



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Tesis Doctoral

Comunicación pulmón-cerebro durante la ventilación mecánica:
estudio de la respuesta inflamatoria y la activación neuronal en dos
modelos experimentales

María Elisa Quílez Tierno

Tesis realizada bajo la dirección de:

Dr. Lluís Blanch Torra y Dra. Josefina López Aguilar

Tutor: Dr. Ferrán Segura Porta

M^a Elisa Quílez Tierno

Dr. Lluís Blanch Torra

Dr. Ferrán Segura Porta

Dra. Josefina López Aguilar

Doctoranda

Directores

Tutor

Programa de Doctorado en Medicina

Departamento de Medicina

Universidad Autónoma de Barcelona

Barcelona, 2016

Lluís Blanch Torra, doctor en Medicina por la Universidad Autónoma de Barcelona, sénior en Medicina Intensiva y Director de Investigación e Innovación de la Corporación Sanitaria Parc Taulí. Director del Instituto de Investigación e Innovación Parc Taulí-I3PT.

Josefina López Aguilar, doctora en Biología por la Universidad Autónoma de Barcelona e investigadora sénior del Instituto de Investigación e Innovación Parc Taulí-I3PT.

Ferrán Segura Porta, doctor en Medicina, Director de la Cátedra de Enfermedades Infecciosas del Instituto Universitario-Fundación Parc Taulí y Profesor Titular de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona.

CERTIFICAN

Que la tesis doctoral titulada “Comunicación pulmón-cerebro durante la ventilación mecánica: estudio de la respuesta inflamatoria y la activación neuronal en dos modelos experimentales” ha sido realizada por la doctoranda María Elisa Quílez Tierno bajo su dirección, y es apta para su defensa pública delante de un tribunal para optar al grado de Doctora por la Universidad Autónoma de Barcelona.

Dr. Lluís Blanch Torra

Dra. Josefina López Aguilar

Dr. Ferrán Segura Porta

Directores

Tutor

Sabadell, Abril 2016

AGRADECIMIENTOS

Yo no quería hacer “Agradecimientos”. No quería.

Y no porque no tuviera nada que agradecer, que más bien **es todo lo contrario**, sino porque no me apetecía seguir la norma y además, me daba una pereza mortal tener que estrujarme la cabeza para hacer memoria y no dejarme a nadie en el tintero. Porque soy una maniática de la leche (¿se puede poner “de la leche” en una tesis?) y si me dejara a alguien, los remordimientos no me iban a dejar vivir. Por eso decidí que yo, indiscutiblemente, no iba a hacer apartado de “Agradecimientos”. Punto.

Lo que sí iba a hacer es poner una frase con una dedicatoria. De hecho, hacía tiempo que la tenía pensada. Era una frase perfecta, sin fisuras, que incluía a todas las personas que han estado a mi lado estos años de mi vida y que además le rendía un pequeño homenaje a mi madre...De esa forma se zanjaba el problema y todo el mundo quedaría contento.

Pero un día, tras una larga conversación, alguien me hizo ver que una tesis sin “Agradecimientos” iba a quedar más fría que la guía telefónica. Que eso quedaría para siempre ahí, en la red, *per secula seculorum*. Todo el mundo que viera esa tesis iba a pensar que la autora era una desagradecida y una engreída...Así que tras reflexionar un poco, finalmente decidí incluir en mi tesis, el dichoso apartado de “Agradecimientos”. A fin y al cabo, sería el único capítulo de la tesis que iba a entender todo el mundo. Así que ahí va:

Quisiera dar las gracias a todas aquellas personas que han formado parte de esta etapa de mi vida y muy especialmente, a mi madre.

María Elisa Quílez, “*Malili*”

“Lo importante es no dejar de hacerse preguntas”

Albert Einstein

PRESENTACIÓN

La presente tesis doctoral está estructurada siguiendo las directrices del Marco Regulador del Doctorado de la Escuela de Postgrado y del Departamento de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona (RD 1393/2007), y se presenta como un compendio de publicaciones, tal y como aceptó la Comisión Académica del Programa de Doctorado en Medicina, el 27 de enero de 2016.

Los estudios que conforman esta tesis doctoral pertenecen a una misma línea de investigación, dirigida al estudio de la comunicación entre el pulmón y el cerebro en el contexto de la ventilación mecánica. Los resultados de estos estudios han aportado información novedosa en este campo y han sido recogidos en dos artículos originales publicados en revistas de elevado factor de impacto.

