



UNIVERSITAT DE BARCELONA



**MODEL ANIMAL DE PNEUMÒNIA GREU;  
ESTUDI DE LA RESPOSTA INFLAMATÒRIA ASSOCIADA  
I LA SEVA MODULACIÓ TERAPÈUTICA**

Tesi presentada per Oriol Sibila Vidal per optar al grau de  
Doctor en Medicina

Directors:

Carles Agustí Garcia-Navarro

Antoni Torres Martí

Barcelona, juliol de 2008



## **AUTORITZACIÓ DEL DIRECTOR DE TESI**

EL DR CARLES AGUSTÍ GARCIA-NAVARRO, METGE CONSULTOR DEL SERVEI DE PNEUMOLOGIA DE L'HOSPITAL CLÍNIC DE BARCELONA,

CERTIFICA:

Que la memòria que duu per títol "Model animal de pneumònia greu; Estudi de la resposta inflamatòria associada i la seva modulació terapèutica", presentada per Oriol Sibila Vidal per optar al grau de Doctor en Medicina, ha estat realitzada sota la meva direcció. Un cop finalitzada autoritzo la seva presentació per a ser jutjada pel tribunal corresponent.

I perquè quedi constància als efectes oportuns, firmo la present a Barcelona, maig de 2008.

Dr. Carles Agustí Garcia-Navarro



## **AUTORITZACIÓ DEL DIRECTOR DE TESI**

EL DR ANTONI TORRES MARTÍ, METGE CONSULTOR SENIOR DEL SERVEI DE  
PNEUMOLOGIA DE L'HOSPITAL CLÍNIC DE BARCELONA,

CERTIFICA:

Que la memòria que duu per títol "Model animal de pneumònia greu; Estudi de la resposta inflamatòria associada i la seva modulació terapèutica", presentada per Oriol Sibila Vidal per optar al grau de Doctor en Medicina, ha estat realitzada sota la meva direcció. Un cop finalitzada autoritzo la seva presentació per a ser jutjada pel tribunal corresponent.

I perquè quedi constància als efectes oportuns, firmo la present a Barcelona, maig de 2008.

Dr. Antoni Torres Martí



**Als meus pares**





## INDEX

---



<b>AGRAÏMENTS</b>	<b>15</b>
<b>PRESENTACIÓ</b>	<b>19</b>
<b>AJUTS AL GRUP D'INVESTIGACIÓ</b>	<b>21</b>
<b>ABREVIATURES</b>	<b>23</b>
<b>ANTECEDENTS DEL TEMA</b>	<b>25</b>
<b>1. INTRODUCCIÓ</b>	<b>27</b>
<b>2. RESPOSTA INFLAMATÒRIA ASSOCIADA A LA PNEUMÒNIA</b>	<b>28</b>
<b>2.1. Generalitats</b>	<b>28</b>
<b>2.2. Utilitat diagnòstica i pronòstica</b>	<b>31</b>
<b>3. MODEL ANIMAL DE PNEUMÒNIA</b>	<b>34</b>
<b>3.1. Generalitats</b>	<b>34</b>
<b>3.2. Model porcí de pneumònia greu</b>	<b>35</b>
<b>4. RESPOSTA INFLAMATÒRIA I ANTIBIÒTICS</b>	<b>40</b>
<b>5. RESPOSTA INFLAMATÒRIA I GLUCOCORTICOIDS</b>	<b>42</b>
<b>5.1. Mecanismes d'acció</b>	<b>43</b>
<b>5.2. Glucocorticoids i pneumònia</b>	<b>46</b>
<b>JUSTIFICACIÓ I OBJECTIUS DE LA TESI</b>	<b>51</b>
<b>Justificació general</b>	<b>53</b>
<b>Justificació i objectius de l'estudi 1</b>	<b>55</b>
<b>Justificació i objectius de l'estudi 2</b>	<b>57</b>
<b>Justificació i objectius de l'estudi 3</b>	<b>59</b>
<b>PUBLICACIONS ORIGINALS</b>	<b>61</b>
<b>Artícle 1</b>	<b>65</b>
<b>Artícle 2</b>	<b>67</b>
<b>Artícle 3</b>	<b>69</b>



<b>DISCUSSIÓ</b>	<b>71</b>
<b>CONCLUSIONS</b>	<b>81</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>85</b>
<b>PUBLICACIONES RELACIONADES</b>	<b>94</b>



## **AGRAÏMENTS**

---





Als Directos d'aquesta tesi; al Dr Carles Agustí, el meu "mentor", perquè és un privilegi i un plaer ser al seu costat, tant a nivell professional com personal. I al Prof. Antoni Torres, per la seva confiança, empena i gran qualitat científica.

Al Prof. Carlos M Luna y a los compañeros del estabulario del Hospital de Clínicas de Buenos Aires, en especial a Alejandro Chirino y Sebastián Baquero, por todos los inolvidables momentos que pasamos juntos.

A la Maria Molina, per ser sempre "allà", tan a prop. A l'Eugeni Ballester, per la seva infinita bondat i protecció. A l'Alfons Torrego, per haver estat el mirall on mirar-me. Al Néstor Soler, per ser com és, i al Ramon Marrades, pel seu "sc". A tots ells i a la resta de companys del servei de Pneumologia de l'Hospital Clínic, per totes les hores conviscudes i, sobretot, per la seva amistat.

Als companys del grup d'investigació 2.8 del IDIBAPS, en especial al Joan Ramon Badia, al Miquel Ferrer, la Ivet Aldabó i la Cristina Esquinas, per haver-me aguantat i ajudat sempre que els vaig reclamar (que no varen ser poques vegades...). Treballar amb ells ha estat un plaer.

Als meus nous companys del Servei de Pneumologia de l'Hospital Son Dureta, per la seva càlida acollida, ajuda i complicitat.

Als meus pares, per l'amor rebut i els valors transmesos. Sense el seu esforç i sacrifici aquesta tesi mai hagués estat possible.

A Elena, por existir y ser la luz que me ilumina.

A tots ells, moltes gràcies.



## **PRESENTACIÓ**

La present Tesi Doctoral està estructurada seguint les directrius de la normativa per a la presentació de tesis doctorals com a compendi de publicacions, aprovada pel Consell del Departament de Medicina de la Universitat de Barcelona el 17 de maig de 1997.

Els estudis que formen aquesta Tesi Doctoral pertanyen a una mateixa línia d'investigació, dirigida a conèixer la resposta inflamatòria associada a la pneumònia greu i la seva possible modulació terapèutica en un model experimental. Els resultats dels estudis han aportat informació rellevant i novedosa en aquest camp i han estat recollits en 3 articles originals, publicats en revistes d'amplia difusió internacional amb un factor d'impacte global de 14,076 punts.



## AJUTS PER A LA REALITZACIÓ DE LA TESI DOCTORAL

Els treballs que constitueixen la base de la present Tesi Doctoral han estat efectuats amb el suport dels següents ajuts i beques personals i al grup d'investigació:

- Beca de l'Hospital Clínic de Barcelona per al projecte d'investigació "Efecte dels glucocorticoids en la pneumònia greu". Becari; Oriol Sibila.
- Beca de la Societat Espanyola de Pneumologia per al projecte "Efecte dels glucocorticoides en la pneumònia greu". Becari; Oriol Sibila.
- Beca de la Societat Catalana de Pneumologia per al projecte "Model animal de pneumònia per *Pseudomonas aeruginosa*". Becari; Oriol Sibila.
- Beca Mutual Mèdica de Catalunya i Balears per al projecte "Efecte dels glucocorticoides en un model animal de pneumònia". Becari; Oriol Sibila.
- Beca de Fondo de Investigació Sanitaria FIS PI05/0120 per al projecte "modelo experimental de neumonía asociada a la ventilación mecánica en cerdos. Estudio de la respuesta inflamatoria asociada y su modulación por glucocorticoides". Investigador principal: Antoni Torres.



## ABREVIATURES

<b>FiO<sub>2</sub></b>	Fracció inspiratòria d'oxigen
<b>FN-KB</b>	Factor Nuclear Kappa-B
<b>GC</b>	Glucocorticoids
<b>G-CSF</b>	Factor estimulant de colònies de granulòcits
<b>GM-CSF</b>	Factor estimulant de colònies de macròfags
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>NK</b>	Cèl.lules <i>Natural Killer</i>
<b>PAC</b>	Pneumònia Adquirida en la Comunitat
<b>PAVM</b>	Pneumònia Associada a la Ventilació mecànica
<b>PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub></b>	Pressió arterial d'oxigen partit per la fracció inspirada d'oxigen
<b>PCR</b>	Proteïna C reactiva
<b>PEEP</b>	Pressió Positiva al final de l'Espiració
<b>SDRA</b>	Síndrome de Distress Respiratori de l'Adult
<b>SIRS</b>	Síndrome d'Inflamació Sistèmica
<b>RBA</b>	Rentat broncoalveolar
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de Necrosis Tumoral alfa
<b>UCI</b>	Unitat de Cures Intensives
<b>Ufc</b>	Unitats formadores de colònies
<b>Vt</b>	Volum corrent





## **ANTECEDENTS DEL TEMA**

---



## **1.- INTRODUCCIÓ**

La pneumònia es la malaltia infecciosa més prevalent i comporta una elevada morbi-mortalitat i un gast sanitari de primer ordre (1).

La pneumònia adquirida en la comunitat (PAC) representa una de les deu causes principals de mort a tot el món. Aproximadament el 20% dels pacients requereixen hospitalització, i un 25% d'aquests ingressen en una Unitat de Cures Intensives (UCI), amb una mortalitat associada en aquests casos de fins al 40-50% (2).

D'altra banda, el 20-30% dels pacients ventilats mecànicament durant més de 48 hores en una UCI acaben desenvolupant pneumònia associada a la ventilació mecànica (PAVM). La mortalitat atribuïble en aquests casos és també superior al 30% i és la principal causa de morbi-mortalitat entre les infeccions nosocomials adquirides en les UCIs (3).

Malgrat els avenços realitzats en les mesures de suport vital i en teràpia antimicrobiana, amb el desenvolupament de nous antibiòtics cada vegada més eficaços i de més àmplia cobertura, la mortalitat relacionada amb els cassos de pneumònia greu no ha variat en els últims anys (4-6).

Aquest fet suggereix que hi ha altres factors molt importants en l'evolució d'aquestes infeccions respiratòries a part dels microorganismes responsables.

Un d'aquests factors és l'anomenada resposta inflamatòria associada a la pneumònia, definida per un conjunt de citoquines, proteïnes de fase aguda i altres mediadors inflamatoris secretats pel sistema immunitari com a mecanisme de defensa vers la infecció (7).

## **2.- RESPOSTA INFLAMATÒRIA ASSOCIADA A LA PNEUMONIA**

### **2.1. Generalitats**

És ben conegut que l'arribada del germen a l'espai alveolar ocasiona una resposta immunitària complexa en la qual hi intervenen diversos mecanismes de defensa que desencadenen la síntesi i secreció de diferents mediadors inflamatoris i proteïnes de fase aguda (8).

