfactante sintético utilizado para reparar membranas musculares afectadas por electroporación en un modelo de trauma por electrocución⁴⁸. Administrando el poloxámero P188 a los 20 minutos del *shock* eléctrico se restauraba la resistividad de la membrana en un 77% del valor inicial (fig. 1). Los estudios histopatológicos indicaban que el poloxámero reducía la inflamación tisular y el daño comparado con controles y dextrano, y aún tenía efectos preventivos si era administrado previo al *shock*. Estos resultados sugerían la posibilidad de reparar membranas tisulares *in vivo* tras lesiones de origen térmico, eléctrico o mecánico. Más recientemente, Yasuda et al administraron P188 en miocitos aislados de ratas deficientes en distrofina, sustancia implicada en la miocardiopatía de la distrofia muscular de Duchenne, produciendo reparación de los defectos de membrana, mejorando instantáneamente la geometría ventricular y bloqueando así el fallo cardíaco agudo durante una prueba de estrés con dobutamina⁴⁹. Estos estudios han despertado el interés en los reparadores químicos de membrana como un nuevo enfoque terapéutico para prevenir o revertir el fallo cardíaco en la distrofia muscular y en otras patologías que acarrear disfunción celular y de la MP. Ésta podría ser una línea de desarrollo futuro para el tratamiento de la VILI.

CONCLUSIÓN

A pesar de que el enfoque actual de la ventilación mecánica se fundamenta en la fisiología cardiopulmonar y la mecánica del sistema respiratorio, el interés por la VILI toma auge en los cuidados críticos

y la investigación biomédica. Hoy en día sabemos que la ventilación mecánica es la única alternativa en algunos casos, pero hay que seguir trabajando en el diseño de estrategias enfocadas a prevenir la lesión inducida por la ventilación mecánica.

En vista del interés actual por esta patología, parecería ser el momento de centrar la atención sobre aspectos que hoy son ajenos a los intensivistas, tales como la biología celular, los componentes estructurales, el citoesqueleto, la MP y la MEC. Esto ayudaría a comprender mejor cómo las fuerzas biofísicas externas pueden alterarlos y así también poder focalizar los esfuerzos investigadores y terapéuticos hacia este campo que hoy en día parece ser ampliamente prometedor.

Declaración de conflicto de intereses

Los autores han declarado no tener ningún conflicto de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rubenfeld GD, Caldwell E, Peabody E, Weaver J, Martin DP, Neff M, et al. Incidence and outcomes of acute lung injury. *N Engl J Med*. 2005;353:1685-93.
2. Slutsky AS. Ventilator-induced lung injury: From barotrauma to biotrauma. *Respir Care*. 2005;50:646-9.
3. Dos Santos CC, Slutsky AS. The contribution of biophysical lung injury to the development of biotrauma. *Annu Rev Physiol*. 2006;68:585-618.
4. Esteban A, Anzueto A, Frutos F, Alía I, Brochard L, Stewart TE, et al. Characteristics and outcomes in adult patients receiving mechanical ventilation: a 28-day international study. *JAMA*. 2002;287:345-55.
5. Brun-Buisson C, Minelli C, Bertolini G, Brazzi L, Pimentel J, Lewandowski K, et al. Epidemiology and outcome of acute lung injury in European intensive care units. Results from the ALIVE study. *Intensive Care Med*. 2004;30:51-61.
6. Estenssoro E, Dubin A, Laffaire H, Canales H, Saenz G, Moseinco M, et al. Incidence, clinical course, and outcome in 217 patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*. 2002;30:2450-6.
7. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 2000;342:1301-8.
8. Amato MB, Barbas CS, Medeiros DM, Magaldi RB, Schettino GP, Lorenzi-Filho G, et al. Effect of a protective-ventilation strategy on mortality in acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 1998;338:347-54.
9. West JB. Ventilación/Perfusión alveolar e intercambio gaseoso. Editorial Panamericana, Bs As; 1979.
10. West JB. Fisiopatología Pulmonar. Editorial Panamericana, Bs As; 1980.
11. Guyton AC, Hall JE. Manual de Fisiología médica. Madrid: McGraw-Hill Interamericana; 2002.
12. Silbernagl S, Despopoulos A. Atlas de Fisiología. Madrid: Harcourt; 2001.
13. Pinsky MR, Dhainaut JF, Artigas A. The pulmonary circulation: Moving from passive to active control. En: Pinsky MR, editor. The pulmonary circulation: evolving concepts of control and interaction. London: WB Saunders Company LTD; 1996. p. 1-7.
14. Sáenz-Valiente A, Piacentini E, Villagra García A, López-Aguilar J, Murias G, Hotchkiss JR, et al. Papel de la microcirculación en el desarrollo de la lesión pulmonar inducida por la ventilación mecánica. *Med Intensiva*. 2005;29:226-35.