Las publicaciones incluidas en esta tesis por compendio son:

- **Quílez ME**, Fuster G, Villar J, Flores C, Martí-Sistac O, Blanch L, López-Aguilar J. *Injurious mechanical ventilation affects neuronal activation in ventilated rats*. Crit Care. 2011;15(3):R124. Epub 2011 May 13. Erratum in: Crit Care. 2015;19:379. (IF: 4,607)
- **Quílez ME**, Rodríguez-González R, Turon M, Fernandez-Gonzalo S, Villar J, Kacmarek RM, Gómez MN, Oliva JC, Blanch L, López-Aguilar J. *Moderate PEEP After Tracheal Lipopolysaccharide Instillation Prevents Inflammation and Modifies the Pattern of Brain Neuronal Activation*. Shock. 2015 Dec;44(6):601-8. (IF: 3,045)

ÍNDICE

MARCO TEÓRICO.....	15
ABREVIATURAS.....	17
1. INTRODUCCIÓN	19
1.1. Alteraciones neurocognitivas adquiridas en el paciente crítico.....	21
1.2. Fisiopatología pulmonar en el paciente crítico.....	25
1.2.1. Lesión pulmonar aguda (LPA) y síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA).....	25
1.2.2. Ventilación mecánica: conceptos generales y complicaciones asociadas a su uso.....	27
1.2.3. Estrategias de ventilación protectora.....	31
1.3. Interacción pulmón-cerebro en el paciente ventilado.....	34
1.3.1. De cerebro a pulmón	34
1.3.2. De pulmón a cerebro	36
1.4. c-Fos.....	40
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	43
2.1. Justificación del trabajo.....	45
2.2. Objetivos.....	45
3. METODOLOGIA	47
3.1. Procedimiento quirúrgico y monitorización	49
3.1.1. Anestesia, cirugía e instrumentación.....	49
3.1.2. Monitorización	50
3.1.3. Variables fisiológicas evaluadas.....	50
3.2. Obtención de muestras biológicas.....	52

3.3. Análisis histológicos y moleculares.....	52
3.3.1. Histología pulmonar.....	52
3.3.2. Evaluación de la apoptosis en pulmón mediante ensayo TUNEL ...	53
3.3.3. Análisis inmunohistoquímico de c-Fos en cerebro	54
3.3.4. Determinación de citoquinas y quimiocinas en plasma y pulmón....	57
3.4. Protocolos de VM y grupos experimentales.....	59
3.4.1. Trabajo I. Efectos de un patrón de ventilación lesivo mediante V_C elevado.....	59
3.4.2. Trabajo II. Efecto de la PEEP en un modelo de ventilación con bajo V_C	61
3.5. Análisis estadístico	63
4. RESULTADOS.....	65
4.1. Estudio del efecto de la VM en la activación neuronal y la respuesta inflamatoria local y sistémica, en un modelo de VM lesiva en ratas	67
4.1.1. Resumen	67
4.1.2. Resultados.....	67
4.2. Evaluación del efecto modulador de la PEEP en la respuesta inflamatoria y la activación neuronal, en un modelo experimental de VM con bajo V_C e instilación de lipopolisacárido	71
4.2.1. Resumen	71
4.2.2. Resultados.....	72
5. DISCUSIÓN	77
6. CONCLUSIONES	89
7. ANEXO I. Compendio de publicaciones.....	93
7.1. Artículo 1: <i>Injurious mechanical ventilation affects neuronal activation in ventilated rats</i>	95
7.2. <i>Erratum</i> (artículo 1).....	107

7.3. Artículo 2: <i>Moderate PEEP after tracheal lipopolysaccharide instillation prevents inflammation and modifies the pattern of brain neuronal activation</i>	109
7.4. <i>Supplemental Digital Content (artículo 2)</i>	117
8. ANEXO II. Otras publicaciones	121
9. BIBLIOGRAFÍA	137

MARCO TEÓRICO

En las últimas décadas, el aumento en la supervivencia de los pacientes ingresados en las unidades de cuidados intensivos (UCI), ha puesto de manifiesto un problema hasta ahora poco conocido: el desarrollo de alteraciones neurocognitivas a largo plazo en muchos de los supervivientes de UCI. Estas deficiencias asociadas a la estancia en UCI, conllevan una importante disminución en la calidad de vida de los pacientes además de representar una sustancial carga socioeconómica. Diversos estudios clínicos han revelado que la presencia de estas alteraciones ocurre con mayor frecuencia en determinadas poblaciones de pacientes, como es el caso de pacientes que han sufrido síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA) o en aquellos pacientes que recibieron soporte ventilatorio durante su estancia en UCI. Estos datos revelan la importancia del eje pulmón-cerebro en el contexto del enfermo crítico que recibe ventilación mecánica (VM).