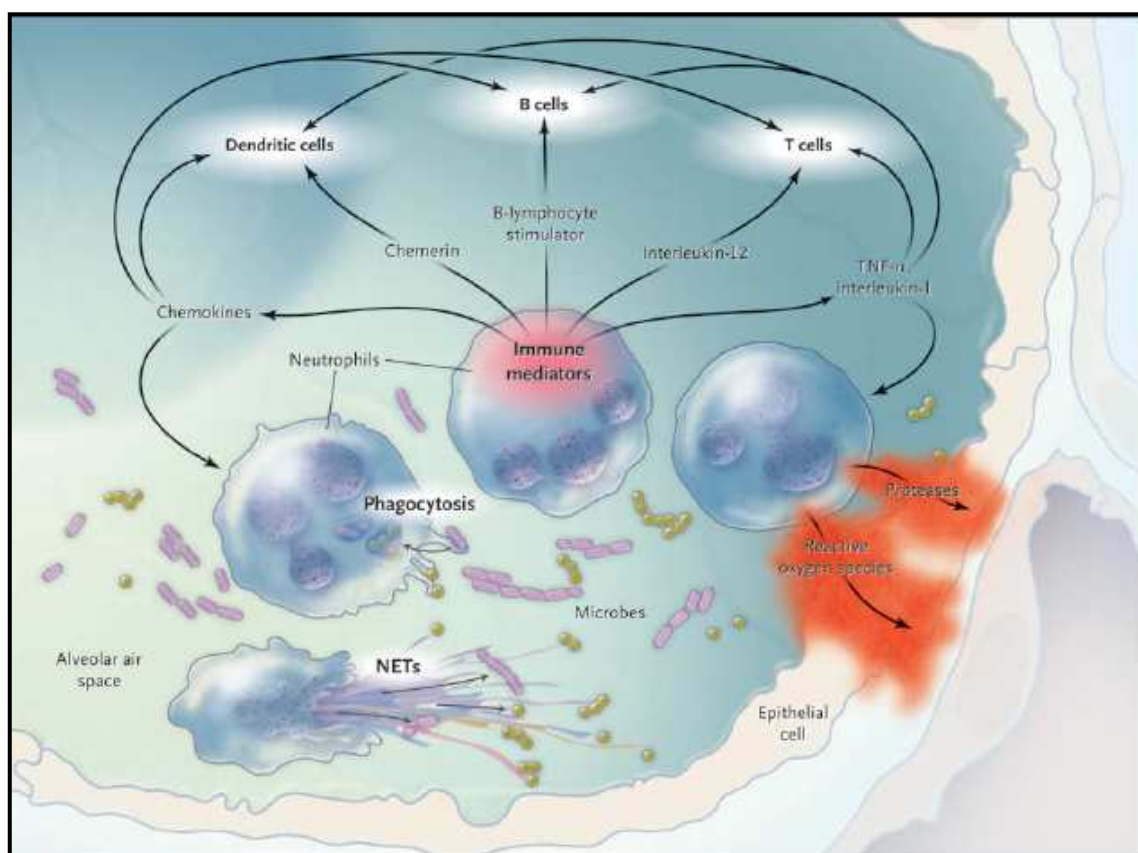
En els pulmons sans, el torrent sanguini dels capil·lars pulmonars està separat de l'espai alveolar per una superfície de menys d'1 nanòmetre, que constitueix la interfase més prima entre la sang i el medi extern, ideal i necessària per al correcte intercanvi de gasos. Gràcies al resultat de diferents forces biofísiques inherents a l'estructura tortuosa dels capil·lars que formen part d'aquesta zona, en ells s'hi produeix un atrapament de macròfags i neutròfils que fa que la seva concentració en aquest territori sigui 50 vegades major que en la resta del torrent circulatori (9).

Quan un microbi o un cos estrany arriben a la via respiratòria inferior, els macròfags i neutròfils migren fora dels vasos sanguinis i es situen dintre dels espais alveolars, convertint-se en les cèl·lules defensives principals contra els microorganismes degut a la seva capacitat de fagocitosi (10).

Un cop realitzada la fagocitosi, gràcies al reconeixement de diferents receptors que s'expressen en la superfície dels microorganismes, els macròfags alveolars i els neutròfils eliminen als gèrmens a través de diferents mecanismes; enzims degradatius (com l'elastasa, típica dels neutròfils), proteïnes antimicrobianes (com la proteïna inductora de permeabilitat bactericida i la lactoferrina) i molècules reactives d'oxigen (per exemple, la hipoclorita) (11). A més, i de forma molt

important, inicien un complex procés conduït per múltiples mediadors immunitaris amb la finalitat d'atreure més cèl·lules de defensa al lloc de l'agressió, bàsicament altres neutròfils, macròfags i cèl·lules B i T per tal de limitar la progressió de la infecció i destruir el microorganisme (**figura 1**).

**Figura 1**



**Figura 1:** Acció dels neutròfils i macròfags alveolars en entrar en contacte amb un microorganisme. Adaptat de Mizgerd JP et al (7).

Entre tots els mediadors immunitaris que hi intervenen, destaca el paper de les citoquines, una sèrie de proteïnes alliberades pels macròfags alveolars i els limfòcits T que es produeixen durant la fase efectora de la immunitat. Aquests mediadors constitueixen una àmplia xarxa de comunicació que intervé en moltes de les funcions de la resposta immunitària, en les que actuen com a molècules reguladores (12).

Les citoquines alliberades a nivell pulmonar pels macròfags alveolars i els limfòcits T són el factor de necrosi tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleuquina -1 beta (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 i factors estimulants de les colònies de granulòcits (G-CSF) i de macròfags (GM-CSF).

Els seus efectes, tant local com sistèmics, inclouen l'activació dels limfòcits, neutròfils, macròfags i cèl.lules NK, la producció d'anticossos, altres citoquines i proteïnes de fase aguda, l'activació de l'endoteli vascular o l'augment de la temperatura (**taula 1**).

Aquest procés fisiològic és beneficiós sempre i quan es limiti el control de la infecció local, s'eliminin els microorganismes i es torni a la situació basal de reparació tissular, amb els macròfags i els neutròfils habitant els múltiples capil·lars pulmonars.

Contràriament, quan aquesta reacció és desproporcionada, existeix una traducció local i sistèmica que influeix desfavorablement en l'evolució de la infecció (13).

**Taula 1 : Efectes de les citokines alliberades pels macròfags i limfòcits T pulmonars**

<b>Citoquina</b>	<b>Efectes locals i sistèmics</b>
IL-1 $\beta$	-Activa endoteli vascular -Activa els limfòcits -Augmenta l'accés de limfòcits activats -Estimula la secreció de citokines del macròfag -Augmenta la temperatura
IL-6	-Activa els limfòcits -Estimula la producció d'anticossos -Indueix la producció de proteïnes de fase aguda
IL-8	-Activa neutròfils -Quimiotaxis entre neutròfils i limfòcits T
IL-10	-Desactiva neutròfils i macròfags -Disminueix la secreció de TNF- $\alpha$
IL-12	-Activa les cèl.lules NK -Indueix la diferenciació de limfòcits T CD4+
TNF- $\alpha$	-Activa l'endoteli vascular i augmenta la seva permeabilitat -Activa als neutròfils i afavoreix la seva adhesió i fagocitosi -Estimula la producció de citokines en el macròfag -Augmenta la temperatura

## 2.2. Utilitat diagnòstica i pronòstica

Diversos estudis han demostrat que la resposta inflamatòria es pot avaluar de forma fidedigna mitjançant tècniques d' ELISA (*"Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay"*) tant en Rentat Broncoalveolar (RBA) com en sèrum, i que la determinació de diferents mediadors inflamatoris pulmonars i sistèmics pot tenir utilitat tant diagnòstica com pronòstica en la pneumònia (14).

Estudis inicials demostraren un augment de diferents citoquines com IL-1 $\beta$ , IL- 6, IL-10 i TNF- $\alpha$  en sèrum de malats amb PAC (15-17).

Aquestes troballes sistèmiques s'han confirmat a nivell local, en detectar-se un augment de IL-1 $\beta$ , IL- 6, i TNF- $\alpha$  en RBA de malalts amb PAC (18;19). A més, Dehoux et al han suggerit que la resposta inflamatòria pulmonar és inicialment compartimentalitzada, en detectar un increment de IL-6 i TNF- $\alpha$  en el RBA dels lòbuls pulmonar afectats per la pneumònia en comparació als lòbuls pulmonars no afectats (18).

En pneumònia greu, estudis en RBA han demostrat un augment de diferents citoquines com IL-6 i TNF- $\alpha$  en comparar el RBA de malats amb pneumònia que requereixen ventilació mecànica amb el RBA d'altres malats ventilats mecànicament sense pneumònia (20).

Altres treballs, han relacionat un excés d'aquestes citoquines amb un mal pronòstic de la malaltia. Estudis inicials realitzats en sepsis (21;22) i Síndrome del Distress Respiratori de l'Adult (SDRA) (23), relacionaren un excés de IL-6, IL-10 i TNF- $\alpha$  amb un pitjor pronòstic d'aquestes patologies. En el cas de la sepsis, s'ha relacionat un excés de IL-10 sistèmic amb major incidència de shock sèptic (21), i nivells elevats de IL-6, IL-10 i TNF- $\alpha$  en sèrum en el moment de l'ingrés amb valors elevats de diferents escales de gravetat (APACHE II, MODS) (22). En el cas del SDRA, s'ha relacionat l'existència d'un excés de IL-10 sistèmic amb un augment de dies de ventilació mecànica i mortalitat en UCI (23).

En PAC, Glynn et al (16) han descrit una associació entre nivells alts de citoquines i Síndrome de resposta inflamatòria sistèmica (SIRS), en determinar que els malalts amb PAC i SIRS tenien nivells de IL-6 i IL-10 més alts que els malalts amb PAC sense SIRS.



Diversos estudis han relacionat nivells alts de IL-6 i proteïna C reactiva (PCR), un reactant de fase aguda de síntesi hepàtica (11) amb la gravetat de la PAC en el moment de l'ingrés hospitalari (24).

I en pneumònia greu, s'ha observat que nivells elevats de IL-6 i IL-10 en sèrum al tercer dia de l'ingrés hospitalari en la pneumònia greu estan relacionats amb major mortalitat (25).

Finalment, cal destacar que els nivells alts de IL-6 han estat descrits com un dels principals factors relacionats amb la falta de resposta al tractament antibiòtic empíric, tant en PAC (26) com en PAVM (27).

Així doncs, quan es produeix una infecció bacteriana a nivell pulmonar, a conseqüència de l'acció defensiva iniciada pels macròfags i els neutròfils alveolars, s'alliberen diferents citoquines al torrent sanguini (tant pulmonar com sistèmic), que poden ser detectades i ens poden ajudar en el diagnòstic i monitorització de la pneumònia bacteriana.

D'altra banda, en un recent estudi de Yende i cols (28), s'ha demostrat que els pacients amb concentracions elevades d'aquestes citoquines circulants en fase d'estabilitat clínica prèvia a la infecció, tenen més risc de presentar una PAC que els pacients amb concentracions de citoquines baixes, la qual cosa indica que la resposta inflamatòria pot jugar un paper crucial en la patogènia de la infecció fins i tot abans que la detectem.

L'estudi de la resposta inflamatòria "pura" en humans afectats de pneumònia greu en molts cassos és difícil donat els múltiples processos intercurrents que s'hi donen, com ara la presència d'altres patologies associades o l'administració de diferents tractaments que poden tenir influència en la seva gènesi i evolució.

Per aquest motiu, l'existència d'un model experimental de pneumònia greu podria ser de gran utilitat per a l'estudi de la resposta inflamatòria associada a la infecció respiratòria, la seva cinètica i les seves possibles modulacions.

### **3.- MODEL ANIMAL DE PNEUMÒNIA**

#### **3.1.- Generalitats**

Els models animals són un pas essencial entre els test "in vitro" i els estudis clínics, i són necessaris per a conèixer i entendre millor molts aspectes relacionats amb qualsevol patologia.

Al llarg de la història, diferents models experimentals han estat utilitzats per estudiar la fisiopatologia i la utilitat de diferents mètodes diagnòstics i noves eines terapèutiques en les infeccions respiratòries.

Els primers models animals de pneumònia foren desenvolupats als anys 1970's i estudiaren diferents aspectes de la pneumònia aspirativa en gats en introduir contingut alimentari a la via aèria i valorar els seus efectes sobre el dany pulmonar agut (29).

