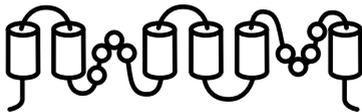


GUSTAVO FABREGAT CID

# EXPRESIÓN DE AQUAPORINAS 1 Y 5 EN EL PULMÓN DE RATAS SOMETIDAS A VENTILACIÓN MECÁNICA:

efectos del volumen corriente y el tiempo de ventilación



DIRECTORES

Dr. JOSÉ GARCÍA DE LA ASUNCIÓN

Dr. BENJAMÍN SARRIÁ CHUST

Dr. ANTONIO ALBEROLA AGUILAR



VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA





VNIVERSITAT  
ID VALÈNCIA

Dr. JOSÉ GARCÍA DE LA ASUNCIÓN, Doctor en Medicina y Médico Especialista de Área del Servicio de Anestesiología y Reanimación. Hospital Clínico Universitario de Valencia.

Dr. BENJAMÍN SARRIÁ CHUST, Profesor titular del Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina y Odontología. Universidad de Valencia.

Dr. ANTONIO ALBEROLA AGUILAR, Profesor titular del Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina y Odontología. Universidad de Valencia.

HACEN CONSTAR que:

El licenciado Gustavo Fabregat Cid, ha realizado en el Servicio de Anestesiología y en los Departamentos de Fisiología y de Farmacia de la Universidad de Valencia bajo nuestra dirección el presente trabajo, titulado “*Expresión de aquaporinas 1 y 5 en el pulmón de ratas sometidas a ventilación mecánica: efectos del volumen corriente y el tiempo de ventilación*”, que constituye la memoria para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Revisado dicho trabajo, quedamos conforme en su presentación y defensa ante el Tribunal correspondiente.

Valencia, a 20 de octubre de 2015.

Dr. José García de la Asunción      Dr. Benjamín Sarriá Chust      Dr. Antonio Alberola Aguilar



# AGRADECIMIENTOS

Quisiera mediante estas líneas expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que de manera más o menos directa han colaborado en la realización del presente trabajo.

Debo agradecer de manera especial a mis directores por aceptarme para realizar esta tesis doctoral bajo su tutela. Su apoyo y confianza en el trabajo y su capacidad para guiar mis ideas han sido de un valor incalculable. Les agradezco también el haberme facilitado los medios suficientes para llevar a cabo todos los experimentos desarrollados a lo largo de esta tesis. En este sentido quiero hacer extensiva mi gratitud a Pedro Santamaría, sin su ayuda en el laboratorio no hubiese sido posible gran parte de este trabajo. Igualmente quiero agradecer a los doctores Manuel Mata y Julio Cortijo su apoyo al facilitar los medios técnicos y humanos para realizar una parte de los experimentos.

Quiero también agradecer a mis padres, Arcadio y María José, y a mi hermano Jorge, su apoyo y cariño incondicional que me han servido para convertirme en lo que soy. Sin ellos nada de esto hubiese sido posible.

Y por encima de todo quiero dar mi más profundo agradecimiento a mi amada compañera de vida, Natalia, y a mis hijos Ariadna, Gonzalo y Paula. A la primera por su amor, paciencia, comprensión y apoyo que me han permitido poder concluir este trabajo de manera exitosa. A los segundos por soportar muchas horas sin la compañía de su papá.

**A todos, muchas gracias.**



<b>5</b>	<b>AGRADECIMIENTOS</b>
<b>11</b>	<b>LISTADO DE ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS</b>
<b>15</b>	<b>LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS</b>
<b>21</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>
<b>21</b>	<b>A) ESTRUCTURA Y FUNCIÓN PULMONAR</b>
<b>23</b>	<b>B) MECÁNICA VENTILATORIA</b>
<b>25</b>	<b>C) INTERCAMBIO GASEOSO</b>
<b>27</b>	<b>D) PATOLOGÍA PULMONAR: SÍNDROME DE DISTRES RESPIRATORIO AGUDO</b>
<b>27</b>	D.1) Generalidades y definición
<b>31</b>	D.2) Epidemiología
<b>32</b>	D.3) Etiología y factores predisponentes
<b>33</b>	D.3.1) Susceptibilidad genética
<b>34</b>	D.4) Pronóstico
<b>35</b>	D.5) Fisiopatología
<b>40</b>	D.5.1) Papel de los neutrófilos en el SDRA
<b>41</b>	D.5.2) El estrés oxidativo como vía de señalización en el ALI / SDRA
<b>42</b>	D.6) Estrategias de tratamiento: el papel de la ventilación mecánica
<b>44</b>	<b>E) LESIÓN PULMONAR INDUCIDA POR VENTILACIÓN MECÁNICA</b>
<b>46</b>	<b>E.1) MECANISMOS DE LESIÓN PULMONAR INDUCIDA POR LA VENTILACION MECÁNICA</b>
<b>46</b>	E.1.1) Daño pulmonar inducido por presión excesiva en la vía aérea (barotrauma) y por sobredistensión pulmonar (volutrauma)
<b>48</b>	E.1.2) Daño pulmonar inducido por liberación de mediadores inflamatorios (biotrauma) y por bajo volumen total (atelectrauma).
<b>51</b>	<b>F) AQUAPORINAS</b>
<b>51</b>	<b>F.1) ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LAS AQUAPORINAS</b>
<b>56</b>	<b>F.2) AQUAPORINAS EN EL PULMÓN</b>
<b>59</b>	<b>F.3) PAPEL DE LAS AQUAPORINAS EN LA LESIÓN PULMONAR INDUCIDA POR VENTILACIÓN MECÁNICA</b>

<b>61</b>	<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>
<b>65</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>
<b>65</b>	<b>1. MODELOS ANIMALES</b>
<b>65</b>	1.1 LESIÓN PULMONAR AGUDA INDUCIDA POR VENTILACIÓN MECÁNICA A VOLÚMENES CORRIENTES ELEVADOS
<b>68</b>	1.2 VENTILACIÓN MECÁNICA PROLONGADA A VOLÚMENES CORRIENTES NO LESIVOS
<b>70</b>	<b>2. MEDICIÓN DEL EDEMA PULMONAR</b>
<b>71</b>	<b>3. MEDICIÓN DE LA PERMEABILIDAD MICROVASCULAR</b>
<b>72</b>	<b>4. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE AQUAPORINAS</b>
<b>72</b>	4.1 WESTERN BLOT
<b>73</b>	4.2 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CON TRANSCRIPTASA INVERSA EN TIEMPO REAL
<b>74</b>	4.3 ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO
<b>75</b>	<b>5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>
<b>77</b>	<b>RESULTADOS</b>
<b>77</b>	<b>1. LESIÓN PULMONAR AGUDA INDUCIDA POR VENTILACIÓN MECÁNICA A VOLÚMENES CORRIENTE ELEVADOS</b>
<b>77</b>	1.1 EDEMA PULMONAR
<b>79</b>	1.2 MECÁNICA VENTILATORIA Y PARÁMETROS HEMODINÁMICOS
<b>83</b>	1.3 PARÁMETROS GASOMÉTRICOS
<b>84</b>	1.4 PERMEABILIDAD MICROVASCULAR
<b>85</b>	1.5 EXPRESIÓN DE AQUAPORINAS 1 Y 5
<b>88</b>	<b>2. VENTILACIÓN MECÁNICA PROLONGADA A VOLÚMENES CORRIENTES NO LESIVOS</b>
<b>88</b>	2.1 EDEMA PULMONAR
<b>89</b>	2.2 MECÁNICA VENTILATORIA Y PARÁMETROS HEMODINÁMICOS
<b>94</b>	2.3 PARÁMETROS GASOMÉTRICOS
<b>95</b>	2.4 PERMEABILIDAD MICROVASCULAR
<b>96</b>	2.5 EXPRESIÓN DE AQUAPORINAS 1 Y 5

<b>103</b>	<b>DISCUSIÓN</b>
<b>103</b>	<b>1. LESIÓN PULMONAR AGUDA INDUCIDA POR VENTILACIÓN MECÁNICA A VOLÚMENES CORRIENTE ELEVADOS</b>
<b>110</b>	<b>2. VENTILACIÓN MECÁNICA PROLONGADA A VOLÚMENES CORRIENTE NO LESIVOS</b>
<b>119</b>	<b>CONCLUSIONES</b>
<b>121</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>
<b>143</b>	<b>ANEXO 1</b>
<b>145</b>	<b>ANEXO 2</b>



# LISTADO DE ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

<b>% agua</b>	Proporción de agua
<b>ABC</b>	Complejo Avidina-Biotina Peroxidasa
<b>ABE</b>	Exceso de Bases
<b>Ala</b>	Alanina
<b>ALI</b>	Acónimo del inglés “Acute Lung Injury”, Lesión Pulmonar Aguda
<b>AMPc</b>	Adenosín Monofosfato Cíclico
<b>ANOVA</b>	Análisis de la Varianza
<b>AQP</b>	Aquaporina
<b>Arg</b>	Arginina
<b>ARN</b>	Ácido Ribonucleico
<b>ARNm</b>	Ácido Ribonucleico Mensajero
<b>Asp</b>	Asparagina
<b>cdNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico Complementario
<b>cmH2O</b>	Centímetros de agua
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de Carbono
<b>COX-2</b>	Ciclooxigenasa 2
<b>CVRS</b>	Calidad de Vida Relacionada con la Salud
<b>DAB</b>	Diaminobenzidina tetrahidroclorhídrica
<b>DARC</b>	“Duffy Antigen Receptor for Chemokines”
<b>DcR3</b>	“Decoy Receptor 3”
<b>FC</b>	Frecuencia cardíaca
<b>FiO<sub>2</sub></b>	Fracción inspirada de Oxígeno
<b>g</b>	Gramos
<b>GSH</b>	Glutation reducido
<b>h</b>	Hora
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Agua Oxigenada
<b>H<sub>3</sub>O<sup>+</sup></b>	Ión hidronio

<b>HgCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de Mercurio
<b>HRQOL</b>	“Health-Related Quality Of Life”
<b>IC</b>	Intervalo de confianza
<b>ICAM-1</b>	“Intercellular Adhesion Molecule 1”
<b>IL</b>	Interleucinas
<b>K<sup>+</sup></b>	Potasio
<b>KDa</b>	KiloDalton
<b>Kg</b>	Kilogramo
<b>l</b>	Litro
<b>lpm</b>	Latidos por minuto
<b>mA</b>	Miliamperio
<b>MAPK</b>	“Mitogen-activated Protein Kinases”
<b>mcg</b>	Microgramos
<b>mg</b>	Miligramos
<b>min</b>	Minuto
<b>MIP26</b>	“Major Intrinsec Protein 26”
<b>ml</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimol
<b>mmHg</b>	Milímetros de Mercurio
<b>mTTP</b>	Presión Transtorácica Máxima
<b>NF-kB</b>	Factor nuclear kappa-B
<b>NIH</b>	“National Institutes of Health”
<b>ng</b>	Nanogramo
<b>nm</b>	Nanometro
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxígeno
<b>°C</b>	Grado centígrado
<b>PAM</b>	Presión Arterial Media
<b>paO<sub>2</sub></b>	Presión parcial de oxígeno en sangre arterial
<b>pCO<sub>2</sub></b>	Presión parcial de dióxido de carbono
<b>pO<sub>2</sub></b>	Presión parcial de oxígeno
<b>PBS</b>	Acrónimo del inglés “Phosphate Buffered Saline”, tampón fosfato salino
<b>PEEP</b>	Acrónimo del inglés “Positive End Espiratory Pressure”, Presión Positiva al Final de la Espiración
<b>PH</b>	Peso Húmedo

<b>PH / PS</b>	Relación entre el peso húmedo y el peso seco
<b>PMN</b>	Neutrófilos Polimorfonucleares
<b>Pro</b>	Prolina
<b>PS</b>	Peso Seco
<b>R</b>	Coefficiente de correlación
<b>R<sub>2</sub></b>	Coefficiente de determinación
<b>RNS</b>	Acrónimo del inglés “Reactive Nitrogen Species”, Especies Reactivas del Nitrógeno
<b>ROS</b>	Acrónimo del inglés “Reactive Oxygen Species”, Especies Reactivas del Oxígeno
<b>rpm</b>	Respiraciones por minuto
<b>RT-PCR</b>	Acrónimo del inglés “Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction”, Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Reversa en Tiempo Real.
<b>s</b>	Segundo
<b>SBF</b>	Suero Bovino Fetal
<b>SD</b>	Desviación Estándar
<b>SDRA</b>	Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo
<b>SPSS</b>	“Statistical Product and Service Solutions”
<b>TNF</b>	Factor de Necrosis Tumoral
<b>TRPV</b>	“Transient Receptor Potential Vanilloid”
<b>VE-cadherin</b>	Cadherina Endotelial Vascular
<b>VGCC</b>	“Voltage-gated Calcium Channel”
<b>VILI</b>	Acrónimo del inglés “Ventilator Induced Lung Injury”, Lesión Pulmonar Inducida por Ventilación Mecánica
<b>VM</b>	Ventilación Mecánica
<b>vs.</b>	Del inglés “versus”, frente a.
<b>WCP</b>	“Water Channel Proteins”



# LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS

## TABLAS

- 29** **Tabla 1.** Tabla resumen de las principales características de las definiciones más relevantes del Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo
- 30** **Tabla 2.** La definición de Berlín del Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo
- 32** **Tabla 3.** Alteraciones clínicas asociadas con la aparición del Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo
- 49** **Tabla 4.** Tabla resumen de los mecanismos implicados en la liberación de mediadores proinflamatorios en los pulmones sometidos a ventilación mecánica
- 53** **Tabla 5.** Tabla resumen de la función y patrón de expresión de las aquaporinas (AQPs)
- 75** **Tabla 6.** Secuencias de los cebadores de la técnica de RT-PCR y condiciones de temperatura
- 83** **Tabla 7.** Resultados de los análisis de los gases arteriales en el Grupo 2 (ventilados a 7 ml/Kg) y en el Grupo 3 (ventilados a 20 ml/Kg) en los animales del modelo de Lesión Pulmonar inducida por Ventilación Mecánica a Volúmenes Corriente Elevados
- 94** **Tabla 8.** Resultados de los análisis de los gases arteriales en el Grupo 2H (ventilados a 10 ml/Kg durante 2 horas) y en el Grupo 4H (ventilados a 10 ml/Kg durante 4 horas)

## FIGURAS

- 22** **Figura 1.** Esquema representativo de las divisiones de las vías respiratorias en el pulmón humano
- 35** **Figura 2.** Eventos en la fisiopatología del ALI y el SDRA
- 39** **Figura 3.** El Alveolo Normal (lado izquierdo) y el Alveolo Lesionado en Fase Aguda (lado derecho) del Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo
- 47** **Figura 4.** Modelo de producción de lesión pulmonar inducida por el respirador (VILI) propuesto por Marini y Gattinoni
- 50** **Figura 5.** Mecanismo propuesto de lesión por atelectrauma
- 52** **Figura 6.** Nomenclatura y clasificación propuesta por Benga de las proteínas intrínsecas de membrana y de las proteínas canal de agua
- 55** **Figura 7.** Modelo de “Reloj de Arena” de las AQPs (vista lateral de uno de los monómeros)
- 55** **Figura 8.** Estructura tetramérica ensamblada de la AQP1 en una membrana
- 55** **Figura 9.** Modelo original de seis hélices transmembrana que atraviesan la bicapa lipídica
- 55** **Figura 10.** Diagrama de cintas de la estructura de un monómero de la AQP1 (vista lateral)
- 57** **Figura 11.** Expresión de aquaporinas (AQP) en el tracto respiratorio humano
- 68** **Figura 12.** Esquema ilustrativo de las acciones llevadas a cabo en las ratas del modelo animal de Lesión Pulmonar Aguda Inducida por Volúmenes Corriente Elevados

**70** **Figura 13.** Esquema ilustrativo de las acciones llevadas a cabo en las ratas del modelo animal de Ventilación Mecánica Prolongada con Volúmenes Corrientes No Lesivos

**78** **Figura 14.** Gráficos que representan el contenido de agua pulmonar de los animales del modelo de Lesión Pulmonar inducida por Ventilación Mecánica a Volúmenes Corriente Elevados

**79** **Figura 15.** Presión inspiratoria pico en los animales del modelo de Lesión Pulmonar inducida por Ventilación Mecánica a Volúmenes Corriente Elevados

**80** **Figura 16.** Compliancia pulmonar en los animales del modelo de Lesión Pulmonar inducida por Ventilación Mecánica a Volúmenes Corriente Elevados

**81** **Figura 17.** Resistencia pulmonar en los animales del modelo de Lesión Pulmonar inducida por Ventilación Mecánica a Volúmenes Corriente Elevados

**82** **Figura 18.** Valores evolutivos de los parámetros hemodinámicos en los animales del modelo de Lesión Pulmonar inducida por Ventilación Mecánica a Volúmenes Corriente Elevados

**84** **Figura 19.** Representación gráfica de la absorbancia en ng/mg de tejido pulmonar del colorante Azul de Evans en los animales del modelo de Lesión Pulmonar Inducida por Ventilación Mecánica a Volúmenes Corriente Elevados

**85** **Figura 20.** Valores de las densitometrías obtenidas de los western blot en los animales del modelo de Ventilación Mecánica a Volúmenes Corriente Elevados

**86** **Figura 21.** Western blot de AQP 1 en el Modelo de Ventilación Mecánica a Volúmenes Corriente Elevados

**86** **Figura 22.** Western blot de AQP 5 en el Modelo de Ventilación Mecánica a Volúmenes Corriente Elevados

- 86** **Figura 23.** Gráfico de dispersión y línea de regresión de las densitometrías obtenidas en el western blot de la AQP 1 en función del volumen corriente medido en ml/kg en los animales del Modelo de Ventilación Mecánica a Volúmenes Corriente Elevados
- 87** **Figura 24.** Representación de la cantidad de ARNm medido por RT-PCR en los animales del modelo de Ventilación Mecánica a Volúmenes Corriente Elevados
- 88** **Figura 25.** Gráfico de dispersión y rectas de regresión de la cantidad de ARNm medido por RT-PCR de la AQP 1 alveolar y de la AQP 5 alveolar y bronquial en función del volumen corriente medido en ml/kg en los animales del modelo de Ventilación Mecánica a Volúmenes Corriente Elevados
- 89** **Figura 26.** Gráficos que representan el contenido de agua pulmonar de los animales del modelo de Ventilación Mecánica Prolongada a Volúmenes Corriente No Lesivos
- 90** **Figura 27.** Presión inspiratoria pico en los animales del modelo de Ventilación Mecánica Prolongada a Volúmenes Corriente No Lesivos
- 91** **Figura 28.** Compliancia pulmonar en los animales del modelo de Ventilación Mecánica Prolongada a Volúmenes Corriente No Lesivos
- 92** **Figura 29.** Resistencia pulmonar en los animales del modelo de Ventilación Mecánica Prolongada a Volúmenes Corriente No Lesivos
- 93** **Figura 30.** Valores evolutivos de los parámetros hemodinámicos en los animales del modelo de Ventilación Mecánica Prolongada a Volúmenes Corriente No Lesivos
- 95** **Figura 31.** Representación gráfica de la absorbancia en ng/mg de tejido pulmonar del colorante Azul de Evans en los animales del modelo de Ventilación Mecánica Prolongada a Volúmenes Corriente No Lesivos
- 96** **Figura 32.** Valores de las densitometrías obtenidas de los western blot en los animales del modelo de Ventilación Mecánica Prolongada a Volúmenes Corriente No Lesivos

**97 Figura 33.** Western blot de AQP1 citosólica y de membrana en el modelo de Ventilación Mecánica Prolongada a Volúmenes Corriente No Lesivos

**97 Figura 34.** Western blot de AQP 5 citosólica y de membrana en el modelo de Ventilación Mecánica Prolongada a Volúmenes Corriente No Lesivos

**98 Figura 35.** Gráfico de dispersión y líneas de regresión de las densitometrías obtenidas en el western blot de la AQP 5 de membrana y citosólica en función del tiempo en los animales del modelo de Ventilación Mecánica Prolongada a Volúmenes Corriente No Lesivos

**99 Figura 36.** Representación de la cantidad de ARNm medido por RT-PCR en los animales del modelo de Ventilación Mecánica Prolongada a Volúmenes Corriente No Lesivos

**99 Figura 37.** Gráfico de dispersión y rectas de regresión de la cantidad de ARNm medido por RT-PCR de la AQP 1 y AQP 5 alveolares en función del tiempo de ventilación mecánica en los animales del modelo de Ventilación Mecánica Prolongada a Volúmenes Corriente No Lesivos

**100 Figura 38.** Inmunohistoquímica de la AQP 5 en los animales del modelo de Ventilación Mecánica Prolongada a Volúmenes Corrientes No Lesivos

**101 Figura 39.** Inmunohistoquímica de la AQP 1 en los animales del modelo de Ventilación Mecánica Prolongada a Volúmenes Corrientes No Lesivos

**108 Figura 40.** Gráfico de dispersión y línea de tendencia de la variación del valor del cociente PH / PS en relación con el volumen corriente expresado en ml/Kg

**113 Figura 41.** Gráfico de dispersión y línea de tendencia de la variación de la compliancia pulmonar en relación con la presión inspiratoria pico en los animales pertenecientes al Grupo 4H

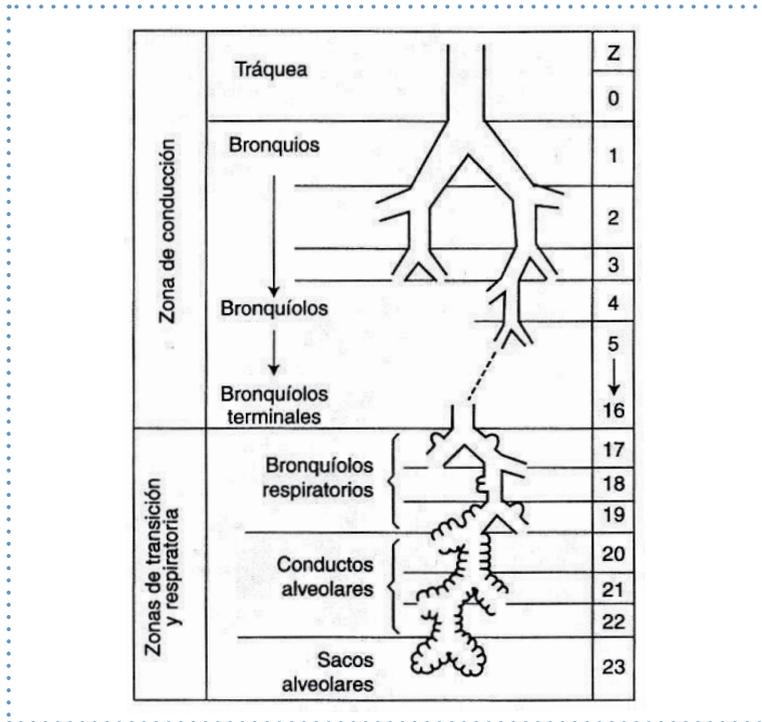


# INTRODUCCIÓN

## A) ESTRUCTURA Y FUNCIÓN PULMONAR

La mayoría de los procesos metabólicos que se llevan a cabo en el cuerpo humano requieren la presencia de oxígeno generando en el proceso dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) como producto de desecho que deberá ser eliminado del organismo. La función principal de los pulmones es la de llevar a cabo el intercambio gaseoso necesario para suministrar oxígeno a la sangre y eliminar el dióxido de carbono. Durante la ventilación, el aire entra en los pulmones permitiendo que en estos se produzcan el paso de oxígeno a la sangre y del dióxido de carbono a la atmósfera. Este proceso imprescindible para la vida se puede afectar por determinadas patologías que afectan a los pulmones.

Para llevar el aire hasta los alveolos desde la nariz y la boca son necesarias las vías respiratorias. Estas consisten en una serie de tubos ramificados que se estrechan progresivamente. Desde la tráquea se producen sucesivas divisiones de las vías respiratorias (bronquios principales, lobares, segmentarios...) hasta llegar a los bronquiolos terminales. Estas 16 primeras generaciones de las vías respiratorias, que no intervienen en el intercambio gaseoso, tienen como función llevar el aire hasta las regiones donde se produce este; se denominan **vías aéreas de conducción** y constituyen el **espacio muerto anatómico**, el cuál representa un volumen de aproximadamente 150 ml. La división de los bronquiolos terminales da lugar a los bronquiolos respiratorios, los cuales dan lugar a los conductos alveolares que ya están revestidos de alveolos. A estas 7 últimas generaciones de vías respiratorias donde sí se produce intercambio gaseoso se le denomina **zona respiratoria (Figura 1)**. Esta constituye la mayor parte del pulmón y su volumen es de aproximadamente 3 litros (West JB et al. 2009).



**Figura 1.** Esquema representativo de las divisiones de las vías respiratorias en el pulmón humano. Las primeras 16 generaciones conforman las vías respiratorias de conducción y las últimas 7 corresponden a la zona respiratoria. (West JB. 2009)

Son las particulares características anatómicas del pulmón las que le permiten llevar a cabo este intercambio, el cual se produce en la denominada interfase hemato-gaseosa. En esta, tanto el oxígeno como el dióxido de carbono se movilizan por difusión simple entre el aire y la sangre siguiendo gradientes de concentración y presión. Los fenómenos de difusión de los gases a través de una lámina de tejido son, según establece la **Ley de Fick**, directamente proporcionales a la superficie de la lámina e inversamente proporcionales a su espesor. Esta interfase tiene una superficie de 50 a 100 m<sup>2</sup> y además es extremadamente delgada por lo que su estructura morfológica es muy adecuada para el intercambio gaseoso. Esta superficie tan extensa se consigue mediante la división en millones de pequeños sacos aéreos (denominados alveolos) y que están envueltos en un entramado de pequeños capilares sanguíneos.

La superficie alveolar está recubierta por 2 tipos de células epiteliales alveolares, las llamadas células alveolares tipo I y tipo II (o neumocitos tipo I y tipo II), siendo las células alveolares tipo II más numerosas que las tipo I. Las células alveolares tipo I cubren el 90% de la superficie alveolar debido a su estructura larga y aplanada, y son las encargadas de realizar el intercambio gaseoso. Las células alveolares tipo II se caracterizan por sintetizar y secretar surfactante pulmonar, formado por una gran proporción de fosfolípidos (85%) y por proteínas (15%). El surfactante disminuye la tensión superficial del líquido que recubre el alveolo, incrementando su estabilidad y evitando el colapso de la superficie alveolar (Serrano-Mollar A. 2012). Además de los neumocitos tipo I y II, en el alveolo existen algunos macrófagos que sirven, entre otras cosas, de primera línea de defensa frente a patógenos externos (West JB. 2009).

## **B) MECÁNICA VENTILATORIA**

El término *ventilación pulmonar* hace referencia al proceso físico por el que un determinado volumen de aire entra y sale de los pulmones en cada ciclo respiratorio. Para que el aire fluya dentro de los pulmones es necesario que la presión dentro de los alveolos sea más baja que la presión atmosférica. Siguiendo la Ley de Boyle, la presión dentro de un compartimento cerrado es inversamente proporcional al volumen del recipiente (Tortora GJ y Derrickson B. 2006). Durante la inspiración, el volumen de la cavidad torácica aumenta con la contracción del diafragma y la de los músculos intercostales, produciendo un descenso del diafragma y un ascenso de las costillas y como consecuencia un aumento del área de sección transversal del tórax (West JB. 2009). Este aumento de volumen de la cavidad torácica se traduce también en un aumento del volumen en los pulmones gracias a la presencia de las pleuras parietal y visceral y al fino espacio entre ellas, el espacio interpleural. Este espacio, dada la tendencia natural de la pared torácica a expandirse y del pulmón a colapsarse, tiene una ligera presión negativa o subatmosférica (presión intrapleural o intratorácica) (West JB. 2009). Así, a medida que la cavidad torácica se expande, la pleura parietal que tapiza la cavidad al completo es llevada hacia fuera en todas las direcciones y la pleural visceral y los pulmones, son arrastrados con ella (Tortora GJ y Derrickson B. 2006). Al aumentar el volumen de los pulmones, la presión en el interior de estos, llamada presión alveolar o intrapulmonar, disminuye por debajo de la

presión atmosférica, estableciéndose de este modo un gradiente de presiones entre el alveolo y la atmósfera que ocasiona el flujo de aire desde la zona de más presión a la de menos presión. Puesto que la inspiración requiere de la contracción muscular de los músculos respiratorios, se dice que el proceso de la inspiración es un proceso activo (Tortora GJ y Derrickson B. 2006).

La salida del aire de los pulmones también se debe a una diferencia de presiones, pero en este caso el gradiente es en dirección opuesta. Este proceso, a diferencia del anterior, es un proceso pasivo porque no involucra a ninguna contracción muscular cuando se moviliza el volumen corriente. La espiración se produce principalmente por la retracción elástica de los pulmones, que como ya hemos mencionado anteriormente tienen una tendencia natural a retraerse. Dos fuerzas contribuyen principalmente a esta retracción: 1) el retroceso de las fibras elásticas del tejido pulmonar y 2) la tracción de la tensión superficial ejercida por la capa del líquido alveolar. El proceso comienza cuando se produce la relajación de los músculos inspiratorios, produciéndose una disminución de los diámetros de la caja torácica y por consiguiente de su volumen. Se produce así el flujo de aire de los alveolos a la atmósfera (Tortora GJ y Derrickson B. 2006).

Por lo tanto mecánicamente, el sistema respiratorio puede concebirse como un conjunto formado por un **componente elástico**, constituido por el tejido pulmonar y la pared torácica, y un **componente resistivo**, constituido por las vías aéreas. Así el trabajo ventilatorio se puede afectar por dos factores principales: la **resistencia** al flujo que ofrecen las vías aéreas y la **distensibilidad** del tejido pulmonar. A la suma de ambos componentes se le conoce como **impedancia** del sistema respiratorio. (Belda FJ y Llorens J. 2009).

La **distensibilidad pulmonar**, conocida comúnmente como **compliance**, hace referencia a la capacidad que tiene el pulmón como cuerpo elástico de aumentar su volumen por encima de su volumen de reposo. Se define básicamente como el cambio de volumen pulmonar por cada cambio de unidad de presión (Belda FJ y Llorens J. 2009). La distensibilidad pulmonar se relaciona principalmente con dos factores: la elasticidad y la tensión superficial alveolar (Tortora GJ y Derrickson B. 2006). Los pulmones normalmente presentan una alta distensibilidad dado que las

fibras elásticas que componen su estructura se estiran con facilidad y el surfactante del líquido alveolar reduce la tensión superficial. La distensibilidad puede estar disminuida en trastornos del pulmón que modifican o lesionan su arquitectura (p.ej. fibrosis pulmonar, enfisema, edema de pulmón, ...etc.) o cuando se altera la capa del surfactante y se pierde la tensión superficial (p.ej. Síndrome de Distrés Respiratorio) (Tortora GJ y Derrickson B. 2006).

Las paredes de las vías aéreas, especialmente las de los bronquiolos, son las que ofrecen una mayor **resistencia** al flujo normal de aire en los pulmones; en cambio, las vías aéreas de mayor calibre ofrecen una resistencia menor. El diámetro de las vías aéreas puede ser regulado por la contracción o relajación del músculo liso de la pared de las vías aéreas. La velocidad de flujo a través de las vías aéreas dependerá tanto de la resistencia como de la diferencia de presión entre los alveolos y la atmósfera. Cualquier situación que estreche u obstruya las vías aéreas (p.ej. asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica,...etc.) provocará un aumento de la resistencia, requiriéndose una mayor diferencia de presión para mantener la misma velocidad del flujo aéreo (Tortora GJ y Derrickson B. 2006).

## C) INTERCAMBIO GASEOSO

El recambio de gases de la sangre se produce porque los alveolos son ventilados y a la vez perfundidos a través de los capilares alveolares (Belda FJ y Llorens J. 2009). El intercambio de oxígeno y dióxido de carbono entre el sistema alveolar y la sangre pulmonar se produce por difusión pasiva, la cual es gobernada por el comportamiento de los gases siguiendo las **leyes de Dalton y Henry**.

Según establece la **Ley de Dalton**, en una mezcla de gases, cada gas ejerce una presión como si ningún otro gas estuviera presente. A esta presión específica de cada gas se le denomina presión parcial. La presión parcial de toda la mezcla se calcula mediante de la suma de las diferentes presiones parciales. Son las diferentes presiones parciales las que determinan el desplazamiento del  $O_2$  y el  $CO_2$  entre la atmósfera y los pulmones, entre los pulmones y la sangre y entre la sangre y las células del organismo, difundiendo a través de las membranas desde el área de mayor pre-

sión parcial hasta la de menor presión parcial; a mayor diferencia de presión, mayor será la tasa de difusión (Tortora GJ y Derrickson B. 2006).

La segunda ley (**Ley de Henry**) establece que la cantidad de gas que se disuelve en un líquido es proporcional a su solubilidad y a su presión parcial. Así el nitrógeno se disuelve muy poco en el plasma a presión atmosférica debido a que tiene una solubilidad muy baja. El CO<sub>2</sub>, en comparación con el O<sub>2</sub> se disuelve mucho más rápido en el plasma sanguíneo, puesto que su solubilidad es del orden de 24 veces mayor (Tortora GJ y Derrickson B. 2006).

El índice o **tasa de intercambio gaseoso** dependerá, por lo tanto, de varios factores: (Tortora GJ y Derrickson B. 2006; West JB. 2009)

- a. de la presión parcial de los gases (**ley de Dalton**),
- b. de la solubilidad de los gases (**ley de Henry**),
- c. de la superficie disponible para el intercambio gaseoso; la superficie alveolar es muy grande y muchos capilares rodean cada alveolo, facilitando el intercambio gaseoso (**ley de Fick**),
- d. y de la distancia de difusión; la membrana respiratoria es muy fina y la difusión se produce de forma rápida (**ley de Fick**).

Este proceso de intercambio gaseoso, por otra parte imprescindible para la vida, se puede afectar por diferentes patologías que afectan a los pulmones entre las que encontramos el Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo.

## D) PATOLOGÍA PULMONAR: SÍNDROME DE DISTRES RESPIRATORIO AGUDO

### D.1) Generalidades y definición

El Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo (SDRA) es una afectación pulmonar grave caracterizada clínicamente por ser aguda, asociar disnea y taquipnea severa y presentar hipoxemia refractaria que requiere en la mayoría de los casos el uso de medidas de soporte respiratorio como la ventilación mecánica (VM).

Posiblemente la primera descripción de esta patología la publicó **René Théophile Hyacinthe Laënnec** en 1821 en su *“Tratado de Enfermedades del Tórax”*. En él se describe la anatomía patológica macroscópica de un síndrome caracterizado por la aparición de *“anasarca idiopática del pulmón”*, definida esta como la presencia de edema pulmonar en ausencia de insuficiencia cardiaca.

A lo largo de la historia este síndrome ha sido identificado recibiendo distintas denominaciones, ya en la guerra civil americana se describe un síndrome similar denominado *“doble neumonía”*, en la primera guerra mundial es descrito como el *“colapso pulmonar postraumático”*, pasando a modificarse esta denominación a *“pulmón húmedo postraumático”* en la segunda guerra mundial y *“pulmón de shock”* en la guerra de Corea. Posteriormente, en la guerra de Vietnam se describe como el *“pulmón Da Nang”*, localidad vietnamita donde estaba situado un centro médico para los combatientes. Una forma más precisa de denominarlo y que surgió también de la guerra de Vietnam fue *“pulmón del ventilador”*, por la creencia de que en la etiología del daño pulmonar se hallaba el tratamiento de soporte con ventilación mecánica.

Sin embargo hay que esperar hasta finales de los años 60 para encontrar la que actualmente se considera como primera descripción del SDRA. En 1967 Ashbaugh y sus colaboradores (Ashbaugh DG et al. 1967), en un artículo publicado en Lancet, describen una serie de 12 pacientes que presentan un cuadro clínico caracterizado por *“disnea severa, cianosis refractaria a oxigenoterapia, compliancia pulmonar disminuida e infiltrados alveolares difusos en la radiografía de tórax”*; otros

hallazgos eran la presencia de **“atelectasias, congestión vascular, edema pulmonar y membranas hialinas en la autopsia”**, todo ello asociado inicialmente a patologías tan diferentes como sepsis, traumas o broncoaspiración. La similitud del síndrome con el pulmón de shock y el Síndrome de Distrés Respiratorio del Recién Nacido le valieron su nombre inicial de síndrome de **“Distrés Respiratorio del Adulto”**, en la actualidad **“Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo”**, dado que esta entidad puede ocurrir tanto en adultos como en niños.

Ya que la definición inicial carecía de criterios específicos que se pudiesen usar para detectar a los pacientes con este cuadro de manera sistemática, se generó mucha controversia acerca de su verdadera incidencia, historia natural y tasas de mortalidad de este síndrome. No fue hasta 1988 cuando se propuso una definición más precisa del cuadro en la que se cuantificaba la alteración respiratoria respecto a la homeostasis fisiológica normal; se propuso una escala de cuatro puntos en los que se medía:

la cantidad de Presión Positiva Espiratoria al Final de la Espiración (PEEP, acrónimo del inglés **“Positive End-Expiratory Pressure”**),

- la relación entre la presión parcial de oxígeno en sangre arterial ( $paO_2$ ) en relación a la fracción de oxígeno inspirado ( $FiO_2$ ),
- la compliancia estática del pulmón y
- la cantidad de infiltrados evidentes en la radiografía de tórax (Murray JF et al. 1988).

Aunque este sistema se usó ampliamente a nivel clínico y de investigación, el no poder emplearse durante las primeras 72 horas tras la aparición del síndrome limitó su uso clínico. Sólo cuando se usaba entre los días cuarto a séptimo podía ser un buen predictor de un curso complicado con necesidad de ventilación mecánica durante tiempo prolongado (Heffner JE et al. 1995).

En 1994, la Conferencia de Consenso Europeo-Americana (Bernard GR et al. 1994), reconoció que la gravedad de la afectación pulmonar era variable. Así definió el daño pulmonar agudo (“*Acute Lung Injury*” y su acrónimo ALI), para pacientes con hipoxemia menos severa (definida por la una relación  $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2 \leq 300$ ), dejando el SDRA para pacientes con hipoxemia más grave (definida por una relación  $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2 < 200$ ). Esta nueva definición aportó simplicidad de uso a nivel clínico y recuperó en los criterios diagnósticos la presencia en la radiografía de tórax de infiltrados compatibles con edema pulmonar (*tabla 1*). Como contrapartida, el criterio radiológico mostró una gran variabilidad entre observadores cuando se aplica por expertos en el campo de la ventilación mecánica y el SDRA (Rubinfeld GD et al. 1999). Esta diversidad sería la causa de las diferencias observadas en las poblaciones de pacientes con ALI y/o SDRA en diferentes trabajos, lo que podría dar lugar a que fuera difícil para los médicos aplicar los resultados de los estudios clínicos a sus pacientes. A pesar de eso muchos expertos recomiendan el uso de estas definiciones para poder comparar los pacientes que se incluyen en diferentes estudios clínicos (Ware LB y Matthay MA. 2000).

REFERENCIA	AÑO	DEFINICIÓN O CRITERIOS	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Ashbaugh et al.	1971	Disnea severa, taquipnea  Cianosis refractaria a la oxigenoterapia Disminución de la distensibilidad pulmonar Infiltrados alveolares difusos en la radiografía de tórax Atelectasia, congestión vascular, hemorragia, edema pulmonar y membranas hialinas en la autopsia	Primera descripción  Resume bien características clínicas	Carece de criterios específicos para identificar a los pacientes de manera sistemática
Murray et al.	1988	Presencia de lesión pulmonar preexistente directa o indirecta Lesión pulmonar leve a moderada o grave  Presencia de disfunción de órganos no pulmonares	Incluye un sistema de puntuación de 4 puntos de la lesión pulmonar Especifica la causa clínica de la lesión pulmonar  Tiene en consideración la presencia o ausencia de enfermedad sistémica	El Score de puntuación daño pulmonar no predice los resultados Carece de criterios específicos para excluir el diagnóstico de edema pulmonar cardiogénico
Bernard et al.	1994	Inicio agudo  Infiltrados bilaterales en la radiografía de tórax  Presión de enclavamiento de arteria pulmonar <18 mm Hg. o la ausencia de evidencia clínica de hipertensión en aurícula izquierda  Se considera Lesión Pulmonar Aguda si $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2$ es < 300 Se considera Síndrome de Distres Respiratorio agudo si $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2$ es <200	Simple, fácil de usar, especialmente en los ensayos clínicos  Reconoce el espectro clínico de la enfermedad	No especifica la causa  No considera la presencia o ausencia de disfunción multiorgánica  Los hallazgos radiológicos no son específicos

**Tabla 1.** Tabla resumen de las principales características de las definiciones más relevantes del Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo.

$\text{PaO}_2$  = presión arterial de oxígeno,  $\text{FIO}_2$  = Fracción inspirada de oxígeno. Modificado de Ware y Matthay (Ware and Matthay, 2000)

Recientemente algunas de las limitaciones de la definición clásica se han intentado subsanar. La “**Definición de Berlín**” elimina el término ALI, y en su lugar distingue entre subgrupos mutuamente excluyentes de pacientes con SDRA. Se clasifican a los enfermos en tres categorías, basándose en el grado de hipoxemia según la relación  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ : pacientes con SDRA leve ( $300 > \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 > 200$ ), moderado ( $200 > \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 > 100$ ) y severo ( $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 100$ ). Las principales características de esta nueva definición se resumen en la **Tabla 2**. En comparación con la definición de la Conferencia de Consenso Europeo-Americana, la última definición de Berlín tiene mejor validez como predictor de la mortalidad (ARDS Definition Task Force. 2012).

<b>SINDROME DE DISTRES RESPIRATORIO AGUDO</b>	
<b>INICIO</b>	Dentro de la primera semana después un insulto clínico conocido o aparición de nuevos síntomas respiratorios o empeoramiento de los mismos
<b>RADIOLOGÍA DE TÓRAX<sup>a</sup></b>	Opacidades bilaterales, no explicadas completamente por derrames, colapso lobular o pulmonar, o nódulos
<b>ORIGEN DEL EDEMA</b>	Insuficiencia respiratoria no explicada completamente por insuficiencia cardíaca o sobrecarga de líquidos Es necesaria una evaluación objetiva (por ejemplo, ecocardiografía) para excluir edema hidrostático si no está presente ningún factor de riesgo
<b>OXIGENACIÓN<sup>b</sup></b>	
<b>LEVE</b>	$200 \text{ mm de Hg} < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300 \text{ mm de Hg}$ con PEEP o CPAP $\geq 5 \text{ cm H}_2\text{O}$ <sup>c</sup>
<b>MODERADA</b>	$100 \text{ mm de Hg} < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200 \text{ mm de Hg}$ con PEEP $\geq 5 \text{ cm H}_2\text{O}$
<b>SEVERA</b>	$\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 100 \text{ mmHg}$ con PEEP $\geq 5 \text{ cmH}_2\text{O}$

**Tabla 2.** La definición de Berlín del Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo.

$\text{PaO}_2$  = presión arterial de oxígeno,  $\text{FiO}_2$  = Fracción inspirada de oxígeno, CPAP = Acrónimo inglés de Presión Positiva Continua en la vía Aérea, PEEP = Acrónimo inglés de Presión Positiva al Final de la Espiración

- Incluye radiografía de tórax o tomografía computerizada.
- Si la altitud es superior a 1.000 m, el factor de corrección se calculará de la siguiente manera:  $[\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \times (\text{presión barométrica} / 760)]$ .
- Esto puede ser administrado de forma no invasiva en el grupo de paciente con Síndrome de Distres Respiratorio Agudo leve.