15. Marini JJ, Hotchkiss JR, Broccard AF. Bench-to-bedside review: Microvascular and airspace linkage in ventilator-induced lung injury. *Critical Care*. 2003;7:435-44.
16. Butler JP, Oldmixon EH, Hoppin FG. Lengths and topology of alveolar septal borders. *J Appl Physiol*. 1989;67:1930-40.
17. Smith JC, Butler JP, Hoppin FC. Contribution of tree structures in the lung to lung elastic recoil. *J Appl. Physiol*. 1984; 57:1422-9.
18. Nieman GF. Alveolar mechanics in the acutely injured lungs: role of alveolar instability in the pathogenesis of VILI. En: *Bench to Bedside: mechanotransduction and ventilator induced lung injury*. May 2003. Washington State Trade and Convention Center, Seattle, Washington. ATS Congress.
19. Orfanos SE, Mavrommati I, Korovesi I, Roussos C. Pulmonary endothelium in acute lung injury: from basic science to the critically ill. *Intensive Care Med*. 2004;30:1702-14.
20. Nelson S, Thomas RM. Cytokines in pulmonary Disease. *Infection and Inflammation*. En: Kelley J, editor. *Cytokines and the resolution of lung inflammation*. New York: Marcel Dekker, Inc; 2000. p. 37-50.
21. Vlahakis NE, Hubmayr RD. Cellular stress failure in ventilator-injured lungs. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171:1328-42.
22. Broccard AF, Hotchkiss JR, Kuwayama N, Olson DA, Jamal S, Wangenstein DO, et al. Consequences of Vascular flow on lung injury induced by mechanical ventilation. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157:1935-42.
23. Elliott AR, Fu Z, Tsukimoto K, Prediletto R, Mathieu-Costello O, West JB. Short-term reversibility of ultrastructural changes in pulmonary capillaries caused by stress failure. *J Appl Physiol*. 1992;73:1150-8.
24. López-Aguilar J. Factores extrapulmonares implicados en la lesión pulmonar inducida por la ventilación mecánica. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona, Departamento de Medicina, Barcelona, España. Abril 2006.
25. Hotchkiss JR, Blanch L, Naveira A, Adams AB, Carter C, Olson DA, et al. Relative roles of vascular and airspace pressures in ventilator-induced lung injury. *Crit Care Med*. 2001;29:1593-8.
26. López-Aguilar J, Piacentini E, Villagra A, Murias G, Pascotto S, Sáenz-Valiente A, et al. Contributions of vascular flow and pulmonary capillary pressure to ventilator-induced lung injury. *Crit Care Med*. 2006;34:1106-12.
27. Hubmayr RD, Vlahakis N, Berrios JC. Biophysical factors leading to VILI. En: *Bench to Bedside: mechanotransduction and ventilator induced lung injury*. May 2003. Washington State Trade and Convention Center, Seattle, Washington. ATS Congress.
28. Cavanaugh KJ Jr, Margulies SS. Measurement of stretch-induced loss of alveolar epithelial barrier integrity with a novel *in vitro* method. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002;283:1801-8.
29. Cavanaugh KJ Jr, Oswari J, Margulies SS. Role of stretch on tight junction structure in alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001;25:584-91.
30. Tschumperlin DJ, Oswari J, Margulies AS. Deformation-induced injury of alveolar epithelial cells. Effect of frequency, duration, and amplitude. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162:357-62.
31. Gajic O, Lee J, Doerr CH, Berrios JC, Myers JL, Hubmayr RD. Ventilator-induced cell wounding and repair in the intact lung. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167:1057-63.