Posteriorment, Tilson et al desenvoluparen el primer model experimental de pneumònia induïda per *Pseudomonas aeruginosa* en ser inoculada a la via aèria de gossos ventilats mecànicament amb l'objectiu de valorar els efectes de la pressió positiva al final de l'expiració (PEEP) sobre l'intercanvi de gasos durant la pneumònia (30).

El primer model experimental de pneumònia per *Streptococcus pneumoniae* fou validat per Moser i col·laboradors ja als 80's, en exposar altes concentracions d'aquesta bactèria als pulmons de gossos. El model fou utilitzat per l'estudi de

diferents procediments invasius i no invasius pel diagnòstic de la pneumònia (31). Posteriorment, l'exposició de *S. Pneumoniae* a animals amb pulmons grans (gats, gossos, ovelles, porcs) fou prohibida degut a l'elevat risc existent de contagi amb els humans que manipulen l'animal (32).

Els monos babuins foren també utilitzats per estudiar diferents aspectes relacionats amb el diagnòstic d'infecció respiratòria associada a la ventilació mecànica (33;34). En aquests estudis, s'utilitzava un model de dany pulmonar difús induït per l'administració d'àcid oleic en primats per comparar l'utilitat diagnòstica de diferents mètodes com l'aspirat traqueal, el RBA o el catèter telescopat protegit, i l'efecte de l'administració de diferents antibiòtics orofaringis com a mesura preventiva de la PAVM.

Finalment, altres models de pneumònia en animals amb pulmons petits (rates, ratolins i conills d'índies) han estat també utilitzats (32;35-38), tot i les importants diferències histopatològiques d'aquestes pneumònies experimentals en ser comparades a les pneumònies que es donen en els humans.

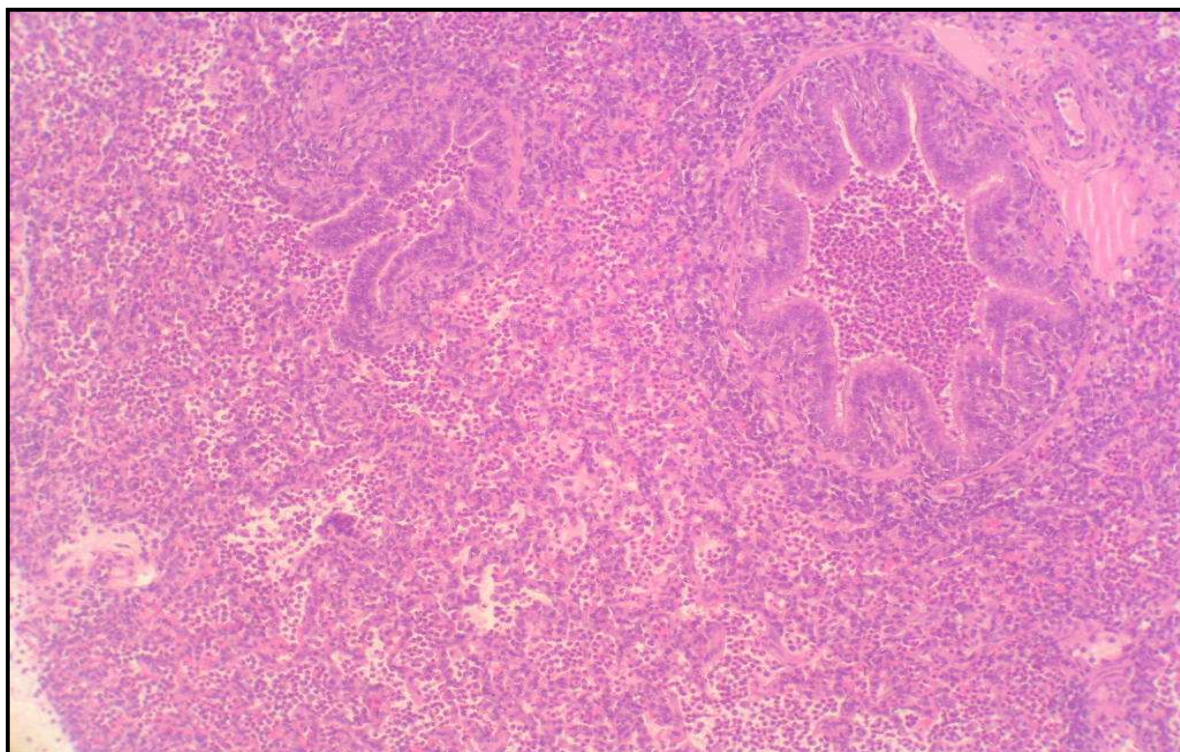
El pulmó animal més semblant al pulmó humà, és el pulmó de porc (32).

### 3.2. Model porcí de pneumònia greu

El primer model porcí de pneumònia fou validat per Marquette CH i col.laboradors en porquets Largewhite-Landrace de 3 mesos d'edat i  $20 \pm 2$  kg de pes. Aquests autors, mentre estudiaven la utilitat de diferents stents en porquets amb estenosis tranqueals, trobaren que els porquets que es ventilaven mecànicament durant més de 72 hores desenvolupaven pneumònia de forma espontània (39).

Posteriorment, validaren el model de PAVM en descriure la pneumònia que apareix tant de forma espontània als porquets ventilats mecànicament com després de la inoculació endobronquial de gèrmens colonitzadors de l'orofarínges porcina. En ambdós casos, es confirmà la gran similitud de la pneumònia porcina amb la humana, tant des del punt de vista microbiològic com des de l'histopatològic (40) (figura 2).

**Figura 2**



**Figura 2:** Tall histològic de pulmó de porc amb pneumònia

En aquest estudi, es caracteritzaren els mètodes a seguir: els porquets, de l'espècie Largewhite-Landrace, han de pesar uns 20 kg i s'han de mantenir sota perfusions de midazolam, fentanil i bromur de pancuroni per tal d'aconseguir una adequada anestèsia, analgèsia i paràlisi muscular un cop són intubats oro-traquealment i connectats a ventilació mecànica. Els paràmetres de ventilació mecànica inicials són: volum corrent ( $V_t$ ) entre 10-15 ml/kg, fracció inspiratòria d'oxigen inicial ( $FiO_2$ ) de 1.0 i una PEEP de 0 cm  $H_2O$ . Finalment, es col·loquen catèters vasculars en la vena jugular i artèria femoral per control analític, hemodinàmic i de l'intercanvi de gasos i una sonda vesical per inserció suprapúbica per a control de la diüresi (**figura 3**).

Els porquets són ventilats en posició prona, com les ovelles o les vaques, ja que la ventilació mecànica en posició supina provoca atelectasis pulmonars amb severa alteració de la relació ventilació/perfusió en poques hores (40). Els paràmetres ventilatoris s'aniran adaptant durant el període de l'estudi per tal de mantenir una saturació d'oxigen  $\geq 90\%$  i una  $PaCO_2$  entre 35 – 45 mmHg. L'aport nutricional s'administra en forma d'infusions contínues de Ringer Lactat (a una velocitat de 125 ml/hora) i sèrum glucosat al 10% (a una velocitat de 40 ml/h). Al final de l'estudi els porcs són sacrificats amb una infusió de clorur potàssic endovenós.

Des del punt de vista anatomo-patològic, les troballes de l'anàlisi histològica del parènquima pulmonar són descrites d'acord a la terminologia que s'utilitza en humans (41), donada l'enorme la similitud existent (**taula 2**).

En tractar-se d'una pneumònia associada a la ventilació mecànica, es considera pneumònia greu "per se", tal i com passa en humans (42).

**Figura 3**



**Figura 3:** El porquet Lagerwhite-Landrace sedat i ventilat mecànicament durant l'estudi

Des del punt de vista microbiològic, la pneumònia espontànea que es desenvolupa en els porquets ventilats més de 72 hores és sempre deguda a gèrmens colonitzadors de la via aèria porcina.

Els gèrmens aïllats més freqüentment en aquests estudis han estat *Pasteurella multocida* i *Streptococcus suis*, tot i que *Klebsiella oxitoca*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* i *Staphylococcus aureus* també en poden formar part (40) (**taula 3**).

**Taula 2: Graduació de les troballes histològiques en la pneumònia.**

<b>Grau</b>	<b>Sinònim</b>	<b>Descripció</b>
0	No pneumònia	Absència de lesions
1	Impacte mucós	Impacte mucós purulent en les vies aèries distals
2	Bronquiolitis	Presència de polimorfonuclears sense alteracions de les parets alveolars ni de l'espai alveolar
3	Pneumònia	Presència focal de leucòcits polimorfonuclears, fibrina i alguns eritròcits en l'espai alveolar
4	Pneumònia Confluent	Lesions de pneumònia confluents en més d'1 segment pulmonar
5	Pneumònia Abscessificada	Pneumònia amb àrees de necrosi

**Taula 3: Microorganismes aïllats en els cultius de teixit pulmonar en porquets ventilats mecànicament que presenten pneumònia espontània. Adaptat de Marquette CH et al (40)**

<b>Microorganisme</b>	<b>Cultiu <math>\geq 10^4</math> ufc/g</b>	<b>Cultiu <math>&lt; 10^4</math> ufc/g</b>
<i>Pasteurella multocida</i>	40	12
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	2
<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	1
<i>Streptococcus suis</i>	20	5
<i>Streptococcus bovis</i>	13	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3	2
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	4
<i>Bacillus spp.</i>	-	1

Finalment, els mateixos autors han validat un model de pneumònia induïda per la inoculació endobronquial de diferents gèrmens a altes concentracions ( $10^6 - 10^8$  unitats formadores de colònies (ufc)/ ml) a través del canal del fibrobroncoscop. En l'estudi de validació utilitzaren l'inoculació de *Pasteurella Multiocida* i *Klebsiella Oxytoca*, descrivint la presència de pneumònia en porquets que es mantenien sota ventilació mecànica durant 72 hores i l'absència de pneumònia en porquets que es despertaven i es mantenien amb respiració espontànea durant 3 i 15 dies (40). Aquest fet confirmava la importància de la ventilació mecànica en aquest model. Estudis posteriors en porquets han utilitzat la inoculació endobronquial de *Escherichia Coli* (43-45), *Group B Streptococci* (46) i *Pseudomonas aeruginosa* (47) per l'inducció de la pneumònia. Aquest estudis foren dissenyats per estudiar les característiques anatomo-patològiques de la PAVM (43), i per testar la penetrància pulmonar de diferents antibiòtics en la pneumònia, com amikacina (44;45) i cefepima (47).

Fins a l'actualitat, cap estudi experimental havia estudiat la resposta inflamatòria associada a la pneumònia, la seva evolució al llarg del temps i les seves possibles modulacions terapèutiques.

#### **4.- RESPOSTA INFLAMATÒRIA I ANTIBIÒTICS**

Els antibiòtics són els fàrmacs fonamentals per al tractament de les infeccions respiratòries, gràcies a la seva capacitat per matar les bacteries (efecte bactericida) i impedir el creixement bacterià (efecte bacteriostàtic).

En les pneumònies, les darreres recomanacions terapèutiques de l'ATS (*American Thoracic Society*) i la IDSA (*Infectious Disease Society of America*) per al seu



correcte tractament, inclouen varis fàrmacs antibiòtics entre els quals hi trobem els beta-lactàmics, les quinolones, els macròlids i els aminoglucòsids. L'elecció del fàrmac dependrà del tipus de pneumònia i dels factors de risc de l'hoste per a tenir determinats microorganismes com a gèrmens causants (48;49).

Alguns dels antibiòtics indicats per a la pneumònia greu han demostrat altres efectes a part de la seva acció antimicrobiana, com ara la capacitat d'interferir en la funció fagocítica dels macròfags i neutròfils (50), i la intervenció directa en la generació i alliberació de diferents mediadors que intervenen en el procés inflamatori (citoquines, factors de creixement...) (51).