Modificado de The ARDS Definition Task Force (ARDS Definition Task Force. JAMA 2012)

## **D.2) Epidemiología**

Durante años el conocimiento de la incidencia real del SDRA y ALI ha sido dificultosa debido, sobre todo y entre otros factores, a la falta de criterios unificados para definir al síndrome como un proceso patológico que solo se corrigió a partir de 1994 con el consenso de unos criterios descriptivos por la Conferencia Europea-Americana. Una primera aproximación del “**National Institutes of Health**” (NIH) en el año 1977 estimó una incidencia anual en Estados Unidos de 75 casos por cada 100.000 habitantes (No authors listed. 1977). Trabajos posteriores han estimado incidencias inferiores que rondan entre los 1,5 y 8,5 casos por cada 100.000 habitantes (Villar J y Slutsky AS. 1989; Webster NR et al. 1988, Thomsen GE y Morris AH. 1995). El inconveniente para el cálculo de la incidencia del SDRA y el ALI es que en los primeros trabajos se valoraban criterios poco homogéneos y no unificados por lo que el conocimiento y la inclusión de estos pacientes ha sido dificultosa. Una de las primeras referencias que utilizó los criterios de 1994 fue la de Luhr et al. en 1999, que encontraron una incidencia de 17.9 casos para ALI y de 13.5 casos para SDRA por cada 100.000 habitantes y año (Luhr et al. 1999). Recientemente un grupo de investigadores islandeses encontró una incidencia estandarizada por edad de SDRA durante un período de 12 años (entre 1988 y 2010) de 7,2 casos por cada 100.000 personas y año (Sigurdsson MI et al. 2013).

### D.3) Etiología y factores predisponentes

La aparición del SDRA se asocia a una gran variedad de factores predisponentes y cuadros clínicos coexistentes que actúan sobre un individuo con predisposición para desarrollar dicha patología (de Haro C et al. 2013). Las entidades nosológicas relacionadas pueden agruparse groseramente en dos categorías:

- e. las asociadas con **lesión directa** del pulmón
- f. las que causan **lesión indirecta** del pulmón en el contexto de un proceso sistémico.

Entre aquellas que desarrollan SDRA asociada a la lesión pulmonar directa encontramos la neumonía, la aspiración de contenido gástrico, la contusión pulmonar, la embolia grasa, el casi-ahogamiento y el edema secundario a reperfusión (p.ej. en trasplante pulmonar).

Entre las entidades que causan lesión pulmonar a distancia encontramos la sepsis, la politransfusión y los politraumatismos, la cirugía cardíaca con circulación extracorpórea y la pancreatitis aguda entre otras (**tabla 3**) (Ware LB y Matthay MA. 2000).

<b>LESIÓN PULMONAR DIRECTA</b>	<b>LESIÓN PULMONAR INDIRECTA</b>
<b>Causas comunes</b>	<b>Causas comunes</b>
Neumonía	Sepsis
Aspiración de contenido gástrico	Trauma grave con shock y politransfusión
<b>Causas menos comunes</b>	<b>Causas menos comunes</b>
Contusión pulmonar	Circulación extracorpórea
Embolia grasa	Sobredosis de drogas
Casi-ahogamiento	Pancreatitis aguda
Lesiones por inhalación	Transfusión de productos sanguíneos
Edema pulmonar por reperfusión después del trasplante de pulmón o embolectomía pulmonar	

**Tabla 3.** Alteraciones clínicas asociadas con la aparición del Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo.

Modificado de Ware y Matthay (Ware and Matthay. 2000)

En conjunto, la sepsis es la patología que se asocia con mayor riesgo de desarrollo de ALI o SDRA, llegando hasta aproximadamente el 40% (Hudson LD et al. 1995). A mayor número de factores predisponentes mayor riesgo (Pepe PE et al. 1982); de modo similar la concomitancia de otros factores secundarios como son las enfermedades pulmonares crónicas o el enolismo crónico (Hudson LD et al. 1995) aumentan también el riesgo de desarrollar ALI y SDRA de manera significativa.

### ***D.3.1) Susceptibilidad genética***

La identificación, en recientes estudios, de variantes en determinados genes ha mejorado nuestra comprensión de las vías específicas implicadas en la manifestación del ALI y el SDRA (Gao L y Barnes KC. 2009). Entre ellos se encuentran variantes en genes que regulan la inflamación, las vías de la coagulación, la función endotelial, la generación de radicales libres y la apoptosis, procesos todos ellos involucrados en el daño y la reparación del pulmón (Matthay MA et al. 2012). Por ejemplo, variantes genéticas en la vía Fas (moduladora de la apoptosis y la inflamación) se han asociado con una susceptibilidad mayor para el desarrollo de lesión pulmonar aguda (Glavan BJ et al. 2011). Un estudio de genes candidatos identificó un polimorfismo funcional en la región promotora gen DARC (acrónimo de ***“Duffy Antigen Receptor for Chemokines”***) que se asoció con un aumento del 17% en la mortalidad a 60 días en los pacientes afroamericanos con SDRA (Kangelaris KN et al. 2012). Uno de los trabajos más significativos en este campo es una revisión de la literatura llevada a cabo por Grigoryev y colaboradores (2004) en la que se identificaron hasta 33 genes relacionados con la patogénesis del ALI/SDRA (Grigoryev DN et al. 2004). Sin embargo, en la actualidad, no podemos identificar un único gen o responsable de una mayor susceptibilidad a desarrollar SDRA.

El conocer los factores predisponentes y detectar de manera precoz a los pacientes en riesgo de desarrollar esta patología es fundamental para prevenir la aparición del ALI y el SDRA.

#### **D.4) Pronóstico**

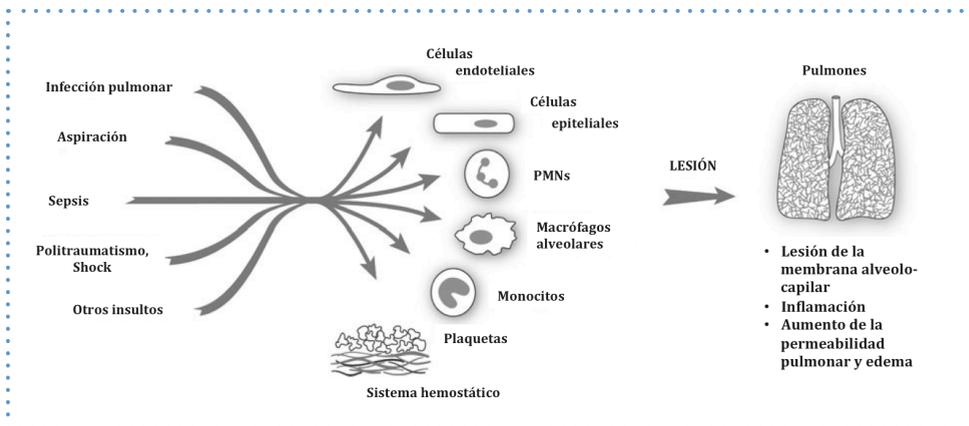
El SDRA y ALI tiene una elevada mortalidad, que oscila entre el 40 y el 60% dependiendo de las series estudiadas (Zilberberg MD y Epstein SK. 1998; Suchyta MR et al. 1992; Milberg JA et al. 1995). Aunque la mayoría de los fallecimientos son atribuibles a la presencia de sepsis o disfunción multiorgánica en vez de a causas respiratorias puras (Zilberberg MD y Epstein SK. 1998) la mejoría de la mortalidad que se ha observado en los pacientes sometidos a determinadas estrategias de ventilación mecánica con volúmenes corrientes bajos sugiere que en determinados casos la mortalidad podría ser atribuida directamente a la lesión pulmonar (Ware LB y Matthay MA. 2000). Los trabajos más recientes indican una reducción de las tasas generales de mortalidad asociadas al SDRA / ALI de aproximadamente el 1,1% por año (Zambon M y Vincent JL. 2008). Entre los factores asociados a esta disminución se incluirían tratamientos más efectivos contra la sepsis, mejoras en las terapias de soporte en los pacientes críticos y cambios en las estrategias de ventilación mecánica (Ware LB y Matthay MA. 2000).

Existen una serie de factores que pueden usarse para predecir la mortalidad en el momento del diagnóstico de ALI o SDRA. Entre ellos encontramos las enfermedades hepáticas crónicas, la presencia de disfunción orgánica concomitante, la sepsis y la edad avanzada (Zilberberg MD y Epstein SK. 1998). Sorprendentemente, los índices iniciales de oxigenación como p.ej. la relación  $pO_2 / FiO_2$  o el “*Lung-Injury Score*” no sirvieron como predictores de mortalidad (Ware LB y Matthay MA. 2000), encontrándose cifras de mortalidad similares entre pacientes con relaciones  $pO_2 / FiO_2$  menores o iguales a 300 y aquellos con cifras inferiores a 200 (Zilberberg MD y Epstein SK. 1998). La falta de mejoría de la función pulmonar a lo largo de la primera semana de tratamiento si se asocia a un peor pronóstico (Heffner JE et al. 1995).

En los pacientes que sobreviven la recuperación normal de la función pulmonar tarda en torno a 6-12 meses, variando en función de la gravedad del cuadro (McHugh LG et al. 1994). Los supervivientes del SDRA sufren sintomatología respiratoria considerable y presentan además una disminución de la Calidad de Vida Relacionada con la Salud (CVRS o HRQOL, acrónimo inglés de “*Health-Related Quality Of Life*”) que aún prevalece 12 meses después de la aparición de la lesión (Heyland DK et al. 2005).

## D.5) Fisiopatología

Los esfuerzos por entender la fisiopatología subyacente en el SDRA han sido intensos y siguen siendo una prioridad para los Sistemas Nacionales de Salud (Matthay MA et al. 2005). Congestión, atelectasias y edema pulmonar eran algunas de las características con las que inicialmente se describió este síndrome (Ashbaugh DG et al. 1967). Posteriormente numerosos trabajos a nivel experimental y clínico establecieron el concepto de que el principal mecanismo fisiopatológico subyacente en los estadios iniciales del SDRA era un edema rico en proteínas ocasionado por un aumento de la permeabilidad microvascular pulmonar (**Figura 2**) (Matthay MA et al. 2012). Actualmente hay un mayor conocimiento de los mecanismos moleculares subyacentes y también de la presencia de factores ambientales y genéticos implicados en la fisiopatología del SDRA. De manera general, el ALI / SDRA se caracteriza por una agresión inicial que desencadena una respuesta celular y la liberación de una cascada de mediadores.



**Figura 2.** Eventos en la fisiopatología del ALI y el SDRA. Una variedad de insultos clínicos directos o indirectos pueden ocasionar Lesión Pulmonar Aguda. En las primeras descripciones el edema pulmonar era la consecuencia más importante. Posteriormente se obtuvieron evidencias de la aparición de lesión inflamatoria como mecanismo patogénico principal.

Modificado de Matthay y Zimmerman. (Matthay and Zimmerman. 2005)

La membrana alveolo-capilar está formada por dos barreras independientes, el endotelio microvascular y el epitelio alveolar. El **daño endotelial** que existe en la **fase aguda o exudativa** del SDRA se caracteriza por un trasiego de fluido rico en proteínas hacia el espacio alveolar que ocurre como consecuencia de un aumento en la permeabilidad de la membrana alveolo-capilar. (**Figura 3**) (Ware LB y Matthay MA. 2000, Pugin J et al. 1999). Este aumento de la permeabilidad es la que condiciona la aparición del edema pulmonar. Además se produce la precipitación de proteínas del plasma y otros detritus celulares en el espacio alveolar dando lugar a la formación de las características membranas hialinas (Castillo RL et al. 2015). Diversos sistemas moleculares y mediadores contribuyen al aumento de la permeabilidad endotelial y del epitelio alveolar (Matthay MA et al. 2012). La cadherina endotelial vascular (VE-cadherin), una proteína de unión celular, es fundamental para mantener la integridad de la barrera endotelial en la microvasculatura pulmonar (Vestweber D et al. 2009); anticuerpos anti VE-cadherin u otros factores desestabilizantes de esta como el factor de necrosis tumoral (TNF) o la trombina rompen las uniones de la VE-cadherin induciendo la formación del edema pulmonar (Schulte D et al. 2011).

La superficie del alveolo normal, como ya se expuso con anterioridad, está tapizada principalmente de dos tipos celulares diferentes: los neumocitos tipo I, de morfología aplanada y que tapizan aproximadamente el 90% de la superficie alveolar los neumocitos tipo I, de morfología aplanada y que tapizan aproximadamente el 90% de la superficie alveolar (aunque sólo constituyen el 20% de la población celular), y los neumocitos tipo II (suman aproximadamente el 80% de las células alveolares), de morfología cuboidal y que cubren aproximadamente el 10% restante de la superficie. Entre las funciones de estos últimos están la producción del surfactante, el transporte de iones y la proliferación y posterior diferenciación hacia neumocitos tipo I cuando estos se lesionan. En el SDRA se produce una **lesión epitelial** y la consiguiente pérdida de integridad del mismo y esto acarrea una serie de consecuencias. En condiciones normales el epitelio alveolar es mucho menos permeable que la superficie endotelial (Wiener-Kronish JP et al. 1991), de tal modo que la pérdida de la integridad física de la membrana alveolar puede contribuir al edema alveolar. Del mismo modo la pérdida de la integridad endotelial puede ocasionar un mal funcionamiento de los sistemas de reabsorción de líquido desde el espacio alveolar (Sznajder JI. 1999). La lesión de los neumocitos tipo II del epitelio alveolar condiciona además

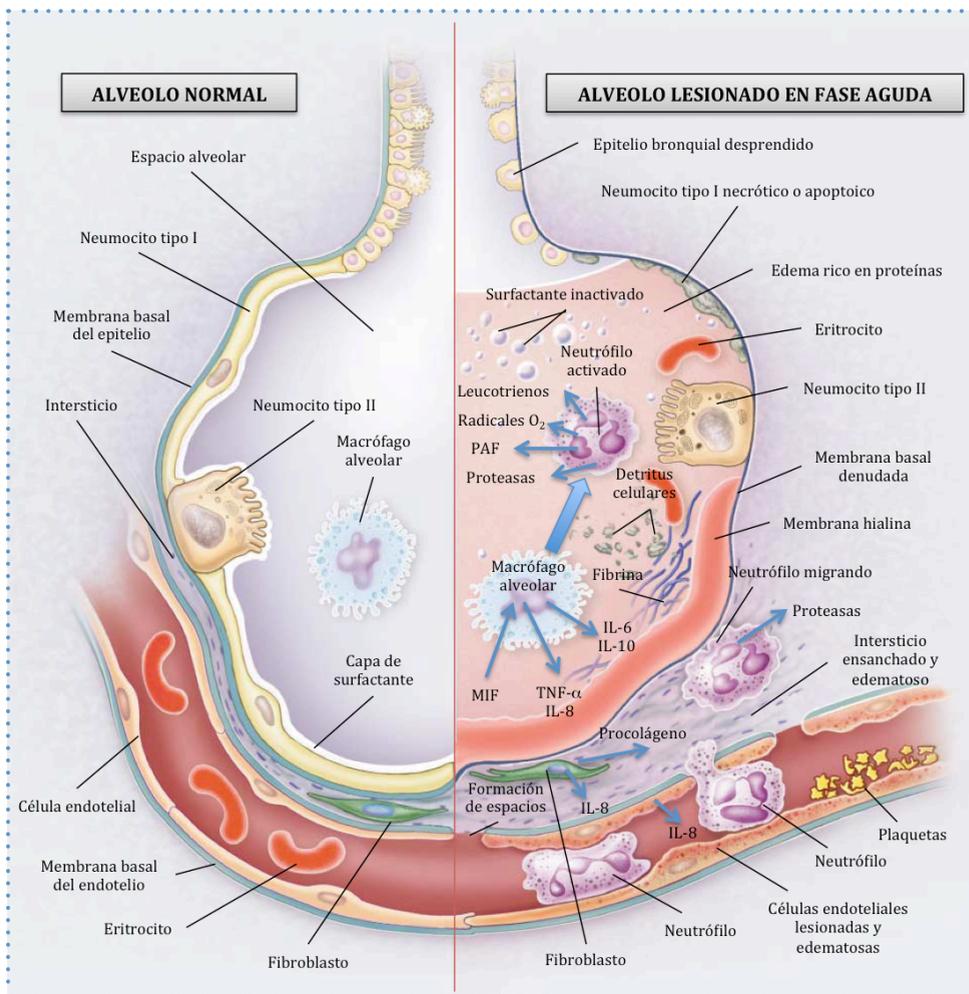
una pérdida en la producción y recambio del surfactante pulmonar (Greene KE et al. 1999) y desencadena la liberación de diversos mediadores entre los que se incluyen citocinas proinflamatorias que dan lugar a la activación de los neutrófilos y estimulan la quimiotaxis (Tyrrell C et al. 2012). Además la pérdida de la barrera física que supone el epitelio predispone a los pacientes a la aparición de sepsis en aquellos casos en los que existe neumonía (Kurahashi K et al. 1999; Castillo RL et al. 2015). Por último, si la lesión es muy extensa, una reparación epitelial insuficiente puede ocasionar la aparición de fibrosis (Bitterman PB. 1992).

La liberación de citocinas inicia y amplifica la respuesta inflamatoria. Esta se puede originar como respuesta a una agresión directa al pulmón (p.ej. neumonía, aspiración o inhalación de sustancias) o de manera indirecta como parte de una respuesta inflamatoria sistémica (p.ej. como ocurre en la sepsis o los politraumatismos). La contribución de algunas citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF) o las interleucinas (IL) 6 y 8 se han asociado a la aparición de ALI y SDRA en diferentes modelos (Menk M et al. 2015) junto con otros como endotoxinas o factores transcripcionales proinflamatorios como el factor nuclear kappaB (NF- $\kappa$ B) (Wang G et al. 2013). Los niveles de algunas de estas citocinas como la IL 1 y la IL 6 (Meduri GU et al. 1995) o de otras proteínas como la DcR3 (“**Decoy Receptor 3**”, una proteína hidrosoluble con efectos inmunomoduladores) se han propuesto como biomarcadores predictores del pronóstico de pacientes con SDRA (Chen CY et al. 2009).

El reclutamiento excesivo de leucocitos resulta fundamental en la fisiopatología del ALI y el SDRA, este proceso es un mecanismo coordinado dependiente de quimiocinas (Bhatia M et al. 2012) por lo tanto, el conocimiento de los eventos celulares asociados al reclutamiento de leucocitos podría llevarnos al diseño de mejores y más eficaces estrategias terapéuticas frente al SDRA.

Se considera que el eje central de la patogénesis del ALI / SDRA está mediado por neutrófilos polimorfonucleares (PMN) y por mediadores (circulantes o generados localmente en el pulmón); no obstante, hay otros mecanismos considerados relevantes como la activación del endotelio y/o la apoptosis (Matthay MA y Zimmerman GA. 2005). Son las citocinas y quimiocinas, junto con otras sustancias, las responsables del inicio y amplificación de la respuesta inflamatoria que ocurre en

la Lesión Pulmonar Aguda y el Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo. A ello se suma como mecanismo subyacente la activación del complemento, y en especial del componente C5a, con la consecuente activación posterior de los neutrófilos (Jacob HS et al. 1980). Pero no sólo es importante el aumento en la producción de sustancias proinflamatorias sino también el equilibrio entre éstas y las citocinas antiinflamatorias que limitarían la progresión de las lesiones inflamatorias, hechos éstos constatados en diferentes trabajos donde se muestra el aumento de sustancias inhibitoras de citocinas proinflamatorias como el antagonista del receptor de la interleucina 1, el receptor soluble de factor de necrosis tumoral, anticuerpos anti-interleucina 8 y citocinas antiinflamatorias como las interleucinas 10 y 11 (Pittet JF et al. 1997). Estudios posteriores sugieren que otros mecanismos pueden estar implicados, como por ejemplo los que rigen el equilibrio entre los enzimas convertidores de la angiotensina 1 y 2 y que pueden modificar el grado de lesión pulmonar (Imai Y et al. 2005; Kuba K et al. 2005).



**Figura 3.** El Alveolo Normal (lado izquierdo) y el Alveolo Lesionado en Fase Aguda (lado derecho) del Síndrome de Ditrés Respiratorio Agudo.

En la fase aguda se produce un desprendimiento del epitelio bronquial y alveolar y la formación de membranas hialinas sobre la membrana basal denudada. Los neutrófilos se encuentran adheridos al endotelio lesionado y migrando a través del intersticio hasta el espacio alveolar el cual se encuentra ocupado por edema rico en proteínas. En el espacio alveolar los macrófagos segregan citocinas, interleucinas (IL) 1, 6, 8 y 10 y Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) las cuales actúan localmente estimulando la quimiotaxis y activando a los neutrófilos. La IL-1 puede también estimular la formación de matriz extracelular por parte de los fibroblastos intersticiales. Los neutrófilos activados liberan sustancias como radicales libres del oxígeno, proteasas, leucotrienos y otras sustancias proinflamatorias como el Factor Activador de las Plaquetas (PAF de su acrónimo inglés). También se producen una serie de sustancias mediadoras anti-inflamatorias (no mostradas en la figura) como el antagonista del receptor de la interleucina 1, el receptor soluble del factor de necrosis tumoral, los autoanticuerpos anti-interleucina 8 y citocinas tales como la interleucina 10 y 11.

Modificado de Matthey y Zimmerman. (Matthey and Zimmerman. 2005)

### ***D.5.1) Papel de los neutrófilos en el SDRA***

La lesión endotelial y del epitelio alveolar y la pérdida de integridad de éstos se acompaña de una entrada de neutrófilos en el intersticio y el espacio broncoalveolar (Grommes J y Soehnlein O. 2011). Como hemos anticipado, los neutrófilos desempeñan un papel clave en la aparición del ALI y el SDRA. A nivel histológico, en preparaciones obtenidas de pulmones en estadios iniciales de ALI y SDRA, puede observarse una marcada acumulación de neutrófilos; además éstos predominan en el líquido broncoalveolar obtenido de pacientes con SDRA y su concentración se correlaciona con la severidad del cuadro y con su pronóstico (Steinberg KP et al. 1994). Además cuando se bloquea la IL-8, la sustancia quimiotáctica más importante en la atracción de neutrófilos, se obtiene un efecto protector en el ALI/SDRA inducido por instilación ácida en conejos (Folkesson HG et al. 1995). Aunque puede ocurrir en pacientes con neutropenia, indicando que en determinadas condiciones, mecanismos independientes de los neutrófilos por si solos son capaces de desarrollar ALI, una gran cantidad de datos experimentales y clínicos apuntan hacia el importante papel de estos como causa en la lesión pulmonar; dejando a un lado que la activación de neutrófilos es vital para la defensa del huésped, su activación excesiva conduce a daños en los tejidos por la liberación de agentes activadores de las células citotóxicas e inmunes tales como las proteinasas, polipéptidos catiónicos, citocinas y los radicales libres de oxígeno (Grommes J y Soehnlein O. 2011).

En los estadios iniciales del ALI/SDRA los neutrófilos se adhieren y son reclutados por los capilares pulmonares desde donde migran al interior del espacio alveolar, son activados y comienzan a liberar sustancias citotóxicas (p.ej. radicales libres de oxígeno, proteasas, ...etc.) que condicionan la lesión del epitelio alveolar y endotelial (**figura 3**). El proceso de reclutamiento de los PMN es complejo y están implicados diferentes mediadores inflamatorios en él (Castillo RL et al. 2015). En el ser humano los PMN se almacenan en la médula ósea y en algunos tejidos; cuando los mediadores inflamatorios llegan a la circulación, la médula ósea es estimulada por éstos para liberar los neutrófilos (Zhao X et al. 2005). Determinadas moléculas de adhesión celular entre las que se encuentran las cadherinas, selectinas, inmunoglobulinas e integrinas, son las mediadoras de la adhesión de los neutrófilos PMN con las células endoteliales activadas (Lai TS et al. 2010). Después de la adhesión al endotelio, los PMN son coactivados

por agonistas proinflamatorios y por la superficie de adhesión, en la que se expresa el ligando de las integrinas, ICAM-1 (acrónimo del inglés “*Intercellular Adhesion Molecule 1*”) (Castillo RL et al. 2015). Las integrinas son cruciales en el proceso de activación de los PMNs; cuando estas se unen a los ligandos y se agrupan se activa la función de los PMNs (Schymeinsky J et al. 2007). Además, también se necesitan otras vías moleculares en la estimulación de PMNs, tales como la fosforilación de la MAPK-p38. La familia de las MAPK (acrónimo del inglés “*mitogen-activated protein kinases*”) es fundamental en la mediación de numerosos cambios en la función celular, tales como la expresión de citocinas y la apoptosis (Puddicombe SM et al. 2000).

Parece también poco probable que los PMN actúen solos en la patogénesis del ALI / SDRA. Los macrófagos alveolares, subpoblaciones de monocitos circulantes y otros subtipos de leucocitos han sido considerados en diferentes trabajos como efectores (Pittet JF et al. 1997; Rosseau S et al. 2000; Niesler U et al. 2014). Las plaquetas pueden producir IL-1 $\beta$  y otras citocinas y además tienen la capacidad de interactuar con los monocitos y los neutrófilos; son por tanto partícipes de las cascadas inmunes y pueden modular la lesión inflamatoria en el ALI / SDRA (Heffner JE et al. 1987, McVey M et al 2012).

### ***D.5.2) El estrés oxidativo como vía de señalización en el ALI / SDRA***

En el ALI / SDRA, tras la agresión inicial que desencadena la liberación mediada por células de una cascada de sustancias inflamatorias, se produce un desbalance en los procesos de oxidación que se manifiesta como estrés oxidativo y que juega un papel importante en el desarrollo, modulación y mantenimiento de las respuestas inflamatorias locales y sistémicas (Castillo RL et al. 2015).

El alveolo está continuamente expuesto a oxígeno reactivo. El sistema de defensa antioxidante consiste en compuestos moleculares de bajo peso como el glutatión reducido (GSH), el ácido ascórbico o vitamina C, antioxidantes lipofílicos como la vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) o el retinol (vitamina A) y enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa. En condiciones normales todos ellos interactúan para proteger a las estructuras pulmonares del efecto deletéreo de la

oxidación (Schmidt R et al. 2004). Independientemente del mecanismo desencadenante las manifestaciones del SDRA son similares lo que implica unas vías fisiopatológicas finales comunes. Tras la activación inicial del endotelio pulmonar y de los macrófagos alveolares e intersticiales se produce un aumento en la expresión de las moléculas de adhesión y la producción de citocinas y quimiocinas que inducen un secuestro masivo de neutrófilos en la microvasculatura pulmonar. Estos migrarán posteriormente a través del endotelio y el epitelio hasta el espacio alveolar donde liberarán una serie de sustancias citotóxicas y proinflamatorias, entre las que encontramos especies reactivas derivadas del oxígeno (ROS, acrónimo del inglés “*reactive oxygen species*”) y del nitrógeno (RNS, acrónimo de “*reactive nitrogen species*”) (Castillo RL et al. 2015).

El aumento de los niveles de oxidantes tanto en el pulmón como en el plasma de pacientes con ALI / SDRA pone de manifiesto su participación en la fisiopatología. Además los niveles de estos oxidantes se correlacionan con la severidad de la enfermedad (Castillo RL et al. 2015). En modelos animales, las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno derivadas de los neutrófilos causan lesión pulmonar histológica así como un aumento de la permeabilidad pulmonar (Auten RL et al. 2001). Otros estudios han revelado que los ROS son capaces de romper las uniones estrechas del endotelio mediante fosforilación por quinasas de acción focal (Galeotti T et al. 2003).

#### ***D.6) Estrategias de tratamiento: el papel de la ventilación mecánica***

La ventilación mecánica se ha utilizado durante décadas para el apoyo de pacientes críticos; a pesar de su potencial capacidad para salvar vidas posee varios inconvenientes posibles como lo demuestran diferentes estudios sobre modelos animales y en el ser humano donde los factores mecánicos y los modos ventilatorios pueden inducir o amplificar la inflamación alveolar, ocasionando lesión pulmonar (Ware LB y Matthay MA. 2000; Klueber WM et al. 1999) además de contribuir a la lesión de otros órganos (Ware LB y Matthay MA. 2000; Ranieri VM et al. 1999). De este modo, las estrategias ventilatorias desfavorables pueden agravar la severidad de el SDRA de forma iatrogénica (Ware LB y Matthay MA. 2000; No authors listed. 2000). Trabajos en modelo animal demuestran que la ventilación mecánica con volúmenes y presiones elevadas pueden lesionar el pul-

món provocando un aumento en la permeabilidad y edema tanto en pulmón sano (Dreyfuss D et al. 1988) como en pulmón lesionado previamente (Corbridge TC et al. 1990). Las teorías iniciales que intentaron explicar este fenómeno se centraron en la activación endotelial secundaria a la distensión alveolar como mecanismo lesivo. Posteriormente la apertura y cierre cíclicos de los alveolos atelectásicos se ha postulado como un mecanismo lesivo independiente de la sobredistensión alveolar. Altas concentraciones de oxígeno pueden ser tóxicas para las células que constituyen la membrana alveolo capilar. Además en modelos animales la hiperoxia incrementa el número de PMNs pulmonares y produce una desregulación de otros mecanismos inmunes (Rinaldo JE y Rogers RM. 1982; Matthay MA y Zimmerman GA. 2005).

Así pues el conocimiento detallado y el uso apropiado de la ventilación mecánica es de crucial importancia en el ALI / SDRA. Tres ensayos clínicos han demostrado que el uso de ventilación mecánica de protección pulmonar con volúmenes corrientes bajos y bajas presiones en la vía aérea reducen la mortalidad en los pacientes con Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo (Amato MB et al. 1998; No authors listed. 2000; Villar J et al. 2006). Entre los beneficios de la ventilación de protección pulmonar encontramos un menor edema al preservar mejor las propiedades del endotelio y del epitelio alveolar (Dreyfuss D et al. 1988). Por este mismo motivo, la resolución del edema cuando ya se ha establecido es más rápida con las estrategias de protección pulmonar (Frank JA et al. 2002). Además disminuye los marcadores de lesión pulmonar y la producción de mediadores proinflamatorios dando lugar a un menor reclutamiento pulmonar de neutrófilos y a una disminución de interleucinas (Ranieri VM et al. 1999).

## E) LESIÓN PULMONAR INDUCIDA POR VENTILACIÓN MECÁNICA

Uno de los cambios conceptuales que se ha producido en el tratamiento de los pacientes críticos, y en especial aquellos con SDRA es que la propia ventilación mecánica puede dañar al pulmón e inducir o perpetuar la situación de lesión pulmonar. El daño causado por esta, tanto a nivel macroscópico como microscópico, es inespecífico y a grandes rasgos es indistinguible del que puede observarse en la lesión alveolar aguda de los pacientes con SDRA. El edema pulmonar inducido por la ventilación mecánica es en esencia el resultado de cambios importantes en la permeabilidad de la barrera alveolo-capilar. Este fenómeno se produce tanto en los pulmones sanos, como en aquellos ya previamente dañados.

En los años 70, el más temido de los efectos adversos de la ventilación mecánica era la alteración hemodinámica secundaria y el riesgo potencial de desarrollar fibrosis pulmonar como consecuencia del uso de fracciones inspiratorias elevadas de oxígeno (Frank L et al. 1978). En general y de manera sorprendente, las alteraciones estructurales inducidas por la ventilación mecánica no se tenían prácticamente en consideración y eran nombradas genéricamente como barotrauma (Gattinoni L et al. 2010); este término se usa para indicar el daño pulmonar atribuible a la aplicación de altas presiones en la vía aérea y se han descrito diferentes formas del mismo de las cuales el neumotórax constituye el paradigma. Otras formas menos frecuentes incluyen el neumomediastino o el embolismo gaseoso.

En el transcurso de los años ochenta algunos investigadores empezaron a cuestionar la terminología descrita (barotrauma). Dreyfuss y sus colaboradores (1988) plantean la posibilidad de que el empleo de volumen corriente elevado y no una presión elevada sea el principal factor responsable de la lesión mecánica de la estructura pulmonar causada por la ventilación mecánica. Estos autores usaron ratas previamente sanas que asignaron a varios grupos: uno en el que se utilizaba la ventilación mecánica con presiones altas pero con el tórax atado y sin posibilidad de expandirse (presiones muy altas y volúmenes bajos). Un segundo grupo ventilado con presiones elevadas y el tórax no limitado en su expansión con lo que se consiguen volúmenes elevados (en este grupo la lesión pulmonar es dramática). Un tercer grupo ventilado con volúmenes elevados pero con bajas presiones

(hecho que consiguen con la apertura del tórax). En todos los caso en los que se ventilaba a las ratas con volúmenes altos se producían cambios significativos en el agua extravascular pulmonar, el peso en seco del pulmón y la distribución de la albúmina marcada, sin embargo este hecho no se observó en el grupo de ratas sometidas a ventilación con elevadas presiones y bajos volúmenes. Basándose en estos hechos los autores concluyen que el volumen y no la presión es responsable de la lesión pulmonar inducida por ventilación mecánica (VILI, acrónimo del inglés “**Ventilator Induced Lung Injury**”). Este fue el motivo por el que se acuñó el término de volutrauma y con él se sientan las bases sobre las que se desarrollarían posteriormente las estrategias de ventilación de protección pulmonar (Dreyfuss D et al. 1988). Las fuerzas implicadas en el desarrollo del barotrauma y volutrauma están estrechamente relacionados y comparten una misma relación constante en sujetos sanos y sujetos con SDRA, la elastancia pulmonar, lo que supone dos caras de una misma moneda (Gattinoni L et al. 2010). Casi simultáneamente, Gattinoni y colaboradores proponen el concepto de “**baby-lung**” (pulmón de bebé)(Gattinoni L y Pesenti A. 2005) que se origina como consecuencia de los exámenes de tomografía computarizada que mostraron en la mayoría de los pacientes con lesión pulmonar aguda y/o Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo que el tejido aireado normalmente tiene las dimensiones de los pulmones de un niño de 5 a 6 años de edad (300-500 g de tejido aireado).

Como ya hemos comentado, el uso adecuado de la ventilación mecánica resulta de crucial importancia puesto que el pronóstico del paciente puede estar influido por la manera en como aplicamos esta. El mayor ensayo de ventilación limitada por presión y volumen fue el ARDSnet. Este ensayo, de 861 pacientes, demostró un 9% de descenso en la mortalidad (31% vs 39.8%,  $p= 0.07$ ) con el empleo de volúmenes corriente reducidos (6,2 ml/kg vs 11,8 ml/Kg) (No authors listed. 2000). Otro meta-análisis concluye el beneficio clínico del uso de volúmenes corriente similares (7.7 ml/Kg vs 11,2 ml/kg) aunque en este caso no se consiguió significación estadística (Moran JL et al. 2005).

Producto de los resultados de estos y otros muchos estudios, el volumen corriente empleado en la ventilación ha ido decreciendo progresivamente desde los 12-15 ml/kg de peso (Suter PM et al. 1975), hasta las cifras recomendadas actualmente, inferiores a los 9 ml/kg, aunque en realidad, volúmenes corrientes bajos son realmente volúmenes normales ya que el volumen corriente normal en mamíferos es de 6.3 ml/kg (Tenney SM et al. 1963).

## **E.1) MECANISMOS DE LESIÓN PULMONAR INDUCIDA POR LA VENTILACION MECANICA**

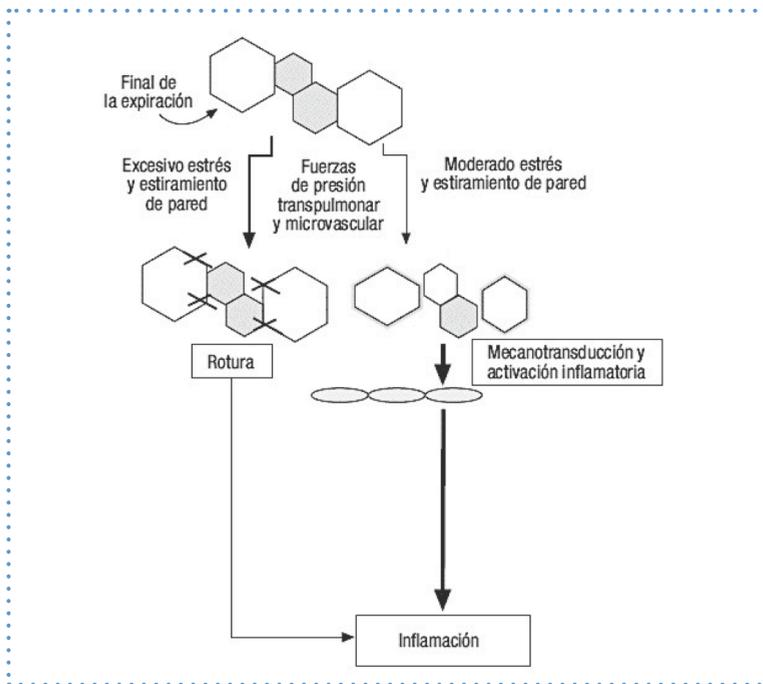
La VILI es iniciada por la aplicación repetida, sobre el tejido pulmonar, de una excesiva tensión y deformación que afecta a estructuras tales como el fibroesqueleto y la microvascularización pulmonar, a las pequeñas vías aéreas distales y a los tejidos juxtaalveolares, y que es capaz de reproducir no sólo el cuadro clínico de la LPA y el SDRA, tal y como fueron definidos por la conferencia de consenso de 1994 (Bernard GR et al. 1994), sino también la lesión histológica que caracteriza al daño alveolar difuso (DAD), definida en 1976 por Katzenstein y colaboradores (Katzenstein AL et al. 1976), y que constituye el verdadero “*gold standard*” (“patrón oro”) para el diagnóstico del SDRA. Este fenómeno se produce tanto en los pulmones sanos, como en aquellos ya previamente dañados (Pinhu L et al. 2003).

### **E.1.1) Daño pulmonar inducido por presión excesiva en la vía aérea (barotrauma) y por sobredistensión pulmonar (volutrauma)**

Como se ha comentado anteriormente, el término barotrauma se usa para indicar el daño pulmonar atribuible a la aplicación de altas presiones en la vía aérea. Históricamente ha sido la lesión pulmonar asociada con más frecuencia a la ventilación mecánica y da lugar al desarrollo de aire extra-alveolar en forma de enfisema intersticial, neumomediastino, enfisema subcutáneo, neumotórax, neumopericardio, neumoperitoneo o embolia gaseosa sistémica. La relación existente entre la presión en la vía aérea y el daño pulmonar se ha puesto de manifiesto mediante diferentes trabajos. Webb y Tierney (2003) usaron un modelo de ratas ventiladas durante 1 hora y utilizaron diferentes niveles de presión en la vía aérea, con y sin PEEP. Los animales que fueron ventilados con presiones pico de 14 cmH<sub>2</sub>O no presentaron ningún cambio histológico en el pulmón, mientras que aquellos ventilados con alta presión (entre 30 y 45 cmH<sub>2</sub>O) presentaron lesiones en forma de un importante edema tanto perivascular como alveolar (Webb HH y Tierney DF. 2003).

Según un modelo publicado recientemente por Marini y Gattinoni (*figura 4*) (Marini JJ y Gattinoni L. 2004), y sin necesidad de que se produzcan presiones intratorácicas elevadas, los cambios en la tensión y deformación de los tejidos pulmonares que

se producen en los diferentes ciclos respiratorios son capaces de inducir fenómenos de auténtica ruptura de las paredes alveolares, así como fenómenos de mecanotransducción y liberación de mediadores inflamatorios que pasan a la circulación pulmonar y sistémica, y que son capaces de producir una lesión sobre órganos a distancia del pulmón. No es necesario el empleo de grandes volúmenes corrientes para inducir estos fenómenos de estiramiento pulmonar; debemos tener en cuenta que estas fuerzas de estiramiento se producen una media de 21.600 veces al día (con una frecuencia respiratoria en VM media de 15 respiraciones por minuto) y sobre unos 480 millones de alveolos en unos pulmones de tamaño medio. Existen pues otros factores implicados en el daño pulmonar inducido por ventilación mecánica que no incluyan el estiramiento o la presión excesivas. Desde los años 90 se ha postulado que sin la necesidad de causar rotura tisular, distensiones no fisiológicas pueden promover la liberación de citocinas proinflamatorias y reclutamiento de leucocitos ocasionando inflamación pulmonar (Uhlig S. 2002; Pugin J. 2003). Se definieron así los conceptos de biotrauma y atelectrauma.



**Figura 4.** Modelo de producción de lesión pulmonar inducida por el respirador (VILI) propuesto por Marini y Gattinoni. (Marini and Gattinoni. 2004)

### ***E.1.2) Daño pulmonar inducido por liberación de mediadores inflamatorios (biotrauma) y por bajo volumen total (atelectrauma).***

Un hallazgo notable en diferentes estudios fue el hecho de que las estrategias de ventilación de protección pulmonar se asociaron con una reducción de los marcadores de la inflamación y en especial de las citocinas proinflamatorias (No authors listed. 2000; Ranieri VM et al. 1999). Estos hallazgos dieron lugar a la hipótesis del **biotrauma**, indicando que la lesión pulmonar causada por estrategias no adecuadas de ventilación era el resultado de la liberación excesiva de mediadores proinflamatorios y la sobreactivación del sistema inmune (Tremblay LN y Slutsky AS. 1998). Entre los mecanismos que explican por qué la ventilación mecánica produce una activación inmune encontramos la mecano-transducción. Este término describe los procesos de señalización intracelular en respuesta a fuerzas externas, tales como el estiramiento. Obviamente, tales procesos de señalización pueden ocurrir sólo si las células permanecen intactas. Si las células se estiran demasiado, se rompe la membrana plasmática y los mecanismos de mecano-transducción se hacen imposibles. También bajo estas condiciones, se liberan mediadores proinflamatorios, pero en este caso por mecanismos diferentes de mecano-transducción (Uhlig S. 2002). Esto debe tenerse en consideración ya que como se resume en la **tabla 4**, la liberación de mediadores proinflamatorios inducida por la ventilación mecánica puede resultar de otros mecanismos diferentes a la mecano-transducción, como la rotura por tensión de la membrana plasmática de las barreras epitelial alveolar y endotelial o de los efectos sobre la vasculatura pulmonar independientes de la distensión o rotura. Vlahakis y colaboradores (Vlahakis NE et al. 1999) encontraron un aumento de la liberación de IL 8 en los neumocitos tipo II sometidos a fuerzas de tracción y Pugin y colaboradores (Pugin J. 2003) realizaron observaciones similares con los macrófagos alveolares. En órganos intactos también se ha demostrado que la ventilación de los pulmones del ratón con parámetros teóricamente seguros (25 cmH<sub>2</sub>O y 3 cmH<sub>2</sub>O de PEEP) no causa daño a los pulmones de acuerdo a los hallazgos microscópicos pero si ocasiona liberación de una variedad de quimiocinas y citocinas proinflamatorias (Von Bethmann AN et al. 1998). Colectivamente, estos y otros hallazgos sugieren que la mecano-transducción puede inducir la producción de mediadores proinflamatorios en las células del pulmón intactas.