32. Morris CE. How did cells get their size? *Anat Rec*. 2002; 268:239-51.
33. Uhlig S. Ventilation-induced lung injury and mechano-transduction: stretching it too far? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002;282:L892-6.
34. Imai Y, Parodo J, Kajikawa O, de Perrot M, Fischer S, Edwards V, et al. Injurious mechanical ventilation and end-organ epithelial cell apoptosis and dysfunction in an experimental model of acute respiratory distress syndrome. *JAMA*. 2003;289: 2104-12.
35. Burrell LM, Johnston CI, Tikellis C, Cooper ME. ACE2, a new regulator of the renin-angiotensin system. *Trends Endocrinol Metab*. 2004;15:166-9.
36. Ranieri VM, Suter PM, Tortorella C, De Tullio R, Dayer JM, Brienza A, et al. Effect of Mechanical ventilation on inflammatory mediators in patients with Acute Respiratory Distress Syndrome. *JAMA*. 1999;282:54-61.
37. Guery BP, Welsh DA, Viget NB, Robriquet L, Fialdes P, Mason CM, et al. Ventilation-induced lung injury is associated with an increase in gut permeability. *Shock*. 2003;19:559-63.
38. Vlahakis NE, Schroeder MA, Limper AH, Hubmayr RD. Stretch induces cytokine release by alveolar epithelial cells *in vitro*. *Am J Physiol*. 1999;277:167-73.
39. Togo T, Krasieva TB, Steinhardt RA. A decrease in membrane tension precedes successful cell-membrane repair. *Mol Biol Cell*. 2000;11:4339-46.
40. Stewart TE, Meade MO, Cook DJ, Granton JT, Hodder RV, Lapinsky SE, et al. Evaluation of a ventilatory strategy to prevent barotrauma in patients at high risk for acute respiratory distress syndrome. Pressure and Volume Limited Ventilation Strategy Group. *N Engl J Med*. 1998;338:355-61.
41. Eichacker PQ, Gerstenberger EP, Banks SM, Cui X, Natanson C. Meta-analysis of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome trials testing low tidal volumes. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;166:1510-4.
42. Dreyfuss D, Saumon G. Evidence-based medicine or fuzzy logic: what is best for ARDS management? *Intensive Care Med*. 2002;28:230-4.
43. Stewart TE. Controversies around lung protective mechanical ventilation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166:1421-2.
44. Imai Y, Kuba K, Rao S, Huan Y, Guo F, Guan B, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature*. 2005;436:112-6.
45. Ma SF, Grigoryev DN, Taylor AD, Nonas S, Sammani S, Ye SQ, et al. Bioinformatic identification of novel early stress response genes in rodent models of lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005;289:468-77.
46. Gharib SA, Liles WC, Matute-Bello G, Glenny RW, Martin TR, Altemeier WA. Computational identification of key biological modules and transcription factors in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173:653-8.
47. McVerry BJ, Peng X, Hassoun PM, Sammani S, Simon BA, Garcia JGN. Sphingosine 1-Phosphate reduces vascular leak in murine and canine models of acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170:987-93.
48. Lee RC, River PL, Pan F, Ji L, Wollmann RL. Surfactant-induced sealing of electroporabilized skeletal muscle membranes *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89:4524-8.
49. Yasuda S, Townsend D, Michele DE, Favre EG, Day SM, Metzger JM. Dystrophic heart failure blocked by membrane sealant poloxamer. *Nature*. 2005;436:1025-9.