Els fàrmacs més estudiats fins a la actualitat són els macròlids, principalment pel seu rellevant paper en el tractament de la panbronquiolitis, malaltia d'alta prevalència al Japó (52), i de la fibrosi quística (53).

Estudis *in vitro* i *in vivo* han demostrat la capacitat dels macròlids per a inhibir l'alliberació de citoquines proinflamatòries com la IL-1 $\beta$ , IL-8 o TNF- $\alpha$ , (54;55) i de disminuir el nombre total de limfòcits CD8+ activats en rentat broncoalveolar (56).

Aquests efectes immunomoduladors poden tenir una important traducció clínica, en relacionar-se amb un millor aclariment de les secrecions respiratòries epitelials (57) i amb una disminució de la mortalitat, tant en la panbronquiolitis (52) com en la pneumònia pneumocòcica bacterièmica (58).

Referent als beta-lactàmics i les quinolones, els fàrmacs més utilitzats en l'actualitat en el tractament de la pneumònia greu, també trobem alguns treballs que han estudiat els seus efectes més enllà de l'acció antibacteriana.

En el cas dels beta-lactàmics, s'han estudiat principalment els mecanismes d'acció que poden justificar les seves freqüents reaccions al·lèrgiques a través de la inhibició de l'interferó-gamma, una quimoquina que interfereix en la funció de les

cèl·lules fagocitàries, en la proliferació limfocitària, en les cèl·lules NK (“*natural killers*”) i en la producció d’anticossos (59).

Referent a la producció de citoquines, estudis *in vitro* han demostrat que el seu ús pot disminuir la IL-4 secretada per les cèl·lules Th 2 (60), i a la vegada incrementar l’alliberació d’IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  com a mecanisme compensatori a la inhibició del interferó-gamma (61).

Referent a les quinolones, estudis *in vitro* han demostrat una activació del factor nuclear AP-1 (que codifica per diferents citoquines proinflamàtores com la IL-6) en cèl·lules epitelials cultivades amb ciprofloxacina (62) i la inhibició de la síntesi de IL-1 i TNF- $\alpha$  en posar en contacte cultius cel·lulars infectats per *Haemophilus influenza* amb ciprofloxacina (63).

Fins a l’actualitat, cap estudi ha avaluat l’impacte de diferents teràpies antibiòtiques sobre la resposta inflamatòria associada a la pneumònia en un model experimental, ni el seu efecte sobre diferents variables clíniques, microbiològiques o histològiques. Aquest fet és impensable en humans, degut a la impossibilitat ètica de poder estudiar un grup control amb infecció bacteriana sense rebre tractament antibiòtic.

## **5-. RESPOSTA INFLAMATÒRIA I GLUCOCORTICOIDS**

Els glucocorticoides (GC) són hormones del grup dels esteroides, que es produeixen de forma fisiològica en el còrtex de les glàndules suprarenals, com és el cas del cortisol, i que també poden ser sintetitzats de forma exògena, com passa en el cas de la hidrocortisona i la metilprednisolona.

Estan implicats en una gran varietat de mecanismes fisiològics, incloent els que regulen la inflamació, el sistema immunitari, el metabolisme dels hidrats de carboni,

el catabolisme de les proteïnes, els nivells electrolítics en plasma i la resposta de l'organisme davant de qualsevol situació d'estrès (64).

Degut a l'esmentada rellevància de la resposta inflamatòria en l'evolució i el pronòstic de les infeccions greus, en els darrers anys els GC han estat plantejats com a teràpia antiinflamatòria i immunomoduladora tant en la sepsis com en la pneumònia greu.

### 5.1.- Mecanismes d'acció

Els GC circulen pel plasma units a un complex proteic format per les proteïnes transcortina i albúmina, que unides al GC el mantenen inactiu.

La part activa, que correspon a la porció lliure de GC, pot travessar la membrana plasmàtica de les cèl·lules i unir-se al seu receptor específic, l'anomenat  $\alpha$ -GR, que es troba en el citoplasma de pràcticament la totalitat de les cèl·lules humanes (65).

Un cop units, el  $\alpha$ -GR s'activa i es transloca al nucli cel·lular on produeix un efecte antiinflamatori a través de dos mecanismes d'acció moleculars (**figura 4**); El primer és l'anomenat transrepressió que consisteix en la disminució de la transcripció genètica de molècules amb acció pro-inflamatòria, bàsicament degut a l'efecte que provoca la unió del  $\alpha$ -GR amb el factor nuclear  $\kappa$ -B (NF- $\kappa$ B), que l'inactiva en unir-se amb el complex proteic p50-p65 (que prèviament estava unit al NF- $\kappa$ B i el mantenia actiu), deixant aquest de transcriure mRNA encarregat de codificar diferents molècules pro-inflamatòries.

El segon mecanisme molecular és l'anomenada transactivació, que consisteix en l'increment de la transcripció genètica de molècules amb acció antiinflamatòria, degut a la unió del  $\alpha$ -GR amb regions promotores del ADN encarregades de

codificar mRNA per la inducció de diferents proteïnes amb acció anti-inflamatòria, com la IL-10, la lipocortina 1 o els receptors  $\beta 2$  (64). Les diferents molècules sobre les que tenen efecte els GC per aquests dos mecanismes genòmics es resumeixen a la **taula 4**.

#### **Taula 4: Efecte dels glucocorticoids sobre la transcripció genètica**

Disminució de la transcripció genètica (TRANSREPRESSIÓ):

- Citoquines (IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-11, IL-13, factor de necrosi tumoral alfa, factor estimulant de colònies de granulocits i macròfags)
- Quimioquines (RANTES, eotoxina, proteïna  $\alpha$  inflammatòria dels macròfags (MIP-1 $\alpha$ ), proteïnes quimiotàctiques de monòlits 1 y 3)
- Enzims (òxid nítric sintetasa induïble, ciclooxigenasa 2, fosfolipasa A2 citoplasmàtica)
- Molècules d'adhesió (molècula 1 de adhesió intracel·lular, molècula 1 d'adhesió de cèl·lules vasculars)
- Receptors (receptor de la IL-2, receptor de la taquicinina 1)

Augment de la transcripció genètica (TRANSACTIVACIÓ):

- Lipocortina 1
- Receptors  $\beta 2$
- SLPI (serum leukoprotease inhibitor)
- Proteïna de cèl·lules clares (CC10, inhibidor de la fosfolipasa A2)
- Antagonista del receptor de la IL-1
- Inhibidor del factor nuclear kappa B
- IL-10

Finalment, els GC també provoquen un efecte antiinflamatori a través d'un tercer mecanisme d'acció, no genòmic, com és l'activació de l'enzima eNOS (*endothelial nitric oxide synthetase*), que provoca una potent disminució de la inflamació vascular a nivell sistèmic (66).

Figura 4

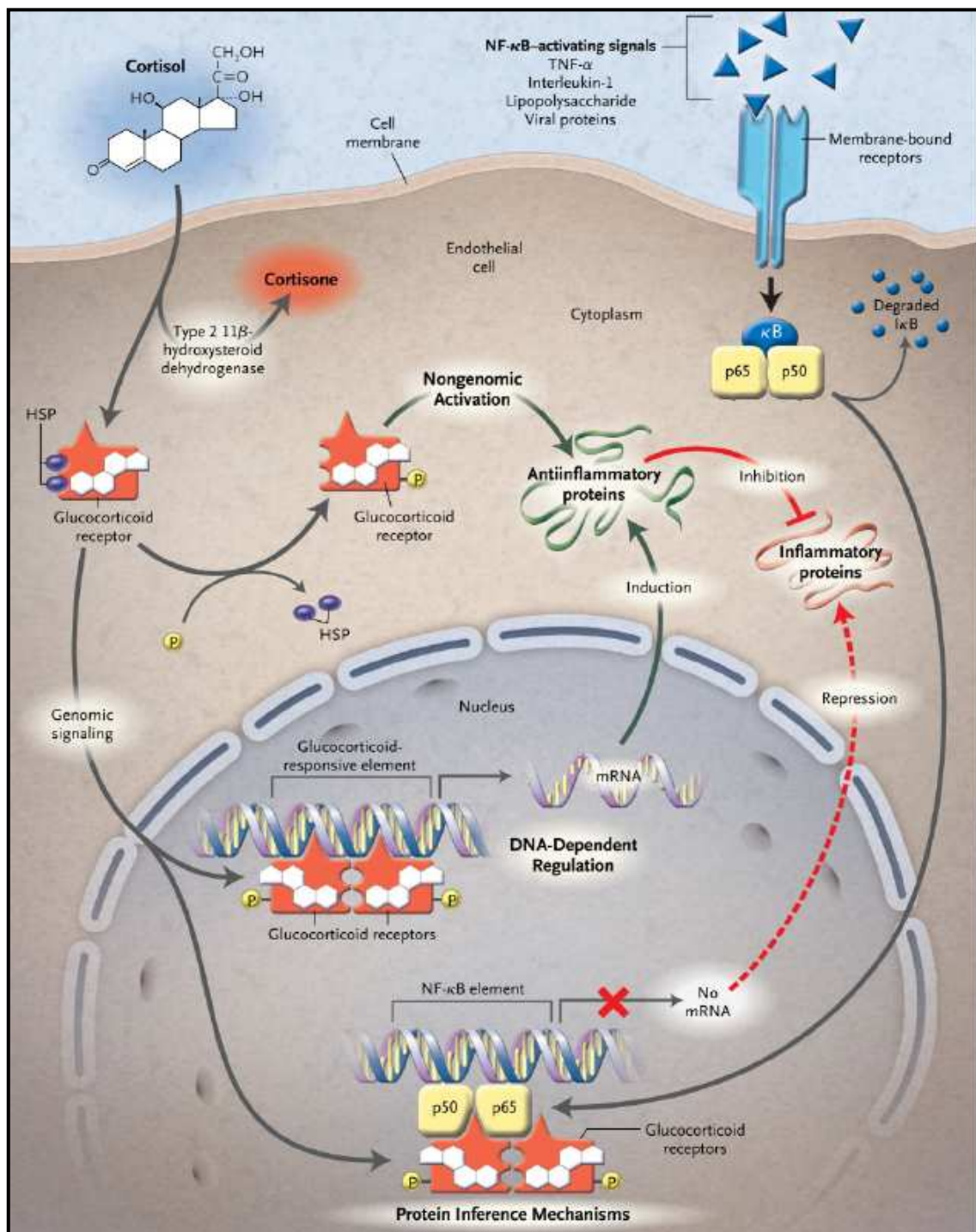


Figura 4: Mecanisme d'acció dels glucocorticoids. Adaptat *Rhen T et al (64)*.

## 5.2.- GC i pneumònies

En la pràctica clínica, els primers estudis realitzats per valorar l'efecte dels GC en pacients amb sepsis i pneumònia indicaven una milloria més ràpida dels símptomes en aquells malalts que rebien tractament amb GC, encara que no s'evidenciaven efectes sobre la mortalitat i en alguns casos s'associava a un major nombre d'efectes secundaris i un pitjor pronòstic quan es suspenia el tractament corticoideu (67).

Tota aquesta controvèrsia en les troballes fou deguda, en gran part, al desconeixement existent fins aquell moment de l'important paper de la resposta inflamatòria associada a la pneumònia en el pronòstic de la malaltia i de la seva possible immunomodulació pels GC.

En un primer treball realitzat per Montón i cols, en pacients amb pneumònia greu que requerien de ventilació mecànica (68), es va detectar el possible efecte immunosupresor dels GC en observar una disminució de les citoquines pro-inflamatòries tant en sèrum com RBA en els pacients que varen rebre tractament coadjuvant amb GC (en la majoria de casos com a tractament broncodilatador associat al tractament antibiòtic) (**taula 5**).