**PRINCIPALES MECANISMOS POR LOS QUE LA VENTILACIÓN  
PUEDE PROVOCAR LA LIBERACIÓN DE MEDIADORES  
PROINFLAMATORIOS**

***Lesión por estrés de la membrana plasmática (necrosis)***

Liberación de mediadores preformados  
Efectos proinflamatorios del citosol liberado de las células dañadas

***Lesión por estrés de las barreras epiteliales y endoteliales***

Pérdida de compartimentación  
Hemorragia y acumulación de leucocitos en los pulmones

***Sobredistensión sin destrucción del tejido***

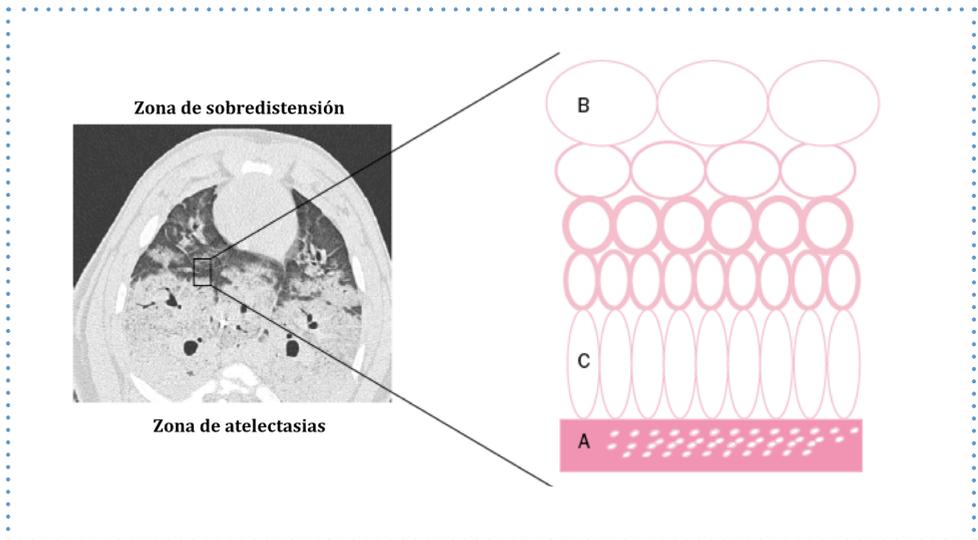
***Efectos sobre los vasos independientes del estiramiento y ruptura***

Aumento de la presión intraluminal  
Fuerzas de cizallamiento elevadas

**Tabla 4.** Tabla resumen de los mecanismos implicados en la liberación de mediadores proinflamatorios en los pulmones sometidos a ventilación mecánica.

El **atelectrauma** ha sido recientemente propuesto como una forma de lesión pulmonar adicional inducida por la ventilación mecánica. Muscedere y sus colaboradores (1994) encontraron que la ventilación con baja presión aumenta la lesión pulmonar por la apertura y cierre cíclicos de las unidades alveolares (Muscedere JG et al. 1994). El atelectrauma se produce pues por el mecanismo de cierre y reapertura cíclico de las unidades alveolares. La base conceptual hay que buscarla en los trabajos de Mead y sus colaboradores en los años 70. Estos desarrollaron un modelo teórico en el que sugerían que las fuerzas que actuaban de manera efectiva sobre el parénquima pulmonar podían ser mucho mayores que las aplicadas en las vías aéreas. Siguiendo este modelo una presión en vía aérea de 30 cmH<sub>2</sub>O podía resultar en una presión de más de 140 cmH<sub>2</sub>O en la unión entre las unidades alveolares abiertas y las cerradas (Mead J et al. 1970). Debido a que los alvéolos y los bronquiolos terminales comparten las paredes adyacentes, las fuerzas que actúan sobre una unidad de pulmón se transmiten a las unidades que lo rodean y el tamaño de los alvéolos permanece constante (Pinhu L et al. 2003). Cuando el pulmón se expande uniformemente, todas las unidades pulmonares tienen una presión transalveolar similar, pero si el pulmón

se expande de manera desigual, como ocurre por ejemplo en el Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo tales fuerzas pueden variar. Cuando un alvéolo se colapsa, las fuerzas de tracción ejercidas sobre sus paredes por las unidades adyacentes expandidas aumentan y estas fuerzas se aplican a una región más pequeña. Estas fuerzas ejercerán un elevado y potencialmente dañino estrés en la interfaz entre las unidades de pulmón colapsado y expandido (**figura 5**) (Pinhu L et al. 2003).



**Figura 5.** Mecanismo propuesto de lesión por atelectrauma. La interfaz entre el pulmón colapsado y consolidado (A) y las unidades de pulmón sobre-distendidas (B) es heterogénea e inestable. Dependiendo de las condiciones ambientales, esta región es propensa al reclutamiento cíclico y a la creación de fuerzas de tensión asimétrica localizada sobre las unidades pulmonares (C) inmediatamente superpuestas a las regiones del pulmón colapsado.

Modificado de Pinhu et al. (Pinhu L et al. 2003)

Barotrauma, volutrauma, biotrauma y atelectrauma constituyen, junto con la hiperoxia, los mecanismos principales de la lesión pulmonar inducida por ventilación mecánica y son la base para el desarrollo de las llamadas estrategias de protección pulmonar.

## F) AQUAPORINAS

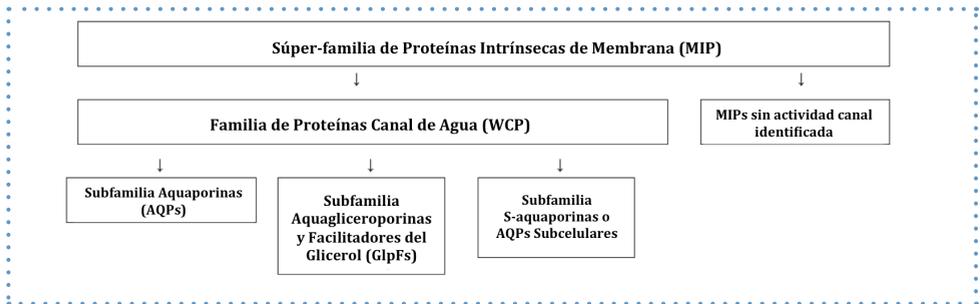
El agua constituye una parte muy importante de la masa de la mayor parte de los organismos vivos de tal modo que la distribución ordenada del agua es necesaria para el mantenimiento del balance líquido entre los distintos compartimentos anatómicos. Aunque se sabe que el agua puede difundir libremente a través de las bicapas lipídicas, esta difusión no es lo suficientemente rápida para muchos procesos biológicos. Es aquí donde, para acomodarse a estas necesidades, intervienen una familia de proteínas-canal de membrana que están involucradas en el transporte rápido de agua a través de las membranas biológicas; estas son las aquaporinas, una familia de pequeñas proteínas de membrana transportadoras de agua (presentes en todos los seres vivos), de las cuales y hasta la fecha se han identificado 13 tipos diferentes en los mamíferos (Verkman AS. 2012), así como numerosas proteínas homólogas que mantienen una estructura idéntica en otros animales inferiores y en plantas.

### **F.1) ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LAS AQUAPORINAS**

Las Proteínas de Canal de Agua (“*Water Channel Proteins*” y su acrónimo WCP) o aquaporinas (AQPs) son muy ubicuas. En los últimos 25 años, se han descubierto cientos de WCPs en los organismos de todos los reinos, incluidos los organismos unicelulares (arqueas, bacterias, levaduras y protozoos) y los pluricelulares (plantas, animales y seres humanos). Las WCPs están presentes en todas las membranas en las que se requiere un paso rápido (o regulado) de moléculas de agua (y / u otras pequeñas moléculas neutras) para permitir que se realicen las funciones de estas células y de las membranas. Desde que la estructura de las membranas biológicas y su permeabilidad al agua se entienden mejor, se sabe que las proteínas integrales de membrana confieren a estas una permeabilidad al agua mucho más alta que la que se puede atribuir a la de la bicapa lipídica (Benga G. 2012).

Una WCP se puede definir como una proteína transmembrana que tiene una estructura tridimensional específica con un poro que proporciona una vía para el paso de agua a través de membranas biológicas. El nombre de Aquaporina (AQP) se

propuso después de que se clonaron las primeras WCPs, y según el grupo que acuñó dicho término, no debe ser usado para describir proteínas que permiten el paso de iones (como es el caso de las proteínas MIP26) u otras moléculas (como el glicerol) (Agre P et al. 1993). Teniendo esto en consideración se han propuesto diferentes clasificaciones que engloban a todas las proteínas de membrana con función canal (Benga G. 2012); un ejemplo de ello se muestra en la **figura 6**.



**Figura 6.** Nomenclatura y clasificación propuesta por Benga (Benga G. 2012) de las proteínas intrínsecas de membrana y de las proteínas canal de agua.

Las AQPs son, por tanto, una familia de pequeñas proteínas canal con un peso molecular en torno a los 30 KDa, hidrofóbicas, presentes en las paredes celulares, que se expresan ampliamente en los reinos animal y vegetal y de las que, como ya se ha comentado anteriormente, se han identificado 13 miembros en los mamíferos, entre ellos el ser humano (Verkman AS. 2005). Permiten el paso rápido y bidireccional de agua, dependiendo fundamentalmente de gradientes de presión (hidrostática y/o osmótica) (Bai C et al. 1999; Ma T et al. 2000; Kozono D et al. 2002). En mamíferos se expresan en muchas células de epitelios y endotelios que se sabe están implicados en el transporte de líquido y también en otras como la piel o las células de la vejiga urinaria que se cree no están implicadas en el transporte de fluidos (Verkman AS. 2005). En la **tabla 5** se resumen la función y el patrón de expresión de las AQPs en los mamíferos.

AQP	PERMEABILIDAD	EXPRESIÓN EN TEJIDOS
AQP0	¿?	Ojo
AQP1	Agua	Túbulos renales, células endoteliales, eritrocitos, plexo coroideo, epitelio ciliar, quilíferos intestinal, endotelio corneal
AQP2	Agua	Túbulos colectores del riñón
AQP3	Agua, glicerol	Túbulos colectores del riñón, epidermis, epitelio de la vía aérea, conjuntivas, vejiga urinaria, vías aéreas de calibre grande
AQP4	Agua	Astroglía en el cerebro y la médula espinal, túbulos colectores del riñón, epitelios glandulares, vías respiratorias, músculo esquelético, estómago, retina
AQP5	Agua	Epitelio glandular, epitelio de la córnea, epitelio alveolar, tracto gastrointestinal
AQP6	Cloruro?	Células intercaladas de los túbulos colectores del riñón
AQP7	Agua, glicerol	Tejido adiposo, testículos, túbulo proximal del riñón
AQP8	Agua	Hígado, páncreas, intestino, glándulas salivares, testículos, corazón
AQP9	Agua, pequeños solutos	Hígado, leucocitos, testículos, cerebro
AQP10	Agua, glicerol	intestino delgado
AQP11	¿?	Riñón, hígado
AQP12	¿?	Células acinares pancreáticas

**Tabla 5.** Tabla resumen de la función y patrón de expresión de las aquaporinas (AQPs).

Adaptado de Verkman AS. (Verkman AS. 2005)

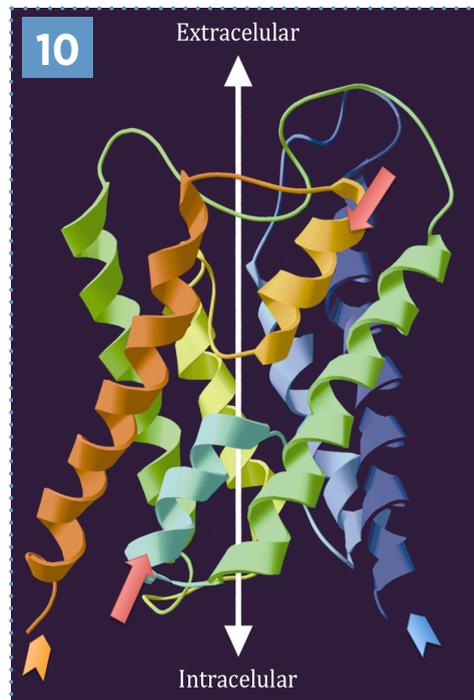
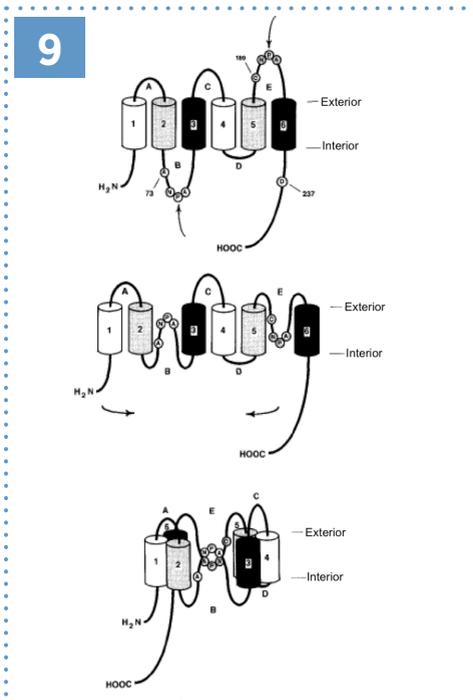
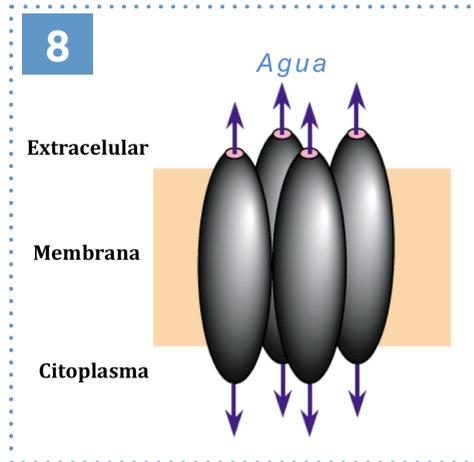
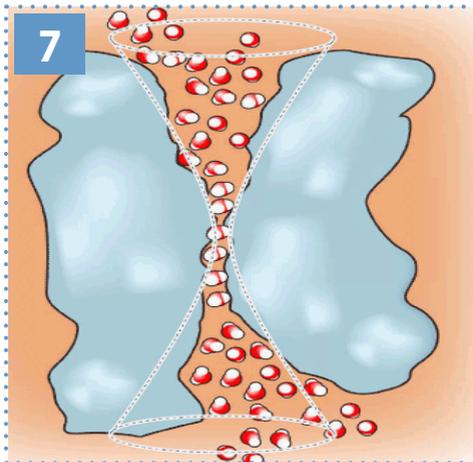
La primera proteína de canal de agua fue descubierta en 1992 por un grupo de investigadores entre los que se encontraba Peter Agre, que recibió en el año 2003 el premio Nobel de química, precisamente por el descubrimiento de las aquaporinas; aunque su existencia ya se sospechaba al evidenciarse la presencia de grupos celulares epiteliales que poseían una mayor permeabilidad osmótica que la que se podía explicar por difusión simple a través de la membrana plasmática (Preston GM et al. 1992).

Los primeros estudios sobre este tipo de proteínas hablaban de una estructura tridimensional en “reloj de arena” (*figura 7*) (Jung JS et al. 1994). La mejor estudiada es la AQP 1 y la mayor parte de los conocimientos existentes hoy día derivan de los estudios sobre este tipo en particular de canal de agua (Sui H et al. 2001).

Están formadas por cuatro subunidades iguales constituyendo un homotetrámero; cada una de estas subunidades contiene un poro de agua individual (**figura 8**). El estudio de la estructura de la AQP1 revela que cada subunidad está constituida por dos secuencias que se repiten en tándem, cada una está formada por tres hélices transmembrana con un bucle corto que conecta la segunda y la tercera hélice. Los bucles cortos (hemiporos) entran pero no abarcan la bicapa, y cada uno contiene una secuencia distintiva Asn-Pro-Ala. Los terminales amino y carboxi se encuentran intracelulares, por lo que las repeticiones de las dos secuencias están orientadas entre sí siguiendo una disposición de 180°. Los dos hemiporos se pliegan en la membrana desde superficies opuestas de la bicapa, superponiéndose a mitad de camino en esta, quedando rodeados por seis hélices transmembrana (**figuras 9 y 10**) (Jung JS et al. 1994; Kozono D et al. 2002). La estructura de la AQP 1 le proporciona un mecanismo único de selectividad para el paso de agua a través del canal sin la necesidad o la presencia de partes móviles. Teóricamente los protones podrían atravesar el canal interactuando de manera transitoria con moléculas de agua ( $H_3O^+$ ). Sin embargo, dos características confieren a la AQP1 mecanismos que previenen esto. La primera barrera se encuentra en el punto más estrecho del poro acuoso que atraviesa la AQP1. A este nivel el diámetro es de 2,8 amstrongs, aproximadamente similar al diámetro de la molécula de agua. Además el residuo Arg-195 se conserva en casi todos los miembros de la familia de las AQPs y proporciona una carga positiva que sirve para repeler el agua protonada ( $H_3O^+$ ) (de Groot BL y Grubmüller H. 2001). La segunda barrera es el fuerte dipolo que constituyen los bucles cortos de los hemiporos y que contienen la secuencia distintiva Asn-Pro-Ala. Estas cargas reorientan las moléculas de agua a su paso por el canal (Murata K et al. 2000). Esta reorientación además rompe las interacciones de los hidrogeniones con las moléculas de agua por encima y por debajo, eliminando la posibilidad del transporte de protones a su través (Kozono D et al. 2002). De modo similar, los iones no pueden atravesar las AQPs. Aunque las moléculas deshidratadas de algunos iones podrían ajustarse a los 2,8 amstrongs de diámetro del poro, la estructura molecular de las AQPs no permite una deshidratación completa de los iones, los cuales continúan siendo muy grandes para pasar a través del cuello de botella del poro acuoso (Kozono D et al. 2002).

**Figura 7.** Modelo de "Reloj de Arena" de las AQPs (vista lateral de uno de los monómeros). Los círculos representan moléculas de agua en el interior del canal estrecho que une los espacios citoplasmático y extracelular. Modificado de Cohen. (Cohen E. 2012)

**Figura 8.** Estructura tetramérica ensamblada de la AQP1 en una membrana; cada uno de los monómeros contiene un poro de agua. Modificado de Verkman AS. (Verkman AS. 2005)



**Figura 9.** Modelo original de seis hélices transmembrana que atraviesan la bicapa lipídica. Estas seis hélices están constituidas por dos secuencias idénticas de tres hélices cada una que se repiten en tándem con un bucle corto que conecta la segunda y la tercera hélice (bucles B y E). Estos bucles contienen una secuencia distintiva Asn-Pro-Ala (NPA). Las flechas curvas verticales indican el plegado de bucle B en la cara citoplásmica de la bicapa y el bucle de E en la cara extracelular. Los dos bucles cortos (constituyen cada uno de los hemiporos), se pliegan pues en la membrana desde superficies opuestas de la bicapa, superponiéndose a mitad de camino en la bicapa y quedando rodeados por seis hélices transmembrana. Las flechas horizontales indican la yuxtaposición de los residuos Amino (NH<sub>2</sub>) y Carboxi (COOH) terminales en la cara citoplásmica. Modificado de Jung JS. (Jung JS et al. 1994)

**Figura 10.** Diagrama de cintas de la estructura de un monómero de la AQP1 (vista lateral). La flecha azul indica el residuo amino-terminal y la flecha naranja el residuo carboxi-terminal, ambos intracelulares. Seis hélices transmembrana rodean a dos hemiporos (bucles con hélices cortas marcadas con flechas rojas) que se encuentran en mitad de la bicapa. La flecha bidireccional blanca ilustra el canal acuoso a través de la proteína. Modificado de Kozono D. (Kozono D et al. 2002)

La otra característica fundamental de las AQPs, además de la selectividad en el transporte de agua, es la rapidez. Se conocen unos cuantos sitios posibles de interacción entre las moléculas de agua y los residuos de aminoácidos que recubren el interior del poro. El resto del canal es altamente hidrofóbico. Las moléculas de agua saltan de sitio en sitio de manera análoga a la conducción saltatoria de los nódulos de Ranvier en los axones mielínicos. La velocidad de paso de moléculas de agua a través de la AQP1 es de aproximadamente  $3 \times 10^9$  moléculas de agua por subunidad y segundo (Kozono D et al. 2002), considerablemente mayor que la velocidad descrita para otros tipos de canal como los canales de  $K^+$  (Morais-Cabral JH et al. 2001). Esta rapidez de paso se vería dramáticamente reducida si las moléculas de agua tuvieran que interactuar con un mayor número de polos en la superficie del poro (Kozono D et al. 2002).

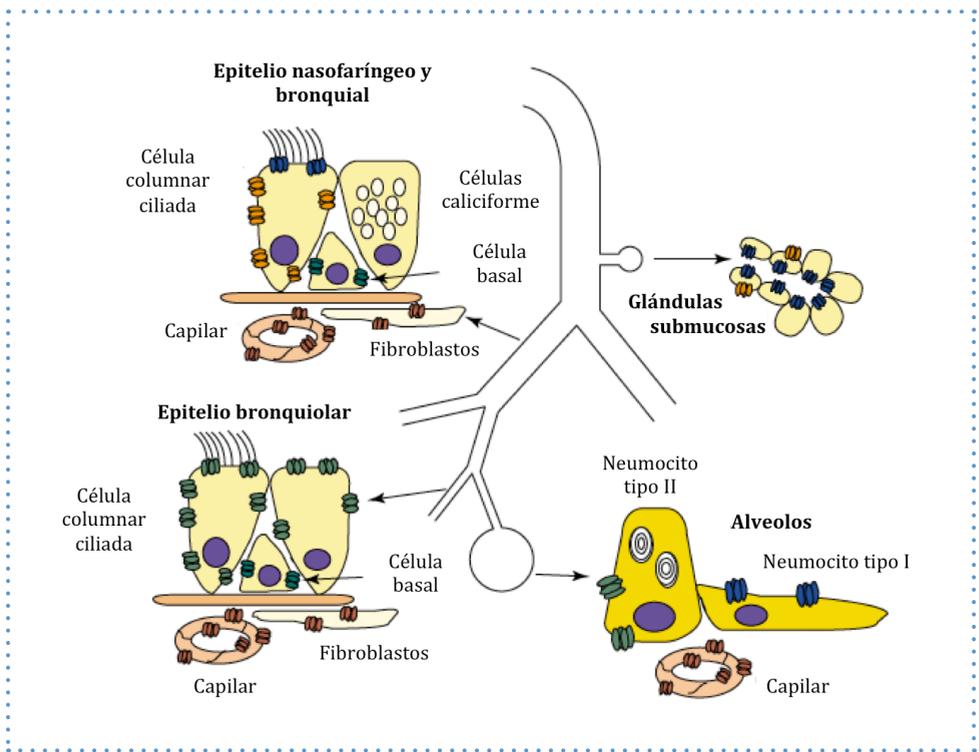
La presencia de sistemas de compuerta es un mecanismo fisiológico vital para muchos de los canales transmembrana conocidos. Así, la mayoría de los canales iónicos descritos tienen mecanismos de activación periódica. (Demo SD y Yellen G. 1991; Premkumar LS y Auerbach A. 1996) Aunque no es una característica general de las aquaporinas, un subconjunto de ellas si que pueden ser cerradas. Así la AQP0 se activa por el pH bajo y se inactiva por la presencia de iones Calcio (Nemeth-Cahalan KL y Hall JE. 2000), la AQP3 se inactiva por pH bajo (Zeuthen T y Klaerke DA. 1999) y la AQP6 del túbulo colector renal se activa por la bajada del pH (Yasui M et al. 1999).

## **F.2) AQUAPORINAS EN EL PULMÓN**

El movimiento de agua a través de las barreras celulares es el resultado del transporte de agua que se produce como consecuencia de gradientes osmóticos o hidrostáticos. En las zonas distales del pulmón y las vías aéreas, el movimiento de líquido entre el espacio aéreo, el espacio celular e intersticial y el compartimento vascular sirve para mantener una hidratación adecuada, absorber el agua alveolar en el momento del nacimiento y en situaciones de edema pulmonar y para la secreción de fluidos en la superficie de las vías aéreas por las glándulas submucosas. Mientras que los mecanismos hidrostáticos producen edema pulmonar y derrame pleural en situaciones de insuficiencia cardíaca, los flujos osmóticos de agua a través de las membra-

nas son el mecanismo principal de transporte de agua en condiciones fisiológicas. El transporte de agua permite disipar los gradientes creados por el transporte de iones. Las AQP5 facilitan esta tarea al permitir un trasiego de agua mucho más rápido que el que se obtendría por difusión simple (Verkman AS. 2007). De las trece AQP5 que se conocen hasta hoy en mamíferos, el pulmón se sabe que expresa al menos 4 tipos.

La AQP1 se expresa en la membrana apical y basolateral de las células del endotelio microvascular que está en relación con las vías aéreas y los alveolos y también en las células mesoteliales y en la microvasculatura de la pleura parietal. La AQP3 se expresa en la membrana basolateral de las células epiteliales de las vías aéreas de mayor calibre y la nasofaringe. La AQP4 se expresa en la membrana basolateral de las células ciliadas del epitelio traqueal, bronquial y nasofaríngeo. La AQP5 se expresa principalmente en la membrana apical de los neumocitos tipo I. Este patrón de expresión de las AQP5 en el pulmón aporta evidencia indirecta de su posible papel en el manejo de líquidos en el pulmón distal y en las vías aéreas (figura 11) (Verkman AS. 2007).



**Figura 11.** Expresión de aquaporinas (AQP) en el tracto respiratorio humano. La expresión y la localización de las diferentes AQP5 varía entre la vía aérea superior (epitelio nasofaríngeo y bronquial), las vías respiratorias inferiores (epitelio bronquiolar), alvéolos (neumocitos tipo I y tipo II) y glándulas submucosas de las vías respiratorias. AQP1 en rojo; AQP3 en verde; AQP4 en naranja; AQP5 en azul.

Modificado de King y Yasui. (King and Yasui. 2002)

La expresión de AQPs en el pulmón, como ocurre en otras muchas proteínas, varía a lo largo de las diferentes etapas de desarrollo. Así la AQP1 se puede detectar en roedores al nacimiento e incrementa considerablemente perinatalmente y en ratones adultos (Ruddy MK et al. 1998); este ascenso se correlaciona con el aumento de la permeabilidad al agua (Carter EP et al. 1997). En contraste, la AQP5 se expresa escasamente al nacimiento y aumenta de manera progresiva en la edad adulta (Yasui M et al. 1997). Determinadas condiciones son capaces de modificar la expresión de AQPs en el pulmón. Así los glucocorticoides aumentan la expresión de la AQP1 (King LS et al. 1996); la AQP 1 y la 5 se encuentran disminuidas en lesiones pulmonares inducidas por infecciones virales (Towne JE et al. 2000), por la instilación de lipopolisacáridos (Jiao G et al. 2002), y en modelos de fibrosis pulmonar inducidos por bleomicina (Gabbazza EC et al. 2004) o generados por mecanismos de isquemia-reperfusión (Zhao S y Li XN. 2010). Determinados mediadores proinflamatorios como el TNF- $\alpha$  y la IL-6 reducen la expresión de AQP5 (Towne JE et al. 2001; Yamamura Y et al. 2012). Otros efectores como los agonistas de los adrenoreceptores  $\beta$ , los agonistas del adenosín monofosfato cíclico (AMPc) o de los receptores vanilloides también regulan la expresión de AQP5 (Sidhaye VK et al. 2005).

Trabajos llevados a cabo con ratones modificados genéticamente, han puesto de manifiesto que la depleción de la AQP1 reduce la permeabilidad osmótica alveolo-capilar (Bai C et al. 1999). Del mismo modo la permeabilidad osmótica al agua del espacio aéreo-capilar se redujo en torno a 10 veces en los ratones “*knockout*” para la AQP5 en pulmón aislado (Ma T et al. 2000). Aunque potencialmente interesante, estos fenómenos no parecen tener relevancia ya que la tasa de aclaramiento alveolar no se vio alterada en los ratones carentes de AQPs. Es más, la absorción rápida de líquido del espacio alveolar al nacimiento no se afectó por la depleción de AQPs, como tampoco el edema pulmonar inducido por la instilación de ácido o por la hiperoxia (Song Y et al. 2000). Por otra parte, se ha demostrado un incremento de la expresión de AQP1 en los capilares pulmonares de humanos con SDRA (Lai KN et al. 2003). Por ello el papel preciso que juegan las AQPs 1 y 5 en la lesión pulmonar aguda y en el Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo sigue siendo controvertido.

### **F.3) PAPEL DE LAS AQUAPORINAS EN LA LESIÓN PULMONAR INDUCIDA POR VENTILACIÓN MECÁNICA**

Muy poco se ha publicado al respecto del papel que desempeñan las AQP's en la Lesión Pulmonar Aguda Inducida por Ventilación mecánica (VILI). Hales y sus colaboradores (Hales CA et al. 2001) pusieron de manifiesto de manera indirecta que las AQP's 1 y 5 estaban involucradas en la formación del edema asociado a el VILI. Para ello usaron un modelo de lesión pulmonar inducido por altos volúmenes corrientes (20 ml/Kg) en rata y utilizaron un conocido bloqueante de los canales de agua. La AQP1 y la AQP5 son inhibidas por el cloruro de mercurio ( $HgCl_2$ ) al unirse este con la cisteína 189 de las mismas de manera competitiva, evitando su función de paso de moléculas de agua (Verkman AS. 2005). Este efecto de inhibición es revertido por la administración de dosis equimolares de cisteína (Preston GM et al. 1993; Raina S et al. 1995). Este grupo de investigadores objetivó que existía un empeoramiento del edema ocasionado por la ventilación mecánica cuando previo al inicio de la misma se administraba el bloqueante  $HgCl_2$ , y este efecto de empeoramiento era revertido por la administración posterior de cisteína.

Sólo hemos encontrado un trabajo en el que se analice la expresión de aquaporinas en animales sometidos a ventilación mecánica. Recientemente Jin y colaboradores (Jin LD et al. 2013) ventilaron ratas con volúmenes corrientes de 8 ml/kg y 40 ml/kg durante 4 horas. Estos investigadores objetivaron un descenso significativo de la expresión de AQP1 y un aumento de las citocinas inflamatorias y de la cantidad de proteínas obtenidas del líquido broncoalveolar, en el grupo de ratas ventiladas con volúmenes corrientes elevados (40 ml/Kg) en comparación con el grupo de animales ventilados con volúmenes corrientes bajos (8 ml/Kg). Observaron también que la administración de una sustancia inhibidora de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) atenuaba tanto la respuesta inflamatoria medida como el descenso en la expresión de AQP1.



# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Sobre las hipótesis de que a) la ventilación mecánica es capaz de producir lesión pulmonar aguda y edema en pulmones previamente sanos (Gattinoni L et al. 2010), b) las aquaporinas pueden estar implicadas en la formación del edema pulmonar secundario a la lesión pulmonar inducida por la ventilación mecánica (Hales CA et al. 2001; Jin LD et al. 2013), y c) la VM con volumen corriente bajo puede condicionar cambios inflamatorios similares a los que ocurren en el VILI (Wolthuis EK et al. 2009; Vanaker M et al. 2007) y que no sólo la estrategia ventilatoria, sino también el tiempo de VM puede ocasionar lesión pulmonar (Hegeman MA et al. 2013), se plantearon los siguientes objetivos...

## En primer lugar:

- a. reproducir un modelo de lesión pulmonar aguda con edema causado por ventilación mecánica a volúmenes corriente elevados, objetivándolo mediante el cociente peso húmedo / peso seco pulmonar;
- b. determinar el impacto sobre el edema pulmonar que tiene el bloquear de manera competitiva los canales de agua con  $\text{HgCl}_2$ , poniendo de manifiesto de manera indirecta la implicación de las aquaporinas 1 y 5 en la formación del edema pulmonar;
- c. objetivar que ocurre con la expresión de aquaporinas 1 y 5 en el pulmón como consecuencia de la agresión que supone la distensión pasiva alveolar durante la ventilación con presión positiva en condiciones lesivas para el pulmón.

## **En segundo lugar:**

- d. poner de manifiesto si la ventilación mecánica en condiciones teóricamente “poco” lesivas para el pulmón (volumen corriente de 10 ml/Kg) pero mantenidas en el tiempo condiciona la aparición de lesión pulmonar y consecuencia de ello la alteración del cociente peso húmedo / peso seco y del porcentaje de agua pulmonar;
- e. determinar que ocurre con la expresión de las AQP<sub>s</sub> 1 y 5 en estas mismas condiciones de ventilación mantenidas en el tiempo.

Para ello el experimento se dividió en dos partes bien diferenciadas. En una primera parte se creó un modelo de lesión pulmonar inducida por ventilación mecánica a volúmenes corrientes elevados (20 ml/Kg) en ratas, que se mantuvieron así durante un periodo de 2 horas. En una segunda parte del experimento se cambiaron las variables y se mantuvo a los animales anestesiados y ventilados durante un mayor tiempo (4 horas) en unas condiciones de ventilación teóricamente poco lesivas (volúmenes corrientes de 10 ml/Kg).





# MATERIAL Y MÉTODOS

El experimento se llevó a cabo tras la aprobación por parte del Comité de Ética de Animales de Experimentación y Bienestar Animal de la Facultad de Medicina de Valencia. Se utilizaron un total de 74 ratas adultas Wistar con pesos que oscilaron entre los 350 g y los 450, todas ellas machos. Estas se asignaron a dos modelos diferentes, uno de lesión pulmonar aguda inducida por volúmenes corriente elevados y otro de ventilación mecánica prolongada con volúmenes corriente no lesivos. Los experimentos se llevaron a cabo en las instalaciones de los Departamentos de Farmacología, Fisiología y Anatomía Patológica, pertenecientes a la Facultad de Medicina de Valencia.

## 1. MODELOS ANIMALES

### **1.1 LESIÓN PULMONAR AGUDA INDUCIDA POR VENTILACIÓN MECÁNICA A VOLÚMENES CORRIENTES ELEVADOS**

Un total de 44 ratas fueron anestesiadas mediante la inyección intraperitoneal de ketamina a razón de 80 mg/kg peso y 5 mg/kg de xilacina. Tras ello se procedió a la canalización de la vena de la cola mediante catéter intravenoso de teflón de la marca Surflo® y del calibre 24G. Seis de las ratas se sacrificaron directamente mediante la inyección intravenosa de 100 mg/Kg de tiopental sódico constituyéndose de esta manera el **grupo 1 o control**. En el resto de animales (hasta un total de 38) se procedió a la realización de traqueostomía quirúrgica, colocándose una cánula intravenosa de teflón también de la marca Surflo® y del calibre 16G. Las ratas traqueostomizadas se asignaron aleatoriamente a 4 grupos, todas ellas ventiladas durante 2 horas mediante un ventilador para ratas/ratones (Hugo Basile® Rodent Ventilator modelo 7025). Doce ratas fueron ventiladas con volúmenes corrientes de 7 ml/Kg y una frecuencia de 90 respiraciones por minuto (rpm) constituyéndose de esta manera el **grupo 2**. Catorce ratas fueron ventiladas con 20 ml/Kg de volumen corriente y una frecuencia de 90 rpm; estos constituían el **grupo 3**. Un cuarto grupo de ratas formado por seis ejem-

plares fueron ventilados con 20 ml/Kg y 90 rpm durante dos horas pero previamente al inicio de la ventilación mecánica (VM) se procedió a la inyección de Cloruro de Mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ) a la dosis de 6 mg/Kg a través de la vena de la cola en bolo lento. Estas conformaron el **grupo 4**. Por último seis ratas a las que previamente a la ventilación mecánica con volúmenes corrientes de 20 ml/Kg y 90 rpm se procedió a la inyección intravenosa de  $\text{HgCl}_2$  a igual dosis que en el grupo 4 y tras un lapso de 5 minutos se administró una dosis equimolar de cisteína. Estos animales constituyeron el **grupo 5**.

A los animales que fueron ventilados mecánicamente y asignados a los grupos 2 (7 ml/Kg) y 3 (20 ml/Kg), se les realizó tras su intubación y el inicio de la ventilación, la disección del paquete vascular del cuello y se procedió a la canalización de la arteria carótida derecha y de la vena yugular interna derecha para la monitorización continua de la frecuencia cardíaca (FC) y la presión arterial media (PAM). Se monitorizó también la mecánica ventilatoria básica, registrándose continuamente la presión transtorácica máxima (mTPP), la compliancia y la resistencia (Physiological Recorder PR 900 de Mumed®). En el momento del inicio de la ventilación, se extrajeron 0,2 ml de sangre arterial que se desecharon y posteriormente 0,5 ml para medición de parámetros gasométricos basales, y se reemplazó dicho volumen por 1 ml de solución coloide (Gelaspan® 40 mg/ml de Braun) a través del acceso venoso central.

El mantenimiento del estado anestésico se realizó mediante infusión continua intravenosa a través de vena yugular interna (IVAC® P7000 de Alaris Medical Systems). Se infundió una mezcla de ketamina (Ketalar® 50mg/ml de Pfizer) a dosis de 100 mcg/Kg/min y cisatracurio (Nimbex® 2 mg/ml de GlaxoSmithKline), un bloqueante neuromuscular no despolarizante, a razón de 2-3 mcg/Kg/min. En caso de que se detectaran elevaciones significativas puntuales en la FC o PA que pudieran sugerir “despertares” del animal durante el experimento, se suplementó la anestesia de mantenimiento mediante un bolo de 0,1 ml de la mezcla de mantenimiento (20 ml de ketamina 5%, 10 ml de cisatracurio al 0,2% y 20 ml de Suero Fisiológico 0,9%, en infusión intravenosa continua a 0,1 ml/h).

Una vez concluido el tiempo de ventilación mecánica (2 horas) se procedió a la extracción de 0,2 ml de sangre arterial que se desecharon nuevamente y posteriormente 0,5 ml para obtención de parámetros gasométricos.

En todos los grupos, transcurrido el tiempo de ventilación se sacrificó al animal mediante una inyección intravenosa de tiopental sódico de 100 mg/Kg y se procedió a la apertura y disección de la caja torácica para extraer los pulmones, a excepción de los animales destinados a medición de la permeabilidad microvascular pulmonar en los que el sacrificio se realizó mediante exanguinación.

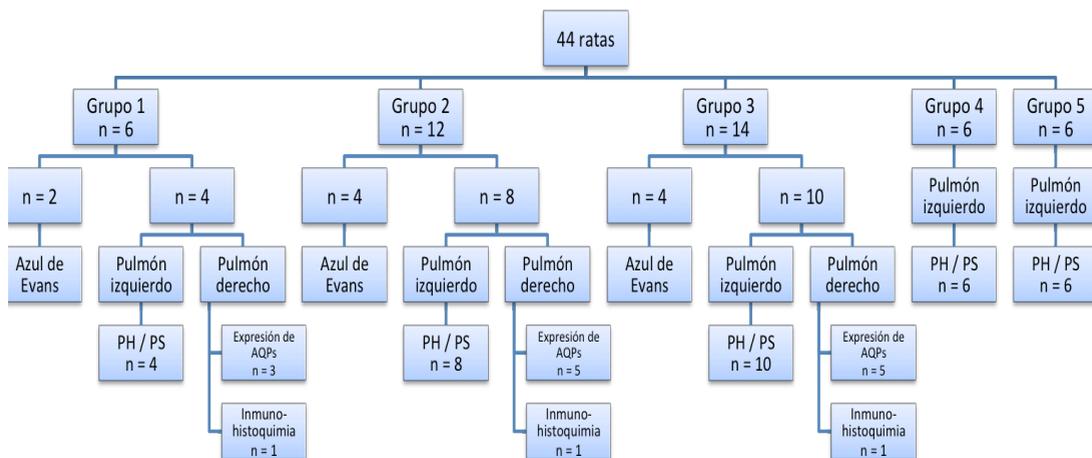
El pulmón izquierdo de todos los animales excepto aquellos destinados a la medición de la permeabilidad microvascular, se destinó a la medición de la cantidad de agua pulmonar.

En tres ratas del grupo 1 y en 5 ratas de cada uno de los grupos 2 y 3, el pulmón derecho, tras su extracción de la caja torácica, se congeló mediante inmersión en nitrógeno líquido y se conservó en un congelador a -80°C para la realización posterior de técnicas de *Western Blot* y de Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Reversa en tiempo real (RT-PCR acrónimo del inglés **“Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction”**).

En una rata de cada uno de los Grupos 1, 2 y 3, el pulmón derecho se destinó a la realización de marcaje inmunohistoquímico según la metodología descrita en el apartado correspondiente y para ello se fijó con parafina para posteriormente realizar cortes con el micrótopo.

Dos animales del grupo 1 y cuatro de los grupos 2 y 3 se destinaron a la determinación de la permeabilidad microvascular pulmonar usando el colorante Azul de Evans y siguiendo la metodología descrita más adelante.

En la **figura 12** se representa gráficamente mediante un esquema la asignación de los animales a los diferentes grupos y las acciones llevadas a cabo sobre cada uno de ellos.



**Figura 12.** Esquema ilustrativo de las acciones llevadas a cabo en las ratas del modelo animal de Lesión Pulmonar Aguda Inducida por Volúmenes Corriente Elevados.

Grupo 1: ratas control; Grupo 2: Ratas ventiladas a 7 ml/Kg; Grupo 3: Ratas ventiladas a 20 ml/Kg; Grupo 4: Ratas ventiladas a 20 ml/Kg y pretratadas con Cloruro de Mercurio ( $HgCl_2$ ); Grupo 5: Ratas ventiladas a 20 ml/Kg y pretratadas con  $HgCl_2$  y cisteína.