En este contexto, la VM es una herramienta de soporte vital básico, ampliamente utilizada en las UCI, aunque su uso no está exento de complicaciones. Desde hace tiempo, se sabe que un patrón de VM inadecuado, incluso en pulmones sanos, puede provocar lesión pulmonar *de novo* o empeorar la lesión previa existente. Se ha demostrado también que la lesión pulmonar inducida por la VM es capaz de desencadenar una respuesta biológica que cursa a través de la liberación de mediadores inflamatorios, agravando el daño pulmonar y favoreciendo la propagación de la lesión a otros órganos distales.

Por este motivo, en la práctica clínica, se han implementado numerosas estrategias de ventilación enfocadas a disminuir los efectos deletéreos de la VM. Las denominadas estrategias de ventilación protectora, caracterizadas por el uso de bajos volúmenes corriente y presión positiva al final de la espiración, atenúan la respuesta inflamatoria derivada de la ventilación y han demostrado tener impacto en la mortalidad de los pacientes con SDRA.

En conjunto, la evidencia clínica parece indicar que los pacientes críticos sometidos a VM son especialmente susceptibles a sufrir alteraciones pulmonares y neurocognitivas. Por tanto, es necesario profundizar en el

conocimiento de los mecanismos moleculares que convergen en el pulmón sometido a VM y su potencial efecto sobre el sistema nervioso central. Sólo así, se podrán desarrollar estrategias terapéuticas dirigidas a minimizar el impacto de la ventilación en el paciente crítico, y a la mejora del pronóstico tanto a nivel pulmonar como neurológico.

Bajo este marco teórico, la presente tesis doctoral pretende investigar la interacción pulmón-cerebro en el contexto de la VM. Con este fin, se ha analizado la influencia de la VM en la respuesta inflamatoria (local y sistémica) y en la activación neuronal (mediante el análisis de c-Fos), en un modelo experimental en ratas. Asimismo, se ha evaluado el efecto de dos estrategias de ventilación protectora, en la modulación de la inflamación y del patrón de activación neuronal.

ABREVIATURAS

Ach	Acetilcolina
ARDS	<i>Acute Respiratory Distress Syndrome</i>
ARN	Ácido ribonucleico
BALF	Fluido broncoalveolar
BHE	Barrera hematoencefálica
CeA	Amígdala Central
cmH ₂ O	centímetros de agua
CrS _{est}	Compliancia del sistema respiratorio
CVO	Órgano circunventricular
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
FiO ₂	Fracción Inspirada de Oxígeno
HC	Hipocampo
IEG	<i>Immediate Early Gene</i>
IHQ	Inmunohistoquímica
IL	Interleuquina
LIS	<i>Lung Injury Score</i>
LPA	Lesión Pulmonar Aguda
LPS	Lipopolisacárido
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos-1
MIP-2	Proteína inflamatoria de macrófagos-2
mmHg	milímetros de mercurio
NAV	Neumonía Asociada a Ventilación mecánica
NTS	Núcleo del Tracto Solitario
PaCO ₂	Presión Arterial de Dióxido de Carbono
PAM	Presión Arterial Media

Abreviaturas

PaO ₂	Presión Arterial de Oxígeno
PEEP	Presión Positiva al final de la espiración
PMN	Polimorfonuclear
Pplat	Presión meseta o <i>plateau</i>
PVN	Núcleo Paraventricular del Hipotálamo
RS	Corteza Retrosplenial
SDMO	Síndrome de disfunción multiorgánica
SDRA	Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo
SNC	Sistema Nervioso Central
SON	Núcleo Supraóptico
TAV	Traqueobronquitis Asociada a Ventilación mecánica
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)- mediated dUTP nick end-labeling</i>
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
V _C	Volumen Corriente
VILI	Lesión Pulmonar Inducida por Ventilación mecánica
VM	Ventilación Mecánica
ZEEP	PEEP de 0 cmH ₂ O (<i>Zero-end expiratory pressure</i>)

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ALTERACIONES NEUROCOGNITIVAS ADQUIRIDAS EN EL PACIENTE CRÍTICO

La unidad de cuidados intensivos (UCI), es el área hospitalaria destinada a la atención y el tratamiento de pacientes en situación grave o crítica, pero con posibilidad de recuperación. El paciente ingresado en UCI, es un paciente de tipología polivalente que requiere soporte vital y un alto grado de monitorización, que no pueden ser administrados en otras unidades de hospitalización.