A més, en el grup de pacients amb tractament esteroideu es va apreciar una tendència cap a una disminució de la mortalitat, malgrat que la població a estudi era petita (n=20) (68).

**Taula 5: Resposta inflammatòria en sèrum i RBA en pacients amb pneumònia greu amb i sense tractament GC. Adaptat de *Montón C et al (68)***

	<b>NO GC (n=9)</b>	<b>GC (n=11)</b>	<i>p value</i>
<b>SÈRUM</b>			
TNF- $\alpha$	43 $\pm$ 7	28 $\pm$ 4	0.15
IL-1 $\beta$	4 $\pm$ 2	1 $\pm$ 0.4	0.50
IL-6	1089 $\pm$ 342	630 $\pm$ 385	0.03*
PCR	34 $\pm$ 5	19 $\pm$ 5	0.03*
<b>RBA</b>			
TNF- $\alpha$	118 $\pm$ 50	24 $\pm$ 5	0.04*
IL-1 $\beta$	91 $\pm$ 35	57 $\pm$ 17	0.31
IL-6	1569 $\pm$ 965	889 $\pm$ 432	0.49
% Neutròfils	93 $\pm$ 3	57 $\pm$ 16	0.03*

La relació entre la intensitat de la resposta inflammatòria en la pneumònia, la dosi de GC i el pronòstic de la malaltia fou estudiada posteriorment per Agustí et al (69). En aquest estudi, els autors avaluaven la resposta inflammatòria associada a la pneumònia en RBA i sèrum de pacients amb pneumònia que havien rebut tractament glucocorticoide durant un llarg període de temps (definit per >20 mg/dia durant més de 30 dies). Els resultats es comparaven en un grup de pacients amb pneumònia sense tractament glucocorticoideu i en un altre grup de pacients amb pneumònia i tractament glucocorticoideu durant un període curt de temps (9  $\pm$  7 dies).

Aquests autors observaren que la resposta inflammatòria local (en RBA) i sistèmica (en sèrum), mesurada a través de citoquines tan rellevants com la IL-6 i el TNF- $\alpha$ , estava marcadament disminuïda en els pacients que havien rebut tractament amb GC durant llargs períodes respecte els que no n'havien rebut. A més, l'administració aguda de GC tenia un efecte intermedi en la supressió de la resposta inflammatòria.

La mortalitat en el grup de pacients amb pneumònia i tractament amb GC durant llargs períodes era similar a la mortalitat del grup amb pneumònia sense tractament amb GC. D'altra banda, els pacients que havien rebut tractament glucocorticoide durant períodes curts i que mostraven una resposta inflamatòria atenuada, presentaven tendència a una menor mortalitat (69).

Aquests resultats indiquen que l'atenuació profunda de la resposta inflamatòria per un tractament corticoideu perllongat pot ser tan perjudicial com la pròpia resposta inflamatòria excessiva, però que la seva atenuació "moderada" per un tractament corticoideu "curt" pot ser beneficiosa per la modulació de la resposta inflamatòria i el pronòstic de la malaltia.

En un altre treball de Ioanas i cols (27), realitzat sobre pacients amb pneumònia adquirida a la UCI que requerien de ventilació mecànica, els autors trobaren que la presència de concentracions elevades de IL-6 i IL-8 en el moment del diagnòstic i de IL-6 al tercer dia eren els únics factors que es relacionaven amb la falta de resposta al tractament antibiòtic empíric, la qual cosa indicava, de nou, que la potencial modulació de la resposta inflamatòria podria ser beneficiosa també en aquest subgrup de malalts. A més, en realitzar l'anàlisi multivariant dels diferents factors que podien estar en relació amb la falta de resposta al tractament, es va trobar que l'administració concomitant de GC era un factor protector (odds ratio = 0,21).

Basant-se en aquestes premisses, Confalonieri et al (70) avaluaren l'eficàcia i la seguretat de l'administració d'una infusió contínua d'hidrocortisona en una estudi doble cec, aleatoritzat i controlat amb placebo en el qual es varen incloure a 46 pacients amb PAC greu que requerien ingrés a una UCI. En total, 23 pacients reberen un bolus d'hidrocortisona de 200 mg per via endovenosa seguit d'una perfusió de 10 mg/h durant 7 dies. Aquests autors demostraren una disminució de la



mortalitat en el grup tractat amb hidro cortisona (0 versus 30%), així com una milloria significativa en les principals mesures clíniques realitzades, com la radiografia de tòrax, l'escala de gravetat MODS, el quocient pressió arterial d'oxigen partit per la fracció inspirada d'oxigen ( $PaO_2/FiO_2$ ) i l'estància hospitalària. En aquest estudi la resposta inflamatòria associada a la pneumònia no va ser analitzada, però els autors hipotitzaven la seva modulació en demostrar una atenuació de la proteïna C reactiva en el grup tractat amb GC.

Així doncs, trobem indicis que l'administració de GC pot ser beneficiosa en el pronòstic de les pneumònies, sobretot en aquells casos en els quals s'administren de forma "fisiològica", és a dir, a dosis baixes i durant períodes curts de temps, gràcies al seu efecte immunomodulador sobre la resposta inflamatòria associada a la pneumònia. Els mecanismes que poden justificar aquest procés són, fins a l'actualitat, desconeguts.



## JUSTIFICACIÓ I OBJECTIUS DE LA TESI

---



## JUSTIFICACIÓ GENERAL

La pneumònia greu és la patologia infecciosa més freqüent a les unitats de cures intensives i comporta un gast sanitari de primer ordre i una elevada morbi-mortalitat.

La taxa de mortalitat, situada entre el 20-40%, no ha variat gens en els darrers anys, tot i els avenços en teràpia antimicrobiana i en mesures de suport vital, suggerint que altres factors són fonamentals en l'evolució d'aquesta malaltia.

Entre aquests factors hi trobem l'anomenada resposta inflamatòria associada a la pneumònia, definida per un conjunt de citoquines, proteïnes de fase aguda i altres mediadors inflamatoris secretats pel sistema immunitari com a mecanisme de defensa vers la infecció, que poden ser detectats de manera fidedigna tant a nivell pulmonar (en rentat broncoalveolar) com a nivell sistèmic (en sèrum).

Diversos treballs han relacionat un excés d'aquesta resposta inflamatòria amb un mal pronòstic de la malaltia, mesurat en termes de falta de resposta al tractament antibiòtic empíric i en mortalitat.

L'estudi de la resposta inflamatòria "pura" associada a la pneumònia en humans és difícil degut als múltiples processos intercurrents que es donen en les infeccions respiratòries greus, com ara la presència d'altres patologies o l'administració de diferents tractaments que poden tenir una gran incidència en la seva gènesi i evolució. Per aquest motiu, disposar d'un model experimental de pneumònia greu pot ser de gran utilitat per l'estudi de la resposta inflamatòria associada a la infecció respiratòria, la seva cinètica i les seves possibles modulacions.

Estudis previs han caracteritzat un model animal de pneumònia associada a la ventilació mecànica en porquets, amb grans semblances ètio-patogèniques, microbiològiques i histològiques a la que es dona en els humans. Fins a l'actualitat,

la resposta inflamatòria associada a la pneumònia i la seva evolució durant el temps no han estat estudiades en cap model experimental "pur" de pneumònia.

Altres estudis han posat de manifest la possible modulació d'aquesta resposta inflamatòria, tant per l'acció de diferents teràpies antibiòtiques com per tractaments immunomoduladors com per exemple els glucocorticoids.

Aquí tampoc cap treball ha estudiat els mecanismes íntims que poden justificar aquests efectes, fins ara desconeguts, ni el seu impacte en variables clíniques, microbiològiques i histològiques.

## JUSTIFICACIÓ I OBJECTIUS DE L'ESTUDI 1

*“Experimental Pseudomonas aeruginosa pneumonia: evaluation of the associated inflammatory response” (European Respiratory Journal 2007; 30: 1167-1172)*

La resposta inflamatòria associada a la pneumònia ha estat detectada com un dels factors capitals en l'evolució i el pronòstic de la pneumònia greu.

El seu estudi en humans és a vegades difícil degut als múltiples factors intercurrents que s'hi donen, com ara la presència d'altres patologies associades o l'administració de diferents tractaments, que poden interferir en la gènesi i evolució de la resposta inflamatòria i que fa que el seu estudi en un model animal “pur” de pneumònia pugui ser de gran utilitat.

Per altra banda, la pneumònia que es produeix en porquets ventilats mecànicament té grans similituds etio-patogèniques, microbiològiques i histològiques a la pneumònia greu que es dona en humans. Els porquets ventilats mecànicament desenvolupen pneumònia tant de forma espontània com per la inoculació endobronquial de microorganismes a elevades concentracions.

La *Pseudomonas aeruginosa* és un dels principals gèrmens responsables de pneumònia greu en humans, i el seu ús està permès en animals de pulmons grans, cosa que no succeeix en altres microorganismes responsables de la pneumònia greu com ara el *Streptococcus pneumoniae* degut a l'alt risc d'infecció que comporta per al personal manipulador.

Fins a l'actualitat, cap treball ha evaluat les conseqüències clíniques, microbiològiques i histològiques de l'inoculació endobronquial d'altres concentracions de *Pseudomonas aeruginosa* en porquets ventilats mecànicament,

ni la resposta inflamatòria associada a la pneumònia i la seva evolució durant períodes llargs de temps tant a nivell pulmonar com a nivell sistèmic.

Per tant, el primer estudi d'aquesta tesi Doctoral va anar dirigit a validar un model animal de pneumònia induït per *Pseudomonas aeruginosa* en porquets ventilats mecànicament i avaluar la resposta inflamatòria associada.

#### -Objectius concrets

- 1.- Estudiar les conseqüències clíniques, analítiques, microbiològiques i histològiques resultants de l'inoculació endobronquial d'altres concentracions de *Pseudomonas aeruginosa* en porquets ventilats mecànicament
- 2.- Estudiar la resposta inflamatòria pulmonar i sistèmica associada a la pneumònia greu i la seva evolució al llarg de 96 hores.
- 3.- Estudiar la relació entre la resposta inflamatòria i les troballes clíniques, analítiques, microbiològiques i histològiques.



## JUSTIFICACIÓ I OBJECTIUS DE L'ESTUDI 2

*“Experimental severe Pseudomonas aeruginosa pneumonia and antibiotic therapy in piglets receiving mechanical ventilation” (Chest 2007; 132: 523-531).*

Els antibiòtics són el tractament fonamental de tota infecció bacteriana.

A part de la seva acció antimicrobiana, diferents antibiòtics han demostrat un efecte directe sobre la generació i l'alliberació de diferents mediadors que intervenen en la resposta inflamatòria associada a la pneumònia.

En humans afectats de pneumònia greu, l'estudi de l'efecte “pur” de diferents teràpies antibiòtiques és impossible donada la impossibilitat ètica de poder disposar d'un grup control sense tractament antibiòtic o d'un grup amb tractament antibiòtic inadequat.

En canvi, el model animal de pneumònia induït per *Pseudomonas aeruginosa* validat prèviament, sí que permet aquest estudi.

El segon estudi d'aquesta Tesi Doctoral va anar dirigit a estudiar l'efecte de diferents teràpies antibiòtiques (una d'adequada, una altra també d'adequada però d'administració tardana i una última d'inadequada) sobre la resposta inflamatòria i sobre variables clíniques, analítiques, microbiològiques i histològiques en un model experimental de pneumònia greu.

### -Objectius concrets

1.- Estudiar les conseqüències clíniques, analítiques, microbiològiques i histològiques de diferents teràpies antibiòtiques (adequada, adequada administrada de forma tardana i inadequada) en un model experimental de pneumònia greu.