PH: Peso húmedo; PS: Peso seco; AQPs: Aquaporinas

## 1.2 VENTILACIÓN MECÁNICA PROLONGADA A VOLÚMENES CORRIENTES NO LESIVOS

Un total de 30 ratas fueron anestesiadas mediante la inyección intraperitoneal de ketamina (80 mg/kg peso) y 5 mg/kg de xilacina. Cinco animales se sacrificaron directamente mediante una inyección intravenosa de 100 mg/Kg de tiopental constituyéndose de esta manera el **grupo C** o **control**. En el resto de animales (hasta un total de 25 animales) se procedió de modo similar al modelo animal de lesión pulmonar, es decir, la realización de una traqueostomía quirúrgica, colocándose una cánula intravenosa de teflón de la marca Surflo® del calibre 16G. Las ratas traqueostomizadas se asignaron aleatoriamente a 2 grupos. Un total de 12 ratas fueron ventiladas durante 2 horas con

la ayuda de un ventilador para ratas/ratones (Hugo Basile® Rodent Ventilator modelo 7025) con un volumen corriente de 10 ml/kg a una frecuencia de 90 respiraciones por minuto, constituyendo de este modo el **Grupo 2H**. Otras 13 ratas fueron ventiladas, mediante idéntico volumen y frecuencia, durante 4h **Grupo 4H**. La disección del paquete vascular del cuello y la canalización de la arteria carótida derecha y de la vena yugular interna derecha permitieron la monitorización continua de la frecuencia cardíaca (FC) y la presión arterial media (PAM). Además se registró continuamente la presión trans-torácica máxima (mTPP), la compliancia del sistema respiratorio y la resistencia de las vías aéreas.

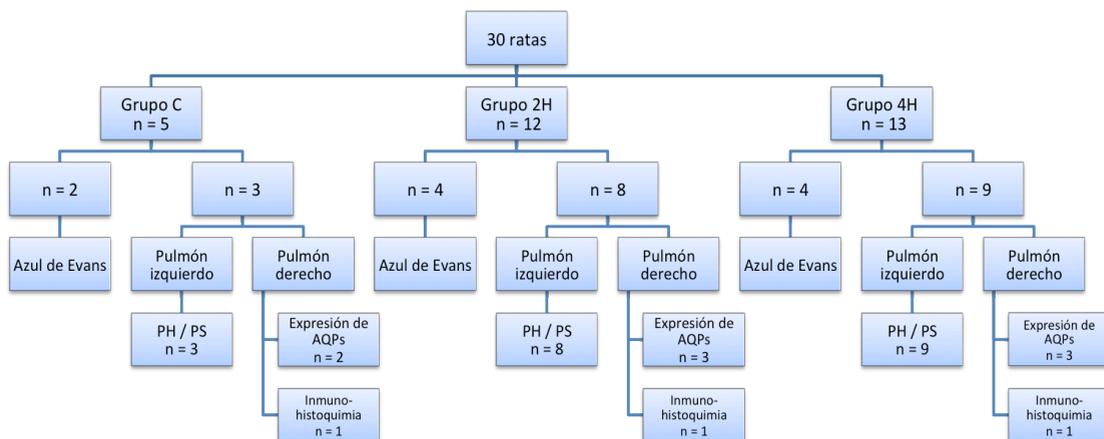
El mantenimiento del estado anestésico se realizó de modo similar a los animales del modelo de lesión pulmonar aguda, mediante infusión continua intravenosa a través de vena yugular interna de una mezcla de ketamina y cisatracurio a dosis de 100 mcg/Kg/min y 2-3 mcg/Kg/min respectivamente. Se suplementó la anestesia, en los casos en los que fue necesario, mediante la administración de un bolo intravenoso de 0,1 ml de la mezcla de mantenimiento (similar a la empleada en el modelo anterior). Se extrajeron muestras gasométricas en todos los animales de los grupos 2H y 4H en el momento del inicio de la ventilación y 30 minutos antes del final del experimento.

En todos los grupos, transcurrido el tiempo correspondiente, se sacrificó al animal mediante la inyección intravenosa de tiopental sódico (100 mg/Kg) y se procedió a la apertura y disección de la caja torácica para extraer los pulmones. El pulmón izquierdo se destinó a la determinación de la cantidad de agua pulmonar. En los animales destinados a la medición de la permeabilidad microvascular la muerte del animal se consiguió mediante exanguinación.

El pulmón derecho en seis de los animales de los grupos 2H y 4H se destinó a la determinación de la expresión de AQPs, para lo cual el pulmón se congeló en nitrógeno líquido, o bien se fijó con parafina para posteriormente realizar cortes y marcaje inmunohistoquímico.

Dos de las ratas del Grupo C y cuatro de los Grupos 2H y 4H se usaron para la determinación de la permeabilidad microvascular pulmonar.

En la **figura 13** se representa gráficamente mediante un esquema la asignación de los animales a los diferentes grupos de estudio y las acciones llevadas a cabo sobre cada uno de ellos.



**Figura 13.** Esquema ilustrativo de las acciones llevadas a cabo en las ratas del modelo animal de Ventilación Mecánica Prolongada con Volúmenes Corrientes No Lesivos.

Grupo C: ratas control; Grupo 2: Ratas ventiladas a 10 ml/Kg durante 2 horas; Grupo 4H: Ratas ventiladas a 10 ml/Kg durante 4 horas.

PH: Peso húmedo; PS: Peso seco; AQP: Aquaporinas

## 2. MEDICIÓN DEL EDEMA PULMONAR

Las muestras recogidas destinadas a la medición del edema pulmonar se secaron con papel de filtro y se colocaron en una placa de Petri de peso conocido previamente. Todas las muestras se pesaron en una balanza de precisión, obteniéndose de esta manera el peso húmedo del pulmón (PH) y posteriormente se colocaron en una estufa seca a 80°C durante 96 horas. Concluido este tiempo se pesaron de nuevo

obteniéndose de este modo el peso seco (PS). Con los datos obtenidos obtuvimos dos parámetros que son indicadores indirectos de la cantidad de edema que se ha producido: la relación entre el peso húmedo y el peso seco pulmonar (PH/PS), obtenida como el cociente simple entre ambos valores y la proporción de agua pulmonar expresada como porcentaje (%<sub>agua</sub>). Este último parámetro se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\%_{\text{agua}} = (\text{PH} - \text{PS}) / \text{PH} * 100$$

### **3. MEDICIÓN DE LA PERMEABILIDAD MICROVASCULAR**

Los cambios en la permeabilidad microvascular se cuantificaron utilizando el colorante Azul de Evans como marcador de proteínas. Con el fin de medir la cantidad de colorante extravasado al sistema respiratorio de la rata, se usó un espectrofotómetro (Kontron Instruments® modelo 940) con un rango de longitud de onda de 190 a 900 nm, con una precisión de 0,1 nm. Para determinar la longitud de onda a la que se produciría la máxima absorción del colorante se realizó un barrido de longitudes de onda con una sensibilidad de 0,1 nm. Sobre una concentración de colorante Azul de Evans de 10 mcg/ml, se obtuvo un pico máximo de absorción a una longitud de onda de 620 nm, determinándose esta como la más apropiada para determinar las concentraciones de marcador. Se procedió a la obtención de una línea de regresión con la ayuda de 10 concentraciones conocidas de Azul de Evans diluido en formamida (de 0,2 a 10 mcg/ml) y con el espectrofotómetro a una longitud de onda fija de 620 nm.

En los animales destinados a medir la permeabilidad microvascular pulmonar se procedió a la inyección, 30 minutos antes del sacrificio del animal, de colorante Azul de Evans intravenoso (30 mg/Kg) en un volumen total de 0,5 ml. Llegado el momento del sacrificio, y tras la extracción de las muestras para gasometría siguiendo la sistemática previamente descrita, se procedió a la exanguinación a través del acceso arterial carotídeo a la vez que se infundía suero salino por el acceso venoso yugular en el mismo volumen que la sangre extraída de la arteria carótida, hasta la muerte del animal.

Tras la muerte del animal se extrajeron los pulmones, separándose el pulmón derecho, el cual se introdujo en 5 ml de formamida y se homogeniza durante 2 min. La suspensión de tejido resultante se incubó a 37 °C durante 18 h y luego se centrifugó a 5000 × g durante 30 minutos después de lo cual se midió el volumen de sobrenadante. La concentración de Azul de Evans en el sobrenadante de pulmón homogeneizado se cuantificó por el método espectrofotométrico. La concentración de Azul de Evans se determinó a partir de las curvas de absorbancia estándar de Azul de Evans y se expresan como mcg de Azul de Evans / g de peso del pulmón húmedo.

## **4. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE AQUAPORINAS**

### **4.1 WESTERN BLOT**

La extracción de proteínas la realizamos a partir de pulmones de rata que tenemos previamente congelados a -80 °C. Para ello, se utilizó un kit de extracción que nos permitió separar las proteínas de forma compartimentalizada (Compartmental Protein Extraction Kit, Chemicon, Ref: 2145). Pesamos entre 200 y 400 mg de tejido que troceamos en presencia de hielo, con la ayuda de un bisturí. Pasamos a homogeneizar en Buffer C frío (1ml/g tejido) en un Ultraturrax hasta que el tejido estaba totalmente disgregado. Este paso se debe realizar en hielo para mantener al máximo la integridad de las proteínas. Seguimos las recomendaciones del kit hasta obtener dos fracciones distintas de cada muestra: las proteínas citoplasmáticas y las de membrana. Se procedió tras ello a cuantificar estas dos fracciones mediante el método del BCA de Pierce (Ref: 23227). Las proteínas de cada fracción (100 mg) se hicieron correr por separado, en un gel Tris-HCl/SDS al 8% de acrilamida. Una vez finalizada la electroforesis, transferimos dichas proteínas a una membrana de Nitrocelulosa (Hybond-ECL, Amersham) a amperaje constante, 160 mA, O.N. a 4°C. Al finalizar, se procedió a la tinción con Rojo Ponceau (Sigma) las membranas para visualizar las proteínas transferidas. Tras lavar con agua destilada se bloqueó la membrana 1h a RT en agitación orbital, en solución bloqueadora (PBS/Tween 0.2% con 5% leche desnatada). Transcurrido este tiempo, se incubó con el anticuerpo primario 2h a RT en agitación. Los anticuerpos utilizados fueron Anti-Rat AQP1 (Ref: AQP11-

A, Alpha Diagnostic) y Anti-Rat AQP5 (Ref: AQP51-A, Alpha Diagnostic) ambos a la concentración de 2 mcg/ml. A continuación, realizamos 3 lavados de 10 minutos con PBS/Tween 0.2% e incubamos 45min a RT en agitación, con el anticuerpo secundario (Anti-Rabbit IgG, Dako) con una dilución 1: 2000. Se procedió tras ello a realizar 4 lavados de 10 min con PBS/Tween 0.2% y un último lavado sólo con PBS. Seguidamente retiramos el exceso y se reveló con ECL (Amersham) 1 minuto a RT. La expresión de  $\beta$ -actina se detectó como un control interno y el contenido relativo de proteínas se analizó por el sistema de aumento de quimioluminiscencia.

#### **4.2 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CON TRANSCRIPTASA INVERSA EN TIEMPO REAL**

Las muestras de pulmón destinadas a la extracción de ARN fueron cortadas con un micrótopo, obteniéndose tres cortes de cada muestra que se montaron sobre un porta. Con la ayuda de un microscopio y un microdisector láser se obtuvieron microcortes de tejido pulmonar que contuviese bronquios y otras cortes que no contuviesen tejido bronquial. Se obtuvieron un total de 50 microcortes de cada tipo de tejido en cada uno de los cortes. El material resultante se destinó a la extracción de ARN total por medio del método de extracción fenólica con TRIZOL® (Reagent Invitrogen™ Life Technologies) descrito por Chomczynsky (Chomczynsky P y Sacchi N. 1987). Este método se basa en el uso de una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina para la lisis de las células y la separación de la muestra en dos fases (acuosa y orgánica). Seguida de la extracción y precipitación del ARN total con cloroformo e isopropanol respectivamente a partir de la fase acuosa. Al tejido pulmonar resultante de los microcortes se le adicionó 1 ml de TRIZOL®, el tejido se homogenizó con un homogenizador (Polytron® PT 1200, Kinematica AG). El tejido homogenizado se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min a 4°C. El sobrenadante se retiró cuidadosamente y el ARN se precipitó mediante la adición de 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M, 2,5 volúmenes de etanol frío y 0.5 mcl de glucógeno (20 mg/ml). El ARN se centrifugó de nuevo, se secó al aire y se resuspendió en 20 mcl del tampón Tris / EDTA. El ARN se transcribió de manera inversa a cDNA con Superscript II (Invitrogen), para ello se incubó con la mezcla de la transcriptasa inversa a 50° C durante 30 min, seguido de la amplificación con los cebadores específicos (sintetizados por Invitrogen) y que se resumen en la **tabla 6**. Se realizaron treinta y cinco ciclos de ampli-

ficación que consisten en 30 segundos de desnaturalización a 95°C, 30 s de hibridación (a las temperaturas que figuran en la *tabla 6*), y 1 min de extensión a 72°C. Después de la amplificación, los productos de la RT-PCR fueron separados en geles de agarosa al 1%, y las bandas se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. La cuantificación se obtuvo mediante el escaneo de densidad las bandas de PCR utilizando un sistema de análisis de imágenes Scion (Beta 4.02, Scion Corporation). Los resultados se expresaron en relación al nivel de ARNm de  $\beta$ -actina en las mismas muestras de ARN.

### **4.3 ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO**

Para el estudio inmunohistoquímico, se extrajeron los pulmones y se fijaron en parafina para obtener posteriormente cortes con el micrótopo. El protocolo seguido desde ese momento fue el siguiente: Desparafinar los cortes en estufa (60°C), hidratar con xilol (3 pasos) y alcoholes graduales (90°, 80°, 70°). Lavar con agua destilada. Tratar con autoclave para producir el desenmascaramiento antigénico, en tampón citrato (1/10) 3 minutos a 1,5 atm. Inhibir la actividad peroxidasa endógena (metanol + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%). Lavar. Cerclear las preparaciones con sigmacote rodeando el corte, para la retención de líquidos. Bloquear la actividad inespecífica del colágeno (Suero Bovino Fetal (SBF) al 20%). Cubrir los cortes con el primer anticuerpo (anteriormente citados), siempre diluido en SBF. Incubación una hora. Lavar con tampón fosfato salino (PBS). Cubrir los cortes con anticuerpo secundario en dilución 1/2000 en SBF. Incubación 30 minutos. Lavar con PBS. Poner el complejo Avidina-Biotina Peroxidasa (ABC, preparado con 30 min de antelación) diluido en SBF. Incubación 30 minutos. Lavar con PBS. Revelar con diaminobenzidina tetrahidroclorehídrica (DAB) en Tris 0,2M y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en estufa, 37°C, 3 minutos. Lavar en agua corriente. Contrastar con hematoxolina de Harris, 30 segundos. Deshidratar con alcoholes graduales (70°, 80°, 90°) y xiloles. Montar los cubreobjetos con entellan, antes de la observación con microscopio de fluorescencia y confocal.

## 5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos se expresan como media  $\pm$  DS. Para comparar los resultados entre los grupos, se utilizaron los tests no paramétricos de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney. Para el análisis de los datos dentro de cada grupo individual se aplicó la prueba Wilcoxon. Se llevaron a cabo análisis de regresión y el cálculo de coeficientes de determinación ( $R^2$ ) para la cantidad de aquaporinas medidas por western blot y para la cantidad de ARNm. El análisis estadístico se llevó a cabo con la ayuda del paquete estadístico SPSS 16.0. Se asumieron diferencias estadísticamente significativas con valores de  $p < 0,05$ .

<b>Gen</b>	<b>Cebador (5' - 3')</b>	<b>Cebador antisentido (5' - 3)</b>	<b>T<sup>a</sup> (°C)</b>
<b>AQP1</b>	TCTGGAGGCTGTGGTGGCT	AAGTGAGTTCTCGAGCAGGGA	60
<b>AQP5</b>	TGGGTCTTCTGGGTAGGCCTATTGT	GCCGGCTTTGGCACTTGAGATACT	50
<b><math>\beta</math>-Actin</b>	ATCATGTTTGAGACCTTCAACA	CATCTCTTGCTCGAAGTCCA	56

**Tabla 6.** Secuencias de los cebadores de la técnica de RT-PCR y condiciones de temperatura.



# RESULTADOS

## 1. LESIÓN PULMONAR AGUDA INDUCIDA POR VENTILACIÓN MECÁNICA A VOLÚMENES CORRIENTE ELEVADOS

### 1.1 EDEMA PULMONAR

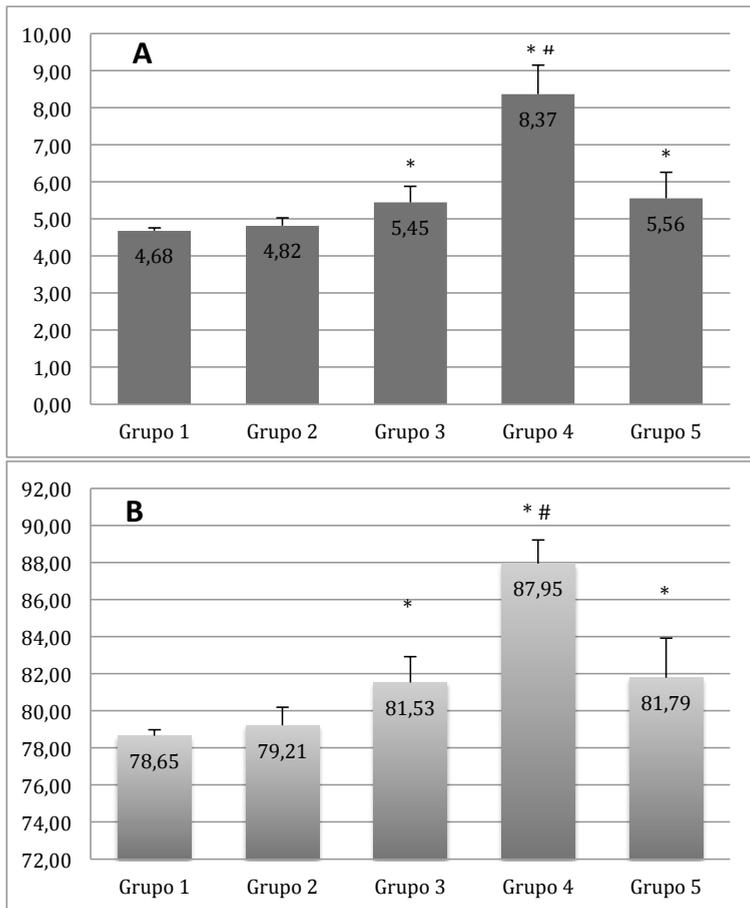
Los resultados de los cocientes entre el peso húmedo y el peso seco (PH/PS) así como el resultado del análisis del porcentaje de agua pulmonar (%<sub>agua</sub>) se resumen en la **figura 14**.

Las ratas ventiladas a 7 ml/Kg (Grupo 2) sufrieron un discreto aumento en el cociente entre el peso húmedo y el peso seco del pulmón en comparación con el grupo de ratas control que no fueron sometidas a ventilación mecánica así como un ligero aumento del porcentaje de agua pulmonar medido, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas en ninguno de los dos valores.

Se puede observar en las representaciones gráficas como las ratas ventiladas a 20 ml/Kg durante 2 horas (grupo 3) comparadas con las ratas ventiladas a 7 ml/Kg de volumen corriente (Grupo 2) o con los controles no ventilados (Grupo 1) desarrollaron un aumento del cociente entre el peso húmedo y el peso seco del parénquima pulmonar y del porcentaje de agua pulmonar; en ambos casos las diferencias fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

En lo que respecta al grupo al que se le administró Cloruro de Mercurio (grupo 4) previo a la ventilación con volúmenes pulmonares elevados (20 ml/Kg) se produjo un aumento aún mayor del cociente entre el peso húmedo y el peso seco y del porcentaje de agua pulmonar. Estas diferencias en también resultaron estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) en comparación en el grupo de ratas ventiladas a 7 ml/Kg (Grupo 2) así como de aquellas ventiladas a 20 ml/Kg exclusivamente (Grupo 3).

Por último, las ratas a las que se les administró cisteína tras el Cloruro de Mercurio (Grupo 5) y fueron ventiladas a 20 ml/kg de volumen corriente, sufrieron un aumento significativo del cociente PH/PS y %<sub>agua</sub> (frente a los Grupos 1 y 2) pero el valor de este fue similar al de los animales ventilados a razón de 20 ml/Kg (Grupo 3), obteniéndose valores iguales a los obtenidos en animales a los que no se les administró Cloruro de Mercurio.



**Figura 14.** Gráficos que representan el contenido de agua pulmonar de los animales del modelo de Lesión Pulmonar inducida por Ventilación Mecánica a Volúmenes Corriente Elevados. A. Gráfico de barras que representa los resultados del cociente entre el peso húmedo y el peso seco (PH/PS) pulmonar. B. Representación gráfica del porcentaje de agua pulmonar (%agua).

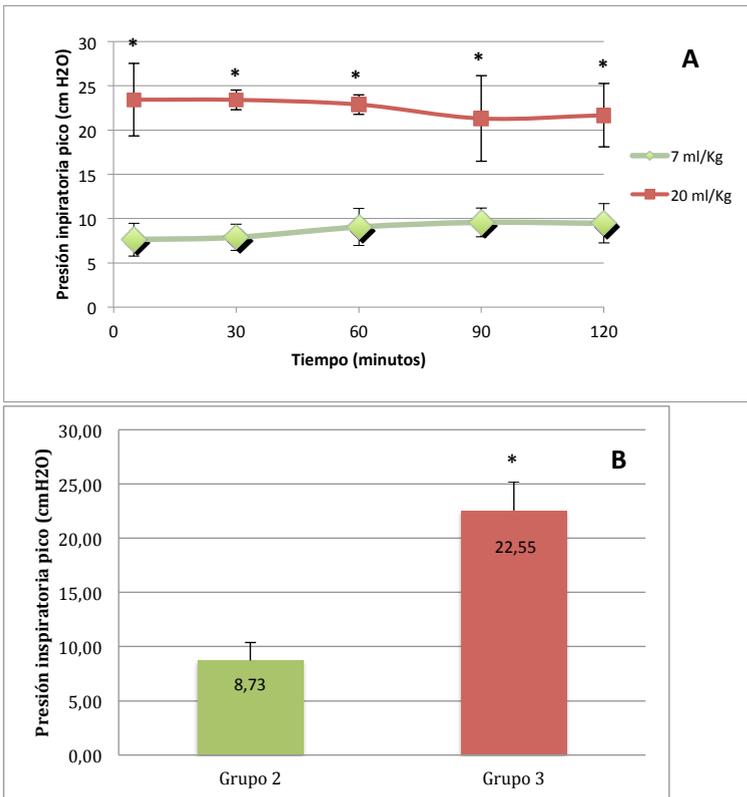
Los valores expresados son la media de cada uno de los grupos de estudio. Las barras de error representan la desviación estándar.

Grupo 1 = Ratas control; Grupo 2 = Ratas ventiladas con volumen corriente de 7 ml/Kg; Grupo 3 = Ratas ventiladas con volumen corriente de 20 ml/Kg; Grupo 4 = Ratas ventiladas con volumen corriente de 20 ml/Kg y pretratadas con Cloruro de Mercurio; Grupo 5 = Ratas ventiladas con volumen corriente de 20 ml/Kg y pretratadas con Cloruro de Mercurio y posteriormente con cisteína.

\* P < 0,05 en comparación con el Grupo 2. # P < 0,05 en comparación con el Grupo 3.

## 1.2 MECÁNICA VENTILATORIA Y PARÁMETROS HEMODINÁMICOS

La presión inspiratoria pico se mantuvo por debajo de los 10 cmH<sub>2</sub>O (8,73 cmH<sub>2</sub>O  $\pm$  1,64 SD) en los animales ventilados a 7 ml/Kg (Grupo 2) y por debajo de los 25 cmH<sub>2</sub>O (22,55 cmH<sub>2</sub>O  $\pm$  2,65 SD) en el grupo ventilado a 20 ml/Kg (Grupo 3). Lógicamente las diferencias entre las Presiones Inspiratorias Pico fueron estadísticamente significativas (*figura 15*).



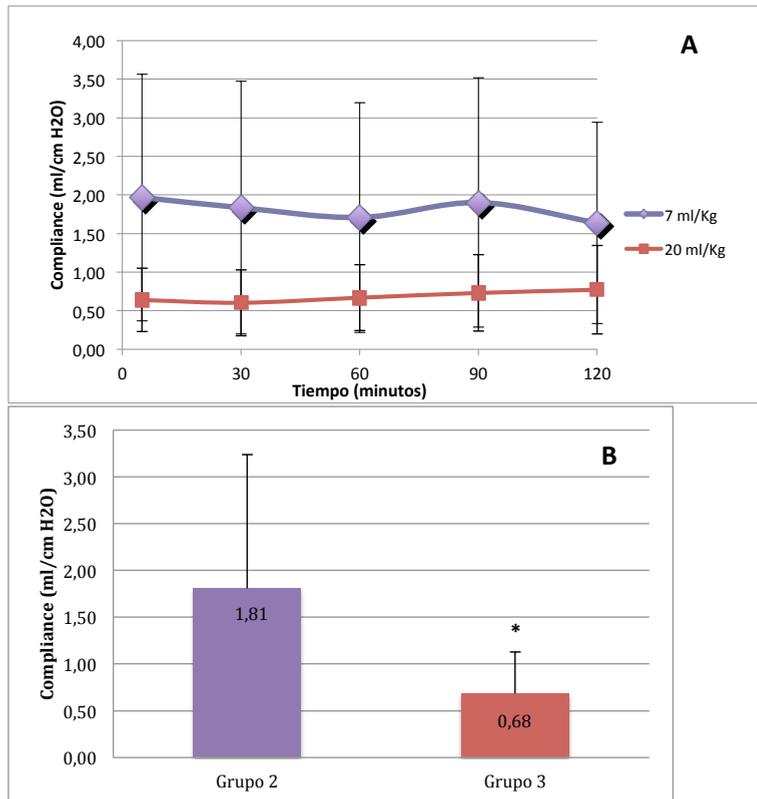
**Figura 15.** Presión inspiratoria pico en los animales del modelo de Lesión Pulmonar inducida por Ventilación Mecánica a Volúmenes Corriente Elevados. Se muestran los resultados de los animales de los Grupos 2 (ventilados a 7 ml/Kg) y 3 (ventilados a 20 ml/Kg). A. Gráfico evolutivo de la presión inspiratoria pico en función del tiempo. B. Representación gráfica del promedio de la Presión inspiratoria pico en los Grupos 2 y 3.

Los valores expresados son la media de cada uno de los grupos de estudio. Las barras de error representan la desviación estándar.

Grupo 2 = Ratas ventiladas con volumen corriente de 7 ml/Kg; Grupo 3 = Ratas ventiladas con volumen corriente de 20 ml/Kg.

\* P < 0,05 en comparación con el Grupo 2.

Los valores de compliancia pulmonar fueron menores en el grupo de ratas ventiladas a 20 ml/kg ( $0,68 \text{ ml/cmH}_2\text{O} \pm 2,65 \text{ SD}$ ) con respecto a aquellas ventiladas a 7 ml/Kg ( $1,81 \text{ ml/cmH}_2\text{O} \pm 1,43 \text{ SD}$ ). Debido a la elevada dispersión en los datos, el análisis evolutivo de estos parámetros en el tiempo no muestra diferencias estadísticamente significativas entre grupos, aunque el análisis de los promedios de este valor en ambos grupos resultó en una  $p < 0,05$ . Ambas representaciones gráficas se muestran en la **figura 16**.



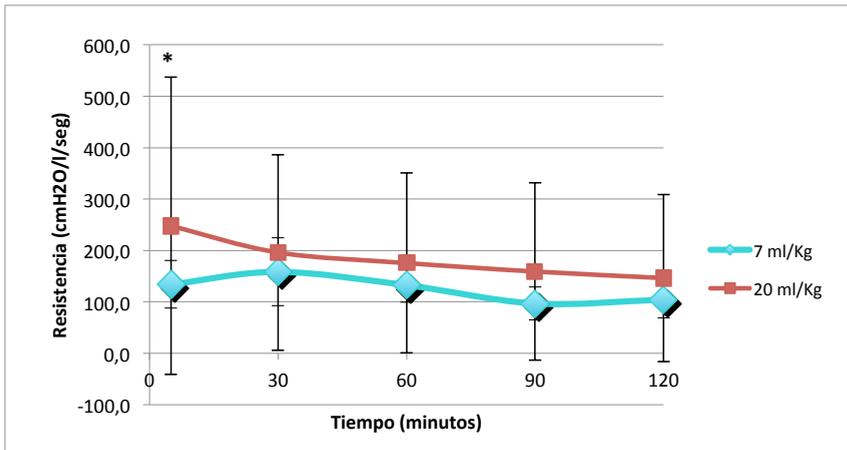
**Figura 16.** Compliancia pulmonar en los animales del modelo de Lesión Pulmonar inducida por Ventilación Mecánica a Volúmenes Corriente Elevados. Se muestran los resultados de los animales de los Grupos 2 (ventilados a 7 ml/Kg) y 3 (ventilados a 20 ml/Kg). A. Gráfico evolutivo de la compliancia pulmonar en función del tiempo. B. Representación gráfica del promedio de la compliancia pulmonar en los Grupos 2 y 3.

Los valores expresados son la media de cada uno de los grupos de estudio. Las barras de error representan la desviación estándar.

Grupo 2 = Ratas ventiladas con volumen corriente de 7 ml/Kg; Grupo 3 = Ratas ventiladas con volumen corriente de 20 ml/Kg.

\*  $P < 0,05$  en comparación con el Grupo 2.

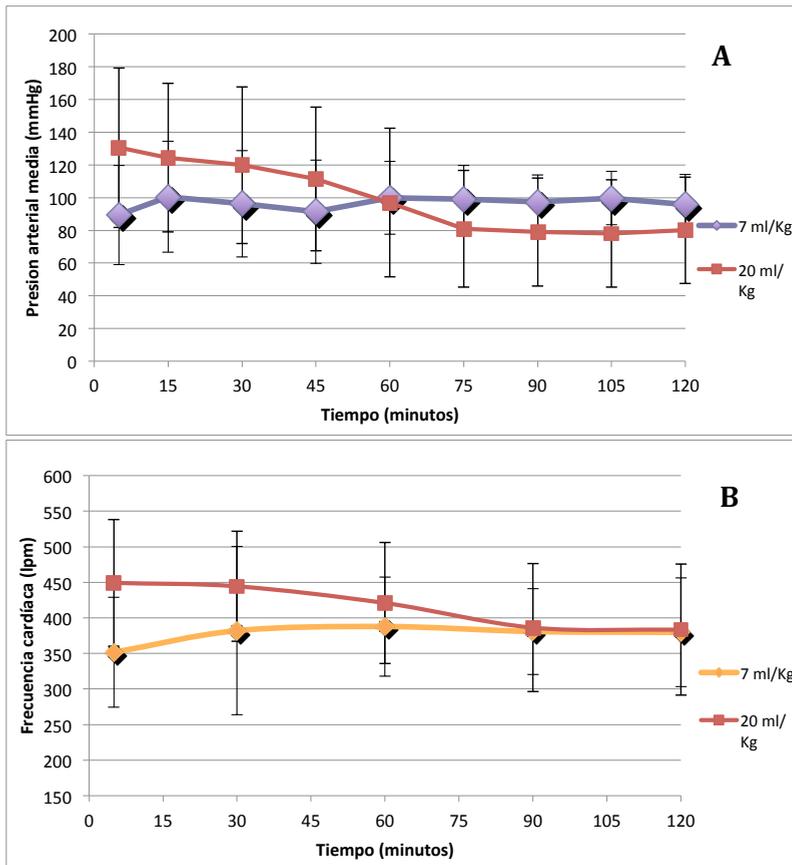
De forma inversa a lo que ocurre con la compliancia, los valores de resistencias pulmonares en el grupo ventilado a 20 ml/Kg (Grupo 3) fueron mayores respecto al Grupo 2 (184,96 cmH<sub>2</sub>O/l/s ± 194,4 SD vs. 125,18 cmH<sub>2</sub>O/l/s ± 47,11 SD), aunque en este caso no se pusieron de manifiesto diferencias significativas en los valores promedio entre ambos grupos. En el análisis de los datos sólo el valor inicial a los cinco minutos de iniciado el experimento mostró una p < 0,05 de los datos del Grupo 3 con respecto al Grupo 2. El resto de puntos del análisis evolutivo no mostró diferencias significativas (*figura 17*).



**Figura 17.** Resistencia pulmonar en los animales del modelo de Lesión Pulmonar inducida por Ventilación Mecánica a Volúmenes Corriente Elevados. Se muestran los resultados de los animales de los Grupos 2 (ventilados a 7 ml/Kg) y 3 (ventilados a 20 ml/Kg) en un gráfico evolutivo en función del tiempo.

\* P < 0,05 en comparación con el Grupo 2.

Las ratas se mantuvieron estables hemodinámicamente durante las dos horas que duró el experimento. No se encontraron diferencias significativas en los valores promedio de PAM (Grupo 2: 96,61 mmHg  $\pm$  23,9 SD vs. Grupo 3: 100,15 mmHg  $\pm$  43,6 SD) ni en los de FC (Grupo 2: 376,40 lpm  $\pm$  74,7 SD vs. Grupo 3: 416,81 lpm  $\pm$  84,2 SD) entre los grupos ventilados a 7 ml/kg de volumen corriente y los ventilados a 20 ml/kg; tampoco se observaron diferencias en el análisis temporal de la variable a lo largo del experimento. Pueden observarse las gráficas en la **figura 18**.



**Figura 18.** Valores evolutivos de los parámetros hemodinámicos en los animales del modelo de Lesión Pulmonar inducida por Ventilación Mecánica a Volúmenes Corriente Elevados. (A) Presión arterial media (PAM) y (B) frecuencia cardíaca (FC) de los grupos 2 (7 ml/Kg) y 3 (20 ml/Kg). Las barras de error representan la desviación estándar.

### 1.3 PARÁMETROS GASOMÉTRICOS

La oxigenación expresada como la relación entre la presión arterial de oxígeno ( $pO_2$ ) y la fracción inspirada de oxígeno ( $FiO_2$ ) se mantuvo en valores considerados normales ( $>300$  mmHg) en ambos grupos a pesar del edema que desarrollaron las ratas ventiladas con volúmenes corrientes de 20 ml/Kg ( $pO_2/FiO_2$  2 horas  $577,43 \pm 99,52$  SD). El aumento del agua pulmonar en las ratas sometidas a volúmenes altos (Grupo 3) no se reflejó como sería de esperar en un empeoramiento de los parámetros de oxigenación. Así tanto la  $pO_2$  como la relación  $pO_2/FiO_2$  mejoraron significativamente con respecto al valor basal en los animales del Grupo 3, así como respecto a los valores obtenidos en las ratas del Grupo 2 a las dos horas, aunque estas no desarrollaron un aumento reseñable del agua pulmonar. Los valores de  $pCO_2$  fueron significativamente más bajos a las 2 horas en el grupo ventilado a 20 ml/Kg respecto al valor inicial (consecuencia de la hiperventilación a la que fueron sometidas). A pesar de ello el pH se mantuvo sin diferencias significativas con respecto a los valores basales. Esto puede explicarse por la presencia de una acidosis metabólica láctica en el grupo 3 ( $p < 0,05$  de los valores de Exceso de Base (ABE) y lactato del Grupo 3 respecto al Grupo 2) que queda compensada con la hiperventilación a la que son sometidos los animales de este grupo. Los resultados gasométricos de ambos grupos se resumen en la **tabla 7**.

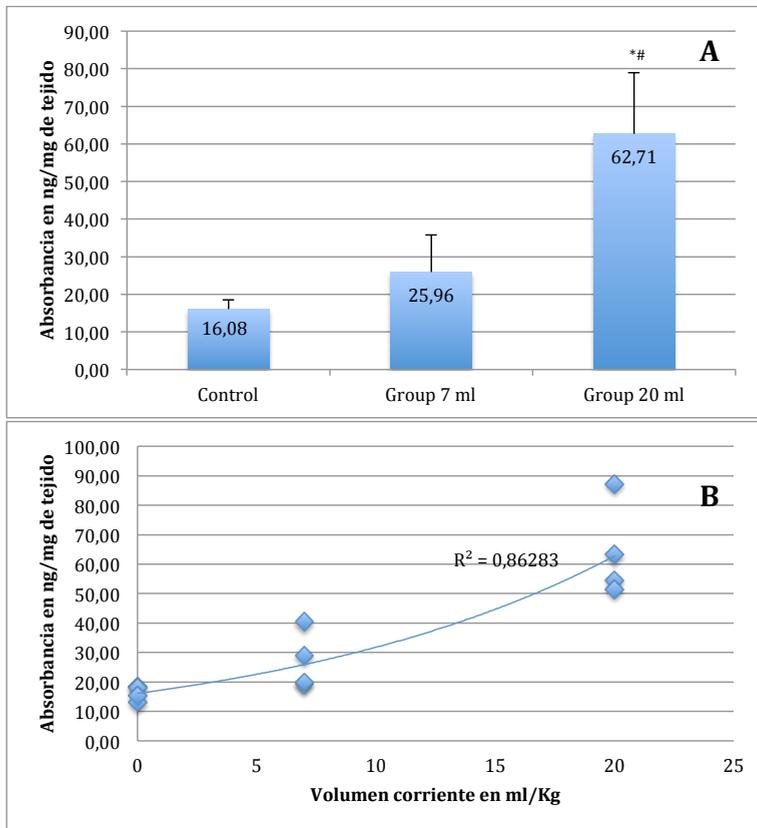
	Grupo 2 (7 ml/Kg)		Grupo 3 (20 ml/Kg)	
	Basal	2 horas	Basal	2 horas
<b>pH</b>	7,35 $\pm$ 0,05	7,21 $\pm$ 0,07	7,35 $\pm$ 0,05	7,45 $\pm$ 0,09 #
<b>pCO2</b>	41,44 $\pm$ 8,01	56,87 $\pm$ 18,04	41,44 $\pm$ 8,01	21,47 $\pm$ 7,14 * #
<b>ABE</b>	-2,37 $\pm$ 2,13	-6,70 $\pm$ 1,61 *	-2,37 $\pm$ 2,13	-7,71 $\pm$ 2,98 *
<b>Lac</b>	2,16 $\pm$ 0,67	1,99 $\pm$ 0,66	2,16 $\pm$ 0,67	5,13 $\pm$ 2,41 * #
<b>pO2</b>	96,03 $\pm$ 18,72	91,56 $\pm$ 16,56	89,04 $\pm$ 5,81	121,29 $\pm$ 21,04 * #
<b>pO2/FiO2</b>	452,00 $\pm$ 89,17	436,86 $\pm$ 79,17	424,14 $\pm$ 27,97	577,43 $\pm$ 99,52 * #

**Tabla 7.** Resultados de los análisis de los gases arteriales en el Grupo 2 (ventilados a 7 ml/Kg) y en el Grupo 3 (ventilados a 20 ml/Kg) en los animales del modelo de Lesión Pulmonar inducida por Ventilación Mecánica a Volúmenes Corriente Elevados. Los valores están expresados como media  $\pm$  desviación estándar.

\*  $P < 0,05$  con respecto al valor basal. #  $p < 0,05$  con respecto al valor del grupo 2.

## 1.4 PERMEABILIDAD MICROVASCULAR

El valor medio de la concentración del colorante Azul de Evans en los pulmones de las ratas ventiladas del Grupo 3 (20 ml/Kg) fue significativamente mayor ( $62,71 \text{ ng/mg} \pm 16,2 \text{ SD}$ ) que el valor obtenido en el Grupo 2 de ratas ventiladas a 7 ml/Kg ( $25,96 \text{ ng/mg} \pm 9,9 \text{ SD}$ ) y que el obtenido en el Grupo 1 de ratas control ( $16,08 \text{ ng/mg} \pm 2,5 \text{ SD}$ ) (**Figura 19A**). No se objetivaron diferencias estadísticamente significativas al comparar los controles (Grupo 1) con las ratas ventiladas a 7 ml/Kg (Grupo 2), aunque si parece existir una tendencia. El análisis de regresión de la concentración de Azul de Evans en función del volumen corriente de la ventilación mecánica demostró la presencia de una relación exponencial entre ambas variables (coeficiente de determinación  $R^2$  de 0,862) estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ) con un aumento de la extravasación de colorante a mayor volumen corriente se usa en la ventilación (**figura 19B**).

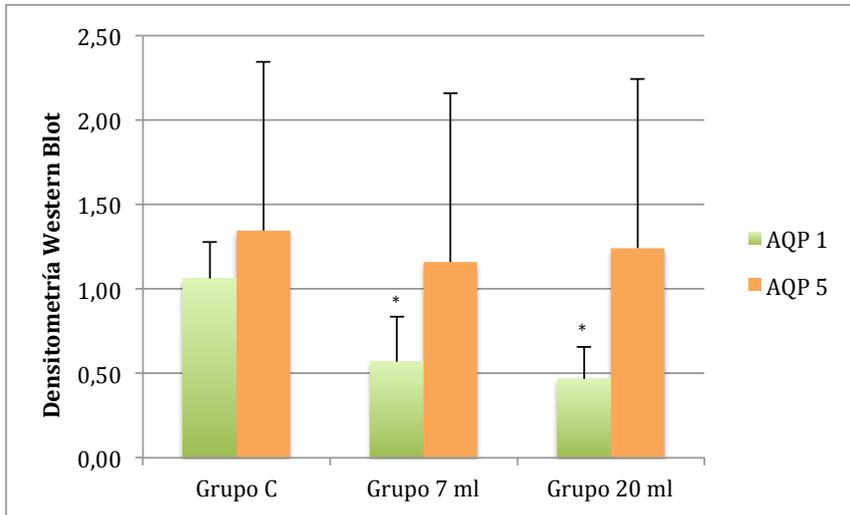


**Figura 19.** (A) Representación gráfica de la absorbancia en ng/mg de tejido pulmonar del colorante Azul de Evans en los animales del modelo de Lesión Pulmonar Inducida por Ventilación Mecánica a Volúmenes Corriente Elevados. (B) Nube de puntos de la concentración de colorante Azul de Evans en función del volumen corriente en ml/Kg usado en la ventilación mecánica en los animales del modelo de Lesión Pulmonar Inducida por Ventilación Mecánica a Volúmenes Corriente Elevados; se muestra también la línea de tendencia que pone de manifiesto una relación lineal de ambas variables.

$R^2$  = coeficiente de determinación. \*  $P < 0,05$  con respecto al valor del grupo control. #  $p < 0,05$  con respecto al valor del grupo 2 (7 ml/Kg)

## 1.5 EXPRESIÓN DE AQUAPORINAS 1 Y 5

En los resultados de la expresión medida por western blot para la AQP 5 no se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a su expresión, en relación con el volumen corriente medido en ml/Kg (*figuras 20 y 22*).