En una revisión de la Junta Directiva de la Sociedad Española de Medicina Intensiva, Crítica y Unidades Coronarias (SEMICYUC) [1] en 2010, se contabilizaron unos 300 servicios de medicina intensiva, con un total aproximado de 3.500 camas, distribuidas a lo largo de todo el país. Se estima que estas unidades tratan anualmente unos 240.000 pacientes, con un índice de mortalidad del 11% aproximadamente [1].

Hasta hace relativamente poco, las intervenciones terapéuticas en las UCI tenían como objetivo principal la supervivencia de los pacientes, más allá de los posibles efectos a largo plazo en su calidad de vida. En las últimas décadas los importantes avances en el manejo de los pacientes críticos han contribuido notablemente a incrementar los índices de supervivencia de éstos, poniendo así de manifiesto un hecho hasta ahora poco conocido como es el desarrollo de alteraciones neurocognitivas en algunos de los pacientes supervivientes [2]. Estas deficiencias que se asocian a la estancia en UCI, se extienden más allá de la fase aguda de la enfermedad y conllevan una importante disminución en la calidad de vida de los pacientes, además de suponer una carga económico-social nada desdeñable. En la actualidad están surgiendo numerosos estudios donde se evalúan las secuelas cognitivas en estos pacientes [3] y los datos recogidos hasta la fecha revelan que hasta un tercio de los pacientes supervivientes de UCI pueden presentar a largo plazo, deficiencias neurocognitivas similares a las observadas en las demencias leves y moderadas [4]. En determinadas poblaciones, como son los supervivientes de síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA) [5, 6] o pacientes que recibieron

soporte ventilatorio prolongado (más allá de 5 días) [7], se ha observado que la prevalencia de estas alteraciones es aún mayor.

Tanto la lesión pulmonar aguda (LPA) como el SDRA, son patologías asociadas a altos índices de morbilidad, que incluyen tanto aspectos físicos como neurológicos. La morbilidad neurológica, comprende un alto espectro de patologías y puede incluir polineuropatías, encefalopatías y deterioro neurocognitivo. En una revisión de la literatura en 2010, Hopkins y col. [8], identificaron hasta 10 estudios, que sumaban un total de 455 pacientes supervivientes de UCI, en los que se habían evaluado las alteraciones neurocognitivas a medio-largo plazo. La evidencia a partir del estudio de cohortes, sugiere que entre un 25-78% de los supervivientes experimentan algún tipo de déficit neurocognitivo tras el alta hospitalaria. En el caso de pacientes con SDRA este porcentaje puede aumentar hasta alcanzar un 80% [6]. En otro estudio en supervivientes de SDRA, el mismo grupo, reportó que la prevalencia de estas secuelas cognitivas podía afectar hasta a un 70% de estos pacientes en el momento del alta hospitalaria, a un 45% al año y a un 47% a los 2 años [8]. Los resultados de este estudio revelan además, que las secuelas mejoran durante los primeros 6-12 meses tras el alta, pero que las alteraciones neurológicas tienden a estabilizarse y cronificarse a partir del año [9].

Los déficits neurocognitivos observados en los supervivientes de SDRA así como en el resto de pacientes de la UCI, están relacionados con un amplio espectro de dominios cognitivos [2]. Desafortunadamente, los estudios realizados hasta la fecha, no permiten determinar la naturaleza exacta de estas deficiencias. Tampoco es fácil establecer comparaciones entre las alteraciones cognitivas entre distintos grupos de pacientes y estudios, debido a la discrepancia en el consenso de definición de secuelas cognitivas, la disparidad de métodos de evaluación utilizados o el tiempo de seguimiento tras el alta. Asimismo, variables como el tipo de patología crítica del paciente, la existencia de alteraciones neurológicas previas o la edad, pueden condicionar qué dominios presentan mayor afectación [10]. A pesar de esta amplia variabilidad, Hopkins y col. establecen que, de forma general, el déficit de memoria es la

alteración neurocognitiva que se presenta con mayor frecuencia, seguido del déficit en la función ejecutiva y del déficit de atención [2].

Además de las alteraciones cognitivas mencionadas anteriormente, se ha reportado que los pacientes sometidos a ventilación mecánica (VM), pueden manifestar también otras alteraciones neuropsicológicas como trastornos de ansiedad o depresión [11, 12].