- 2.- Estudiar la resposta inflamatoria associada a la pneumònia i la seva modulació per diferents teràpies antibiòtiques tant a nivell pulmonar com sistèmic.
- 3.- Estudiar la relació entre la resposta inflamatòria i les troballes clíniques, analítiques, microbiològiques i histològiques.

### JUSTIFICACIÓ I OBJECTIUS DE L'ESTUDI 3

*“Effects of glucocorticoids in ventilated piglets with severe pneumonia” (European Respiratory Journal 2008 (en premsa)).*

Degut a la crucial importància de la resposta inflamatòria en l'evolució de les infeccions greus, en els darrers anys s'han plantejat diferents tractaments antiinflamatoris i immunomoduladors en la sepsis i en la pneumònia greu, entre els quals destaquen els glucocorticoids.

Les troballes dels estudis realitzats en humans fins a l'actualitat suggereixen una millora en el pronòstic de la malaltia en associar tractament glucocorticoideu a dosis fisiològiques durant períodes curts de temps al tractament antibiòtic, tot i que els mecanismes que poden justificar aquests efectes són fins a l'actualitat desconeguts i molt difícils d'estudiar en humans, on és pràcticament impossible determinar els efectes dels glucocorticoids “per se” en pacients afectats de pneumònia.

En aquest contexte, el model animal de pneumònia greu induït per *Pseudomonas aeruginosa* validat prèviament pot ser de gran utilitat.

El tercer i darrer estudi d'aquesta tesi Doctoral va anar dirigit a estudiar els efectes de l'administració de tractament glucocorticoideu, a dosis baixes i com a teràpia coadjuvant al tractament antibiòtic, sobre la resposta inflamatòria pulmonar i sistèmica i sobre variables clíniques, analítiques, microbiològiques i histològiques en un model experimental de pneumònia greu.

### -Objectius concrets

- 1.- Estudiar les conseqüències clíniques, microbiològiques i histològiques de l'administració de tractament glucocorticoideu associat al tractament antibiòtic en un model experimental de pneumònia greu.
- 2.- Estudiar la resposta inflamatòria associada a la pneumònia i la seva modulació per al tractament glucocorticoideu tant a nivell pulmonar com sistèmic.
- 3.- Estudiar la relació entre la resposta inflamatòria i les troballes clíniques, analítiques, microbiològiques i histològiques.

**PUBLICACIONS ORIGINALS**

---



Els resultats dels estudis que constitueixen la base de la present Tesi Doctoral han estat recollits en les següents publicacions:

-Sibila O, Agustí C, Torres A, Baquero S, Gando S, Garcia-Morato J, Absi R, Famiglietti A, Vay CA, Luna CM. "Experimental *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia; Evaluation of the associated inflammatory response". *Eur Respir J* 2007; 30: 1167-72. (Factor d'Impacte = 5,076) \*

-Luna CM, Baquero S, Gando S, Risso J, Garcia Morato J, Sibila O, Absi R, Famiglietti A, Vay AC, Von Stecher F, Agusti C, Torres A. "Experimental severe *Pseudomonas Aeruginosa* pneumonia and antibiotic therapy in piglets receiving mechanical ventilation ". *Chest* 2007; 132 (2); 523-31. (Factor d'Impacte = 3,924) \*

-Sibila O, Luna CM, Agustí C, Baquero S, Gando S, Garcia-Morato J, Absi R, Famiglietti A, Vay CA, Von Stecher F, Torres A. "Effects of glucocorticoids in ventilated piglets with severe pneumonia". *Eur Respir J* 2008 (en prensa). (Factor d'Impacte = 5,076) \*

**Factor d' Impacte global: 14,076**

\* *Journal Citation Report Science Edition 2006*





**ARTICLE 1**



**ARTICLE 2**



**ARTICLE 3**



## DISCUSSIÓ

---





Els resultats de la present Tesi Doctoral han permés validar un model animal de pneumònia greu, estudiar la resposta inflamatòria associada a la pneumònia i valorar l'impacte de diferents teràpies antibiòtiques i del tractament glucocorticoideu tant en la modulació de la resposta inflamatòria com a nivell de diferents variables clíniques, analítiques, microbiològiques i histològiques.

El primer treball d'aquesta Tesi Doctoral demostra que l'inoculació endobronquial d'altres concentracions de *Pseudomonas aeruginosa* en porquets ventilats mecànicament provoca pneumònia. Després d'un període llarg de ventilació mecànica (96 hores), tots els animals estudiats han desenvolupat pneumònia per *Pseudomonas aeruginosa*, amb criteris de gravetat en la majoria dels estudis histològics realitzats. A més, la pneumònia ha estat present en tots els lòbuls pulmonars analitzats que macroscòpicament estaven afectats, però també en un 60% dels lòbuls aparentment respectats macroscòpicament, confirmant una distribució multilobar de la infecció. El fet de tractar-se d'una pneumònia associada a la ventilació mecànica, fa que la podem considerar com a pneumònia greu en cada cas (71).

El desenvolupament d'aquest model experimental de pneumònia greu, on els animals s'han mantingut ventilats durant 96 hores, ha permés estudiar d'una forma "pura" els canvis fisiopatològics que es produeixen durant la pneumònia.

Fins a l'actualitat, els estudis realitzats en porquets ventilats amb pneumònia havien estat utilitzats per estudiar les característiques anatomo-patològiques de la PAVM (43) i la penetrança pulmonar de diferents antibiòtics (44-47), però cap estudi havia avaluat els canvis fisiològics deguts a la pròpia pneumònia "per se".

El germen escollit per l'estudi, la *Pseudomonas aeruginosa*, és un dels gèrmens més freqüents que provoca pneumònia greu i que s'associa a una elevada morbi-

mortalitat (27;72;73). Els pacients amb pneumònia per *P. aeruginosa* reben teràpies amb més d'un antibiòtic (48) i en la majoria de casos associen diferents comorbilitats, circumstàncies que influeixen en l'evolució de la pneumònia i que el model animal aconsegueix eliminar.

La inoculació endobronquial de *P. aeruginosa* ha provocat l'aparició dels signes clínics característics de la pneumònia greu, com ara l'aparició de febre a les primeres 24 hores de l'inducció de la pneumònia i el deteriorament progressiu de l'intercanvi de gasos i de la mecànica pulmonar durant tot l'estudi.

Pel que fa a l'estudi de la resposta inflamatòria associada a la pneumònia, a nivell pulmonar s'ha objectivat un augment de totes les citokines estudiades a les 96 hores de l'inoculació del microorganisme, principalment de la IL-6.

A nivell sistèmic, tot i observar també un augment de la IL-6 amb un pic màxim a les 48 hores de la inducció de la pneumònia, la dinàmica de la resta de citokines estudiades (IL-1 $\beta$ , IL-8 i TNF- $\alpha$ ) ha mostrat un patró poc consistent, suggerint que la resposta inflamatòria és inicialment compartimentalitzada, tal i com s'havia postulat en estudis previs en humans (18). En canvi, quan la pneumònia provoca shock sèptic, la resposta inflamatòria sistèmica és també molt important (20;74;75). En el present estudi, la falta de correlació entre la resposta inflamatòria local i sistèmica, i el patró poc consistent de les citokines estudiades en sèrum, es pot explicar per l'absència de sepsis en els porquets estudiats, tal i com ho reflexen els hemocultius realitzats (negatius en tots els casos excepte en un animal) i l'absència d'instabilitat hemodinàmica durant tot l'estudi que ha fet innecari administrar drogues vasoactives.

Com ja s'ha comentat, la IL-6 ha estat l'única citokina estudiada que ha augmentat de forma estadísticament significativa tant en RBA com en sèrum. Diferents estudis

han correlacionat els nivells de IL-6 amb la severitat de la pneumònia (16;24), i les elevades concentracions sistèmiques han estat detectades com a factor predictiu independent de mortalitat en diferents poblacions de pacients afectats de pneumònia greu (25;27). Per aquests motius, l'estudi de la IL-6 tant en RBA com en sèrum pot ser de gran utilitat per determinar la magnitud de la resposta inflamatòria associada a la pneumònia i el potencial efecte de diferents teràpies immunomoduladores.

En el segon estudi d'aquesta tesi doctoral es demostra que l'administració de diferents teràpies antibiòtiques en la pneumònia greu té efecte tant en la resposta inflamatòria com, sobretot, en els comptatges microbiològics de les mostres pulmonars analitzades.

L'estudi es va plantejar inicialment per valorar l'efecte de diferents teràpies antibiòtiques (una d'adequada administrada precoçment, una altra d'adequada administrada tardanament i una última d'inadequada), però la baixa població d'animals estudiats en cada grup (n=3) no ha permès establir diferències entre aquests tres grups ni entre els antibiòtics administrats (ciprofloxacina com a teràpia adequada i ceftriaxona com a teràpia inadequada enfront *Pseudomonas aeruginosa*).

En canvi, en comparar els animals que han rebut tractament antibiòtic (qualsevol) amb els que no n'han rebut, s'ha apreciat que el tractament antibiòtic provoca una disminució de la resposta inflamatòria tant a nivell pulmonar (en disminuir els valors de IL-6 i IL-10 en RBA a les 72 hores de l'estudi) com sistèmic (en disminuir les concentracions de IL-10 en sèrum a les 24 i 48 hores de l'estudi). A més, l'administració de la teràpia antibiòtica també té efectes clínics, en disminuir la febre, i, sobretot, microbiològics, en detectar-se un menor creixement bacterià en els

cultius de teixit pulmonar realitzats en els porquets que han rebut tractament antibiòtic. Aquest fet confirma les troballes d'estudis prèvis en humans amb PAVM, on el correcte tractament antibiòtic millora el pronòstic de la malaltia i redueix els comptatges pulmonars dels cultius microbiològics de la via aèria inferior (73;76).

Una altra troballa important d'aquest estudi ha estat que el cultiu bacterià del RBA en els porquets sense tractament antibiòtic ha estat positiu a alts comptatges per *Pseudomonas aeruginosa* en tots els porquets estudiats. En canvi, aquesta positivitat no s'ha reproduït en tots els casos amb diferents tractaments antibiòtics que sí que han presentat pneumònia en l'anàlisi histopatològic i creixement bacterià en el cultiu de teixit pulmonar. Aquest fet confirma la utilitat limitada dels cultius de RBA per al diagnòstic i l'avaluació dels efectes d'una teràpia antibiòtica correcta en pacients amb PAVM sota tractament antibiòtic, tal i com havia estat descrit prèviament (77-79).

Finalment, cal destacar també que la presència en l'anàlisi histològica de trombosi venosa s'ha associat amb alteracions locals i sistèmiques de la pneumònia, al presentar els porquets amb trombosis venosa pulmonar una temperatura més alta durant l'estudi i nivells més elevats de TNF- $\alpha$  en sèrum i RBA i de IL-6 en RBA. En estudis realitzats amb pacients amb ARDS, la trombosi venosa s'ha relacionat amb major dany alveolar i destrucció epitelial (80), i en pacients amb PAVM i tractament antibiòtic inadequat s'ha descrit un increment de l'activitat procoagulant local associada a una major hipoxèmia (81). Així doncs, l'alteració de la coagulació i la presència de microtrombosis en la circulació venosa pulmonar poder ser un dels factors que justifiquin una mala evolució clínica en la pneumònia greu, i obren el camí per a l'estudi de futures teràpies anticoagulants associades.

El tercer estudi de la present Tesi Doctoral avalua els efectes dels GC, administrats de manera coadjuvant a la teràpia antibiòtica, en el model animal de pneumònia greu prèviament descrit, demostrant una disminució de la resposta inflamatòria pulmonar i dels comptatges microbiològics tant en RBA com en teixit pulmonar, així com una tendència a tenir lesions histològiques menys greus i una millora de la mecànica pulmonar en aquells porquets que reben tractament glucocorticoideu i antibiòtic.