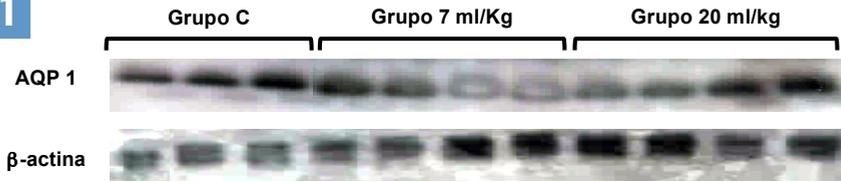
**Figura 20.** Valores de las densitometrías obtenidas de los western blot en los animales del modelo de Ventilación Mecánica a Volúmenes Corriente Elevados. Los valores que se muestran corresponden a la media. Las barras de error representan la desviación estándar.

AQP 1 = Aquaporina 1; AQP 5 = Aquaporina 5.

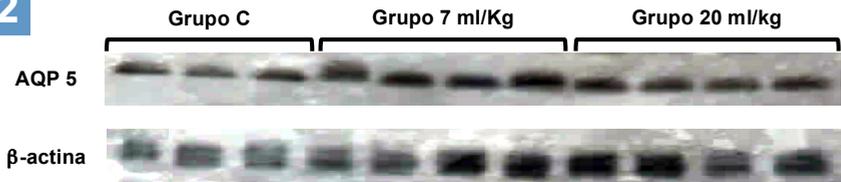
\* P < 0,05 con respecto al valor del Grupo C. # p < 0,05 con respecto al valor del grupo 2H

Para la AQP 1, el test de Kruskal-Wallis mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ( $p < 0,05$ ). El análisis de los diferentes grupos mediante el test de Mann-Whitney arrojó diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de 7 ml/Kg (Grupo 2) y 20 ml/Kg (Grupo 3) con respecto al grupo Control (Grupo C), pero no puso de manifiesto diferencias significativas entre los grupos 2 y 3 (*figuras 20 y 21*). Para caracterizar mejor estas diferencias, se realizó un análisis de regresión de ambas variables. Se obtuvo un coeficiente de correlación R entre el valor de la densitometría y el volumen corriente medido en ml/kg de 0,798, con una coeficiente de determinación  $R^2$  de 0,638, estadísticamente significativo ( $p = 0,006$ ) (*figura 23*).

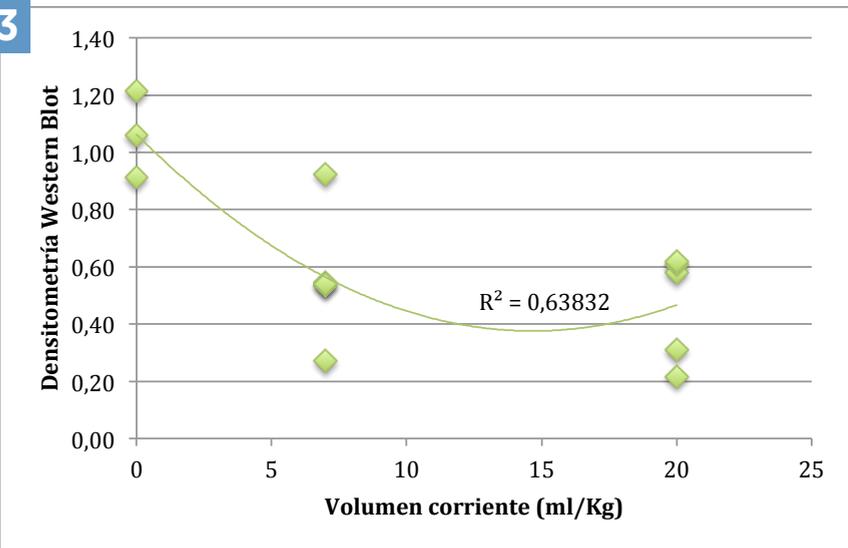
21



22



23

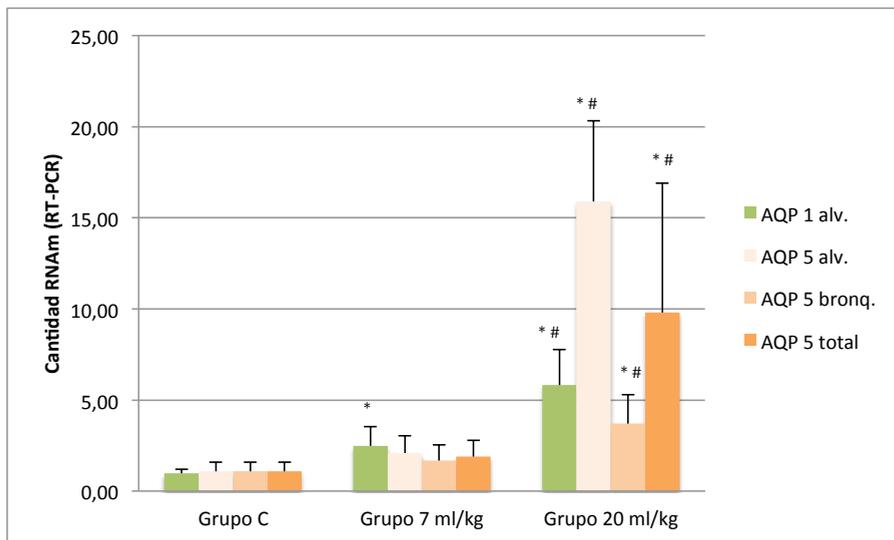


**Figura 21.** Western blot de AQP 1 en el Modelo de Ventilación Mecánica a Volúmenes Corriente Elevados.

**Figura 22.** Western blot de AQP 5 en el Modelo de Ventilación Mecánica a Volúmenes Corriente Elevados.

**Figura 23.** Gráfico de dispersión y línea de regresión de las densitometrías obtenidas en el western blot de la AQP 1 en función del volumen corriente medido en ml/kg en los animales del Modelo de Ventilación Mecánica a Volúmenes Corriente Elevados. El valor corresponde al coeficiente de determinación  $R^2$ .

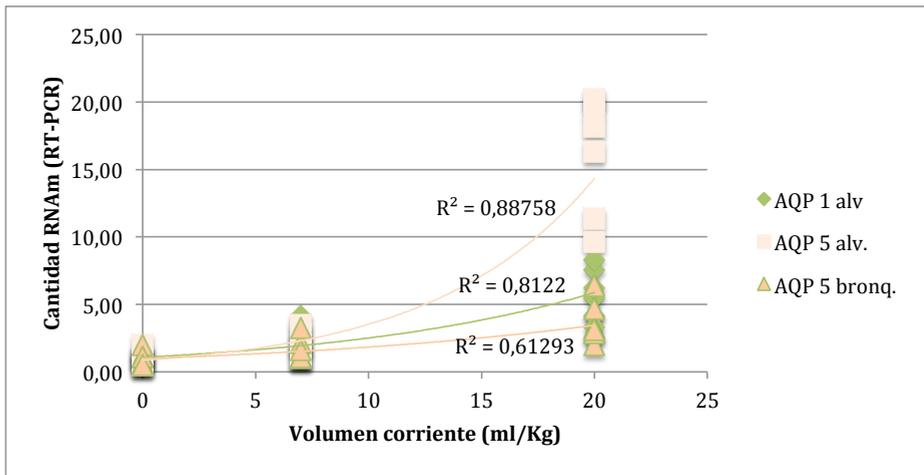
Estos resultados obtenidos en la medición de proteínas contrastan con los obtenidos al determinar la cantidad de ARNm. Los resultados de la RT-PCR reflejaron una tendencia al aumento de la cantidad de ARNm de la AQP-1 a nivel alveolar que resultó estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) entre los grupos 2 y 3 (7 ml/Kg y 20 ml/Kg) con respecto al grupo control. Igualmente se obtuvieron diferencias significativas en la cantidad de ARNm de la AQP-1 entre los grupos 2 y 3 ( $p < 0,05$ ), siendo mayor en este último grupo (**figura 24**). En lo que respecta a la AQP-5, la cantidad de ARNm resultó ser significativamente mayor tanto a nivel alveolar como bronquial en el grupo de 20 ml/kg (Grupo 3) con respecto a los grupos Control y 7 ml/Kg ( $p < 0,05$ ) (**figura 24**). El análisis de regresión arrojó los siguientes coeficientes de determinación:  $R^2_{AQP\ 5\ alv.} = 0,89$  ( $p < 0,001$ ),  $R^2_{AQP\ 5\ bronq.} = 0,61$  ( $p < 0,001$ ) y  $R^2_{AQP\ 1\ alv.} = 0,812$  ( $p < 0,001$ ) (**figura 25**).



**Figura 24.** Representación de la cantidad de ARNm medido por RT-PCR en los animales del modelo de Ventilación Mecánica a Volúmenes Corriente Elevados.

\*  $P < 0,05$  con respecto al valor del Grupo C

#  $p < 0,05$  con respecto al valor del grupo 7 ml/kg



**Figura 25.** Gráfico de dispersión y rectas de regresión de la cantidad de ARNm medido por RT-PCR de la AQP1 alveolar y de la AQP5 alveolar y bronquial en función del volumen corriente medido en ml/kg en los animales del modelo de Ventilación Mecánica a Volúmenes Corriente Elevados.

Los valores que se muestran corresponden coeficientes de dispersión  $R^2$  de cada uno de los ajustes de regresión lineal.

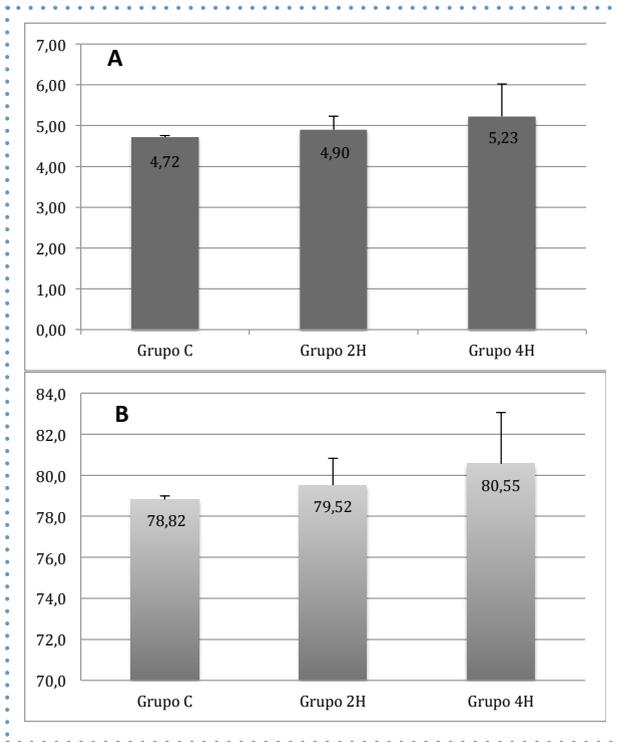
alv. = Alveolar; bronq. = Bronquial

## 2. VENTILACIÓN MECÁNICA PROLONGADA A VOLÚMENES CORRIENTES NO LESIVOS

### 2.1 EDEMA PULMONAR

Al analizar los resultados del agua pulmonar en el modelo de Ventilación Mecánica Prolongada a Volúmenes Corrientes No Lesivos no se objetivaron diferencias significativas entre los tres grupos de estudio ni en el cociente entre peso húmedo y peso seco (Grupo C:  $4,72 \pm 0,04$  SD vs. Grupo 2H:  $4,90 \pm 0,33$  SD vs. Grupo 4H:  $5,23 \pm 0,79$  SD) ni en el porcentaje de agua pulmonar (Grupo C:  $78,82 \pm 0,16$  SD vs. Grupo 2H:  $79,52 \pm 1,31$  SD vs. Grupo 4H:  $80,55 \pm 2,50$  SD), aunque sí que parece observarse una tendencia al aumento en ambos parámetros. Los

resultados del cociente entre el peso húmedo y el peso seco así como el valor del porcentaje de agua pulmonar se representan gráficamente en la **figura 26**.



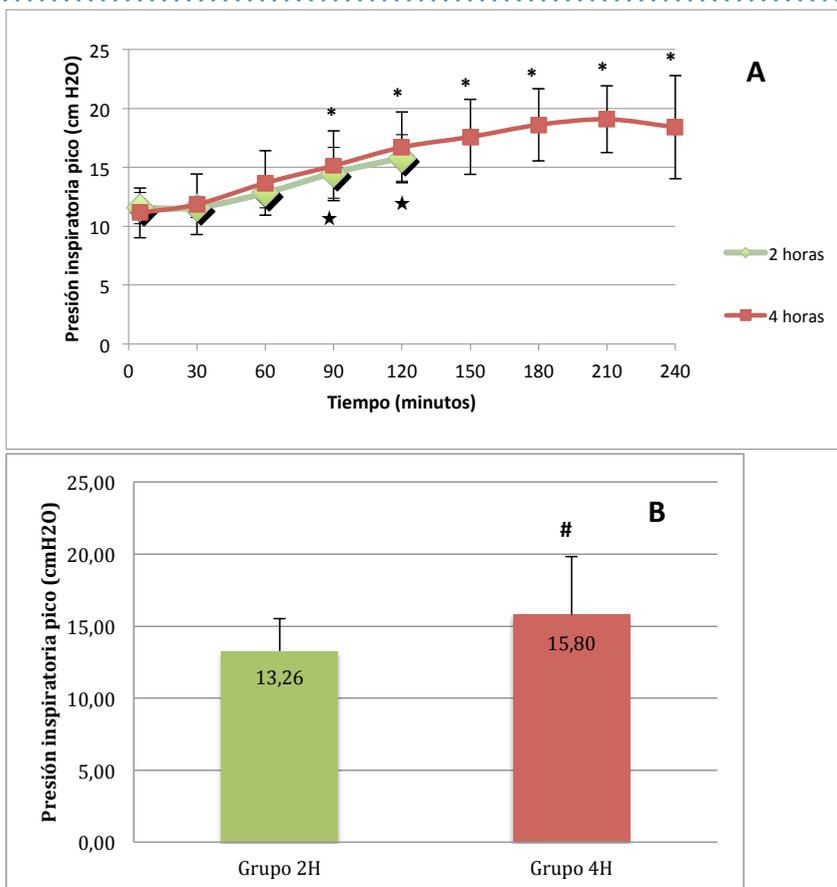
**Figura 26.** Gráficos que representan el contenido de agua pulmonar de los animales del modelo de Ventilación Mecánica Prolongada a Volúmenes Corriente No Lesivos. A. Gráfico de barras que representa los resultados del cociente entre el peso húmedo y el peso seco (PH/PS) pulmonar. B. Representación gráfica del porcentaje de agua pulmonar (%agua).

Los valores expresados son la media de cada uno de los grupos de estudio. Las barras de error representan la desviación estándar.

Grupo C = Ratas control; Grupo 2H = Ratas ventiladas con volumen corriente de 10 ml/Kg durante 2 horas; Grupo 4H = Ratas ventiladas con volumen corriente de 10 ml/Kg durante 4 horas

## 2.2 MECÁNICA VENTILATORIA Y PARÁMETROS HEMODINÁMICOS

La presión inspiratoria pico sufrió un aumento progresivo en ambos grupos de animales sometidos a ventilación mecánica (Grupo 2H y Grupo 4H), encontrando unos valores de significativamente mayores ( $p < 0,05$ ) a partir de los 90 minutos de iniciado el experimento cuando se comparan con los valores basales de cada uno de los grupos (**figura 27**). Al comparar los valores promedio de las presiones inspiratorias pico de ambos grupos observamos que la presión del grupo sometido a cuatro horas de ventilación (Grupo 4H) es significativamente mayor que la presión promedio del grupo sometido a 2 horas de ventilación mecánica con un valor de  $p < 0,05$  (Grupo 2H:  $13,26 \text{ cmH}_2\text{O} \pm 2,27 \text{ SD}$  vs. Grupo 4H:  $15,80 \text{ cmH}_2\text{O} \pm 2,27 \text{ SD}$ ).



**Figura 27.** Presión inspiratoria pico en los animales del modelo de Ventilación Mecánica Prolongada a Volúmenes Corriente No Lesivos. Se muestran los resultados de los animales de los Grupos 2H (ventilados durante 2 horas) y 4H (ventilados durante 4 horas). A. Gráfico evolutivo de la presión inspiratoria pico en función del tiempo. B. Representación gráfica del promedio de la Presión inspiratoria pico en los Grupos 2H y 4H.

Los valores expresados son la media de cada uno de los grupos de estudio. Las barras de error representan la desviación estándar.

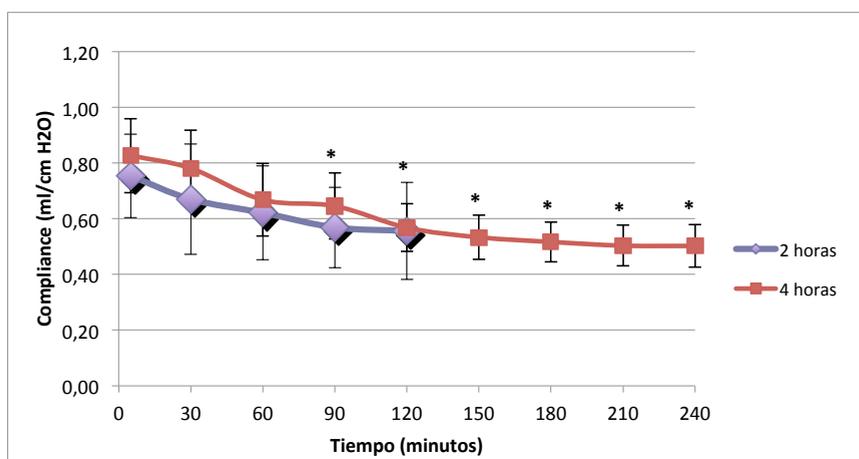
Grupo 2H = Ratas ventiladas con volumen corriente de 10 ml/Kg durante 2 horas; Grupo 4H = Ratas ventiladas con volumen corriente de 10 ml/Kg durante 4 horas.

p < 0,05 con respecto al valor basal del grupo 2H

\* p < 0,05 con respecto al valor basal del grupo 4H

# p < 0,05 con respecto al grupo 2H

La compliancia pulmonar registró un descenso progresivo en ambos grupos a medida que transcurría el tiempo del experimento. Este descenso fue significativamente menor con respecto al valor inicial ( $p < 0,05$ ) en el grupo de animales ventilados durante cuatro horas (Grupo 4H) a partir del minuto 90 de experimento. En el grupo de animales ventilados durante 2 horas (Grupo 2H) aunque también se ve una tendencia al descenso en función del tiempo, este no es significativo estadísticamente. Al comparar los promedios de compliancia pulmonar entre ambos grupos no se objetivaron diferencias significativas entre los animales del Grupo 2h y los del Grupo 4H (Grupo 2H:  $0,63 \text{ ml/cmH}_2\text{O} \pm 0,18 \text{ SD}$  vs. Grupo 4H:  $0,62 \text{ ml/cmH}_2\text{O} \pm 0,15 \text{ SD}$ ). En la **figura 28** se muestra la representación gráfica de los parámetros de compliancia pulmonar en los animales ventilados durante 2 y 4 horas.



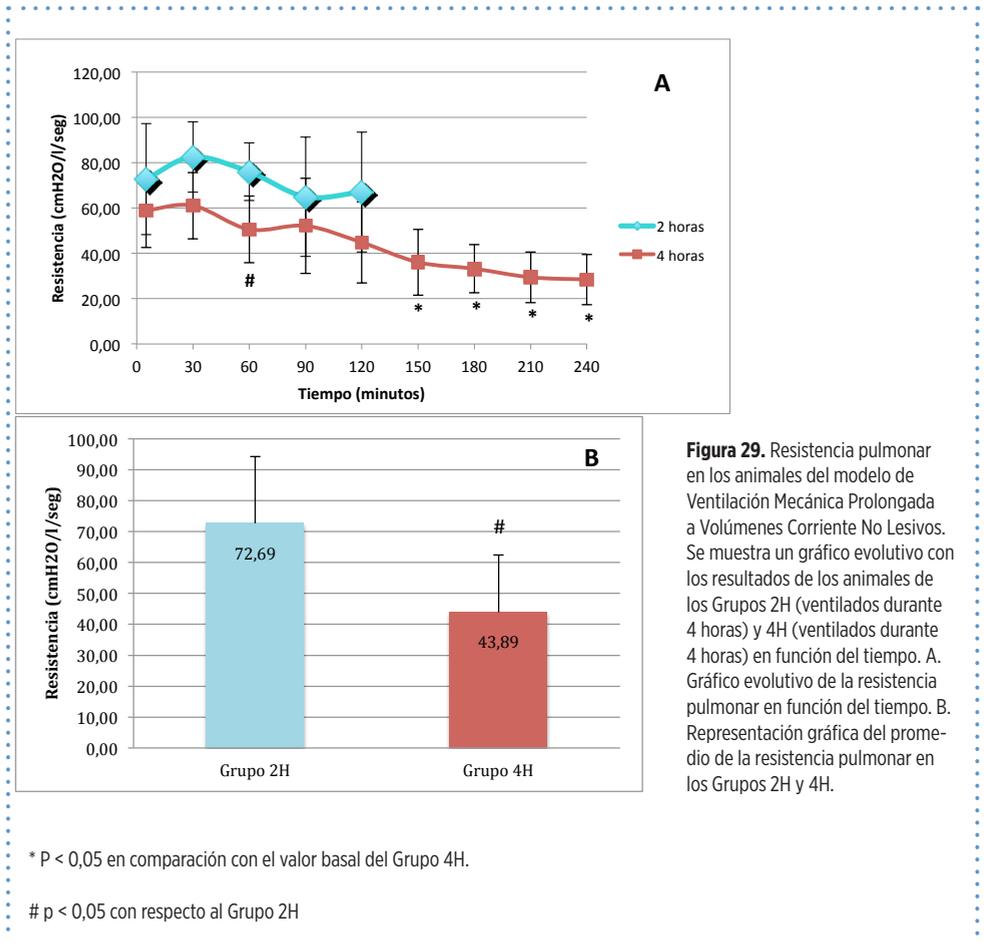
**Figura 28.** Compliancia pulmonar en los animales del modelo de Ventilación Mecánica Prolongada a Volúmenes Corriente No Lesivos. Se muestra un gráfico evolutivo con los resultados de los animales de los Grupos 2H (ventilados durante 4 horas) y 4H (ventilados durante 4 horas) en función del tiempo. Las barras de error representan la desviación estándar.

Grupo 2 = Ratas ventiladas con volumen corriente de 7 ml/Kg; Grupo 3 = Ratas ventiladas con volumen corriente de 20 ml/Kg.

\*  $p < 0,05$  con respecto al valor basal del grupo 4H

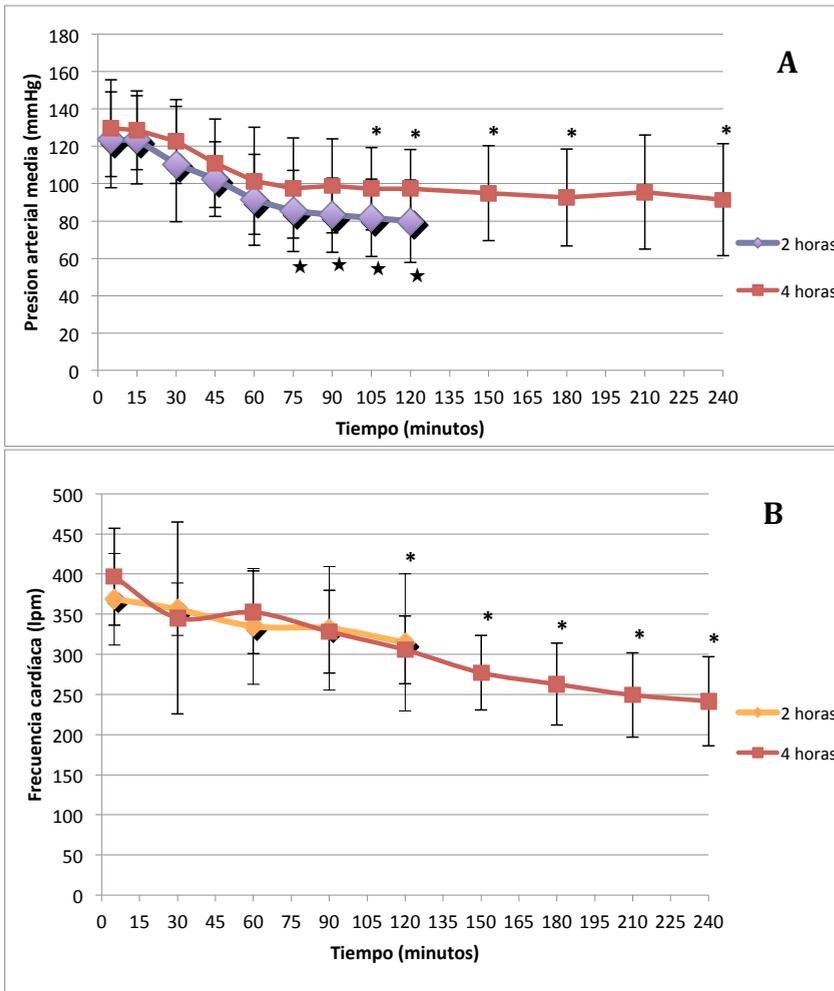
Las resistencias del sistema respiratorio se muestran en la **figura 29**. No se encontraron diferencias reseñables entre los valores de los Grupos 2H y 4H al analizar su evolución en función del tiempo, aunque en los dos grupos se objetiva una tendencia descendente. En los animales ventilados durante 4 horas, la tendencia descen-

dente de los valores arroja diferencias estadísticamente significativas con respecto al valor basal a partir del minuto 150 de experimento. Analizando los valores promedio de los Grupos 2H y 4H observamos menores resistencias pulmonares en el Grupo 4H (43,89 cmH<sub>2</sub>O/l/s ± 18,60 SD) que en el Grupo 2H (72,69 cmH<sub>2</sub>O/l/s ± 21,63 SD) con un valor de  $p < 0,05$ .



Al igual que se observó en el modelo animal de Lesión Pulmonar Aguda Inducida por Ventilación Mecánica a Volúmenes Corriente Elevados, las ratas se mantuvieron hemodinámicamente estables durante la todo el tiempo del experimento en ambos grupos. No se encontraron diferencias significativas en los valores promedio

de presión arterial media (Grupo 2H: 97,95 mmHg  $\pm$  27,75 SD vs. Grupo 4H: 104,53 mmHg  $\pm$  27,54 SD) ni en los de frecuencia cardíaca (Grupo 2H: 341,29 lpm  $\pm$  66,73 SD vs. Grupo 4H: 306,52 lpm  $\pm$  78,11 SD) entre los animales ventilados durante 2 horas y los ventilados durante 4 horas. Si que se puede observar un descenso de la Presión Arterial Media (PAM) en el Grupo 2H con respecto al valor basal que se hace estadísticamente significativo a partir de los 75 minutos de iniciado el experimento. De manera similar en el Grupo 4H se objetiva un descenso de la PAM en la parte final del experimento significativo a partir del minuto 105 de experimento y un descenso de las cifras de FC significativo a partir del minuto 120 (*figura 30*).



**Figura 30.** Valores evolutivos de los parámetros hemodinámicos en los animales del modelo de Ventilación Mecánica Prolongada a Volúmenes Corriente No Lesivos. (A) Presión arterial media (PAM) y (B) frecuencia cardíaca (FC) de los grupos 2H (ventilados durante 2 horas) y 4H (ventilados durante 4 horas). Las barras de error representan la desviación estándar.

p < 0,05 con respecto al valor basal del grupo 2H. \* p < 0,05 con respecto al valor basal del grupo 4H

## 2.3 PARÁMETROS GASOMÉTRICOS

Los resultados gasométricos de los Grupos 2H (ventiladas durante 2 horas) y 4H (ventiladas durante 4 horas) se resumen en la **tabla 8**. No se han objetivado diferencias estadísticamente significativas en los parámetros de equilibrio ácido-base (pH, pCO<sub>2</sub>, Exceso de Bases (ABE) y lactato) dentro de los grupos de estudio ni tampoco diferencias entre los parámetros de ambos grupos, aunque si parece existir una tendencia hacia la aparición de acidosis de componente mixto conforme aumenta el tiempo de ventilación. En lo referente a la oxigenación podemos observar una tendencia a la disminución de la pO<sub>2</sub> y del cociente pO<sub>2</sub> / FiO<sub>2</sub> a las dos horas respecto al valor basal en el Grupo 2H y algo más marcada a las 4 horas respecto al valor inicial en el Grupo 4H, aunque ninguna de estas diferencias adquirió significación estadística.

	Grupo 2H (2 horas)		Grupo 4H (4 horas)	
	Basal	2 horas	Basal	4 horas
<b>pH</b>	7,29 ± 0,05	7,21 ± 0,07	7,30 ± 0,05	7,23 ± 0,07
<b>pCO<sub>2</sub></b>	47,96 ± 3,56	56,87 ± 18,04	47,33 ± 8,51	52,84 ± 7,73
<b>ABE</b>	-3,96 ± 2,02	-6,70 ± 1,61 *	-3,70 ± 2,72	-6,26 ± 4,20
<b>Lac</b>	2,08 ± 0,62	1,99 ± 0,66	1,79 ± 0,74	1,91 ± 1,24
<b>pO<sub>2</sub></b>	93,30 ± 17,72	91,56 ± 16,56	97,28 ± 15,76	83,03 ± 24,27
<b>pO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub></b>	444,38 ± 84,62	436,86 ± 79,17	462,78 ± 74,61	395,22 ± 115,30

**Tabla 8.** Resultados de los análisis de los gases arteriales en el Grupo 2H (ventilados a 10 ml/Kg durante 2 horas) y en el Grupo 4H (ventilados a 10 ml/Kg durante 4 horas). Los valores están expresados como media ± desviación estándar.

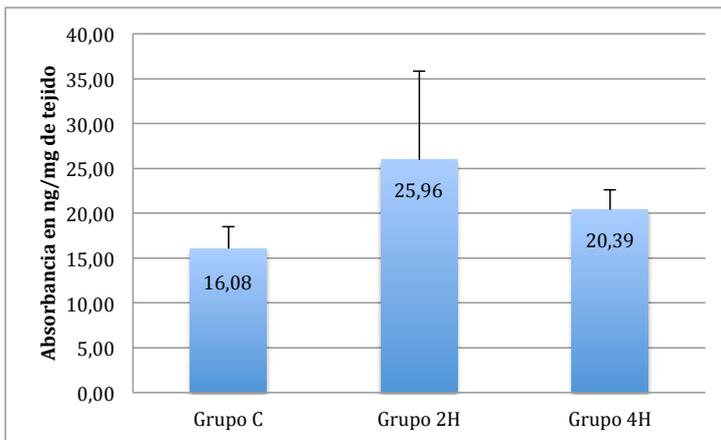
Grupo 2H = Ventiladas durante 2 horas; Grupo 4H = Ventiladas durante 4 horas

\* P < 0,05 con respecto al valor basal

# p < 0,05 con respecto al valor del grupo 2H

## 2.4 PERMEABILIDAD MICROVASCULAR

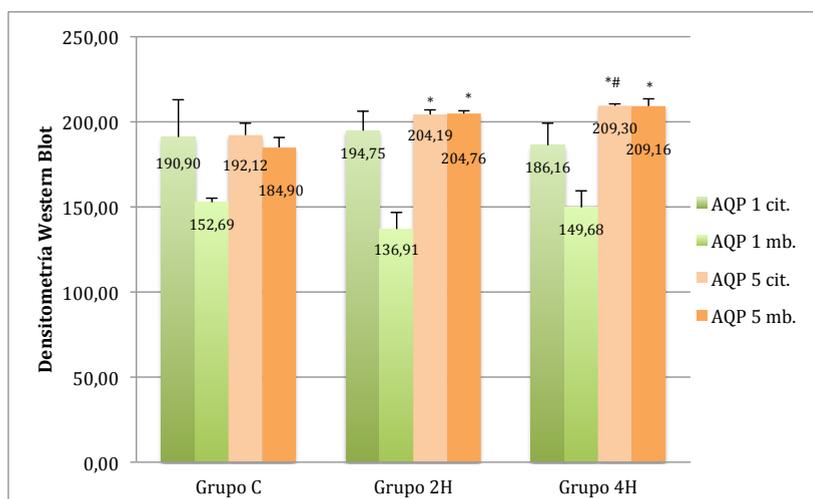
La Ventilación Mecánica a Volúmenes Corriente No Lesivos en nuestro modelo animal no provocó un aumento significativo de la permeabilidad microvascular determinada por el método de medición del colorante Azul de Evans en el tejido pulmonar. Los valores de absorbancia de colorante Azul de Evans en el tejido pulmonar encontrados fueron 16,08 ng/mg  $\pm$  2,45 SD en el Grupo C (ratas control no ventiladas), 25,96 ng/mg  $\pm$  9,90 SD en el Grupo 2H (ratas ventiladas durante 2 horas) y 20,39 ng/mg  $\pm$  2,20 SD en el Grupo 4H (ratas ventiladas durante 4 horas). Estos resultados se representan gráficamente en la **figura 31**.



**Figura 31.** Representación gráfica de la absorbancia en ng/mg de tejido pulmonar del colorante Azul de Evans en los animales del modelo de Ventilación Mecánica Prolongada a Volúmenes Corriente No Lesivos. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio.

## 2.5 EXPRESIÓN DE AQUAPORINAS 1 Y 5

En los resultados de la expresión medida por *western blot* para la AQP 1, tanto en membrana como en citoplasma, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a su expresión, en relación con el tiempo de ventilación mecánica (*figuras 32 y 33*).



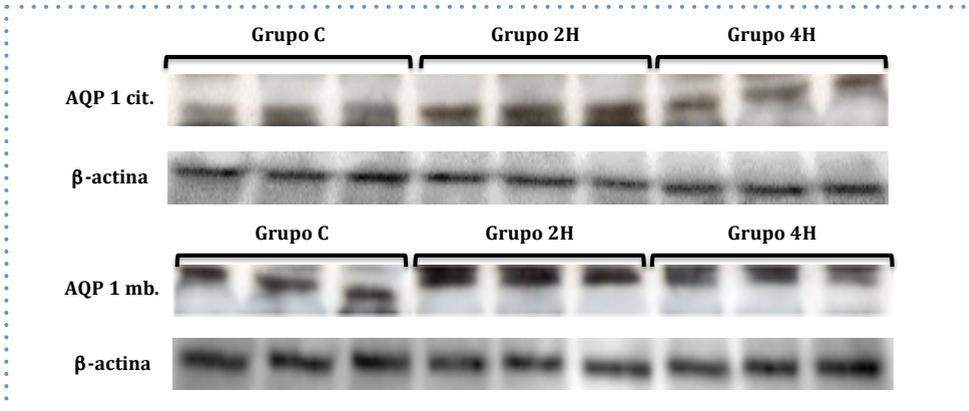
**Figura 32.** Valores de las densitometrías obtenidas de los western blot en los animales del modelo de Ventilación Mecánica Prolongada a Volúmenes Corriente No Lesivos. Los valores que se muestran corresponden a la media. Las barras de error representan la desviación estándar.

AQP 1 cit. = Aquaporina 1 citosólica; AQP 1 mb. = Aquaporina 1 de membrana; AQP 5 cit. = Aquaporina 5 citosólica; AQP 5 mb. = Aquaporina 5 de membrana.

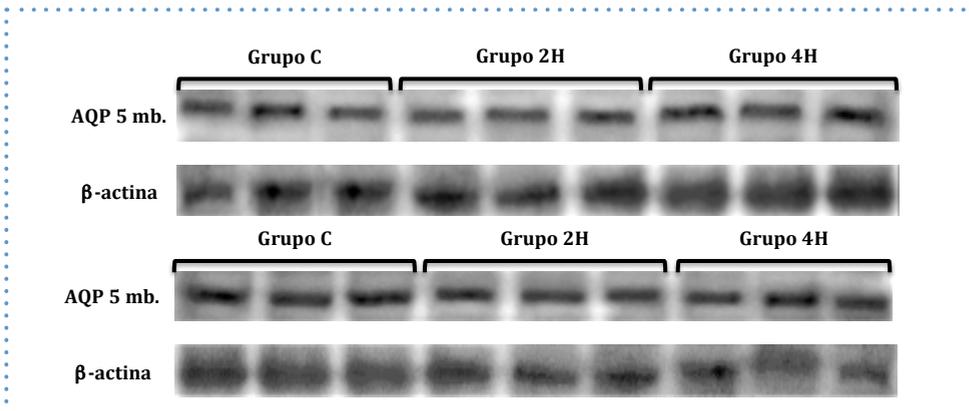
\* P < 0,05 con respecto al valor del Grupo C. # p < 0,05 con respecto al valor del grupo 2H

Para la AQP 5 citosólica (AQP-5 cit.), el test de Kruskal-Wallis mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ( $p = 0,001$ ) (*figuras 32 y 34*). Para caracterizar mejor estas diferencias, se realizó un análisis de regresión de ambas variables, obteniéndose un coeficiente de correlación R entre el valor de la densitometría y el tiempo de VM de 0,948, con una coeficiente de determinación  $R^2 = 0,90$  (el 90% de los cambios en el valor de la densitometría se debe únicamente a la variable tiempo de VM), con un promedio de aumento de la densitometría de 19,826 a las 2h (IC 95% = 11,199 – 28,453), y un aumento a las 4 h de 24,265 (IC95% = 15,638 – 32,892). Para la AQP 5 en membrana (AQP-5 mb.) el Anova mostró

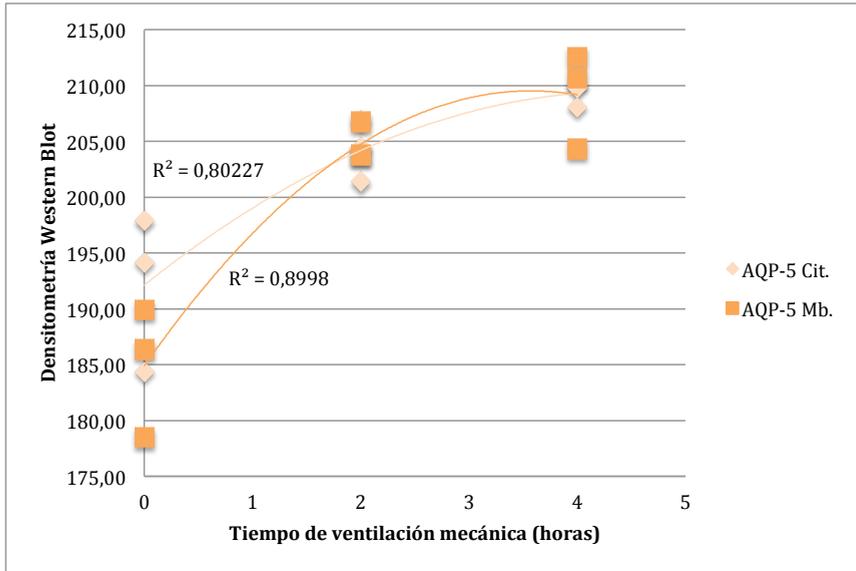
diferencias estadísticamente significativas ( $p= 0,008$ ) entre los Grupos 2H y 4H con respecto al valor del Grupo C. El análisis de regresión (*figura 35*) mostró una fuerte correlación entre las dos variables ( $R= 0,896$ ;  $R^2 = 0,804$ ), mostrando un aumento de la densitometría de 12.066 a las 2h (IC 95%= 3,265 – 20,866), y de 17,396 a las 4h (IC 95%= 8,595 – 26,197).



**Figura 33.** Western blot de AQP 1 citosólica y de membrana en el modelo de Ventilación Mecánica Prolongada a Volúmenes Corriente No Lesivos.



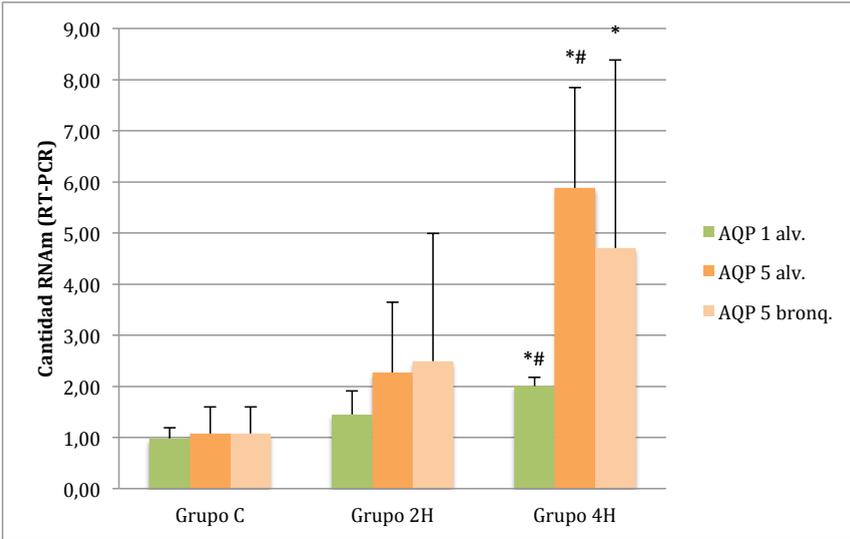
**Figura 34** Western blot de AQP 5 citosólica y de membrana en el modelo de Ventilación Mecánica Prolongada a Volúmenes Corriente No Lesivos.



**Figura 35.** Gráfico de dispersión y líneas de regresión de las densitometrías obtenidas en el western blot de la AQP 5 de membrana y citosólica en función del tiempo en los animales del modelo de Ventilación Mecánica Prolongada a Volúmenes Corriente No Lesivos. Los valores que se muestran corresponden coeficientes de determinación  $R^2$  de cada uno de los ajustes de regresión lineal.

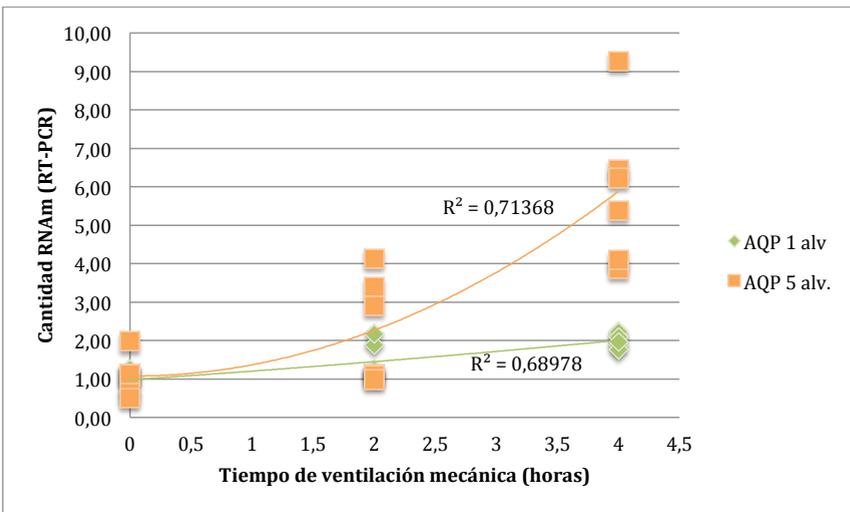
AQP 5 cit. = Aquaporina 5 citosólica; AQP 5 mb. = Aquaporina 5 de membrana.