Algunas poblaciones de pacientes presentan una mayor susceptibilidad al deterioro neurológico, como es el caso de los pacientes geriátricos con deterioro cognitivo preexistente, con lesión cerebral aguda o demencia. En estos pacientes las alteraciones neurocognitivas asociadas al estado crítico, pueden agravar un deterioro cognitivo leve preexistente y desencadenar el llamado síndrome de “demencia acelerada por la estancia en UCI”.

Las investigaciones realizadas hasta ahora no han elucidado de manera clara el vínculo entre la enfermedad de base del paciente crítico y el desarrollo de estas deficiencias [9]. De hecho, los estudios indican que las disfunciones observadas en los supervivientes de UCI no pueden explicarse únicamente por el grado de severidad de la patología crítica y postulan que otros factores pueden influir en las mismas [8].

A pesar de que aún se desconocen los mecanismos exactos por los cuales se produce el deterioro neurológico, sí parece claro que la presencia de síndrome confusional, una de las alteraciones neuropsiquiátricas más observadas en la fase aguda de los pacientes críticos, estaría asociada al deterioro cognitivo a largo plazo. La prevalencia de este síndrome se sitúa entre un 50-70% en pacientes de UCI no ventilados mecánicamente, y aumenta hasta un 60-80% en pacientes con VM [2, 13]. Girard y col. [14] concluyen que, la duración del síndrome confusional en pacientes ventilados es, en sí mismo, un factor predictor independiente del déficit cognitivo, hasta un año después del alta de la UCI.

La etiología de las alteraciones cerebrales adquiridas en el paciente crítico es indudablemente multifactorial, pudiendo ser resultado tanto de las múltiples disfunciones orgánicas derivadas de la patología como de su tratamiento durante la estancia en UCI [15-17]. Entre los factores que podrían

contribuir al desarrollo de deterioro neurológico se hallan la hiperglicemia, la hipoxemia, el uso de determinados sedantes y, como ya se ha mencionado, la presencia de síndrome confusional.

La liberación masiva de citoquinas inflamatorias bien a nivel local como sistémico podría influir también en el desarrollo de alteraciones cognitivas. En este sentido, se han relacionado procesos de inflamación a nivel cerebral con algunas enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer o la enfermedad de Parkinson [16]. Asimismo, varios estudios refieren déficits de atención, concentración y memoria en pacientes que presentan niveles elevados de citoquinas circulantes [9, 17].

Los déficits cognitivos crónicos adquiridos tienen importantes consecuencias en estos pacientes, interfieren en el desarrollo normal de sus actividades cotidianas y, dificultan el retorno a la vida laboral mermando considerablemente su calidad de vida. Un estudio en supervivientes de SDRA reveló que dos años después del alta hospitalaria, un 34% de estos pacientes estaba recibiendo algún tipo de prestación por incapacidad y otro 32% no había vuelto a trabajar o se había retirado anticipadamente [9]. En esta línea, en otro estudio de seguimiento de los pacientes con SDRA al año del alta hospitalaria [18], Herridge y col. observaron que hasta en un 51% de los casos, los pacientes no podían volver a desarrollar su actividad laboral previa.

El potencial impacto económico-social que supone una creciente población de supervivientes de UCI con secuelas neurocognitivas, es otro aspecto a tener en cuenta. La alta y prolongada demanda de tratamientos médicos que requieren estos pacientes, no sólo representan una considerable carga económica para sus familias, sino que también genera importantes costes para el sistema de salud y sociosanitario.

1.2. FISIOPATOLOGÍA PULMONAR EN EL PACIENTE CRÍTICO

1.2.1. LESIÓN PULMONAR AGUDA (LPA) Y SÍNDROME DE DISTRÉS RESPIRATORIO AGUDO (SDRA)

La LPA y su forma más severa, el SDRA, son dos patologías pulmonares que se observan con frecuencia en el paciente crítico y que están asociadas a una alta morbilidad y mortalidad [19]. El término SDRA fue descrito por primera vez en 1967 por Ashbaugh y colaboradores [20] y se definió como un cuadro caracterizado por taquipnea, disnea severa, infiltración alveolar y disminución de la distensibilidad pulmonar. Más adelante, en 1994, la Conferencia de Consenso Americano-Europea propuso la definición formal de SDRA [21] siguiendo los siguientes criterios diagnósticos (Tabla 1):

1) Dificultad respiratoria grave de comienzo agudo, 2) Presencia de infiltrados bilaterales en la radiografía de tórax, 3) Presión capilar pulmonar inferior a 18 mmHg o sin evidencias clínicas de insuficiencia ventricular izquierda y 4) Hipoxemia severa ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200$ mmHg). Asimismo, se incorporó el término de lesión pulmonar aguda (LPA) o ALI (del inglés *Acute Lung Injury*). Este último concepto, se reservó para casos de menor gravedad y está definido por el grado de hipoxemia ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 > 200$ mmHg y ≤ 300 mmHg).