Recents estudis clínics han evidenciat que dosis baixes d'hidrocortisona disminueixen la mortalitat en pacients amb PAC greu (69;70), hipotitzant que l'acció beneficosa dels GC és deguda a la seva capacitat per modular la resposta inflamatòria associada a la pneumònia (64). En aquest estudi, s'ha demostrat una atenuació pulmonar de les diferents citoquines estudiades (IL-1, IL-6, IL-8 i TNF- $\alpha$ ) en els porquets tractats amb GC+ antibiòtics, en presentar al final de l'estudi nivells d'aquestes citoquines en RBA molt similars als nivells observats a l'inici de l'estudi (abans de la inoculació del bacteri), suggerint una eficient activitat antiinflamatòria dels GC al ser associats als antibiòtics, sobretot a nivell de la IL-6. Els porquets sense cap tipus de tractament han experimentat un marcat increment en la resposta inflamatòria pulmonar a les 96 hores, reproduint els resultats del primer treball de la present Tesi Doctoral, i els porquets que han rebut només tractament antibiòtic, n'han mostrat una lleugera disminució, tal i com ocorria en el segon treball d'aquesta Tesi Doctoral, però en cap cas fins a assolir valors baixos i similars als basals com ha passat després d'administrar GC de forma coadjuvant.

A nivell sistèmic, no s'han trobat diferències entre la cinètica de les diferents citoquines estudiades en els tres grups d'animals, tot i que, de nou i com en els

anterior treballs de la present Tesi Doctoral, l'absència de signes de sepsis durant les 96 hores de l'estudi podria justificar aquest fet.

A més, els animals tractats amb antibiòtics + GC han demostrat menors comptatges microbiològics en els cultius de RBA i teixit pulmonar, suggerint una millor capacitat per erradicar els bacteris quan els dos tractaments són associats. Estudis en humans amb infeccions respiratòries associades a bronquiectàssies, ja havien mostrat prèviament una disminució paral.lela entre la resposta inflamatòria pulmonar i el creixement bacterià (82), i un estudi in vitro havia demostrat l'inhibició del creixement intracel.lular de diferents bacteris, entre ells *Pseudomonas aeruginosa*, en ser exposats a cultius cel.lulars de cèl.lules monocítiques humanes U937 i ser banyades amb metilprednisolona (83).

Tots aquest efectes han tingut repercussió clínica i histològica, en presentar els porquets tractats amb GC+ antibiòtics una millora en la mecànica pulmonar i una clara tendència a tenir menys lòbuls afectats per la pneumònia i menys lesions de pneumònia confluent i abscessos pulmonars en l'anàlisi anatomo-patològica.

Per tot això, en el seu conjunt, els resultats de la present Tesi Doctoral mostren que l'inoculació endobronquial d'altres concentracions de *Pseudomonas aeruginosa* en porquets intubats i ventilats mecànicament provoca pneumònia i permet estudiar la resposta inflamatòria pulmonar i sistèmica associada, que augmenta sobretot a nivell pulmonar.

Per altra banda, l'administració de diferents teràpies antibiòtiques en la pneumònia greu experimental atenua, en part, a la resposta inflamatòria pulmonar i sistèmica i disminueix el creixement bacterià a nivell pulmonar. I l'administració de glucocorticoides associats al tractament antibiòtic disminueix tant la resposta

inflamatòria com el creixement bacterià a nivell pulmonar, millorant la gravetat de les lesions histopatològiques i la mecànica pulmonar.





## **CONCLUSIONS**

---



Els resultats obtinguts en els diferents estudis que componen aquesta Tesi Doctoral, han permès obtenir les següents conclusions:

1.- La inoculació endobronquial d'altres concentracions de *Pseudomonas aeruginosa* en porquets intubats i ventilats mecànicament durant 96 hores provoca pneumònia i permet estudiar la resposta inflamatòria pulmonar i sistèmica associada, que augmenta sobretot a nivell pulmonar.

2.- L'administració de diferents teràpies antibiòtiques en la pneumònia greu experimental atenua la resposta inflamatòria pulmonar i sistèmica i disminueix el creixement bacterià a nivell pulmonar.

3.- L'administració de glucocorticoides associats al tractament antibiòtic en la pneumònia greu experimental disminueix tant la resposta inflamatòria pulmonar com el creixement bacterià a nivell pulmonar, i millora la gravetat de les lesions histopatològiques i la mecànica pulmonar.



## **BIBLIOGRAFIA**

---



- (1) Mizgerd JP. Lung infection--a public health priority. *PLoS Med* 2006 February;3(2):e76.
- (2) Alvarez-Lerma F, Torres A. Severe community-acquired pneumonia. *Curr Opin Crit Care* 2004 October;10(5):369-74.
- (3) Jimenez P, Torres A, Rodriguez RR, de-la-Bellacasa JP, Aznar R, Gatell JM et al. Incidence and etiology of pneumonia acquired during mechanical ventilation. *Crit Care Med* 1989;17(9):882-5.
- (4) Leeper KV, Jr., Torres A. Community-acquired pneumonia in the intensive care unit. *Clin Chest Med* 1995 March;16(1):155-71.
- (5) Heyland DK, Cook DJ, Griffith L, Keenan SP, Brun-Buisson C. The attributable morbidity and mortality of ventilator-associated pneumonia in the critically ill patient. The Canadian Critical Trials Group. *Am J Respir Crit Care Med* 1999 April;159(4 Pt 1):1249-56.
- (6) Armstrong GL, Conn LA, Pinner RW. Trends in infectious disease mortality in the United States during the 20th century. *JAMA* 1999 January 6;281(1):61-6.
- (7) Mizgerd JP. Acute lower respiratory tract infection. *N Engl J Med* 2008 February 14;358(7):716-27.
- (8) Sibille Y, Reynolds HY. Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. *Am Rev Respir Dis* 1990 February;141(2):471-501.
- (9) Doerschuk CM. Mechanisms of leukocyte sequestration in inflamed lungs. *Microcirculation* 2001 April;8(2):71-88.
- (10) Burns AR, Smith CW, Walker DC. Unique structural features that influence neutrophil emigration into the lung. *Physiol Rev* 2003 April;83(2):309-36.
- (11) Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 2006 March;6(3):173-82.
- (12) Kunkel SL, Strieter RM. Cytokine networking in lung inflammation. *Hosp Pract (Off Ed)* 1990 October 15;25(10):63-6.
- (13) Nelson S, Bagby GJ, Bainton BG, Wilson LA, Thompson JJ, Summer WR. Compartmentalization of intraalveolar and systemic lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor and the pulmonary inflammatory response. *J Infect Dis* 1989 February;159(2):189-94.
- (14) Ewig S, Welte T. Biomarkers in the diagnosis of pneumonia in the critically ill: don't shoot the piano player. *Intensive Care Med* 2008 April 8.
- (15) Puren AJ, Feldman C, Savage N, Becker PJ, Smith C. Patterns of cytokine expression in community-acquired pneumonia. *Chest* 1995;107:1342-9.

- (16) Glynn P, Coakley R, Kilgallen I, Murphy N, O'Neill S. Circulating interleukin 6 and interleukin 10 in community acquired pneumonia. *Thorax* 1999;54:51-5.
- (17) Moussa K, Michie HJ, Cree IA, McCafferty AC, Winter JH, Dhillon DP et al. Phagocyte function and cytokine production in community-acquired pneumonia. *Thorax* 1994;49:107-11.
- (18) Dehoux MS, Boutten A, Ostinelli J, Seta N, Dombret MC, Crestani B et al. Compartmentalized cytokine production within the human lung in unilateral pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150:710-6.
- (19) Kolsuz M, Erginel S, Alatas O, Alatas F, Metintas M, Ucgun I et al. Acute phase reactants and cytokine levels in unilateral community-acquired pneumonia. *Respiration* 2003 November;70(6):615-22.
- (20) Monton C, Torres A, El Ebiary M, Filella X, Xaubet A, de la Bellacasa JP. Cytokine expression in severe pneumonia: a bronchoalveolar lavage study. *Crit Care Med* 1999 September;27:1745-53.
- (21) Gomez-Jimenez J, Martin MC, Sauri R, Segura RM, Esteban F, Ruiz JC et al. Interleukin-10 and the monocyte/macrophage-induced inflammatory response in septic shock. *J Infect Dis* 1995 February;171(2):472-5.
- (22) Gardlund B, Sjolín J, Nilsson A, Roll M, Wickerts CJ, Wretling B. Plasma levels of cytokines in primary septic shock in humans: correlation with disease severity. *J Infect Dis* 1995 July;172(1):296-301.
- (23) Donnelly SC, Strieter RM, Reid PT, Kunkel SL, Burdick MD, Armstrong I et al. The association between mortality rates and decreased concentrations of interleukin-10 and interleukin-1 receptor antagonist in the lung fluids of patients with the adult respiratory distress syndrome. *Ann Intern Med* 1996 August 1;125(3):191-6.
- (24) Antunes G, Evans SA, Lordan JL, Frew AJ. Systemic cytokine levels in community-acquired pneumonia and their association with disease severity. *Eur Respir J* 2002 October;20(4):990-5.
- (25) Fernandez-Serrano S, Dorca J, Coromines M, Carratala J, Gudiol F, Manresa F. Molecular inflammatory responses measured in blood of patients with severe community-acquired pneumonia. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003 September;10(5):813-20.
- (26) Menendez R, Torres A. Treatment failure in community-acquired pneumonia. *Chest* 2007 October;132(4):1348-55.
- (27) Ioanas M, Ferrer M, Cavalcanti M, Ferrer R, Ewig S, Filella X et al. Causes and predictors of non-response to treatment of the ICU-acquired pneumonia. *Crit Care Med* 2004;32:938-45.
- (28) Yende S, Tuomanen EI, Wunderink R, Kanaya A, Newman AB, Harris T et al. Preinfection systemic inflammatory markers and risk of hospitalization



- due to pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2005 December 1;172(11):1440-6.
- (29) Brandt B, Doyle B, Weintraub H, Harrison H. Pulmonary artery pressure and lung water during extracorporeal circulation in experimental pulmonary insufficiency. *Ann Thorac Surg* 1975 September;20(3):308-15.
- (30) Tilson MD, Bunke MC, Walker Smith GJ, Katz J, Cronau L, Barash PG et al. Quantitative bacteriology and pathology of the lung in experimental *Pseudomonas pneumonia* treated with positive end-expiratory pressure (PEEP). *Surgery* 1977;82(1):133-40.
- (31) Moser KM, Maurer J, Jassy L, Kremsdorf R, Konopka R, Shure D et al. Sensitivity, specificity, and risk of diagnostic procedures in a canine model of *Streptococcus pneumoniae pneumonia*. *Am Rev Respir Dis* 1982 April;125(4):436-42.
- (32) Mizgerd JP, Skerrett SJ. Animal models of human pneumonia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008 March;294(3):L387-L398.
- (33) Johanson WG, Seidenfeld JJ, Gomez P, de los Santos R, Coalson JJ. Bacteriologic diagnosis of nosocomial pneumonia following prolonged mechanical ventilation. *Am Rev Respir Dis* 1988;137:259-64.
- (34) Johanson WG, Jr., Seidenfeld JJ, de los SR, Coalson JJ, Gomez P. Prevention of nosocomial pneumonia using topical and parenteral antimicrobial agents. *Am Rev Respir Dis* 1988 February;137(2):265-72.
- (35) Fox-Dewhurst R, Alberts MK, Kajikawa O, Caldwell E, Johnson MC, Skerrett SJ et al. Pulmonary and systemic inflammatory responses in rabbits with gram-negative pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 1997 June;155:2030-40.
- (36) Charles PE, Etienne M, Croisier D, Piroth L, Lequeu C, Pugin J et al. The impact of mechanical ventilation on the moxifloxacin treatment of experimental pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Crit Care Med* 2005 May;33(5):1029-35.
- (37) Charles PE, Piroth L, Desbiolles N, Lequeu C, Martin L, Portier H et al. New model of ventilator-associated pneumonia in immunocompetent rabbits. *Crit Care Med* 2002 October;30(10):2278-83.
- (38) Croisier D, Etienne M, Bergoin E, Charles PE, Lequeu C, Piroth L et al. Mutant selection window in levofloxacin and moxifloxacin treatments of experimental pneumococcal pneumonia in a rabbit model of human therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2004 May;48(5):1699-707.
- (39) Marquette CH, Mensier E, Copin MC, Desmidt A, Freitag L, Witt C et al. Experimental models of tracheobronchial stenoses: A useful tool for evaluating airway stents. *Ann Thoracic Surg* 1995;60:651-6.