Los resultados de la RT-PCR reflejaron una tendencia al aumento de la cantidad de ARNm de la AQP-1 a nivel alveolar que resultó estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) en el Grupo 4H comparado con los Grupos C y 2H. En lo referente a la AQP 5, de manera similar a lo que ocurre con el ARNm en la AQP 1 alveolar, observamos un aumento de la cantidad de ARNm tanto a nivel alveolar como bronquial en los Grupos 2H y 4H con respecto al Grupo C de animales control aunque este aumento sólo es estadísticamente significativo a nivel alveolar en el Grupo 4H ( $p < 0,05$ ) (**figura 36**). El análisis de regresión arrojó unos coeficientes de determinación ( $R^2$ ) de la cantidad de ARNm de la AQP 5 y AQP 1 alveolar en función del tiempo de ventilación mecánica bajos ( $R^2_{AQP\ 5\ alv.} = 0,71$  y  $R^2_{AQP\ 1\ alv.} = 0,69$ ) (**figura 37**).



**Figura 36.** Representación de la cantidad de ARNm medido por RT-PCR en los animales del modelo de Ventilación Mecánica Prolongada a Volúmenes Corriente No Lesivos.

\* P < 0,05 con respecto al valor del Grupo C. # p < 0,05 con respecto al valor del grupo 2H

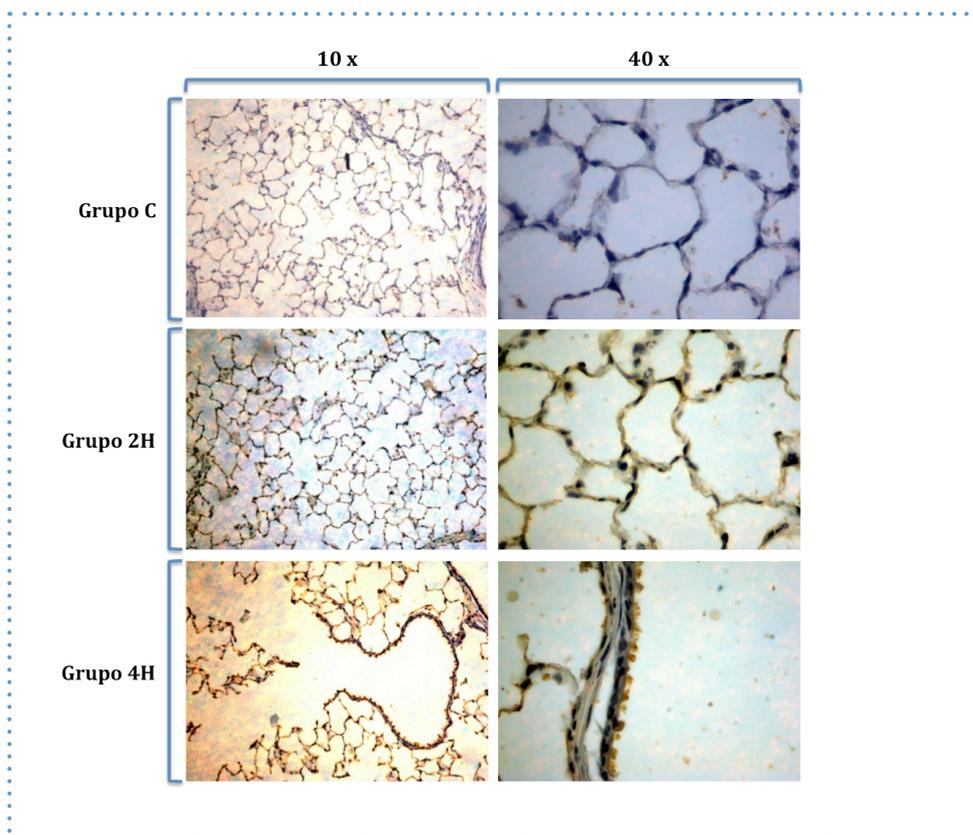


**Figura 37.** Gráfico de dispersión y rectas de regresión de la cantidad de ARNm medido por RT-PCR de la AQP 1 y AQP 5 alveolares en función del tiempo de ventilación mecánica en los animales del modelo de Ventilación Mecánica Prolongada a Volúmenes Corriente No Lesivos.

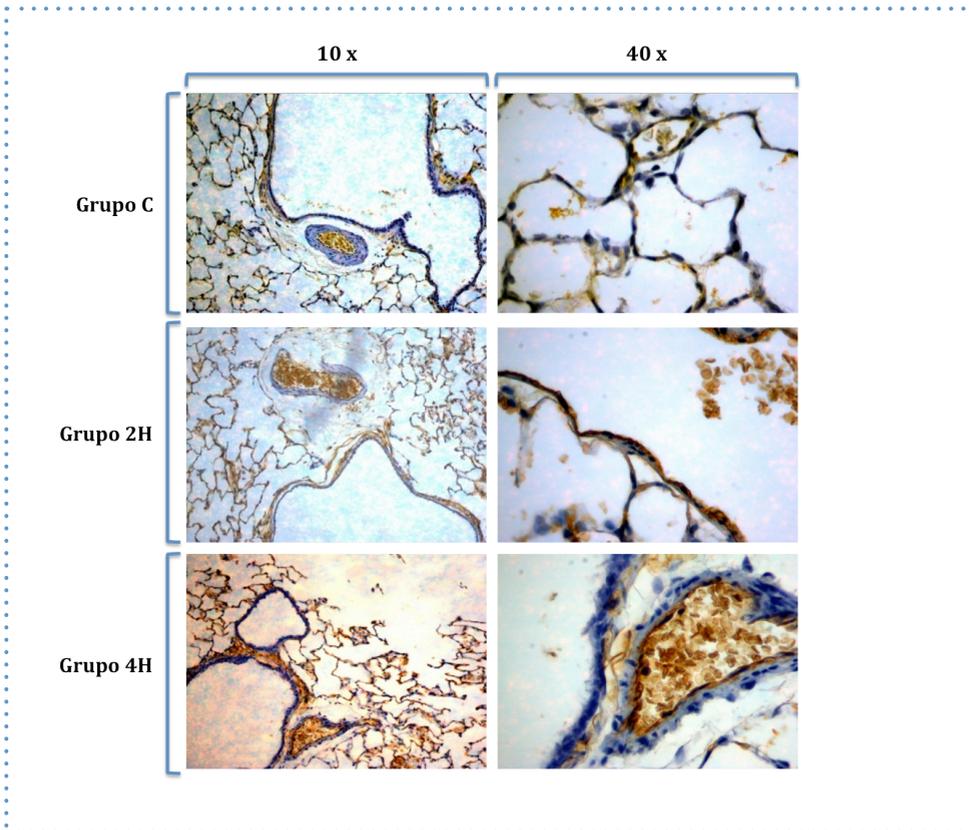
Los valores que se muestran corresponden coeficientes de determinación  $R^2$  de cada uno de los ajustes de regresión lineal.

alv. = Alveolar

Las preparaciones que se destinaron al marcaje inmunohistoquímico revelan como se tiñen las membranas de los neumocitos I, delimitando todo el entramado alveolar pulmonar, cuando el target es la AQP 5. La tinción es más evidente conforme aumenta el tiempo de exposición a la VM de las muestras (**figura 38**). En aquellas en las que se marcó la AQP 1, la tinción revela la disposición del entramado microvascular formado por los capilares alveolares, al encontrarse la AQP-1 tanto en la célula endotelial como en los propios hematíes, sin teñirse los neumocitos que tapizan el alveolo. En este caso, en el análisis de visu no parece existir un aumento de tinción evidente relacionado con el tiempo de exposición a la ventilación mecánica (**figura 3**)



**Figura 38.** Inmunohistoquímica de la AQP 5 en los animales del modelo de Ventilación Mecánica Prolongada a Volúmenes Corrientes No Lesivos. La tinción delimita perfectamente el entramado alveolar y la superficie de los neumocitos tipo I. Se puede apreciar un aumento de la intensidad de la tinción a mayor tiempo de exposición a la ventilación mecánica (Grupos 2H y 4H).



**Figura 39.** Inmunohistoquímica de la AQP 1 en los animales del modelo de Ventilación Mecánica Prolongada a Volúmenes Corrientes No Lesivos. La tinción delimita el entramado microvascular que configuran los capilares alrededor de los alveolo, en el endotelio de los cuales se expresan preferentemente las AQP-1, así como también en los eritrocitos. Se puede observar la ausencia de tinción de los neumocitos tipo I.



## 1. LESIÓN PULMONAR AGUDA INDUCIDA POR VENTILACIÓN MECÁNICA A VOLÚMENES CORRIENTE ELEVADOS

Por lo que se observa en los datos obtenidos en nuestro experimento, la ventilación mecánica a volúmenes corrientes de 20 ml/Kg produce lesión pulmonar de carácter agudo en ratas y con ello edema y por tanto como producto de esto un incremento del valor del cociente entre el peso húmedo y el peso seco pulmonar y de manera análoga, del porcentaje de agua pulmonar. Estos resultados son similares a los presentados previamente por otros grupos (Hales CA et al. 2001). Según un modelo publicado por Marini y Gattinoni (Marini JJ and Gattinoni L. 2004), sin necesidad de que se produzcan presiones intratorácicas elevadas, los cambios en la tensión y deformación de los tejidos pulmonares que se producen en los diferentes ciclos respiratorios son capaces de inducir fenómenos de auténtica ruptura de las paredes alveolares, así como fenómenos de mecanotransducción y liberación de mediadores inflamatorios que pasan a la circulación pulmonar y sistémica, y que son capaces de producir lesión pulmonar y sobre órganos a distancia del pulmón. No es necesario el empleo de grandes volúmenes corrientes para inducir estos fenómenos de estiramiento pulmonar. Parece que el mecanismo por el que se genera la lesión pulmonar inducida por ventilación mecánica es la distensión pulmonar más que el aumento de la presión en si mismo, como demuestran algunos trabajos con animales (Dreyfuss D. 1998). Aunque los niveles de presión pico inspiratoria alcanzados en nuestro experimento en las ratas ventiladas con volúmenes corriente elevados ( $22,55 \text{ cmH}_2\text{O} \pm 2,65 \text{ SD}$ ) son inferiores a los que alcanzó el grupo de Dreyfuss et al. (1988) parece posible que este mecanismo de estiramiento pulmonar sea el responsable de la lesión pulmonar que aparece en las ratas ventiladas con volúmenes corriente de 20 ml/Kg (Dreyfuss D et al. 1988).

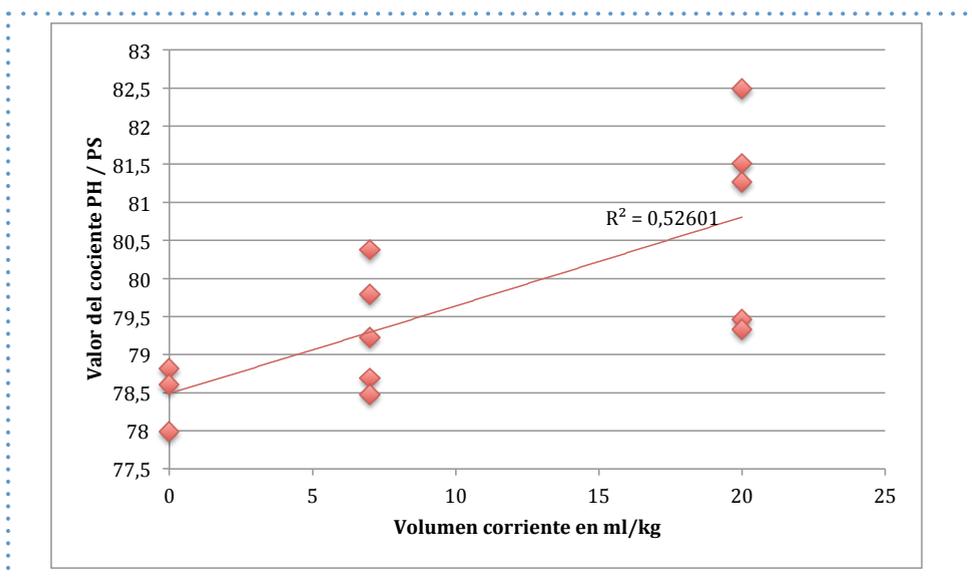
Si bien en nuestro trabajo no hemos medido gasto cardíaco en los animales ventilados ni tampoco parámetros como la presión arterial pulmonar, cuyas alteraciones pueden estar implicadas en la producción de edema pulmonar, la cuantificación de la permeabilidad microvascular usando el colorante Azul de Evans, se correlaciona bien con la extravasación de albúmina marcada en la piel y la vía aérea de roedores (Rogers DF et al. 1989). El aumento de los niveles de proteínas marcadas con Azul de Evans en el tejido pulmonar fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) en las ratas ventiladas con volúmenes corriente de 20 ml/kg, obteniéndose cifras más de dos veces mayores que las obtenidas en las ratas control. Esto hace pensar que el mecanismo principal en la generación del edema pulmonar en este grupo de ratas se debe a una alteración de permeabilidad microvascular, siendo poco probable que el origen sea un fallo hemodinámico. Resultados similares fueron obtenidos por Dreyfuss y colaboradores (1985). Estos últimos demostraron, usando albúmina marcada radiactivamente, un aumento de la cantidad de proteínas en el aspirado traqueal de pulmón de ratas ventiladas con presiones pico de 40 cmH<sub>2</sub>O, así como alteraciones anatomopatológicas que incluían alteraciones epiteliales y membranas hialinas, por lo que concluían que el mecanismo principal del edema era un aumento de la permeabilidad (Dreyfuss D et al. 1985). Igualmente, aunque los volúmenes corrientes empleados sean bajos observamos una alteración de la permeabilidad microvascular al objetivarse un aumento de la concentración de Azul de Evans en el grupo 2 respecto al grupo 1. Aunque estas diferencias no resultan significativas estadísticamente si muestran una tendencia. Una posible explicación podría ser que la ventilación mecánica, aún a volúmenes corrientes teóricamente seguros (7 ml/Kg), provoca alteración de la permeabilidad, aunque esta no sea relevante ni puesta de manifiesto por el aumento del edema medido mediante el cociente peso húmedo/peso seco (Wolthuis EK et al. 2009). En línea con esto Hegeman MA et al (2013), objetivaron un aumento de la permeabilidad pulmonar en un modelo de ventilación pulmonar prolongada a volúmenes corrientes bajos (7 ml/Kg) en ratón, aunque de manera similar a nuestro experimento, no se alcanzó significación estadística a pesar de la tendencia en los valores (Hegeman MA et al. 2013). Resultados similares se han objetivado en la segunda parte de nuestro experimento, donde la ventilación mecánica a volúmenes corrientes no lesivos pero mantenidos durante 4 horas, no objetivó aumento significativo de la permeabilidad pulmonar aunque si parece existir una tendencia (Fabregat G et al. 2014). Serán necesarios futuros estudios que corroboren o desmientan estos resultados.

Diferentes estudios experimentales han puesto de manifiesto el papel de las AQP1 y 5 en el desarrollo de edema pulmonar en modelos animales de lesión pulmonar de diferente etiología (Zhang YW et al. 2009; Wang F et al. 2010; Li J et al. 2011). Sólo hemos encontrado un trabajo en la literatura que investigue el rol de estos canales de agua en el edema pulmonar que aparece como consecuencia de la Lesión Pulmonar Inducida por Ventilación mecánica (VILI). Hales et al. (2001) provocaron una lesión pulmonar en ratas mediante la ventilación mecánica con volúmenes corriente elevados (20 ml/Kg); de manera indirecta pusieron de manifiesto el papel de las AQP1 y 5 al objetivar un empeoramiento del edema pulmonar en las ratas ventiladas en las que previo al inicio de la VM se administró un conocido inhibidor de la función de estas proteínas canal, el Cloruro de Mercurio (Hales CA et al. 2001). Nuestro grupo decidió, en una primera parte del experimento, reproducir parte del trabajo de Hales CA y colaboradores. Aunque no determinamos niveles circulantes de cloruro de mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ) en la sangre de las ratas a las que se les administró, las dosis utilizadas calculadas por peso del animal (6 mg/Kg) son similares a las usadas en trabajos previos (Hales CA. 2001) y con las que conseguían concentraciones próximas a 0,03 mM que se ha visto en diferentes trabajos experimentales (Schnitzer JE y Oh P. 1996) que produce la inhibición del 60% del transporte de agua en pulmón aislado de rata. Hemos podido corroborar que se produce un aumento significativo del cociente PH/PS cuando previamente al inicio de la VM se administra  $\text{HgCl}_2$ , cuando se compara con los valores obtenidos en animales que son ventilados al mismo volumen corriente (20 ml/Kg) en los que no se administró dicha sustancia. Este hecho, observado previamente en otros modelos animales (Preston GM et al. 1993, Schnitzer JE y Oh P. 1996), va a favor de la hipótesis de que el  $\text{HgCl}_2$  produce una inhibición competitiva en las AQP1 y 5; esta se cree que está mediada por la unión a la cisteína de la posición 189 (Preston GM et al. 1993). Cuando administramos cisteína exógena posteriormente a la administración de  $\text{HgCl}_2$  y previamente a la inducción de la lesión pulmonar por ventilación mecánica, el cociente PH/PS vuelve a valores similares a los del grupo de animales ventilados a 20 ml/Kg en los que no se administró  $\text{HgCl}_2$ . El efecto del cloruro de mercurio sobre los canales de agua es por tanto reversible. No podemos descartar la posibilidad de que el  $\text{HgCl}_2$  esté actuando en la formación del edema pulmonar inducido por

ventilación mecánica a través de otras vías diferentes a las AQP, pero en vista de los hechos no es aventurado pensar que lo hace a través de la inhibición de los canales de agua. Nuestros resultados, coincidentes con los obtenidos en el trabajo de Hales (Hales CA et al. 2001), van pues a favor de la hipótesis de que los canales de agua AQP1 y AQP5 desempeñan un papel importante en la formación y reabsorción del edema secundario a la Lesión Inducida por Ventilación Mecánica.

El papel que desempeña la AQP 1 en la permeabilidad capilar pulmonar fue puesto de manifiesto por Bai et al. (1999) usando ratones knockout carentes de esta proteína. La permeabilidad al agua del endotelio microvascular, se redujo más de 10 veces en los ratones AQP1 (- / -) frente a los ratones salvajes en pulmón aislado (Bai C et al. 1999). Estos resultados indican que el transporte de agua a través de microvasos en el pulmón se produce por una vía dependiente de canales de agua AQP1. De manera similar la permeabilidad osmótica al agua del espacio aéreo-capilar se redujo en torno a 10 veces en los ratones knockout para la AQP5 en pulmón aislado, indicando que la AQP5 es responsable de la mayoría del transporte de agua a través de la membrana apical del epitelio alveolar (Ma T et al. 2000). La AQP1, junto con la AQP5, constituyen la principal vía de transporte osmótico de agua entre el espacio aéreo y los compartimentos capilares y su ausencia deteriora la permeabilidad osmótica del agua en el endotelio microvascular y en el espacio alveolo-capilar. En el presente trabajo hemos observado un descenso en la expresión de AQP1 en todos los animales sometidos a ventilación mecánica. Este descenso fue significativamente mayor en los animales ventilados a volúmenes corriente elevados (20 ml/kg), aunque no objetivamos diferencias entre los grupos 2 y 3. Niveles disminuidos de AQP1 y AQP5 se han relacionado con la aparición de edema pulmonar en diversas situaciones (Towne JE et al. 2001; Su X et al. 2004; Zhao S y Li XN. 2010; Dong C et al. 2012). Recientemente Jin LD et al. (2013) han puesto de manifiesto en un modelo de lesión pulmonar inducida por ventilación mecánica a volúmenes corriente elevados (40 ml/Kg) un descenso en la expresión de AQP1 tras 4 horas de ventilación mecánica en ratas, así como un aumento del cociente entre el peso húmedo y el peso seco como indicativo del edema ocasionado (Jin LD et al. 2013). Los trabajos con animales knockout

nos indican que si bien el transporte osmótico de agua es dependiente de la AQP1, esta no parece ser necesaria en la absorción de agua isoosmolar desde el espacio alveolar (Bai C et al. 1999). Del mismo modo, aunque la AQP5 proporciona una ruta cuantitativamente importante para el movimiento osmótico del agua dentro y fuera de los espacios aéreos, no parece facilitar la aparición de edema pulmonar de origen hidrostático o el transporte activo de líquido alveolar (Ma T et al. 2000). Song Y et al. (2000) usaron animales knockout de las principales AQPs expresadas en el pulmón (AQPs 1, 4 y 5) y los sometieron a diferentes situaciones para evaluar la implicación de estas en condiciones “fisiológicas” (pulmón neonatal o instilación intratraqueal de suero salino) y de lesión pulmonar (aspiración ácida y administración de tiourea) y no encontraron diferencias en ninguna de las situaciones en el contenido de agua pulmonar medido por gravimetría en los ratones que carecían de AQPs (Song Y et al. 2000); similares resultados obtuvo el mismo grupo de investigadores posteriormente en un modelo de lesión pulmonar inducida por lipopolisacárido en ratones (Su X et al. 2004). En contraposición a esto, en otras situaciones patológicas que incluyen el VILI (Jiao G et al. 2002; Yue DM y Xue XD. 2006; Wang F et al. 2010; Jin LD et al. 2013), cuando disminuye la expresión de AQPs o bloqueamos su funcionamiento (Hales CA et al. 2001) se altera el trasiego de agua reflejándose en un empeoramiento del edema pulmonar. Y de modo inverso cuando facilitamos la expresión de AQPs se produce una mejoría en el edema del pulmón lesionado (Wu XM et al. 2009; Cao CS et al. 2010; Dong C et al. 2012). En nuestro modelo de lesión pulmonar inducida por ventilación mecánica observamos un descenso significativo en la expresión de AQP 1 que se correlaciona significativamente con el volumen corriente empleado en la ventilación mecánica (a mayor volumen corriente menor expresión de AQP 1 – ver **figura 23** –). Este último se correlaciona además de manera significativa con la cantidad de edema pulmonar ( $R^2 = 0,526$ ;  $p = 0,005$ ) (**figura 40**). Aunque si parece existir una tendencia a la disminución de la expresión de AQP 5 con respecto al valor del grupo control cuando se utilizan volúmenes corriente de 20 ml/kg, estas diferencias no resultaron significativas (**figura 20**). A la vista de estos resultados, parece por tanto que la AQP 1 puede desempeñar un papel significativo en la aparición del edema en el pulmón lesionado por ventilación mecánica.



**Figura 40.** Gráfico de dispersión y línea de tendencia de la variación del valor del cociente PH / PS en relación con el volumen corriente expresado en ml/Kg.

En nuestro experimento, el grupo de animales ventilados a volumen corriente de 7 ml/Kg no sufrió un aumento significativo del agua pulmonar representado por el cociente PH/PS aunque si pudimos objetivar un descenso en la expresión de AQP1 en este grupo de animales estadísticamente significativo ( $p > 0,05$ ) con respecto al valor del grupo control. Aunque la ausencia AQP1 no aumenta el contenido de agua extravascular pulmonar cuando la ventilación se produce a volúmenes corrientes bajos o poco lesivos (10 ml/kg) (Song Y et al. 2000), una posible explicación podría ser que a pesar de encontrarse en menor cantidad en estos animales, las AQP1 sólo serían importantes en respuesta a condiciones de estrés, como ocurriría cuando la presión hidrostática intersticial aumenta drásticamente debido a la ventilación a volúmenes corriente elevados (Hales CA et al. 2001).

Uno de los mecanismos que contribuye a una disminución de la expresión de AQPs en es la presencia de mediadores inflamatorios como la interleucina 6 (IL-6) y el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (Towne JE et al. 2001; Su X et al. 2004; Yamamura Y et al. 2012; Ma T y Liu Z. 2013) los cuales se sabe aumentan en los pulmones

sometidos a ventilación mecánica, incluso cuando se utilizan parámetros ventilatorios teóricamente seguros o no lesivos (Wolthuis EK et al. 2009; Jin LD et al. 2013). Por otra parte, las fuerzas de cizallamiento son capaces de provocar, por un mecanismo mediado por la activación de el “*transient receptor potential vanilloid*” (TRPV) 4 y el “*L-type voltage-gated calcium channel*” (VGCC), una disminución de la cantidad de AQP-5 y de la permeabilidad epitelial de las células epiteliales bronquiales humanas (Sidhaye VK et al. 2008). Esto podría explicar la disminución que observamos en la expresión de los canales de agua en los animales sometidos a ventilación mecánica.

Llama la atención que a pesar de encontrar una disminución en la expresión proteica de AQP 1 en el pulmón de las ratas ventiladas mecánicamente con volúmenes corriente elevados, se produce un aumento de la cantidad de ARNm de la AQP 1, significativamente mayor en los animales ventilados a mayor volumen corriente. Otros autores han comunicado hechos similares. Así Tiwari y colaboradores (2014) encontraron una disminución significativa en la cantidad de ARNm de la AQP5 en células cancerígenas del ovario de la gallina aunque la cantidad de proteína medida por western blot estaba aumentada (Tiwari A et al. 2014). Esta correlación negativa entre la cantidad de ARNm y la cantidad de proteína expresada podría deberse a la presencia de factores protranscripcionales. En nuestro modelo, estos factores podrían ejercer su efecto cuando se produce lesión pulmonar, no estando presentes cuando la VM no produce lesión pulmonar, ya que esta correlación negativa no hemos podido objetivarla en el modelo de Ventilación Pulmonar a Volúmenes Corrientes No Lesivos.

Poniendo en conjunto estos resultados con los de la segunda parte de nuestro experimento, en el que se varió el tiempo de ventilación mecánica, parece que el hecho de someter a los animales a la VM aumenta la expresión de ARNm de las AQPs 1 y 5, aunque su expresión proteica final varía en los diferentes escenarios planteados en nuestros experimentos. Se produciría una disminución de la expresión proteica de la AQP1 cuando hay lesión pulmonar y un aumento de la expresión proteica de la AQP5 cuando la VM no produce lesión pulmonar expresada como un aumento del cociente entre el peso húmedo y el peso seco pulmonar (Fabregat G et al. 2014).

En conclusión, hemos demostrado que la ventilación mecánica a volúmenes corriente elevados (20 ml/Kg) produce edema pulmonar en ratas y que este edema

se debe principalmente a un aumento de la permeabilidad pulmonar ya que los niveles de albúmina marcada con el colorante Azul de Evans fueron significativamente mayores. El uso de una sustancia que es un conocido bloqueante de la función de las AQP 1 y 5, el cloruro de mercurio (Preston GM et al. 1993; Raina S et al. 1995), provocó un empeoramiento del edema aparecido en el contexto de el VILI. En todos los animales sometidos a ventilación mecánica se objetivó un descenso en la expresión de AQP 1. Este descenso podría estar relacionado con la aparición del edema en los animales ventilados a volúmenes corriente elevados (20 ml/Kg), siendo poco relevante su papel en la ventilación a volúmenes corriente bajos (7 ml/Kg).

## 2. VENTILACIÓN MECÁNICA PROLONGADA A VOLUMENES CORRIENTE NO LESIVOS

Ya sabemos que la ventilación mecánica es capaz de inducir por ella misma lesión pulmonar aguda. En varios estudios, se ha demostrado que la ventilación mecánica usando volúmenes corriente elevados o no usar presión positiva al final de la espiración (PEEP) puede conducir la aparición de mediadores inflamatorios en el pulmón por mecanismos de mecanotransducción (Tremblay L et al. 1997; Bueno PC et al. 2002; Uhlig S. 2002).

Los estudios clínicos muestran que el uso de volúmenes corriente elevados (mayores de 12 ml/kg) se asocia con un mal pronóstico, y por el contrario, una “**estrategia de ventilación de protección pulmonar**” (bajos volúmenes corrientes, menores de 10 ml / kg) y la optimización de la PEEP mejora el pronóstico y reduce la lesión causada por ventilación mecánica (No authors listed. 2000). Pero...¿el uso de estas estrategias previene o evita la aparición de lesión pulmonar?.

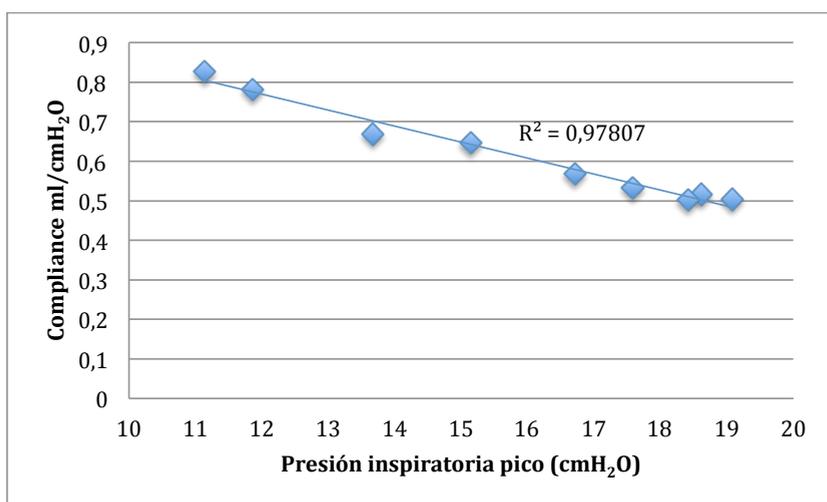
De modo interesante, diferentes trabajos en animales y humanos han puesto de manifiesto que incluso la ventilación con volúmenes corrientes bajos es capaz de ocasionar la aparición de un patrón de respuesta inflamatoria pulmonar similar al que se encuentra en pacientes que han desarrollado VILI. Cobelens PM y colaboradores (2009) utilizaron un modelo de isquemia-reperusión pulmonar en ratas Sprague-Dawley; tanto las ratas sometidas a isquemia como el grupo control (que recibió una

cirugía placebo) fueron sometidos a ventilación mecánica con presiones bajas (12 cmH<sub>2</sub>O y 4 cmH<sub>2</sub>O de PEEP) durante 4 horas. Observaron que el grupo placebo con ventilación mecánica a bajas presiones sufrió un aumento claro de la actividad de la mieloperoxidasa, y aumentos de la expresión de la proteína inflamatoria de macrófagos-2 (MIP-2), de la interleucina-6 (IL-6), y de la caspasa-3 (como indicador de apoptosis celular) en comparación con los animales control no ventilados (Cobelens PM et al. 2009). En humanos, Plotz et al. (2002) informaron sobre cambios proinflamatorios moderados en el aspirado traqueal y la sangre de niños con pulmones sanos que fueron ventilados durante 2 horas para cirugía cardíaca (Plotz FB et al. 2002). En consonancia con este hallazgo, Caruso y colaboradores (2003) demostraron en ratas Wistar que la ventilación mecánica con volumen corriente de 6 ml/Kg induce una respuesta proinflamatoria y profibrogenica en el pulmón (Caruso P et al. 2003). Del mismo modo Wolthuis y sus colaboradores (2009) obtuvieron resultados similares en ratones ventilados mecánicamente a 7,5 ml/Kg durante 5 horas; objetivaron aumentos significativos de IL-6 y TNF $\alpha$  entre otras sustancias así como aumentos en la cantidad de agua pulmonar significativos con respecto a los controles incluso con volúmenes corrientes bajos, aunque esto sólo ocurrió en una de las especies de ratón estudiadas, no objetivándose en la otra (Wolthuis EK et al. 2009). Resultados similares han sido también comunicados por Vanaker et al. (2007) sobre ratones ventilados a 8 ml/Kg durante 4 horas y encontraron un aumento de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF $\beta$ , IL-6, IL-10 y quimiocinas en homogeneizado de tejido pulmonar cuando lo compararon con los animales sin ventilar (Vanaker M et al. 2007). Estas concentraciones de citocinas aumentaron con la duración de la ventilación mecánica. Encontraron también un aumento de la cantidad de agua pulmonar significativamente elevada con respecto a los controles a las 4 horas de iniciada la ventilación mecánica. Parece pues que no solo la estrategia de ventilación usada sino también el tiempo de ventilación pueden estar implicados en la aparición de lesión aguda, apareciendo efectos deletéreos similares a los encontrados en el VILI con parámetros de volumen corriente bajos pero mantenidos en el tiempo (Hegeman MA et al. 2013). En contraposición a lo anterior, Altemeier WA et al. (2005) demostraron que la ventilación mecánica con volúmenes corrientes de 10 ml / kg durante seis horas no causaba aumento significativo de la expresión de citocinas (Altemeier WA et al. 2005). En este trabajo, las citocinas se midieron en el líquido procedente del lavado broncoalveolar, difiriendo con respecto a otros (Vanaker M et al. 2007; Wolthuis EK et al. 2009) donde las citocinas se midieron

en un homogenado de pulmón. Una posible explicación es que las citocinas, tal vez estaban todavía en el sub-epitelio y no habían migrado al espacio alveolar, por lo que no pudieron medirse en el líquido del lavado. De modo similar Wrigge et al. (2000) no encontraron aumento de citocinas ni mediadores en pacientes previamente sanos sometidos a ventilación mecánica después de una hora de exposición, incluso con volúmenes corriente de 15 ml/Kg (Wrigge H et al. 2000). Como críticas se puede argumentar que el tiempo de exposición posiblemente sea demasiado corto en este caso y que las citocinas se detectaron en sangre y no en pulmón. No podemos afirmar con los resultados obtenidos en nuestros animales que la ventilación mecánica con parámetros poco lesivos produzca lesión pulmonar aguda y como consecuencia de ello una alteración de la permeabilidad pulmonar y un aumento del agua pulmonar cuando esta es mantenida durante 4 horas, puesto que los resultados no son estadísticamente significativos aunque si que puede observarse una tendencia en los resultados, especialmente en la cantidad de agua pulmonar. Aunque no hemos hecho mediciones de mediadores inflamatorios en el pulmón, a tenor de los resultados publicados en otros grupos, parece probable que estos estén presentes en la ventilación mecánica incluso con presiones o volúmenes corriente bajos, aunque la relevancia clínica de este hecho puede ser variable dependiendo de las circunstancias, pudiendo comportarse como adyuvantes o potenciadores en la aparición de lesión pulmonar sobre todo en presencia de otras agresiones (Altemeier WA et al. 2005).

La anestesia general y la posición en decúbito supino se sabe que son capaces de ocasionar atelectasias pulmonares de predominio en las zonas declives (Hedenstierna G et al. 1989). Estas darían al pulmón un aspecto heterogéneo en el que coexistirían zonas de atelectasia con zonas aireadas e incluso sobredistendidas y sus correspondientes zonas de transición inestables que como sabemos pueden contribuir al biotrauma generado con la ventilación mecánica (Dreyfuss D. 1998). Además el uso de volúmenes corriente bajos sin presión positiva al final de la espiración (PEEP) puede promover la aparición y mantenimiento de las atelectasias que se forman en los pacientes bajo anestesia general y con relajación muscular (Wolthuis EK et al. 2009). Además se ha demostrado que el reclutamiento periódico con insuflaciones profundas relativamente frecuentes durante la ventilación con volúmenes corrientes bajos puede mejorar la oxigenación, la ventilación y la mecánica pulmonar sin evidenciarse lesión pulmonar en ratones sometidos a ventilación mecánica durante horas

(Allen GB et al. 2006). Por lo tanto, estos hechos explicarían el empeoramiento observado en la oxigenación de nuestros animales a medida que aumenta el tiempo de exposición a la ventilación mecánica con volúmenes corriente no elevados y sin PEEP; en cierto modo nuestros animales es probable que, aunque sometidos a unos parámetros teóricamente no lesivos, hayan desarrollado atelectasias en zonas declives y estas puedan ocasionar diferentes grados de atelectrauma que explicarían el deterioro en la oxigenación observado (**ver tabla 8**), -- aunque este no resultó ser estadísticamente significativo --, así como el descenso en los parámetros de compliancia pulmonar y el aumento de los valores de presión inspiratoria pico observados con la exposición a la ventilación mecánica (**ver figuras 27 y 28**). Estos últimos parámetros presentaron además una correlación lineal con una fuerte asociación marcada por un coeficiente de determinación  $R^2$  de 0,98 en el Grupo 4H de animales ventilados durante 4 horas (**figura 41**).



**Figura 41.** Gráfico de dispersión y línea de tendencia de la variación de la compliancia pulmonar en relación con la presión inspiratoria pico en los animales pertenecientes al Grupo 4H (ventilados durante 4 horas).

Aunque es bien sabido que los parámetros ácido-base son indicadores fiables del estado general de los animales, estos parámetros no han sido o lo han sido

sólo parcialmente, evaluados en modelos murinos de ventilación mecánica (Tremblay L et al. 1997; Belperio JA et al. 2002; Altemeier WA et al. 2005; Cobelens PM et al. 2009). En nuestro modelo los animales ventilados pertenecientes a los Grupos 2H y 4H sufrieron una tendencia a la acidosis de componente mixto, aunque estos hallazgos no adquirieron significación estadística. Es posible que debido a la formación de atelectasias y el aumento de las presiones la ventilación fuese cada vez menos efectiva, lo que explicaría el ascenso (aunque no significativo) de los parámetros de  $p\text{CO}_2$ . El componente metabólico de la acidosis puede tener varios orígenes. La acidosis metabólica en los ratones puede ser inducida por administración de solución salina (Zuurbier CJ et al. 2002, Wolthuis EK et al. 2009), que en nuestros animales se utilizó en la mezcla de mantenimiento, aunque en dosis muy bajas. Sin embargo, no se puede excluir totalmente que la acidosis metabólica no fuera causada por alguna deficiencia hemodinámica a pesar de que la presión arterial media durante las cuatro horas (como máximo) de ventilación mecánica se mantuvo siempre por encima de los 80 mmHg, aunque se pudo apreciar un descenso significativo de este valor con respecto al valor basal a partir de aproximadamente el minuto 75 en ambos grupos, probablemente en relación a una deficiente reposición de las pérdidas más que a un posible déficit de retorno venoso y bajo gasto secundario a la inversión de las presiones torácicas en la ventilación mecánica a presión positiva (Schwarte LA et al. 2000). Algo similar ocurre en los datos de frecuencia cardíaca que mostraron una disminución a lo largo del tiempo significativo a partir de los 120 minutos de experimento, aunque siempre manteniéndose dentro del rango considerado fisiológico en ratas (Papadimitriou D et al. 2008).

Hasta donde sabemos no ha habido ningún grupo de investigadores que estudiase la expresión de las AQP1 y 5 en un ratas sometidas a ventilación mecánica; sólo hemos encontrado un grupo de investigadores que estudió la expresión de AQP1 en ratas sometidas a ventilación mecánica. Jin LD et al. (2013) usando ratas ventiladas mecánicamente a volúmenes de 8 ml/Kg y 40 ml/Kg durante cuatro horas observaron que se producía una disminución de la expresión de AQP1 en el grupo ventilado a volúmenes corriente elevados (Jin LD et al. 2013); estos investigadores proponen un mecanismo secundario a la producción de mediadores inflamatorios (interleucinas) durante la ventilación mecánica ya que consiguieron mitigar esta disminución con la administración de un inhibidor de la ciclooxygenasa 2 (COX-2). De manera paralela

objetivaron un aumento la cantidad de agua pulmonar en los animales con volumen corriente elevado significativamente mayor que aquellos ventilados con volúmenes corrientes bajos y una disminución de este valor al tratar a los animales con la sustancia inhibidora de la COX-2. Schmalstieg FC y colaboradores (2001) desarrollaron un modelo animal de lesión pulmonar por inhalación de humo en ovejas, provocando en ellas un SDRA. Sometieron después a los animales a ventilación mecánica y los dividieron en dos grupos en función de si llevaban o no un dispositivo arterio-venoso externo de eliminación de CO<sub>2</sub>. Aunque no encontraron diferencias entre la cantidad de AQP 1 medida por western blot entre ambos grupos de animales si que encontraron un aumento del ARNm de AQP1 en el grupo sometido exclusivamente a ventilación en comparación con el que llevaba el depurador de CO<sub>2</sub> extracorpóreo (Schmalstieg FC et al. 2001). El inconveniente de estos trabajos es que no existe un grupo control de animales no ventilados para poder objetivar que ocurre con la expresión de AQPs como consecuencia de someter a los animales a la ventilación mecánica. En nuestro experimento hemos encontrado un aumento de la expresión de AQP5 que se hace más significativo a mayor tiempo de exposición a la ventilación mecánica y de manera similar un aumento del ARNm de AQP5 también mayor en el Grupo 4H con respecto a los animales no ventilados; este aumento no se ha acompañado de variaciones significativas en la cantidad de agua pulmonar ni en la permeabilidad microvascular. Estos parámetros contrastan también con los resultados obtenidos en la primera parte del experimento. En ella, se objetivó una disminución de la expresión de AQP 1, mayor a mayor volumen corriente, aunque la expresión de ARNm de la AQP 1 aumentó significativamente, al igual que ocurre en la segunda parte del experimento, donde se varió el tiempo de exposición a la VM. Como ya se comentó con anterioridad, parece que el hecho de someter a los animales a la VM aumenta la cantidad de ARNm las AQPs 1 y 5, aunque su expresión proteica final varía en los diferentes escenarios planteados en nuestros experimentos. Así en los animales en los que se pretendió realizar una lesión pulmonar inducida por VM, se objetivó una disminución de la expresión proteica de la AQP1 (sin cambios significativos en la de AQP5); por el contrario en los animales en los que se prolongó el tiempo de VM se objetivó un aumento en la expresión de AQP 5, significativamente mayor a mayor tiempo de VM (sin cambios en la expresión de AQP1) (Fabregat G et al. 2014).

Diferentes factores han demostrado modular la cantidad de aquaporinas,

encontrándose disminuidas en diferentes situaciones patológicas para el pulmón que cursan con aumento del agua pulmonar y edema (Jiao G et al. 2002; Yue DM y Xue XD. 2006; Wang F et al. 2010). Además el hecho de que mejoren los parámetros de lesión pulmonar al inducir su expresión les atribuye un mecanismo protector a las AQP5 en la aparición y desarrollo del edema pulmonar (Wu XM et al. 2009; Cao CS et al. 2010; Dong C et al. 2012), aunque algunos estudios con animales modificados genéticamente cuestionan un posible papel relevante de las AQP5 en la reabsorción del agua alveolar, pero si demuestran la importancia de estos canales en la permeabilidad pulmonar (Bai C et al. 1999; Ma T et al. 2000; Song Y et al. 2000). En nuestros animales no objetivamos cambios significativos en el agua pulmonar o la permeabilidad microvascular pulmonar a pesar del aumento de aquaporinas. Esto podría explicarse porque las AQP5, según algunos autores, sólo funcionan en situaciones de estrés (Hales CA et al. 2001). Aunque más trabajos serán necesarios para determinar el verdadero papel que desempeñan las AQP5 1 y 5 en la ventilación mecánica.