	Oxigenación ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$)	Tiempo	Radiografía de tórax	Presión enclavamiento arteria pulmonar
LPA	≤ 300 mmHg	Comienzo agudo	Infiltración bilateral	≤ 18 mmHg o sin evidencias de hipertensión de aurícula izquierda
SDRA	≤ 200 mmHg			

Tabla 1. Criterios de LPA y SDRA, según el consenso americano-europeo (1994)

En el Congreso de la Sociedad Europea de Medicina Intensiva (ESICM) celebrado en Berlín en 2011, se presentó la nueva definición de SDRA [22]. En la nueva definición de Berlín, se establecen las siguientes variables para el diagnóstico:

1) Tiempo de inicio: Debe ser agudo y estar dentro del periodo de una semana desde el inicio de los síntomas, 2) Imagen torácica: Se mantiene el

criterio de infiltrado bilateral en la radiografía de tórax y 3) Origen del edema: La insuficiencia respiratoria no puede explicarse por una insuficiencia cardíaca o sobrecarga de líquidos.

Una de las novedades más importantes de la definición Berlín es la estratificación del SDRA en tres niveles de gravedad, según el grado de hipoxemia presente: Leve ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ de 201-300 mmHg), Moderado ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200$ mmHg) y Grave ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 100$ mmHg). En segundo lugar la nueva definición elimina el concepto de LPA, que es substituido por el de SDRA leve (Tabla 2).

SDRA	Leve	Moderado	Grave
Hipoxemia ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$)	200-300 mmHg	$\leq 200 - >100$ mmHg	≤ 100 mmHg
Tiempo inicio	Inicio dentro de una semana desde el diagnóstico de la causa predisponente o deterioro de los síntomas respiratorios		
Imagen torácica	Opacidades bilaterales no explicables por derrame, atelectasia pulmonar o nódulos		
Origen del edema	Fallo respiratorio no explicable por una insuficiencia cardíaca o sobrecarga de líquidos		

Tabla 2. Nueva definición de Berlín de SDRA (2011) de la ESICM

Los importantes progresos científicos de la última década, han permitido avanzar notablemente en el conocimiento del SDRA, sin embargo, hoy en día su tratamiento sigue siendo principalmente el soporte ventilatorio. No obstante, a pesar de ser una herramienta de soporte vital básica en el tratamiento de pacientes con LPA / SDRA, la ventilación asistida, sigue siendo una estrategia terapéutica no exenta de complicaciones.

1.2.2. VENTILACIÓN MECÁNICA: CONCEPTOS GENERALES Y COMPLICACIONES ASOCIADAS A SU USO

La VM, es una herramienta de soporte vital básico y la principal estrategia terapéutica en el tratamiento de la insuficiencia respiratoria aguda en la UCI. La pérdida de la capacidad respiratoria, puede ser consecuencia de patologías de origen pulmonar, como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica o el SDRA, pero también ser secundaria a otras patologías como enfermedades neuromusculares o traumatismos graves. Cuando la función respiratoria fracasa, la VM garantiza el intercambio gaseoso adecuado y proporciona el tiempo necesario hasta que la recuperación de la enfermedad de base permite restaurar la función respiratoria normal.

Aunque el empleo de soporte ventilatorio está ampliamente extendido en las UCI y se estima que un 40% de pacientes críticos reciben VM en algún momento de su estancia en estas unidades, su uso no está libre de complicaciones. Desde hace tiempo, se sabe que la VM, incluso en pulmones sanos, puede inducir la aparición de lesión pulmonar *de novo* o empeorar la lesión previa existente [23-25]. A este fenómeno se le denomina lesión pulmonar inducida por ventilación mecánica o VILI (del inglés *ventilator-induced lung injury*). Desde que se definiera el concepto de VILI, se han realizado multitud de investigaciones dirigidas a responder cuestiones sobre la influencia de los distintos parámetros ventilatorios utilizados o la identificación de aquellos factores pulmonares o extrapulmonares que pueden predisponer al desarrollo de esta patología [26]. En esta línea, numerosos estudios clínicos y experimentales han demostrado que la VM es capaz de desencadenar una respuesta biológica que, entre otros mecanismos, cursa a través de la liberación de mediadores inflamatorios, agravando la lesión pulmonar y favoreciendo la propagación a otros órganos.