- (40) Marquette CH, Wermert D, Wallet F, Copin MC, Tonnel AB. Characterization of an animal model of ventilator-acquired pneumonia. *Chest* 1999 January;115(1):200-9.
- (41) Rouby JJ, Martin DL, Poete P, Nicolas MH, Bodin L, Jarlier V et al. Nosocomial bronchopneumonia in the critically ill. Histologic and bacteriologic aspects. *Am Rev Respir Dis* 1992 October;146(4):1059-66.
- (42) Niederman MS. The clinical diagnosis of ventilator-associated pneumonia. *Respir Care* 2005 June;50(6):788-96.
- (43) Goldstein I, Bughalo MT, Marquette CH, Lenaour G, Lu Q, Rouby JJ. Mechanical ventilation-induced air-space enlargement during experimental pneumonia in piglets. *Am J Respir Crit Care Med* 2001 March;163(4):958-64.
- (44) Goldstein I, Wallet F, Nicolas-Robin A, Ferrari F, Marquette CH, Rouby JJ. Lung deposition and efficiency of nebulized amikacin during *Escherichia coli* pneumonia in ventilated piglets. *Am J Respir Crit Care Med* 2002 November 15;166(10):1375-81.
- (45) Elman M, Goldstein I, Marquette CH, Wallet F, Lenaour G, Rouby JJ. Influence of lung aeration on pulmonary concentrations of nebulized and intravenous amikacin in ventilated piglets with severe bronchopneumonia. *Anesthesiology* 2002 July;97(1):199-206.
- (46) van Kaam AH, Lutter R, Lachmann RA, Haitzma JJ, Herting E, Snoek M et al. Effect of ventilation strategy and surfactant on inflammation in experimental pneumonia. *Eur Respir J* 2005 July;26(1):112-7.
- (47) Tonnellier M, Ferrari F, Goldstein I, Sartorius A, Marquette CH, Rouby JJ. Intravenous versus nebulized ceftazidime in ventilated piglets with and without experimental bronchopneumonia: comparative effects of helium and nitrogen. *Anesthesiology* 2005 May;102(5):995-1000.
- (48) Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, Bartlett JG, Campbell GD, Dean NC et al. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. *Clin Infect Dis* 2007 March 1;44 Suppl 2:S27-S72.
- (49) Torres A. The new American Thoracic Society/Infectious Disease Society of North America guidelines for the management of hospital-acquired, ventilator-associated and healthcare-associated pneumonia: a current view and new complementary information. *Curr Opin Crit Care* 2006 October;12(5):444-5.
- (50) Hamilton-Miller JM. Immunopharmacology of antibiotics: direct and indirect immunomodulation of defence mechanisms. *J Chemother* 2001 April;13(2):107-11.
- (51) Van VB, Vanholder R, De PP, Vogelaers D, Ringoir S. Immunomodulating effects of antibiotics: literature review. *Infection* 1996 July;24(4):275-91.

- (52) Kudoh S, Azuma A, Yamamoto M, Izumi T, Ando M. Improvement of survival in patients with diffuse panbronchiolitis treated with low-dose erythromycin. *Am J Respir Crit Care Med* 1998 June;157(6 Pt 1):1829-32.
- (53) Peckham DG. Macrolide antibiotics and cystic fibrosis. *Thorax* 2002 March;57(3):189-90.
- (54) Sakito O, Kadota J, Kohno S, Abe K, Shirai R, Hara K. Interleukin 1 beta, tumor necrosis factor alpha, and interleukin 8 in bronchoalveolar lavage fluid of patients with diffuse panbronchiolitis: a potential mechanism of macrolide therapy. *Respiration* 1996;63(1):42-8.
- (55) Culic O, Erakovic V, Parnham MJ. Anti-inflammatory effects of macrolide antibiotics. *Eur J Pharmacol* 2001 October 19;429(1-3):209-29.
- (56) Mukae H, Kadota J, Kohno S, Kusano S, Morikawa T, Matsukura S et al. Increase in activated CD8+ cells in bronchoalveolar lavage fluid in patients with diffuse panbronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995 August;152(2):613-8.
- (57) Shimizu T, Shimizu S, Hattori R, Gabazza EC, Majima Y. In vivo and in vitro effects of macrolide antibiotics on mucus secretion in airway epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2003 September 1;168(5):581-7.
- (58) Martinez JA, Horcajada JP, Almela M, Marco F, Soriano A, Garcia E et al. Addition of a macrolide to a beta-lactam-based empirical antibiotic regimen is associated with lower in-hospital mortality for patients with bacteremic pneumococcal pneumonia. *Clin Infect Dis* 2003 February 15;36(4):389-95.
- (59) Brooks BM, Hart CA, Coleman JW. Differential effects of beta-lactams on human IFN-gamma activity. *J Antimicrob Chemother* 2005 December;56(6):1122-5.
- (60) Brugnolo F, Annunziato F, Sampognaro S, Campi P, Manfredi M, Matucci A et al. Highly Th2-skewed cytokine profile of beta-lactam-specific T cells from nonatopic subjects with adverse drug reactions. *J Immunol* 1999 July 15;163(2):1053-9.
- (61) Brooks BM, Thomas AL, Coleman JW. Benzylpenicillin differentially conjugates to IFN-gamma, TNF-alpha, IL-1beta, IL-4 and IL-13 but selectively reduces IFN-gamma activity. *Clin Exp Immunol* 2003 February;131(2):268-74.
- (62) Galley HF, Dhillon JK, Paterson RL, Webster NR. Effect of ciprofloxacin on the activation of the transcription factors nuclear factor kappaB, activator protein-1 and nuclear factor-interleukin-6, and interleukin-6 and interleukin-8 mRNA expression in a human endothelial cell line. *Clin Sci (Lond)* 2000 November;99(5):405-10.
- (63) Ahren IL, Karlsson E, Forsgren A, Riesbeck K. Comparison of the antibacterial activities of ampicillin, ciprofloxacin, clarithromycin, telithromycin and quinupristin/dalfopristin against intracellular non-typeable

Haemophilus influenzae. J Antimicrob Chemother 2002 December;50(6):903-6.

- (64) Rhen T, Cidlowski JA. Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. N Engl J Med 2005 October 20;353(16):1711-23.
- (65) De BK, Vanden BW, Haegeman G. The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. Endocr Rev 2003 August;24(4):488-522.
- (66) Hafezi-Moghadam A, Simoncini T, Yang Z, Limbourg FP, Plumier JC, Rebsamen MC et al. Acute cardiovascular protective effects of corticosteroids are mediated by non-transcriptional activation of endothelial nitric oxide synthase. Nat Med 2002 May;8(5):473-9.
- (67) Lefering R, Neugebauer EA. Steroid controversy in sepsis and septic shock: a meta-analysis. Crit Care Med 1995 July;23(7):1294-303.
- (68) Monton C, Ewig S, Torres A, El Ebiary M, Filella X, Rano A et al. Role of glucocorticoids on inflammatory response in nonimmunosuppressed patients with pneumonia: a pilot study. Eur Respir J 1999 July;14(1):218-20.
- (69) Agusti C, Rano A, Filella X, Gonzalez J, Moreno A, Xaubet A et al. Pulmonary infiltrates in patients receiving long-term glucocorticoid treatment: etiology, prognostic factors, and associated inflammatory response. Chest 2003 February;123:488-98.
- (70) Confalonieri M, Urbino R, Potena A, Piattella M, Parigi P, Puccio G et al. Hydrocortisone Infusion for Severe Community-acquired Pneumonia: A Preliminary Randomized Study. Am J Respir Crit Care Med 2005 February 1;171:242-8.
- (71) Ewig S, Ruiz M, Mensa J, Marcos MA, Martinez JA, Arancibia F et al. Severe community-acquired pneumonia: Assessment of severity criteria. Am J Respir Crit Care Med 1998;158:1102-8.
- (72) Bodi M, Rodriguez A, Sole-Violan J, Gilavert MC, Garnacho J, Blanquer J et al. Antibiotic prescription for community-acquired pneumonia in the intensive care unit: impact of adherence to Infectious Diseases Society of America guidelines on survival. Clin Infect Dis 2005 December 15;41(12):1709-16.
- (73) Chastre J, Fagon JY. Ventilator-associated pneumonia. Am J Respir Crit Care Med 2002 April 1;165:867-903.
- (74) Schutte H, Lohmeyer J, Rosseau S, Ziegler S, Siebert C, Kielisch H et al. Bronchoalveolar and systemic cytokine profiles in patients with ARDS, severe pneumonia and cardiogenic pulmonary oedema. Eur Respir J 1996 September;9(9):1858-67.
- (75) Bauer TT, Monton C, Torres A, Cabello H, Filella X, Maldonado A et al. Comparison of systemic cytokine levels in patients with acute respiratory

distress syndrome, severe pneumonia, and controls. *Thorax* 2000 January;55:46-52.

- (76) Luna CM, Vujacich P, Niederman MS. Impact of bronchoalveolar lavage data on therapy and outcome of VAP. *Chest* 1997;111:676-87.
- (77) Marquette CH, Wallet F, Copin MC, Wermert D, Desmidt A, Ramon P et al. Relationship between microbiologic and histologic features in bacterial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:1784-7.
- (78) Prats E, Dorca J, Pujol M, Garcia L, Barreiro B, Verdaguer R et al. Effects of antibiotics on protected specimen brush sampling in ventilator-associated pneumonia. *Eur Respir J* 2002 May;19(5):944-51.
- (79) Luna CM, Aruj P, Niederman MS, Garzon J, Violi D, Prignoni A et al. Appropriateness and delay to initiate therapy in ventilator-associated pneumonia. *Eur Respir J* 2006 January;27(1):158-64.
- (80) Rinaldo JE, Rogers RM. Adult respiratory-distress syndrome: changing concepts of lung injury and repair. *N Engl J Med* 1982 April 15;306(15):900-9.
- (81) El-Solh AA, Okada M, Pietrantonio C, Aquilina A, Barbary E. Procoagulant and fibrinolytic activity in ventilator-associated pneumonia: impact of inadequate antimicrobial therapy. *Intensive Care Med* 2004 October;30(10):1914-20.
- (82) Angrill J, Agusti C, de Celis R, Filella X, Rano A, Elena M et al. Bronchial inflammation and colonization in patients with clinically stable bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001 November 1;164:1628-32.
- (83) Meduri GU, Kanangat S, Bronze M, Patterson DR, Meduri CU, Pak C et al. Effects of methylprednisolone on intracellular bacterial growth. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001 November;8(6):1156-63.



## **PUBLICACIONES RELACIONADAS**

---





Relacionat amb els treballs que formen la present Tesi Doctoral, s'han publicat també els següents articles;

-Rañó A, Agustí C, Sibila O, Torres A. "Associated inflammatory response in pneumonia. Role of adjunctive therapy with glucocorticoids". *Curr Opin Infect Dis* 2006 Apr; 19(2): 179-84.

-Sibila O, Agustí C, Torres A. "Corticoesteroids in severe pneumonia". *Eur Respir J* 2008 (en prensa)