En conclusión, en nuestro modelo de ventilación mecánica prolongada, el uso de volúmenes corrientes de 10 ml/Kg durante 4 horas no desarrolló lesión pulmonar puesta de manifiesto por aumento del contenido de agua pulmonar ni alteración de la permeabilidad microvascular, que como es sabido, es uno de los principales mecanismos implicados en la lesión pulmonar inducida por ventilación mecánica. Además hemos objetivado un aumento de la expresión de AQP 5 y de su ARNm, tanto mayor cuanto mayor es el tiempo de exposición a la ventilación mecánica, aunque serán necesarios posteriores trabajos para clarificar si verdaderamente estas proteínas canal juegan un papel en los pulmones sometidos a ventilación mecánica en diferentes condiciones.





# CONCLUSIONES

1. La ventilación mecánica a volúmenes corriente elevados (20 ml/Kg) produjo edema pulmonar y este edema se debe principalmente a un aumento de la permeabilidad pulmonar.
2. El uso de cloruro de mercurio, una sustancia que es bloqueante específico de la función de las aquaporinas 1 y 5, produjo un empeoramiento del edema pulmonar.
3. En los animales con ventilación mecánica a volúmenes corriente elevados (20 ml/Kg) se objetivó un gran descenso en la expresión de aquaporina 1. Este se acompañó de un aumento en la cantidad de RNAm de las aquaporinas 1 y 5, siendo menos relevantes los cambios observados en la ventilación a volúmenes corriente bajos (7 ml/Kg).
4. Nuestro modelo de ventilación mecánica prolongada (10 ml/Kg durante 4 horas) no aumentó el contenido de agua pulmonar por una alteración de la permeabilidad microvascular.
5. En estos animales hemos objetivado un aumento en la expresión de la aquaporina 5 y de su ARNm, tanto mayor cuanto mayor es el tiempo de exposición a la ventilación mecánica.



# BIBLIOGRAFÍA

1. Agre P, Sasaki S, Chrispeels MJ. ***Aquaporins: a family of water channel proteins. Am J Physiol. 1993 Sep; 265(3 Pt 2):F461.***
2. Allen GB, Suratt BT, Rinaldi L, Petty JM, Bates JH: ***Choosing the frequency of deep inflation in mice: balancing recruitment against ventilator-induced lung injury. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2006, 291:L710-L717***
3. Altemeier WA, Matute-Bello G, Gharib SA, Glenny RW, Martin TR, Liles WC. ***Modulation of lipopolysaccharide-induced gene transcription and promotion of lung injury by mechanical ventilation. J Immunol. 2005 Sep 1; 175(5): 3369-76.***
4. Amato MB, Barbas CS, Medeiros DM, Magaldi RB, Schettino GP, Lorenzi-Filho G, Kairalla RA, Deheinzelin D, Munoz C, Oliveira R, Takagaki TY, Carvalho CR. ***Effect of a protective-ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress syndrome. N Engl J Med. 1998 Feb 5; 338(6): 347-54.***
5. ARDS Definition Task Force, Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, Fan E, Camporota L, Slutsky AS. ***Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. JAMA. 2012 Jun 20; 307(23): 2526-33.***
6. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. ***Acute respiratory distress in adults. Lancet 1967; 2: 319-323.***
7. Auten RL Jr, Mason SN, Tanaka DT, Welty-Wolf K, Whorton MH. ***Anti-neutrophil chemokine preserves alveolar development in hyperoxia-exposed newborn rats. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2001; 281: L336-44.***

8. Bai C, Fukuda N, Song Y, Ma T., Matthay MA, Verkman AS. ***Lung fluid transport in aquaporin-1 and aquaporin-4 knockout mice. J Clin Invest. 1999; 103, 555-561.***
9. Bhatia M, Zemans RL, Jeyaseelen S. ***Role of chemokines in the pathogenesis of acute lung injury. Am J Respir Cell Mol Biol. 2012; 46; 566-572.***
10. Belda FJ, Llorens J. ***Ventilación mecánica en anestesia y cuidados críticos. Aran Ediciones. Madrid, 2009.***
11. Belperio JA, Keane MP, Burdick MD, Londhe V, Xue YY, Li K, Phillips RJ, Strieter RM: ***Critical role for CXCR2 and CXCR2 ligands during the pathogenesis of ventilator-induced lung injury. J Clin Invest 2002, 110: 1703-1716.***
12. Benga G. ***On the definition, nomenclature and classification of water channel proteins (aquaporins and relatives). Mol Aspects Med. 2012 Oct-Dec; 33(5-6): 514-7.***
13. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, Lamy M, Legall JR, Morris A, Spragg R. ***The American-European Consensus Conference on ARDS: definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. Am J Respir Crit Care Med. 1994; 149: 818-824.***
14. Bitterman PB. ***Pathogenesis of fibrosis in acute lung injury. Am J Med. 1992 Jun 22; 92(6A): 39S-43S.***
15. Bueno PC, Bueno CE, Santos ML, Oliveira-Júnior I Jr, Salomão R, Pinheiro BV, Beppu OS. ***Ventilation with high tidal volume induces inflammatory lung injury. Braz J Med Biol Res. 2002 Feb ;; 35(2): 191-8.***
16. Castillo RL, Carrasco Loza R, Romero-Dapuerto C. ***Pathophysiological approaches of Acute Respiratory Distress Syndrome: novel bases for study of lung injury. Open Respir Med J. 2015 Jun 26; 9: 83-91.***

17. Cao CS, Yin Q, Huang L, Zhan Z, Yang JB, Xiong HW. ***Effect of angiotensin II on the expression of aquaporin 1 in lung of rats following acute lung injury. Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue. 2010 Jul; 22(7): 426-9.***
18. Carter EP, Umenishi F, Matthay MA, Verkman AS. ***Developmental changes in water permeability across the alveolar barrier in perinatal rabbit lung. J Clin Invest. 1997 Sep 1; 100(5): 1071-8.***
19. Caruso P, Meireles SI, Reis LF, Mauad T, Martins MA, Deheinzelin D. ***Low tidal volume ventilation induces proinflammatory and profibrogenic response in lungs of rats. Intensive Care Med. 2003 Oct; 29(10): 1808-11.***
20. Chen CY, Yang KY, Chen MY, Chen HY, Lin MT, Lee YC, Perng RP, Hsieh SL, Yang PC, Chou TY. ***Decoy receptor 3 levels in peripheral blood predict outcomes of acute respiratory distress syndrome. Am J Respir Crit Care Med. 2009 Oct 15; 180(8): 751-60.***
21. Chomczynski P, Sacchi N. ***Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem. 1987 Apr; 162(1): 156-9.***
22. Cobelens PM, van Putte BP, Kavelaars A, Heijnen CJ, Kesecioglu J. ***Inflammatory consequences of lung ischemia-reperfusion injury and low-pressure ventilation. J Surg Res. 2009 May 15; 153(2): 295-301.***
23. Cohen E. ***Roles of Aquaporins in Osmoregulation, Desiccation and Cold Hardiness in Insects. Entomol Ornithol Herpetol. 2012;S1: 001. doi: 10.4172/2161-0983.S1-001***
24. Corbridge TC, Wood LD, Crawford GP, Chudoba MJ, Yanos J, Sznajder JI. ***Adverse effects of large tidal volume and low PEEP in canine acid aspiration. Am Rev Respir Dis. 1990 Aug; 142(2): 311-5.***

25. de Groot BL, Grubmüller H. *Water permeation across biological membranes: mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF*. *Science*. 2001 Dec 14; 294(5550): 2353-7.
26. de Haro C, Martín-Loeches I, Torrents E, Artigas A. *Acute respiratory distress syndrome: prevention and early recognition*. *Ann Intensive Care*. 2013 Apr 24; 3(1): 11.
27. Demo SD, Yellen G. *The inactivation gate of the Shaker K<sup>+</sup> channel behaves like an open-channel blocker*. *Neuron*. 1991. 7: 743–753.
28. Dong C, Wang G, Li B, Xiao K, Ma Z, Huang H, Wang X, Bai C. *Anti-asthmatic agents alleviate pulmonary edema by upregulating AQP1 and AQP5 expression in the lungs of mice with OVA-induced asthma*. *Respir Physiol Neurobiol*. 2012 Apr 15; 181(1): 21-8.
29. Dreyfuss D, Basset G, Soler P, Saumon G. *Intermittent positive-pressure hyperventilation with high inflation pressures produces pulmonary microvascular injury in rats*. *Am Rev Respir Dis*. 1985 Oct; 132(4): 880-4.
30. Dreyfuss D, et al. *Ventilator induced lung injury: Lessons from experimental studies*. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 294-323
31. Dreyfuss D, Soler P, Basset G, Saumon G. *High inflation pressure pulmonary edema. Respective effects of high airway pressure, high tidal volume, and positive end-expiratory pressure*. *Am Rev Respir Dis*. 1988; 137: 1159–1164.
32. Fabregat G, García-de-la-Asunción J, Sarriá B, Cortijo J, De Andrés J, Mata M, Pastor E, Belda FJ. *Increased expression of AQP 1 and AQP 5 in rat lungs ventilated with low tidal volume is time dependent*. *PLoS One*. 2014; 9(12):e114247.

33. Folkesson HG, Matthay MA, Hébert CA, Broaddus VC. ***Acid aspiration-induced lung injury in rabbits is mediated by interleukin-8-dependent mechanisms. J Clin Invest. 1995 Jul; 96(1): 107-16.***
34. Frank JA, Gutierrez JA, Jones KD, Allen L, Dobbs L, Matthay MA. ***Low tidal volume reduces epithelial and endothelial injury in acid-injured rat lungs. Am J Respir Crit Care Med. 2002 Jan 15; 165(2): 242-9.***
35. Frank L, Bucher JR, Roberts RJ. ***Oxygen toxicity in neonatal and adult animals of various species. J Appl Physiol. 1978 Nov; 45(5): 699-704.***
36. Gabazza EC, Kasper M, Ohta K, Keane M, D'Alessandro-Gabazza C, Fujimoto H, Nishii Y, Nakahara H, Takagi T, Menon AG, Adachi Y, Suzuki K, Taguchi O. ***Decreased expression of aquaporin-5 in bleomycin-induced lung fibrosis in the mouse. Pathol Int. 2004 Oct; 54(10): 774-80.***
37. Gao L, Barnes KC. ***Recent advances in genetic predisposition to clinical acute lung injury. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2009 May; 296(5): L713-25.***
38. Galeotti T, Ramponi G, Chiarugi P, et al. ***Reactive oxygen species as essential mediators of cell adhesion: the oxidative inhibition of a FAK tyrosine phosphatase is required for cell adhesion. J Cell Biol 2003; 161: 933-44.***
39. Gattinoni L, Pesenti A. ***The concept of "baby lung". Intensive Care Med 2005; 31: 776-784.***
40. Gattinoni L, Protti A, Caironi P, Carlesso E. ***Ventilator-induced lung injury: the anatomical and physiological framework. Crit Care Med. 2010 Oct; 38(10 Suppl):S539-48.***
41. Glavan BJ, Holden TD, Goss CH, Black RA, Neff MJ, Nathens AB, Martin TR, Wurfel MM; ARDSnet Investigators. ***Genetic variation in the FAS gene and associations with acute lung injury. Am J Respir Crit Care Med. 2011; 183(3): 356-363***

42. Greene KE, Wright JR, Steinberg KP et al. ***Serial changes in surfactant-associated proteins in lung and serum before and after onset of ARDS. Am J Respir Crit Care Med. 1999 Dec; 160(6): 1843-50.***
43. Grigoryev DN, Finigan JH, Hassoun P, Garcia JG. ***Science review: searching for gene candidates in acute lung injury. Crit Care. 2004 Dec; 8(6): 440-7.***
44. Grommes J, Soehnlein O. ***Contribution of neutrophils to acute lung injury. Mol Med. 2011 Mar-Apr; 17(3-4): 293-307.***
45. Hales C.A, Du HK, Volokhov A, Mourfarrej R, Quinn DA. ***Aquaporin channels may modulate ventilator-induced lung injury. Respiratory Physiology 2001; 124: 159-166***
46. Hedenstierna G, Lundquist H, Lundh B, Tokics L, Strandberg A, Brismar B, Frostell C. ***Pulmonary densities during anaesthesia. An experimental study on lung morphology and gas exchange. Eur Respir J. 1989 Jun; 2(6): 528-35.***
47. Heffner JE, Brown LK, Barbieri CA, Harpel KS, DeLeo J. ***Prospective validation of an acute respiratory distress syndrome predictive score. Am J Respir Crit Care Med. 1995 Nov; 152(5 Pt 1): 1518-26.***
48. Heffner JE, Sahn SA, Repine JE. ***The role of platelets in the adult respiratory distress syndrome. Culprits or bystanders?. Am Rev Respir Dis. 1987 Feb; 135(2): 482-92.***
49. Hegeman MA, Hemmes SN, Kuipers MT, Bos LD, Jongsma G, Roelofs JJ, van der Sluijs KF, Juffermans NP, Vroom MB, Schultz MJ. ***The extent of ventilator-induced lung injury in mice partly depends on duration of mechanical ventilation. Crit Care Res Pract. 2013; 2013: 435236. doi: 10.1155/2013/435236. Epub 2013 Apr 17.***
50. Heyland DK, Groll D, Caeser M. ***Survivors of acute respiratory distress syndrome: relationship between pulmonary dysfunction and long-term health-related quality of life. Crit Care Med. 2005 Jul; 33(7): 1549-56.***

51. Hudson LD, Milberg JA, Anardi D, Maunder RJ. ***Clinical risks for development of the acute respiratory distress syndrome. Am J Respir Crit Care Med. 1995 Feb; 151(2 Pt 1): 293-301.***
52. Imai Y, Kuba K, Rao S, Huan Y, Guo F, Guan B, Yang P, Sarao R, Wada T, Leong-Poi H, Crackower MA, Fukamizu A, Hui CC, Hein L, Uhlig S, Slutsky AS, Jiang C, Penninger JM. ***Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. Nature. 2005 Jul 7; 436(7047): 112-6.***
53. Jiao G, Li E, Yu R. ***Decreased expression of AQP1 and AQP5 in acute injured lungs in rats. Chin Med J (Engl). 2002 Jul; 115(7): 963-7.***
54. Jin LD, Wang LR, Wu LQ et al. ***Effects of COX-2 inhibitor on ventilator-induced lung injury in rats. Int Immunopharmacol. 2013 Jun; 16(2): 288-95.***
55. Jung JS, Preston GM, Smith BL, Guggino WB, Agre P. ***Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. The hourglass model. J Biol Chem. 1994 May 20; 269(20): 14648-54.***
56. Kangelaris KN, Sapru A, Calfee CS, Liu KD, Pawlikowska L, Witte JS, Vittinghoff E, Zhuo H, Auerbach AD, Ziv E, Matthay MA; National Heart, Lung, and Blood Institute ARDS Network. ***The association between a Darc gene polymorphism and clinical outcomes in African American patients with acute lung injury. Chest. 2012 May; 141(5): 1160-9.***
57. Katzenstein AL, Bloor CM, Leibow AA. ***Diffuse alveolar damage--the role of oxygen, shock, and related factors. A review. Am J Pathol. 1976; 85: 209-28***
58. King LS, Nielsen S, Agre P. ***Aquaporin-1 water channel protein in lung: ontogeny, steroid-induced expression, and distribution in rat. J Clin Invest. 1996 May 15; 97(10): 2183-91.***

59. King LS, Yasui M. *Aquaporins and disease: lessons from mice to humans. Trends Endocrinol Metab.* 2002 Oct; 13(8): 355-60.
60. Kozono D, Yasui M, King LS, Agre P. *Aquaporin water channels: atomic structure molecular dynamics meet clinical medicine. J Clin Invest.* 2002 Jun; 109(11): 1395-9.
61. Kuba K, Imai Y, Rao S, Gao H, Guo F, Guan B, Huan Y, Yang P, Zhang Y, Deng W, Bao L, Zhang B, Liu G, Wang Z, Chappell M, Liu Y, Zheng D, Leibbrandt A, Wada T, Slutsky AS, Liu D, Qin C, Jiang C, Penninger JM. *A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. Nat Med.* 2005 Aug; 11(8): 875-9.
62. Kuebler WM, Ying X, Singh B, Issekutz AC, Bhattacharya J. *Pressure is proinflammatory in lung venular capillaries. J Clin Invest.* 1999 Aug; 104(4): 495-502.
63. Kurahashi K, Kajikawa O, Sawa T, Ohara M, Gropper MA, Frank DW, Martin TR, Wiener-Kronish JP. *Pathogenesis of septic shock in Pseudomonas aeruginosa pneumonia. J Clin Invest.* 1999 Sep; 104(6): 743-50.
64. Lai KN, Leung JC, Metz CN, Lai FM, Bucala R, Lan HY. *Role for macrophage migration inhibitory factor in acute respiratory distress syndrome. J Phatol.* 2003; 199: 496-508.
65. Lai TS, Cai SX, Guo ZH. *Serum and lung endothelin-1 increased in a canine model of ventilator-induced lung injury. Chin Med J (Engl)* 2010; 123: 1021-1027.
66. Li J, Xu M, Fan Q, Xie X et al. *Tanshinone IIA ameliorates seawater exposure-induced lung injury by inhibiting aquaporins (AQP) 1 and AQP5 expression in lung. Respir Physiol Neurobiol.* 2011 Apr 30; 176(1-2): 39-49.

67. Luhr OR, Antonsen K, Karlsson M, Aardal S, Thorsteinsson A, Frostell CG, Bonde J. ***Incidence and mortality after acute respiratory failure and acute respiratory distress syndrome in Sweden, Denmark, and Iceland. The ARF Study Group. Am J Respir Crit Care Med. 1999 Jun; 159(6): 1849-61.***
68. Ma T, Fukuda N, Song Y, Matthay MA, Verkman AS. ***Lung fluid transport in aquaporin-5 knockout mice. J Clin Invest 2000; 105: 93-100.***
69. Ma T, Liu Z. ***Functions of aquaporin 1 and  $\alpha$ -epithelial Na(+) channel in rat acute lung injury induced by acute ischemic kidney injury. Int Urol Nephrol. 2013 Aug; 45(4): 1187-96.***
70. Marini JJ, Gattinoni L. ***Ventilatory management of acute respiratory distress syndrome: a consensus of two. Crit Care Med. 2004; 32: 250-5.***
71. Matthay MA, Ware LB, Zimmerman GA. ***The acute respiratory distress syndrome. J Clin Invest. 2012 Aug 1; 122(8): 2731-40.***
72. Matthay MA, Zimmerman GA. ***Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: four decades of inquiry into pathogenesis and rational management. Am J Respir Cell Mol Biol. 2005 Oct; 33(4): 319-27.***
73. McHugh LG, Milberg JA, Whitcomb ME, Schoene RB, Maunder RJ, Hudson LD. ***Recovery of function in survivors of the acute respiratory distress syndrome. Am J Respir Crit Care Med. 1994 Jul; 150(1): 90-4.***
74. McVey M, Tabuchi A, Kuebler WM. ***Microparticles and acute lung injury. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2012 Sep; 303(5):L364-81.***
75. Mead J, Takishima T, Leith D: ***Stress distribution in lungs: A model of pulmonary elasticity. J Appl Physiol 1970; 28: 596-608.***

76. Meduri GU, Headley S, Kohler G, Stentz F, Tolley E, Umberger R, Leeper K. **Persistent elevation of inflammatory cytokines predicts a poor outcome in ARDS. Plasma IL-1 beta and IL-6 levels are consistent and efficient predictors of outcome over time.** *Chest.* 1995 Apr; 107(4): 1062-73.
77. Menk M, Graw JA, Steinkraus H, Haefen CV, Sifringer M, Spies CD, Lachmann B, Schwaiblmair D. **Characterization of inflammation in a rat model of acute lung injury after repeated pulmonary lavage.** *Exp Lung Res.* 2015 Oct; 41(8): 466-76.
78. Milberg JA, Davis DR, Steinberg KP, Hudson LD. **Improved survival of patients with acute respiratory distress syndrome (ARDS): 1983-1993.** *JAMA.* 1995 Jan 25; 273(4): 306-9.
79. Monchi M, Bellenfant F, Cariou A, Joly LM, Thebert D, Laurent I, Dhainaut JF, Brunet F. **Early predictive factors of survival in the acute respiratory distress syndrome. A multivariate analysis.** *Am J Respir Crit Care Med.* 1998 Oct; 158(4): 1076-81.
80. Morais-Cabral JH, Zhou Y, MacKinnon R. **Energetic optimization of ion conduction rate by the K<sup>+</sup> selectivity filter.** *Nature.* 2001 Nov 1; 414(6859): 37-42.
81. Moran JL, Bersten AD, Solomon PJ. **Meta-analysis of controlled trials of ventilator therapy in acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: an alternative perspective.** *Intensive Care Med.* 2005 Feb; 31(2): 227-35.
82. Murata K, Mitsuoka K, Hirai T, Walz T, Agre P, Heymann JB, Engel A, Fujiyoshi Y. **Structural determinants of water permeation through aquaporin-1.** *Nature.* 2000 Oct 5; 407(6804): 599-605.
83. Murray JF, Matthay MA, Luce JM, Flick MR. **An expanded definition of the adult respiratory distress syndrome.** *Am Rev Respir Dis* 1988; 138: 720-3. [Erratum, *Am Rev Respir Dis* 1989; 139: 1065.]

84. Muscedere JG, Mullen JB, Gan K, et al: ***Tidal ventilation at low airway pressures can augment lung injury. Am J Respir Crit Care Med. 1994; 149: 1327-1334***
85. Nemeth-Cahalan KL, Hall JE. ***pH and calcium regulate the water permeability of aquaporin 0. J. Biol. Chem. 2000. 275: 6777-6782.***
86. Niesler U, Palmer A, Radermacher P, Huber-Lang MS. ***Role of alveolar macrophages in the inflammatory response after trauma. Shock. 2014 Jul; 42(1): 3-10.***
87. No authors listed. ***Conference report: Mechanisms of acute respiratory failure. Am Rev Respir Dis. 1977 Jun; 115(6): 1071-8.***
88. No authors listed. ***Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network. N Engl J Med. 2000 May 4; 342(18): 1301-8.***
89. Papadimitriou D, Xanthos T, Dontas I, Lelovas P, Perrea D. ***The use of mice and rats as animal models for cardiopulmonary resuscitation research. Lab Anim. 2008 Jul; 42(3): 265-76. doi: 10.1258/la.2007.006035.***
90. Pepe PE, Potkin RT, Reus DH, Hudson LD, Carrico CJ. ***Clinical predictors of the adult respiratory distress syndrome. Am J Surg. 1982 Jul; 144(1): 124-30.***
91. Pinhu L, Whitehead T, Evans T, Griffiths M. ***Ventilator-associated lung injury. Lancet. 2003 Jan 25; 361(9354): 332-40.***
92. Pittet JF, Mackersie RC, Martin TR, Matthay MA. ***Biological markers of acute lung injury: prognostic and pathogenetic significance. Am J Respir Crit Care Med. 1997 Apr; 155(4): 1187-205.***

93. Plotz FB, Vreugdenhil HA, Slutsky AS, et al. ***Mechanical ventilation alters the immune response in children without lung pathology. Intensive Care Med 2002; 28: 486-92.***
94. Premkumar LS, Auerbach A. ***Identification of a high affinity divalent cation binding site near the entrance of the NMDA receptor channel. Neuron. 1996 16: 869-880.***
95. Preston GM, Carroll TP, Guggino WB, Agre P. ***Appearance of water channels in Xenopus oocytes expressing red cell CHIP 28 protein. Science 1992; 256: 385-387***
96. Preston GM, et al. ***The mercury-sensitive residue at cysteine-189 in the CHIP 28 water channel. J Biol Chem 1993; 268: 17-20.***
97. Puddicombe SM, Davies DE. ***The role of MAP kinases in intracellular signal transduction in bronchial epithelium. Clin Exp Allergy. 2000; 30: 7-11.***
98. Pugin J, Verghese G, Widmer MC, Matthay MA. ***The alveolar space is the site of intense inflammatory and profibrotic reactions in the early phase of acute respiratory distress syndrome. Crit Care Med. 1999 Feb; 27(2): 304-12.***
99. Pugin J. ***Molecular mechanisms of lung cell activation induced by cyclic stretch. Crit Care Med. 2003 Apr; 31(4 Suppl): S200-6.***
100. Raina S, Preston GM, Guggino WB, Agre P. ***Molecular cloning and characterization of an aquaporin cDNA from salivary, lacrimal, and respiratory tissues. J Biol Chem 1995; 270: 1908-1912.***
101. Ranieri VM, Suter PM, Tortorella C, De Tullio R, Dayer JM, Brienza A, Bruno F, Slutsky AS. ***Effect of mechanical ventilation on inflammatory mediators in patients with acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. JAMA. 1999 Jul 7; 282(1): 54-61.***

102. Rinaldo JE, Rogers RM. **Adult respiratory-distress syndrome: changing concepts of lung injury and repair.** *N Engl J Med.* 1982 Apr 15; 306(15): 900-9.
103. Rogers DF, Boschetto P, Barnes PJ. **Plasma exudation. Correlation between Evans blue dye and radiolabeled albumin in guinea pig airways in vivo.** *J Pharmacol Methods.* 1989 Jul; 21(4): 309-15.
104. Rosseau S, Hammerl P, Maus U, Walmrath HD, Schütte H, Grimminger F, Seeger W, Lohmeyer J. **Phenotypic characterization of alveolar monocyte recruitment in acute respiratory distress syndrome.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000 Jul; 279(1):L25-35.
105. Rubenfeld GD, Caldwell E, Granton J, Hudson LD, Matthay MA. **Inter-observer variability in applying a radiographic definition for ARDS.** *Chest.* 1999 Nov; 116(5): 1347-53.
106. Ruddy MK, Drazen JM, Pitkanen OM, Rafii B, O'Brodovich HM, Harris HW. **Modulation of aquaporin 4 and the amiloride-inhibitable sodium channel in perinatal rat lung epithelial cells.** *Am J Physiol.* 1998 Jun; 274(6 Pt 1):L1066-72.
107. Serrano-Mollar A. **Alveolar epithelial cell injury as an etiopathogenic factor in pulmonary fibrosis.** *Arch Bronconeumol.* 2012 Oct; 48 Suppl 2: 2-6.
108. Schmalstieg FC, Chow J, Savage C, Rudloff HE, Palkowetz KH, Zwischenberger JB. **Interleukin-8, aquaporin-1, and inducible nitric oxide synthase in smoke and burn injured sheep treated with percutaneous carbon dioxide removal.** *ASAIO J.* 2001 Jul-Aug; 47(4): 365-71.
109. Schmidt R, Luboewski T, Markart P, Ruppert C, Daum C, Grimminger F, Seeger W, Günther A. **Alveolar antioxidant status in patients with acute respiratory distress syndrome.** *Eur Respir J* 2004; 24: 994-9.

110. Schnitzer JE, Oh P. ***Aquaporin-1 in plasma membrane and caveolae provides mercury-sensitive water channels across lung endothelium. Am J Physiol 1996; 270 (1 pt 2): H416-22.***
111. Schulte D, Küppers V, Dartsch N, Broermann A, Li H, Zarbock A, Kamenyeva O, Kiefer F, Khandoga A, Massberg S, Vestweber D. ***Stabilizing the VE-cadherin-catenin complex blocks leukocyte extravasation and vascular permeability. EMBO J. 2011; 30(20): 4157-4170.***
112. Schwarte LA, Zuurbier CJ, Ince C. ***Mechanical ventilation of mice. Basic Res Cardiol. 2000 Dec; 95(6): 510-20.***
113. Schymeinsky J, Mócsai A, Walzog B. ***Neutrophil activation via beta2 integrins (CD11/CD18): molecular mechanisms and clinical implications. Thromb Haemost 2007; 98: 262-73.***
114. Sidhaye VK, Schweitzer KS, Caterina MJ, Shimoda L, King LS. ***Shear stress regulates aquaporin-5 and airway epithelial barrier function. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Mar 4; 105(9): 3345-50.***
115. Sigurdsson MI, Sigvaldason K, Gunnarsson TS, Moller A, Sigurdsson GH. ***Acute respiratory distress syndrome: nationwide changes in incidence, treatment and mortality over 23 years. Acta Anaesthesiol Scand. 2013 Jan; 57(1): 37-45.***
116. Song Y, Fukuda N, Bai C, Ma T, Matthay MA, Verkman AS. ***Role of aquaporins in alveolar fluid clearance in neonatal and adult lung, and in oedema formation following acute lung injury: studies in transgenic aquaporin null mice. J Physiol 2000; 525(Pt 3): 771-9.***
117. Steinberg KP, Milberg JA, Martin TR, Maunder RJ, Cockrill BA, Hudson LD. ***Evolution of bronchoalveolar cell populations in the adult respiratory distress syndrome. Am J Respir Crit Care Med. 1994 Jul; 150(1): 113-22.***

118. Su X, Song Y, Jiang J, Bai C. *The role of aquaporin-1 (AQP1) expression in a murine model of lipopolysaccharide-induced acute lung injury. Respir Physiol Neurobiol. 2004 Aug 20; 142(1): 1-11.*
119. Suchyta MR, Clemmer TP, Elliott CG, Orme JF Jr, Weaver LK. *The adult respiratory distress syndrome. A report of survival and modifying factors. Chest. 1992 Apr; 101(4): 1074-9.*
120. Sui H, Han BG, Lee JK, Walian P, Jap BK. *Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. Nature. 2001 Dec 20-27; 414(6866): 872-8.*
121. Suter PM, Fairley B, Isenberg MD: *Optimum end-expiratory airway pressure in patients with acute pulmonary failure. N Engl J Med, 1975, 292: 284-89.*
122. Sznajder JI. *Strategies to increase alveolar epithelial fluid removal in the injured lung. Am J Respir Crit Care Med. 1999 Nov; 160(5 Pt 1): 1441-2.*
123. Tenney SM, Remmers JE: *Comparative quantitative morphology of the mammalian lung: diffusing area. Nature, 1963; 197: 54-56.*
124. Thomsen GE, Morris AH. *Incidence of the adult respiratory distress syndrome in the state of Utah. Am J Respir Crit Care Med. 1995 Sep; 152(3): 965-71*
125. Tiwari A, Hadley JA, Ramachandran R. *Aquaporin 5 expression is altered in ovarian tumors and ascites-derived ovarian tumor cells in the chicken model of ovarian tumor. J Ovarian Res. 2014 Oct 25; 7(1): 99. [Epub ahead of print]*
126. Tortora GJ, Derrickson B. *Principios de anatomía y fisiología. 11ª ed. Editorial Médica Panamericana. Madrid, 2006.*

127. Towne JE, Harrod KS, Krane CM, Menon AG. ***Decreased expression of aquaporin (AQP)1 and AQP5 in mouse lung after acute viral infection. Am J Respir Cell Mol Biol. 2000 Jan; 22(1): 34-44.***
128. Towne JE, Krane CM, Bachurski CJ, Menon AG. ***Tumor necrosis factor-alpha inhibits aquaporin 5 expression in mouse lung epithelial cells. J Biol Chem. 2001 Jun 1; 276(22): 18657-64.***
129. Tremblay L, Valenza F, Ribeiro SP, et al. ***Injurious ventilator strategies increase cytokines and c-fos m-RNA expression in an isolated rat lung model. J Clin Invest. 1997; 99: 944.***
130. Tremblay LN, Slutsky AS. ***Ventilator-induced injury: from barotrauma to biotrauma. Proc Assoc Am Physicians. 1998; 110: 482-488.***
131. Tyrrell C, McKechnie SR, Beers MF, Mitchel TJ, McElroy MC. ***Differential alveolar epithelial injury and protein expression in pneumococcal pneumonia. Exp Lung Res. 2012; 38: 266-276.***
132. Uhlig S. ***Ventilation-induced lung injury and mechanotransduction: Stretching it too far? Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2002; 282:L892-L896***
133. Vaneker M, Halbertsma FJ, van Egmond J, Netea MG, Dijkman HB, Snijdelaar DG, Joosten LA, van der Hoeven JG, Scheffer GJ. ***Mechanical ventilation in healthy mice induces reversible pulmonary and systemic cytokine elevation with preserved alveolar integrity: an in vivo model using clinical relevant ventilation settings. Anesthesiology. 2007 Sep; 107(3): 419-26.***
134. Verkman A.S. ***More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. J Cell Sci 2005; 118: 3225-3232***
135. Verkman AS. ***Aquaporins in Clinical Medicine. Annu Rev Med. 2012; 63: 303-316.***

136. Verkman AS. *Role of aquaporins in lung liquid physiology. Respir Physiol Neurobiol.* 2007 Dec 15; 159(3): 324-30.
137. Vestweber D, Winderlich M, Cagna G, Nottebaum AF. *Cell adhesion dynamics at endothelial junctions: VE-cadherin as a major player. Trends Cell Biol.* 2009; 19(1): 8-15
138. Villar J, Kacmarek RM, Pérez-Méndez L, Aguirre-Jaime A. *A high positive end-expiratory pressure, low tidal volume ventilatory strategy improves outcome in persistent acute respiratory distress syndrome: a randomized, controlled trial. Crit Care Med.* 2006 May; 34(5): 1311-8.
139. Villar J, Slutsky AS. *The incidence of the adult respiratory distress syndrome. Am Rev Respir Dis.* 1989 Sep; 140(3): 814-6.
140. Vlahakis NE, Schroder MA, Limper AH, and Hubmayr RD. *Stretch induces cytokine release by alveolar epithelial cells in vitro. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 1999; 277: L167-L173.
141. Von Bethmann AN, Brasch F, Nusing R, Vogt K, Volk D, Muller K-M, Wendel A, and Uhlig S. *Hyperventilation induces release of cytokines from perfused mouse lung. Am J Respir Crit Care Med.* 1998; 157: 263-272.
142. Wang F, Huang H, Lu F, Chen Y. *Acute lung injury and change in expression of aquaporins 1 and 5 in a rat model of acute pancreatitis. Hepatogastroenterology.* 2010 Nov-Dec; 57(104): 1553-62.
143. Wang G, Huang X, Li Y, Guo K, Ning P, Zhang Y. *PARP-1 inhibitor, DPQ, attenuates LPS-induced acute lung injury through inhibiting NF- $\kappa$ B-mediated inflammatory response. PLoS One.* 2013 Nov 21; 8(11):e79757.
144. Ware LB, Matthay MA. *The acute respiratory distress syndrome. N Engl J Med.* 2000 May 4; 342(18): 1334-49.

145. Webb HH, Tierney DF. *Experimental pulmonary edema due to intermittent positive pressure ventilation with high inflation pressures. Protection by positive end-expiratory pressure. Am Rev Respir Dis. 2003; 1974: 556-65.*
146. Webster NR, Cohen AT, Nunn JF. *Adult respiratory distress syndrome-how many cases in the UK?. Anaesthesia. 1988 Nov; 43(11): 923-6.*
147. West JB. *Fisiología respiratoria. 8ª edición. Editorial Lippincott Williams and Walters Kluver. Madrid, 2009.*
148. Wiener-Kronish JP, Albertine KH, Matthay MA. *Differential responses of the endothelial and epithelial barriers of the lung in sheep to Escherichia coli endotoxin. J Clin Invest. 1991 Sep; 88(3): 864-75.*
149. Wolthuis EK, Vlaar AP, Choi G, Roelofs JJ, Juffermans NP, Schultz MJ. *Mechanical ventilation using non-injurious ventilation settings causes lung injury in the absence of pre-existing lung injury in healthy mice. Crit Care. 2009; 13(1):R1*
150. Wrigge H, Zinserling J, Stuber F, von Spiegel T, Hering R, Wetegrove S, Hoeft A, Putensen C. *Effects of mechanical ventilation on release of cytokines into systemic circulation in patients with normal pulmonary function. Anesthesiology. 2000; 93: 1413-7*
151. Wu XM, Wang HY, Li GF, Zang B, Chen WM. *Dobutamine enhances alveolar fluid clearance in a rat model of acute lung injury. Lung. 2009 Aug; 187(4): 225-31.*
152. Yamamura Y, Motegi K, Kani K, Takano H, Momota Y, Aota K, Yamanoi T, Azuma M. *TNF- $\alpha$  inhibits aquaporin 5 expression in human salivary gland acinar cells via suppression of histone H4 acetylation. J Cell Mol Med. 2012 Aug; 16(8): 1766-75.*

153. Yasui M, Serlachius E, Löfgren M, Belusa R, Nielsen S, Aperia A. ***Perinatal changes in expression of aquaporin-4 and other water and ion transporters in rat lung.*** *J Physiol.* 1997 Nov 15; 505 ( Pt 1): 3-11.
154. Yasui M, Hazama A, Kwon TH, Nielsen S, Guggino WB, Agre P. ***Rapid gating and anion permeability of an intracellular aquaporin.*** *Nature.* 1999. 402: 184-187.
155. Yue DM, Xue XD. ***Relationship between expression of aquaporin-1, -5 and pulmonary edema in hyperoxia-induced lung injury in newborn rats.*** *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi.* 2006 Apr; 8(2): 147-50.
156. Zambon M, Vincent JL. ***Mortality rates for patients with acute lung injury/ARDS have decreased over time.*** *Chest.* 2008 May; 133(5): 1120-7.
157. Zeuthen T, Klaerke DA. ***Transport of water and glycerol in aquaporin 3 is gated by H(+).*** *J. Biol. Chem.* 1999. 274: 21631-21636.
158. Zhang YW, Bi LT, Hou SP, Zhao XL, Song YL, Ma TH. ***Reduced lung water transport rate associated with downregulation of aquaporin-1 and aquaporin-5 in aged mice.*** *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2009 Jul; 36(7): 734-8
159. Zhao S, Li XN. ***Expression of aquaporin-1 and aquaporin-3 in lung tissue of rat model with ischemia-reperfusion injury.*** *Chin Med J (Engl)* 2010; 123: 3711-3.
160. Zhao X, Dib M, Wang X, Widegren B, Andersson R. ***Influence of mast cells on the expression of adhesion molecules on circulating and migrating leukocytes in acute pancreatitis-associated lung injury.*** *Lung* 2005; 183: 253-64

161. Zilberberg MD, Epstein SK. *Acute lung injury in the medical ICU: comorbid conditions, age, etiology, and hospital outcome. Am J Respir Crit Care Med.* 1998 Apr; 157(4 Pt 1): 1159-64.
162. Zuurbier CJ, Emons VM, Ince C. *Hemodynamics of anesthetized ventilated mouse models: aspects of anesthetics, fluid support, and strain. Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002 Jun; 282(6):H2099-105.





**D. Enrique Font Bisier**, Profesor Titular de Zoología y Secretario del Comité Ético de Experimentación y Bienestar Animal de la Comisión de Ética en Investigación Experimental de la Universitat de València.

CERTIFICA:

Que, reunido el Comité Ético de Experimentación y Bienestar Animal de la Comisión de Ética de la Universitat de València el día 3 de junio de 2011, acordó informar FAVORABLEMENTE la realización en sus instalaciones del protocolo de experimentación animal A1298554446662 titulado “**Expresión de aquaporinas 1 y 5 en un modelo de lesión pulmonar inducida por ventilación mecánica**”, cuyo investigador responsable es D. Gustavo Fabregat Cid.

En Valencia, a 7 de marzo de 2012.





## RESEARCH ARTICLE

## Increased Expression of AQP 1 and AQP 5 in Rat Lungs Ventilated with Low Tidal Volume Is Time Dependent

Guillermo Febregat<sup>1</sup>, José García-de-la-Asunción<sup>2,3</sup>, Benjamín Serriti<sup>4</sup>, Julio Cortijo<sup>5,6</sup>, José De Andrés<sup>7</sup>, Manuel Mata<sup>8</sup>, Ernesto Pastor<sup>2,3</sup>, Francisco Javier Belda<sup>7,8</sup>

**1** Hospital General Universitario, Valencia, Spain, **2** Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain, **3** Department of Pharmacology, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain, **4** Research Foundation of Hospital General Universitario, Valencia, Spain, **5** School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain, and Anesthesiology and Critical Care Department, Hospital General Universitario, Valencia, Spain, **6** Department of Physiology, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain, **7** School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain, and Anesthesiology and Critical Care Department, Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain, **8** Instituto de Investigación Clínica (INCLIVA), Fundación de Investigación Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain



CrossMark

click for updates

## OPEN ACCESS

Guillermo Febregat G, García-de-la-Asunción J, Serriti B, Cortijo J, De Andrés J, et al. (2014) Increased Expression of AQP 1 and AQP 5 in Rat Lungs Ventilated with Low Tidal Volume Is Time Dependent. PLOS ONE 9(12): e114247. doi:10.1371/journal.pone.0114247

Editor: Jose Vila, University of Valencia, Spain

Received: August 29, 2014

Accepted: November 5, 2014

Published: December 9, 2014

Copyright: © 2014 Febregat et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability:** The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All relevant data are within the paper.

**Funding:** The authors received no specific funding for this work.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

### Abstract

**Background and Goals:** Mechanical ventilation (MV) can induce or worsen pulmonary oedema. Aquaporins (AQPs) facilitate the selective and rapid bi-directional movement of water. Their role in the development and resolution of pulmonary oedema is controversial. Our objectives are to determine if prolonged MV causes lung oedema and changes in the expression of AQP 1 and AQP 5 in rats.

**Methods:** 25 male Wistar rats were subjected to MV with a tidal volume of 10 ml/kg, during 2 hours (n=12) and 4 hours (n=13). Degree of oedema was compared with a group of non-ventilated rats (n=5). The expression of AQP 1 and AQP 5 were determined by western immunoblotting, measuring the amount of mRNA (previously amplified by RT-PCR) and immunohistochemical staining of AQPs 1 and 5 in lung samples from all groups.

**Results:** Lung oedema and alveolar-capillary membrane permeability did not change during MV. AQP-5 steady state levels in the western blot were increased (p<0.01) at 2 h and 4 h of MV. But in AQP-1 expression these differences were not found. However, the amount of mRNA for AQP-1 was increased at 2 h and 4 h of MV; and for AQP 5 at 4 h of MV. These findings were corroborated by representative immunohistochemical lung samples.

**Conclusion:** In lungs from rats ventilated with a low tidal volume the expression of AQP 5 increases gradually with MV duration, but does not cause pulmonary

oedema or changes in lung permeability. AQP<sub>s</sub> may have a protective effect against the oedema induced by MV.