Es primordial comprender los mecanismos que determinan el desarrollo de la VILI para poder aplicar estrategias ventilatorias que minimicen, en lo posible, sus efectos lesivos sobre el pulmón. Se han descrito algunos mecanismos a través de los cuales la VM puede inducir lesión pulmonar (Figura 1):

Barotrauma y/o volutrauma: se define como una lesión pulmonar producida por altas presiones y/o volúmenes administrados por el ventilador.

En el barotrauma, el daño pulmonar se produce cuando la presión excesiva en la vía aérea genera una sobredistensión de los espacios alveolares que puede incluso conducir a la rotura de la pared alveolar y a la consiguiente fuga de aire fuera del tracto respiratorio. Este gas extraalveolar puede producir, entre otras complicaciones, enfisema intersticial, neumomediastino o incluso, neumotórax. La rotura de la pared alveolar es producto de una suma de factores, de un lado los derivados del manejo respiratorio y de otro de factores relacionados con el estado del paciente, como la propia patología de base (infecciones, edema, etc.), el SDRA o la presencia de secreciones excesivas.

Debido a las características que presenta el parénquima pulmonar, los pacientes con SDRA son especialmente susceptibles al desarrollo de VILI. En el pulmón de un paciente con SDRA, las lesiones se distribuyen de forma heterogénea distinguiéndose áreas con diferentes grados de aireación, lo que implica que la ventilación tenga un efecto diferente en función del área tratada: Esto implica que las presiones necesarias para ventilar y mantener abiertas áreas con colapso alveolar, puedan generar sobredistensión e inclusive daño, en aquellas áreas del pulmón bien aireadas [27]. Algunas de las recomendaciones clínicas enfocadas a evitar el desarrollo de barotrauma incluyen: la reducción de las presiones meseta (*plateau*) de la vía aérea, la optimización de los niveles de presión positiva al final de la espiración (PEEP) y principalmente el uso de volumen corriente (V_C) bajo. Recientemente además, se ha demostrado que la reducción de la presión de distensión (“*driving pressure*”) se asocia a un incremento en la supervivencia en pacientes con SDRA [28, 29].

El término volutrauma fue establecido por Dreyfuss [30] al observar que la VM con V_C elevados era capaz de propiciar la generación de edema pulmonar independientemente de que hubiera o no presiones elevadas. La sobredistensión de los alvéolos debida al volutrauma se asocia a la degradación del surfactante, a la disrupción de la barrera endotelio-epitelial, al incremento de los niveles de citoquinas y a la infiltración de células inflamatorias en el pulmón.