## Introduction

Mechanical ventilation (MV) has been used in critical care patients for decades. In spite of its life-saving potential, it has several shortcomings. A number of experimental studies have shown that mechanical ventilation may result in the appearance of inflammatory mediators in the lung [1] and subsequently in oedema. [2] Ventilator-Induced Lung Injury (VILI) causes macro and microscopic unspecific changes [3] similar to those found in patients with Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS). As it happens with ARDS, VILI is basically the result of important changes in the permeability of the alveolar-capillary membrane. [4] The potential of mechanical ventilation for triggering or worsening pulmonary damages has been shown in animal models where the application of non-physiological ventilatory parameters (mostly very high tidal volumes) aggravated the condition of animals with a previously injured lung [5], and even caused an injury in those without a previous pulmonary pathology. [2] The use of low tidal volumes has proved to be a better approach in ARDS patients, survival being improved in strategies based on its usage. [6–8] Interestingly, recent experimental and clinical work has demonstrated that MV with low tidal volume can induce similar pulmonary changes to those noticed for VILI [9–11] and that its appearance may be related to MV exposure time. [12]

Aquaporins are a family of small transmembrane proteins that help water to move fast, selectively and bi-directionally through lipid bi-layers. [13,14] 13 different types have been identified in mammals, [15] from which the lung is known to express four: AQP-1, in the pulmonary capillary endothelium (especially alveolar), and the visceral pleura; AQP-3, in the tracheal epithelium; AQP-4, in the tracheal and bronchial epithelium; and AQP-5, on type I pneumocyte cells of the alveoli, on the membrane adjoining to the alveolar lumen. [16] Their role in the development and resolution of pulmonary oedema gives rise to controversy, although it does seem to play a part in VILI. [13]

This research aimed to verify if MV with low or moderately high tidal volumes (10 ml/kg) sustained over time results in lung injury, subsequently altering pulmonary water content and microvascular permeability, as observed in VILI, and to objectivize what happens with AQP 1 and 5 expression, both types mainly involved in the formation of lung oedema, under the same ventilation conditions.

## Material and Methods

### 1. Ethics statement

The project was carried out after approval from the Ethics Committee for Animal Experimentation and Wellbeing of the Research Foundation of Valencia's Hospital Clínico Universitario.

### 2. Animal model and monitoring

A total of 30 rats were anaesthetised by intraperitoneal injection of ketamine 90 mg/kg and xylazine 5 mg/kg. 5 rats (group C or controls) were sacrificed by intravenous injection of 100 mg/kg thiopental. The rest of the animals ( $n=25$ ) were performed a surgical tracheostomy, using a teflon cannula (Surflo, 16G). Rats were randomly allocated into two groups. 12 rats were ventilated for 2 hours (group 2H) with a Harvard Rodent Ventilator, model 683 (Harvard Apparatus) with a tidal volume of 10 ml/kg and a respiratory rate of 90 breaths/minute. 13 rats were ventilated with exactly the same parameters for 4 hours (group 4H). The cervical vascular bundle was dissected, and the right internal jugular vein and the right carotid artery were catheterized to continuously monitor heart rate (HR) and mean arterial pressure (MAP). Peak inspiratory pressure and respiratory system compliance were continuously recorded.

Anaesthesia was maintained by continuous intravenous infusion of ketamine and clostracium using doses of 100 mcg/kg/min and 2–9 mcg/kg/min, respectively (20 ml of ketamine 5%, 10 ml of clostracium 0.2% and 20 ml of saline solution 0.9% at a rate of approximately 0.1 ml/h in the internal jugular vein). Anaesthesia was supplemented, in cases in which it was necessary, by administration of an intravenous bolus of 0.1 ml of the mixture. Geometric samples were taken in all animals in groups 2H and 4H at the beginning of MV and 30 minutes before the end of MV.

Rats were sacrificed by intravenous injection of sodium thiopental. The left lung was used for the determination of lung water content. The right lung of 6 rats from groups 2H and 4H was used for determining AQP1 and AQP5 expression. Lungs were either frozen in liquid nitrogen or paraffin-embedded for immunohistochemical sectioning and marking. 2 rats in group C and 4 rats from groups 2H and 4H were used to establish pulmonary macrovascular permeability.

### 3. Measuring lung oedema

Lungs were dried with filter paper and placed on a Petri dish with known weight to obtain lung wet weight (LWW). They were then placed in a drying chamber at 90°C for 96 hours and their dry weight (LDW) was determined.

Two indicators of the amount of oedema were obtained: Lung WW/LDW ratio and the proportion of pulmonary water, expressed in percentages (%<sub>water</sub>). The latter parameter was estimated using this formula: %<sub>water</sub> = (LWW - LDW) / LWW \* 100

#### 4. Measuring microvascular permeability

Microvascular permeability was quantified using Evans Blue Dye. 0.5 ml Evans Blue was injected intravenously (30 mg/kg) 30 minutes before sacrificing the animal. Rats were sacrificed by exsanguination from the carotid artery, but saline was simultaneously infused via the jugular vein in the same amount as that of the blood extracted.

After death, the right lung was separated and immersed in formalin (5 ml) and homogenized for 2 min. The resulting suspension was incubated at 37°C/18 h and then centrifuged at 5000g/30 minutes, and the supernatant was measured. Concentration of Evans Blue in the supernatant was spectrophotometrically determined.

#### 5. Study of aquaporin expression

##### 5.1 Western blot

Proteins were extracted from previously frozen lungs. A Compartmental Protein Extraction Kit (Chemicon International, Temecula CA) was used. 200–400 mg tissue was homogenized in cold buffer C (1 ml/g tissue) and Ultra Turax (KA, Steffen, Germany). Two protein fractions were obtained for each sample: cytoplasm and membrane, and they were quantified. Proteins in each fraction (100 mg) were separately run on a Tris-HCl/SDS gel, 8% acrylamide, and they were transferred onto a nitrocellulose membrane (Hybond-ECL, Amersham). After washing the membrane with distilled water, it was blocked with a PBS/Tween solution, 0.2%, with 5% skimmed milk. It was then incubated with the primary antibody during 2 hours at room temperature. The antibodies used were Anti-Rat AQP1 (Alphac Diagnostic, San Antonio, TX) and Anti-Rat AQP5 (Alphac Diagnostic, San Antonio, TX), both with a 2 mg/ml concentration. After several washes with PBS/Tween 0.2%, it was incubated with the secondary antibody Anti-Rabbit IgG (DAKO, Glostrup, Denmark) in 1:2000 dilution.  $\beta$ -actin expression was detected as an internal control, and relative protein content was analysed using the enhanced chemoluminescence method.

##### 5.2 Real-time polymerase chain reaction with reverse transcriptase

Lungs were cut with a microtome, three sections being obtained for each sample for total RNA extraction with TRIzol (Reagent Invitrogen™ Life Technologies) as in the phenol extraction method described by Chomczynsky. [19] Microsections were added 1 ml TRIzol and homogenized (Polytron PT 1200, Kinematic AG) and centrifuged at 10,000 rpm/10 min at 4°C. The supernatant was removed and RNA was precipitated by adding 0.1 volumes of sodium acetate 3 M, 2.5 volumes cold ethanol and 0.5  $\mu$ l glycogen (20 mg/ml). RNA was centrifuged again, air-dried and resuspended in 20  $\mu$ l Tris/EDTA buffer. RNA was reversely transcribed to cDNA with Superscript II (Invitrogen), by incubation with reverse transcriptase at 50°C for 30 min, followed by amplification with custom primers (Invitrogen), summarized in Table 1. 35 amplification cycles were completed, with denaturalization at 95°C (30 sec), hybridization (30 sec)

Table 1. RT-PCR primer sequences and temperature conditions.

Gene	Primer (5'-3')	Primer, counterclockwise (5'-3')	T (°C)
AQP1	TCTGGAGGCTGTG GTG GCT	AAGTGAGTTCTCGAGCAGGGA	60
AQP5	TGGGTCCTCTGGGTAGGGCCATTGT	GCCGGCTTTGGCACTTGAGATACT	50
$\beta$ -Actin	ATCATGTTTGAGACCTTCAACA	CATCTCTTGCTCGAAGTCCA	56

DOI:10.1371/journal.pone.0194267.t001

(temperatures on Table 1) and extension at 72°C (1 min). Following amplification, RT-PCR products were separated in agarose gels at 1% and bands were viewed by ethidium bromide staining, and quantified by band density scanning using Scion Image (Beta 4.02, Scion Corporation). Results were expressed in relation to the level of  $\beta$ -actin mRNA in the same RNA samples.

### 5.3 Immunohistochemical study

Sections (4  $\mu$ m thickness) from the paraffin-embedded lungs were obtained with the microtome. After the sections were dewaxed and hydrated, autoclave pretreatment (10 min, 121°C) for AQP1 and AQP5 antigen retrieval was performed and the sections were incubated in 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 30 min at room temperature to block endogenous peroxidase activity. After being washed in FBS, the sections were then preincubated with goat serum albumin for 30 min at 37°C, and subsequently incubated with the primary antibodies against AQP1 (1:500) and AQP5 (1:300) for 18 h at 4°C. Then, the sections were washed with FBS and stained with Biotin-labelled goat anti-rabbit IgG for 30 min at 37°C. Intervening washes in FBS again were followed by incubation with Horseradish enzyme labelled streptavidin working solution for 30 min at 37°C. The sections were washed in FBS before application of diaminobenzidine (DAB), then were mounted under coverslip and analyzed under light microscope.

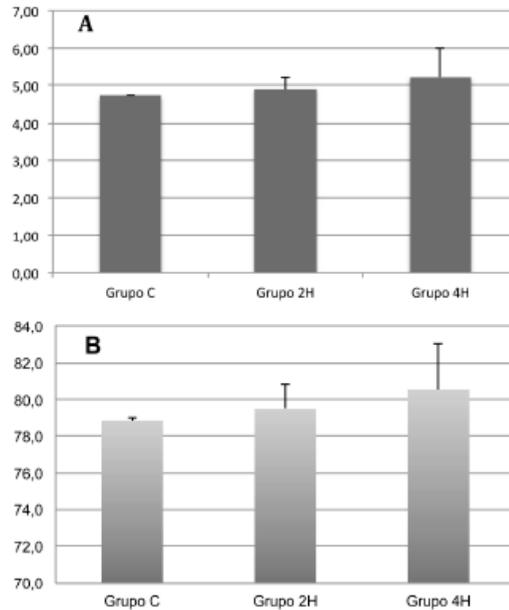
## 6. Statistical analysis

Results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). To compare results between groups, the non-parametric Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests were used. For the analysis of data within each individual group, the Wilcoxon test was applied. Regression analyses for the amount of aquaporins and mRNA and determination coefficients ( $R^2$ ) were performed. Values of  $p < 0.05$  were assumed to be statistically significant in all cases.

## Results

### 1. Pulmonary oedema

No significant differences were found between the three groups for the wet weight-dry weight ratio (group C:  $4.72 \pm 0.04$  vs. group 2H:  $4.90 \pm 0.39$  vs. group 4H:  $5.23 \pm 0.79$ ) or the percentage of pulmonary water (group C:  $79.82 \pm 0.16$  vs.



**Fig 1. Pulmonary water content charts.** A. The bar chart shows the results of lung wet weight (mg) (WetWt). B. Graphical representation of pulmonary water content (% wet weight). Error bars represent standard deviation. Group C = Control rat; Group 2H = Rat ventilated with 40 ml/kg tidal volume for 2 hours; Group 4H = Rat ventilated with 40 ml/kg tidal volume for 4 hours.

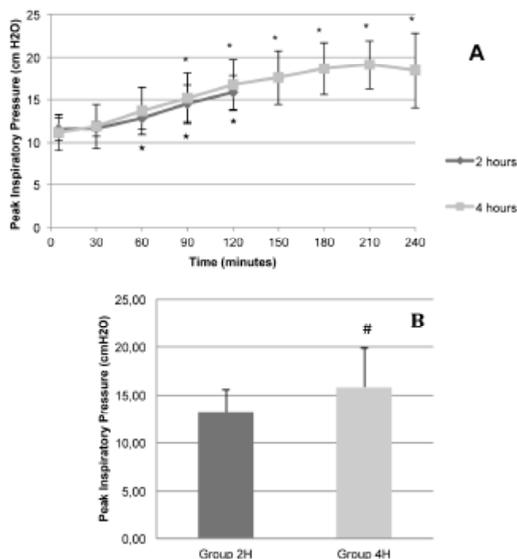
doi:10.1371/journal.pone.0194267.g001

group 2H:  $79.52 \pm 1.31$  vs. group 4H:  $80.55 \pm 2.50$ ), though an increasing trend was noticed for both parameters (Fig 1).

## 2. Ventilatory mechanics and hemodynamic parameters

Peak inspiratory pressure (PIP) progressively rose in both groups (group 2H and group 4H), higher values being found 90 minutes after the start of the experiment in group 2H and at minute 60 in group 4H (Fig 2). No differences were found in the cut-off points of the two groups.

Pulmonary compliance was reduced gradually in both groups, with significance in respect of the initial value as from minute 30 for group 2H and minute 60 in

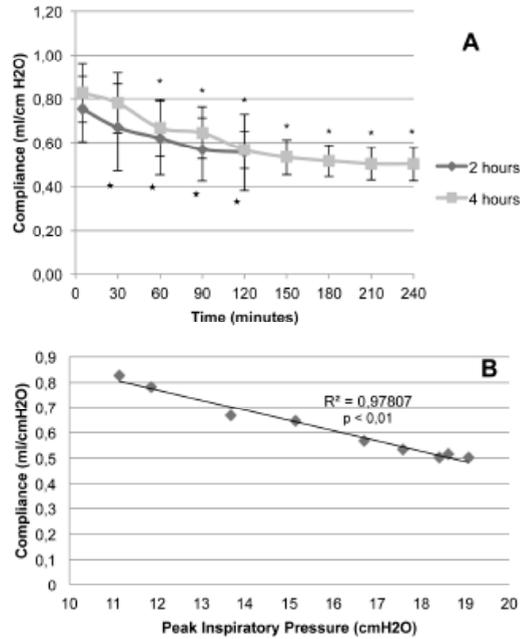


**Fig 3. Peak inspiratory pressure.** The figure shows the results of animals in Groups 2H (ventilated for 2 hours) and 4H (ventilated for 4 hours). **A.** Evolution of peak inspiratory pressure in relation to time. **B.** Graphic representation of mean peak inspiratory pressure in Groups 2H and 4H. Error bars represent standard deviation. Group 2H = Rats ventilated with 10 mL/kg tidal volume for 2 hours; Group 4H = Rats ventilated with 10 mL/kg tidal volume for 4 hours. \*  $p < 0.05$  in relation to baseline of Group 2H. #  $p < 0.05$  in relation to baseline of Group 4H. †  $p < 0.05$  in relation to Group 2H.

doi:10.1371/journal.pone.0194267.g003

group 4H (Fig 3A). No differences were found between the groups in none of the cut-off points. This decrease in compliance correlated with the peak pressure rise, with an  $R^2$  value of 0.96,  $p < 0.01$  (Fig 3B).

Rats in both groups were hemodynamically stable. No differences were found in mean arterial pressure (group 2H: 97.95 mmHg  $\pm$  27.75 vs. group 4H: 104.59 mmHg  $\pm$  27.54), and the same applies to average heart rate values (group 2H: 341.29 bpm  $\pm$  66.73 vs. group 4H: 306.52 bpm  $\pm$  78.11). Mean arterial pressure (MAP) dropped in group 2H progressively compared to the baseline as from minute 60, but this also happened in group 4H as from minute 45. Heart rate also decreased after 120 minutes (Fig 4).

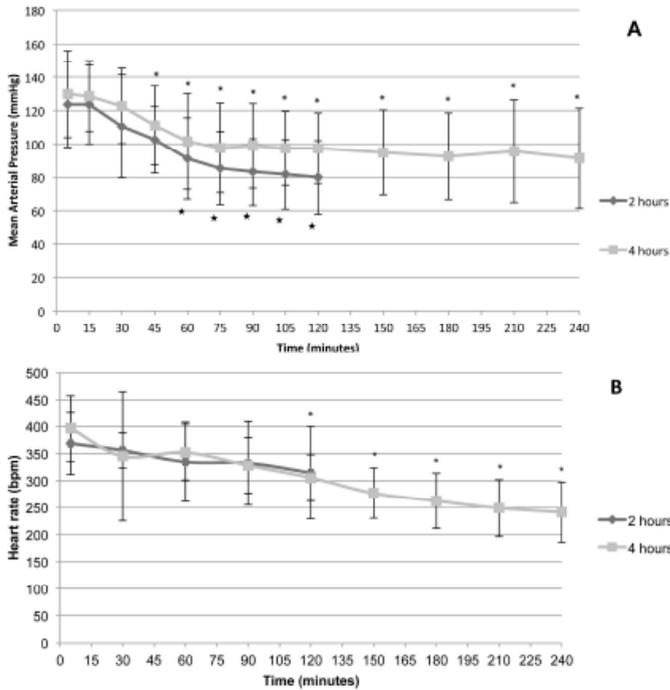


**Fig 3. Pulmonary compliance.** A. Evolution of compliance in Groups 2H (ventilated for 2 hours) and 4H (ventilated for 4 hours) in relation to time. Error bars represent standard deviation. B. Dispersion chart and trend line for ventilation in pulmonary compliance in relation to peak inspiratory pressure in Group 4H animals (ventilated during 4 hours). \* $p < 0.05$  in relation to baseline of Group 2H. #  $p < 0.05$  in relation to baseline of Group 4H.

doi:10.1371/journal.pone.0194267.g003

### 3. Gasometric parameters

Gasometric results for groups 2H and 4H are summarized in [Table 2](#). No differences were found for pH,  $p\text{CO}_2$ , ABE and lactate values within the study groups, and differences between the two groups were not found either. But a tendency towards mixed acidosis in relation to duration of MV was observed. Oxygenation presented a tendency to  $p\text{O}_2$  and  $p\text{O}_2/\text{FIO}_2$  ratio reduction two hours after MV in group 2H, which was slightly more marked in group 4H after 4 hours.



**Fig. 4. Evolution of hemodynamic parameters. A. Mean arterial pressure (MAP) and B. heart rate (HR) in Groups 2H (ventilated for 2 hours) and 4H (ventilated for 4 hours). Error bars represent standard deviation. \*p<0.05 in relation to baseline of Group 2H. \* p<0.05 in relation to baseline of Group 4H.**

[doi:10.1371/journal.pone.0194267.g004](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194267.g004)

#### 4. Microvascular permeability

A significant increase in microvascular permeability was not found. Evans Blue absorbance on lung tissue was as follows: 16.08 ng/mg ± 2.45 in group C; 25.96 ng/mg ± 9.90 in group 2H and 20.39 ng/mg ± 2.20 in group 4H.

**Table 2. Results of arterial blood gas tests in Group 2H (ventilated for 2 hours, 10 ml/kg) and Group 4H (ventilated for 4 hours, 10 ml/kg).**

	Group 2H (2 hours)		Group 4H (4 hours)	
	Baseline	2 hours	Baseline	4 hours
pH	7.29±0.05	7.21±0.07	7.30±0.05	7.23±0.07
pCO <sub>2</sub>	47.96±3.56	56.87±18.04	47.33±8.51	52.84±7.73
ABE	-3.96±2.02	-6.70±1.61*	-3.70±2.72	-6.26±4.20
Lac	2.08±0.62	1.99±0.66	1.79±0.74	1.91±1.24
pO <sub>2</sub>	93.30±17.72	91.56±16.56	97.28±15.76	83.03±24.27
pO <sub>2</sub> /FIO <sub>2</sub>	444.38±84.62	436.86±79.17	462.78±74.81	385.22±115.30

Values expressed as mean ± standard deviation.

\* p < 0.05 in relation to baseline.

doi:10.1371/journal.pone.0142172.t002

## 5. Expression of aquaporins 1 and 5

AQP 1 steady state levels measured by Western blot in membrane and cytoplasm did not show statistically significant differences in relation to duration of MV (Figs 5 and 6).

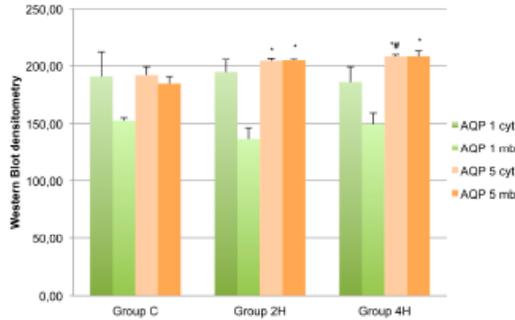
AQP-5 steady state levels in cytoplasm and membranes was significantly greater in both groups (2H and 4H) vs. the controls. Besides, AQP-5 expression on cytoplasm and membranes was greater in group 4H than in group 2H ( $p=0.027$  and  $p=0.009$ , respectively) (Figs 5 and 7). To better characterize these differences in the expression of AQP 5, a regression analysis of both variables was conducted, which provided a coefficient of determination  $R^2=0.80$  ( $p=0.008$ ) and  $R^2=0.90$  ( $p=0.001$ ) (Fig 8).

RT-PCR results show a significant increase in the amount of mRNA for AQP-1 in groups 2H and 4H compared to group C. For AQP 5, an increase was found in the amount of mRNA in group 4H compared to group C (Fig 9). The regression analysis of the amount of mRNA showed very significant determination coefficients for alveolar AQP 5 and AQP 1 in relation to duration of MV ( $R^2$  AQP-5 = 0.71 ( $p<0.001$ ) and  $R^2$  AQP-1 = 0.69 ( $p<0.001$ ).

Immunohistochemical lung preparations of AQP-5 show the membranes of type 1 pneumocytes delimiting the alveolar network. The intensity of the staining increases with duration of MV (Fig 10). AQP 1 samples show the network of the alveolar capillaries, as AQP-1 is found in endothelial cells and red blood cells but not in the pneumocytes covering the alveolus. In this case, image analysis does not show an increase in dye intensity in relation to MV time (Fig 11).

## Discussion

MV with high tidal volumes or without positive end-expiratory pressure (PEEP) may lead to the appearance of inflammatory mediators in the lung via mechanotransduction. [1, 20, 21] MV with tidal volumes over 12 ml/kg is associated with a bad prognosis, while "lung-protective ventilation" with low tidal

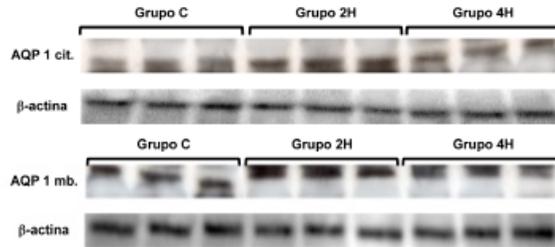


**Fig 5. Western Blot densitometry values.** Mean values. Error bars represent standard deviation. AQP 1 cyt = Aqueporin 1, cytosolic; AQP 1 mb. = Aqueporin 1, membrane; AQP 5 cyt = Aqueporin 5, cytosolic; AQP 5 mb. = Aqueporin 5, membrane. \* p < 0.05 in relation to value of Group C. # p < 0.05 in relation to value of Group 2H.

doi:10.1371/journal.pone.0142477.g005

volumes (under 10 ml/kg) and PEEP optimization reduces ventilation-induced injuries. [7]

However, ventilation with low tidal volumes may result in the appearance of an inflammatory response pattern in the lung. In rats ventilated with low pressures (12 cmH<sub>2</sub>O) and 4 cmH<sub>2</sub>O PEEP during 4 hours, increased activity of myeloperoxidase and macrophage inflammatory protein-2 and interleukin-6 has been reported. [2] Similarly, mild pro-inflammatory changes have been found in tracheal aspirates and blood of children with healthy lungs ventilated for 2 hours for heart surgery. [22] Likewise, 6 ml/Kg tidal volume MV in Wistar rats has been



**Fig 6. Western blot, AQP 1, cytosolic and membrane.**

doi:10.1371/journal.pone.0142477.g006

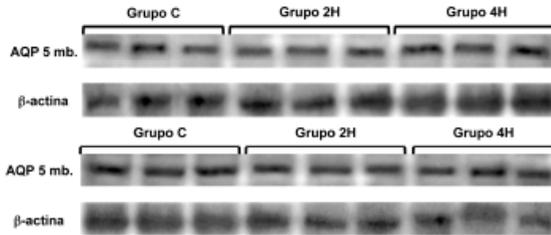


Fig 7. Western blot, AQP 5, cytosolic and membrane.

doi:10.1371/journal.pone.0114247.g007

reported to induce a proinflammatory and profibrogenic response in the lung. [23] And in mechanically ventilated mice at 7.5 ml/Kg for 5 hours, rising levels of IL-6, TNF- $\alpha$  and lung water were found. [11] Conversely, some trials have demonstrated MV with tidal volumes of 10 ml/kg during 6 hours not to cause an increase in cytokine expression. [24] Similarly, no increases in cytokines or mediators were found in previously healthy patients undergoing MV after one hour of exposure, even with tidal volumes of 15 ml/Kg. [25]

Based on our results, we fail to confirm that MV with scarcely injurious parameters during 4 hours causes acute lung damage or changes in pulmonary

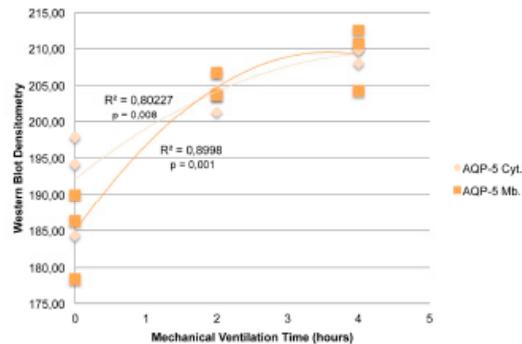
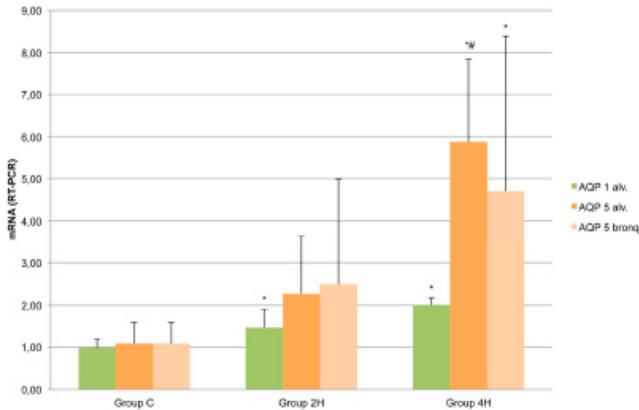


Fig 8. Dispersion chart and regression lines for Western Blot densitometry (AQP 5, cytosolic and membrane, in relation to time. Values correspond to densitometry.  $R^2$ : AQP5 cyt. = Aquaporin 5, cytosolic; AQP 5 mb. = Aquaporin 5, membrane.

doi:10.1371/journal.pone.0114247.g008



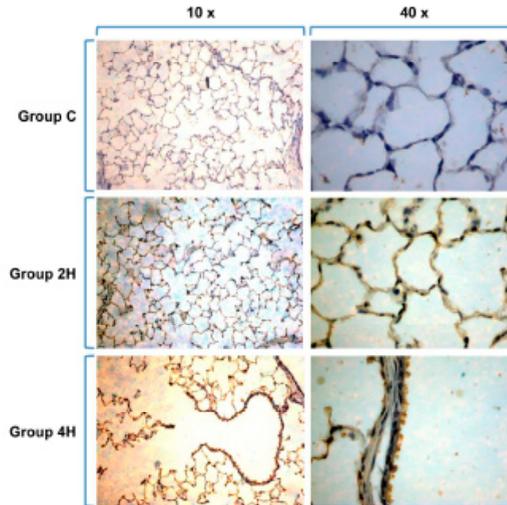
**Fig. 8. Representation of mRNA measured by RT-PCR.** Error bars represent standard deviation. \* $p < 0.05$  in relation to values of Group C, † $p < 0.05$  in relation to values of Group 2H.

DOI:10.1371/journal.pone.0194267.g008

permeability with an increase in lung water. A mild trend was observed in our experiments, however. Although levels were not measured for any inflammatory mediator, based on previous studies, inflammatory mediators are likely to be increased by MV even with low tidal volumes.

General anaesthesia and the supine position are known to cause pulmonary atelectasis with predominance in the dependent region. [26] These give the lung a heterogeneous appearance in which atelectasis areas co-exist with ailed and even overdistended areas and their corresponding transition zones. [4] Besides, the use of low tidal volumes without PEEP can result in the appearance and maintenance of atelectasis in patients under general anaesthesia and muscular relaxation. [11] Regular recruitment with frequent deep insufflations during low tidal volume MV has been reported to improve oxygenation without signs of lung injury in mice mechanically ventilated for hours. [27] Therefore, this would explain the worsening observed in the oxygenation of our animals as exposure to MV with low tidal volumes and without PEEP increased.

Our animals may have developed atelectasis in dependent areas, causing different degrees of atelectasis that would explain the degradation in oxygenation seen in the experiment (see Table 2), although it was not statistically significant, as well as the fall in pulmonary compliance and the rise in peak inspiratory pressure (see Fig. 2 and 3A). The latter parameters correlated linearly with a coefficient of determination  $R^2$  of 0.98 in group 4H (animals ventilated for 4 hours) (Fig. 3B).

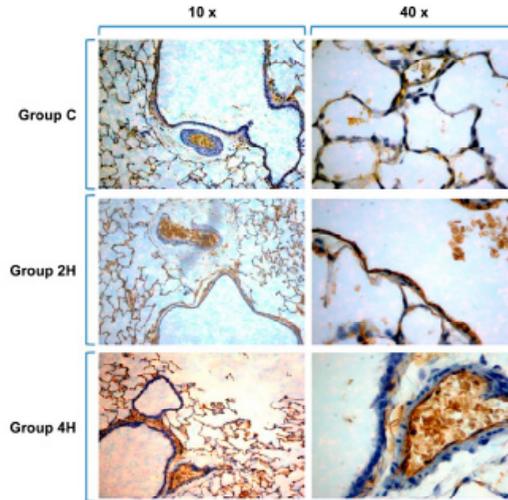


**Fig 18. Immunohistochemistry of AQP 5.** The dye stains the alveolar network and the surface of type 1 pneumocytes partially. Staining is more intense with longer MV exposure times (Groups 2H and 4H).

[doi:10.1371/journal.pone.0194267.g018](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194267.g018)

Although acid-base parameters are well-known reliable indicators of animal wellbeing, they have only been partially evaluated in murine mechanical ventilation models. [8, 23, 24, 29] In our model, ventilated animals in groups 2H and 4H showed a trend towards mixed acidosis but without significance. As a result of the formation of atelectases and higher pressures, ventilation might have been less effective, which could account for the rise in  $p\text{CO}_2$  levels, although not significantly. The metabolic component of acidosis can have several causes. Metabolic acidosis in mice can be induced by saline administration, [29, 11] which in our animals was used for maintenance at very low levels. Yet, metabolic acidosis caused by some hemodynamic failure cannot be totally excluded. This is possibly related to poor compensation for losses rather than potential deficits in venous return and secondary low cardiac output, as a result of the thoracic pressure reversal observed in positive pressure MV. [30] Similarly, heart rate data showed a significant reduction over time from minute 120 of the experiment, although always within the physiological range of rats. [31]

To date, no research group has explored the expression of AQP 1 and AQP 5 jointly in mechanically ventilated rats with low tidal volumes. However, a study



**Fig. 11. Immunohistochemistry of AQP 1.** The dye denotes the intravascular release of capillaries around the alveoli, on the endothelium, wherein AQP1 are preferentially expressed, as well as on the capillaries. No staining can be seen on type 1 pneumocytes.

[doi:10.1371/journal.pone.0194267.g011](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194267.g011)

conducted in rats ventilated with very high tidal volumes (40 ml/kg during 4 hours) showed a reduction in AQP 1 expression. The researchers suggested an inflammatory mediator secondary mechanism, as they managed to mitigate the reduction in AQP 1 by administering a cyclooxygenase 2 inhibitor. [32] In another trial, based on an animal model of ARDS induced by smoke inhalation, animals were subjected to MV, finding an increase in mRNA for AQP 1. [33] The shortcoming in these studies is the absence of a control group with non-ventilated animals to study AQP expression.

Our experiments show an increase in AQP 5 expression that became more significant as MV exposure was prolonged and, similarly, an increase in mRNA of AQP 5 which was also greater in group 4H compared to non-ventilated animals. These increases were not accompanied by significant variations in lung water content or microvascular permeability. Although an increase in AQP 1 in the lungs was not found, after 4 h of MV, our study did find a significant increase in mRNA. This is likely to be the previous step to AQP 1 synthesis. It is possibly due to the fact that a longer MV period is needed for an increase in AQP 1 on cytoplasm and membranes to be seen with the Western blot. Different factors have

been shown to modulate the amount of AQPs, reducing them under a number of pathological conditions and leading to an increase in pulmonary water and oedema. [34–36] In addition, the fact that lung injury parameters improve when their expression is induced, assigns AQPs a protective mechanism in the occurrence and development of pulmonary oedema. [37–39] Although some studies with genetically modified animals debate the possible relevant role of AQPs in the reabsorption of alveolar water, they prove the importance of these channels in pulmonary permeability. [17, 14, 40] Significant changes in lung water or microvascular permeability were not objectivized in our animals. The explanation for this could be that AQPs, according to some authors, only work in situations of stress. [18] Further studies are needed to determine the true role of AQP1 and AQP 5 in MV.

To conclude, in our model prolonged MV and tidal volumes of 10 ml/Eg for 4 hours did not result in increased pulmonary water or changes in microvascular permeability, these being mechanisms involved in ventilation-induced lung injury. Our study found an increase in the protein expression of AQP 5 and its mRNA, correlated with exposure time and mechanical ventilation. Likewise, the amount of mRNA for AQP 1 also increased in correlation with MV time. Apparently, AQP 5 and AQP 1 can have a protective effect against MV-induced pulmonary oedema, but more studies are needed to clarify whether these proteins really play a relevant role in mechanically ventilated lungs under different conditions.

#### Acknowledgments

The experiment was carried out in the facilities of the Medical School (University of Valencia).

#### Author Contributions

Conceived and designed the experiments: GF JGD LA. Performed the experiments: GF MM EF. Analyzed the data: GF JGD LA BS JC JDA FJB. Contributed reagents/materials/analysis tools: JC BS. Wrote the paper: GF JGD LA BS EF.

#### References

1. Utzig S (2002) Ventilation-induced lung injury and mechanical ventilation: Striking it too far? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282: L180–L188.
2. Dreyfuss D, Soler P, Basset G, Saumon G (1982) High inflation pressure pulmonary oedema. Respective effects of high steady pressure, high tidal volume, and positive end-expiratory pressure. *Am Rev Respir Dis* 125: 715–719.
3. Katzenstein AL, Bloor CM, Lebow AA (1975) Diffuse alveolar damage—the site of oxygen, shock, and inhalational trauma. *A review. Am J Pathol* 85: 229–228.
4. Dreyfuss D, Saumon G (1982) Ventilator induced lung injury: Lessons from experimental studies. *Am J Respir Crit Care Med* 127: 204–228.
5. Corbridge TG, Wood LD, Crawford GP, Chudoba MA, Vance J, et al. (1982) Adverse effects of large tidal volume and low PEEP in canine acute expiration. *Am Rev Respir Dis* 124(2): 371–376.

6. Amato MB, Barbas CS, Medeiros DM, Magaldi RB, Schettino GP, et al. (1998) Effect of a protective-ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* 39(3): 347–354.
7. Po authors (2000) Ventilator-associated pneumonia in acute respiratory distress syndrome. *The Acute Respiratory Distress Syndrome Network. N Engl J Med.* 342(13): 1301–1306.
8. Villar J, Kacmarek RM, Pérez-Méndez L, Aguilta-Jaime A (2008) A high positive end-expiratory pressure, low tidal-volume ventilatory strategy improves outcome in persistent acute respiratory distress syndrome: a randomized, controlled trial. *Crit Care Med.* 36(5): 1291–1298.
9. Cabellec PW, Van Pulte WF, Karaman A, Hojman CJ, Kocogluglu J (2008) Inflammatory consequences of lung ischemia-reperfusion injury and low-pressure ventilation. *J Surg Res.* 163(2): 286–301.
10. Venzler M, Helberstein FJ, van Egmond J, Heles MC, Cilman HB, et al. (2007) Mechanical ventilation in healthy mice induces reversible pulmonary and systemic cytokine elevation with preserved alveolar integrity: an in vivo model of using animal relevant ventilation settings. *Anesthesiology* 107(3): 418–428.
11. Wolke BK, Veer AP, Choi G, Pooles JJ, Juffermans NP, et al. (2008) Mechanical ventilation using non-invasive ventilation settings causes lung injury in the absence of pre-existing lung injury in healthy mice. *Crit Care* 12(1): R1.
12. Hegeman MP, Hommes SN, Kulpers NT, Bos LD, Jongsma G, et al. (2010) The extent of ventilator-induced lung injury in mice partly depends on duration of mechanical ventilation. *Crit Care Res Pract.* doi:10.1186/2045-4028
13. Kosono D, Yssel M, King LS, Agre P (2002) Aquaporin water channel: shares structure molecular dynamics in rat alveolar epithelium. *J Clin Invest.* 110(11): 1286–1298.
14. Ma Y, Fukuda R, Song Y, Muthy MA, Verlowen AS (2003) Lung fluid transport in aquaporin-5 knockout mice. *J Clin Invest.* 112: 85–100.
15. Verlowen AS (2012) Aquaporins in Clinical Medicine. *Annu Rev Med.* 63: 303–316.
16. King LS, Nelson S, Agre P (1998) Aquaporin-1 water channel protein in lung: ontogeny, alveolar expression, and distribution in rat. *J Clin Invest.* 101(10): 2183–2191.
17. Bai C, Fukuda R, Song Y, Ma Y, Muthy MA, et al. (1999) Lung fluid transport in aquaporin-1 and aquaporin-4 knockout mice. *J Clin Invest.* 103: 555–561.
18. Heles CA, Du HK, Voloshin A, Mourfemaj R, Quinn DA (2001) Aquaporin channels may modulate ventilator-induced lung injury. *Respiratory Physiology* 12(4): 168–185.
19. Chromczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162(1): 156–159.
20. Tremblay L, Valera F, Ribeiro SF, Li J, Slutsky AS (1997) Injurious ventilator strategies increase cytokines and iNOS mRNA expression in an isolated rat lung model. *J Clin Invest.* 100: 814–822.
21. Bueno PC, Bueno CB, Santos ML, Oliveira-Junior J, Salomão R, et al. (2002) Ventilation with high tidal volume induces inflammatory lung injury. *Braz J Med Biol Res.* 35(7): 104–106.
22. Pota PB, Vreugdenhil MP, Slutsky AS, Zijlstra J, Hojman CJ, et al. (2002) Mechanical ventilation alters the immune response in children without lung pathology. *Intensive Care Med.* 28: 485–492.
23. Caruso P, Mezzano S, Pato LF, Meaud Y, Marline MA, et al. (2003) Low tidal volume ventilation induces proinflammatory and proliferative responses in lungs of rats. *Intensive Care Med.* 28(10): 1606–1611.
24. Altemeier NA, Metub-Bello G, Othari SA, Glenn RW, Martin TR, et al. (2006) Modulation of lipopolysaccharide-induced gene transcription and promotion of lung injury by mechanical ventilation. *J Immunol.* 176(5): 3269–3276.
25. Wrigge H, Zinnerling J, Stuber F, von Spiegel Y, Hering R, et al. (2000) Effects of anaesthetic ventilation on release of cytokines into systemic circulation in patients with normal pulmonary function. *Anesthesiology.* 10: 1415–7.

36. Hedenstierna G, Lundquist H, Lundh B, Totter L, Strandberg A, et al. (1988) Pulmonary aeration during anaesthesia. An experimental study on lung morphology and gas exchange. *Eur Respir J* 2(6): 625–636.
37. Allen GR, Surek BR, Rinaldi L, Petty JM, Bales JR (2008) Choosing the frequency of deep inflation in mice balancing maintenance against ventilator-induced lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297: L1763–L1777.
38. Belperio JA, Keane MP, Burdick MD, Lindsie V, Xue YY, et al. (2002) Critical role for CXCR2 and CXCR2 ligands during the pathogenesis of ventilator-induced lung injury. *J Clin Invest* 112: 1708–1718.
39. Zurbler GJ, Emone VM, Ince C (2002) Hemodynamic of anaesthetized ventilated mouse: intracolic aspects of anaesthesia, fluid support, and alveoli. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283(3): H2088–2105.
40. Schwartz LA, Zurbler GJ, Ince C (2002) Mechanical ventilation of mice. *Basic Res Cardiol* 95(6): 610–620.
41. Papadimitrakou F, Katsinos T, Dotsis I, Lekakos P, Petrou D (2008) The use of mice and mice as animal models for nonpulmonary ventilation research. *Lab Anim* 42(2): 265–276.
42. Jin LD, Wang LP, Wu LG, Shen YL, Zhou XY, et al. (2013) Effects of CXCR2 inhibitor on ventilator-induced lung injury in mice. *Int Immunopharmacol* 16(2): 288–296.
43. Sotomayor PC, Chow J, Savage C, Rudloff HL, Fallowfield KJ, et al. (2001) Interleukin-6, aquaporin-1, and inducible nitric oxide synthase in acute and late injured sheep treated with postischemic carbon dioxide removal. *ASAIO J* 47(4): 385–391.
44. Wang F, Huang H, Lu F, Chen Y (2013) Acute lung injury and change in expression of aquaporin 1 and 5 in a model of acute pancreatitis. *Hepato-gastroenterology* 57(104): 1653–1657.
45. Yue DW, Xue XD (2008) Relationship between expression of aquaporin-1, -5 and pulmonary edema in hyperoxia-induced lung injury in newborn mice. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi* 10(2): 147–150.
46. Jiao Q, Li B, Yu R (2002) Decreased expression of AQP1 and AQP5 in acute injured lungs in mice. *Chin Med J (Engl)* 115(7): 885–887.
47. Geo GB, Yin G, Huang L, Shen Z, Yang JB, et al. (2012) Effect of angiotensin II on the expression of aquaporin 1 in lung of rats following acute lung injury. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue* 22(7): 428–430.
48. Wu XM, Wang HY, Li QF, Jiang B, Chen WM (2008) Dobutamine enhances alveolar fluid clearance in a rat model of acute lung injury. *Lung* 167(4): 225–231.
49. Dong C, Wang Q, Li B, Xiao K, He Z, et al. (2012) Anti-endothelin agonist attenuates pulmonary edema by upregulating AQP1 and AQP5 expression in the lungs of mice with endotoxin-induced edema. *Respir Physiol Neurobiol* 181(1): 21–28.
50. Song Y, Fukuda R, Bai C, Ma Y, McElroy MA, et al. (2000) Role of aquaporin in alveolar fluid clearance in neonatal and adult lung, and in edema resolution following acute lung injury: studies in transgenic aquaporin null mice. *J Physiol* 526(Pt3): 771–778.