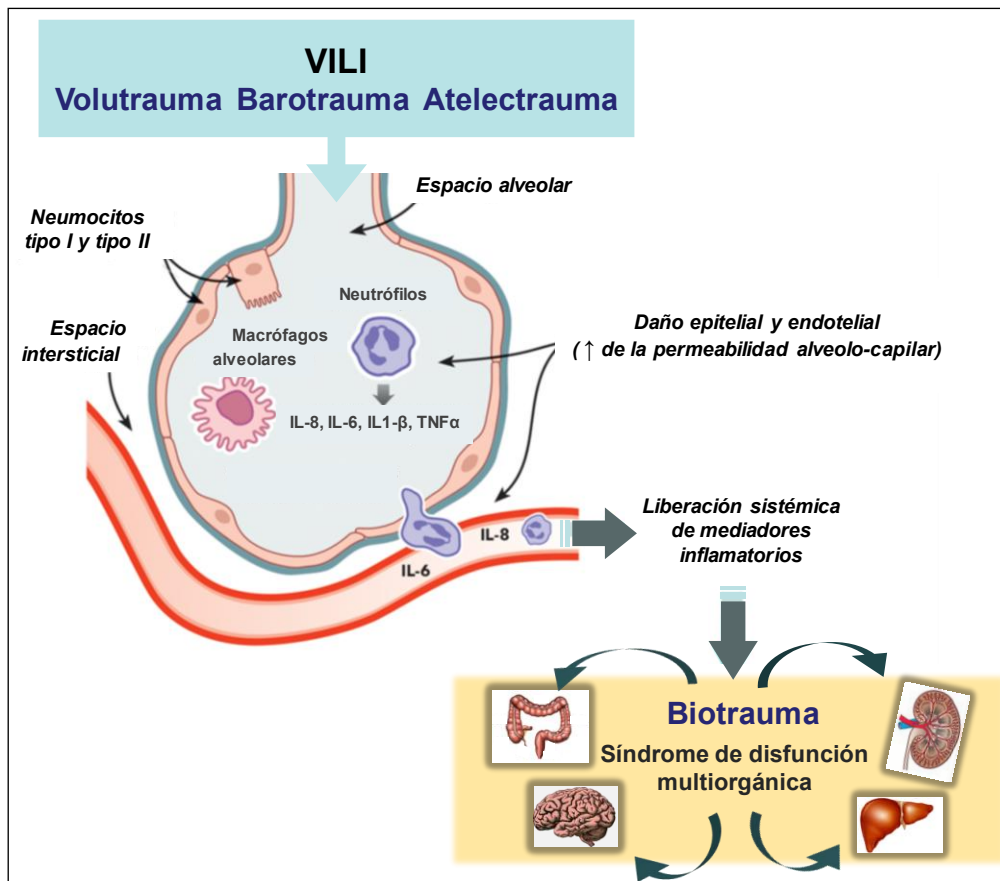


Figura 1. Mecanismos de lesión pulmonar inducida por ventilación mecánica (VILI). Modificado de Futier et al. *Anesthesiology*, 2014 Aug; 121(2):400-8.

Atelectrauma: Se define como la lesión derivada del proceso cíclico de cierre y reapertura de las unidades alveolares. Este tipo de lesión se ha relacionado con el uso de volúmenes inspiratorios excesivamente bajos o bajos niveles de PEEP. Esta situación de reclutamiento/desreclutamiento de los alvéolos puede inducir desgarro alveolar, por el aumento de las fuerzas de estrés que tiene su origen en la interdependencia entre los alvéolos distendidos y los colapsados. Como en el caso del volutrauma, en la lesión por atelectrauma se observa un deterioro de la función del surfactante y un incremento de la permeabilidad vascular, lo que propicia la aparición de edema pulmonar.

Biotrauma: Se define como la lesión pulmonar derivada de la liberación de mediadores inflamatorios en el pulmón como consecuencia de la aplicación de un patrón de ventilación inadecuado. En algunos casos la inflamación localizada inicialmente en el pulmón puede difundirse a nivel sistémico.

El mecanismo por el cual se produce la conversión de un estímulo mecánico derivado de la VM en una señal molecular se denomina mecanotransducción. Las fuerzas de deformación y estiramiento que se generan sobre el alveolo durante la VM desencadenan respuestas celulares que pueden activar la cascada inflamatoria provocando la liberación de mediadores inflamatorios en el pulmón. Aunque no se conocen con exactitud cuáles son los mecanismos moleculares que conducen la mecanotransducción, sí se han identificado diversas vías de señalización sensibles al estiramiento, a cambios en la integridad de la membrana plasmática o a cambios conformacionales en las moléculas asociadas a la membrana [31]. En este sentido, diversos estudios realizados en cultivos celulares de macrófagos alveolares humanos así como en preparaciones *ex vivo* de pulmón de rata y ratón, que habían sido sometidos a patrones de ventilación lesiva, demuestran una regulación al alza en la síntesis de citoquinas, que puede resultar en una respuesta inflamatoria *in vivo*.

Ranieri y col. [23] fueron los primeros en demostrar que la VM *per se*, producía un aumento en los niveles de citoquinas en pulmón y plasma, en pacientes con SDRA. Estos resultados, podían explicar en parte, porque muchos de los pacientes con SDRA desarrollaban fallo multiorgánico [23, 32, 33]. La pérdida de compartimentalización de la inflamación originada en el pulmón y su consecuente diseminación sistémica, podría llegar a afectar órganos dístales, desencadenando el síndrome de disfunción multiorgánica (SDMO) y, a comprometer la supervivencia del paciente [23-25]. En el mismo estudio, observaron una disminución de los niveles de las citoquinas IL-6, TNF- α , IL-1 β , IL-8 y del número de neutrófilos, en el lavado broncoalveolar (BALF) y plasma, en aquellos pacientes que habían sido tratados con estrategias de ventilación protectoras.

Estos datos, sugieren que la optimización de la estrategia ventilatoria puede contribuir, no sólo a minimizar el impacto mecánico de la VM sobre el pulmón, sino a atenuar la respuesta inflamatoria derivada del mismo.

Además del riesgo asociado a fenómenos mecánicos, la VM junto con la entubación orotraqueal incrementa el riesgo de colonización bacteriana de las vías respiratorias [26], pudiendo desembocar en posteriores infecciones [34]. Que se llegue a desarrollar una infección respiratoria está condicionado por múltiples factores que comprenden desde la enfermedad de base y las comorbilidades del paciente, hasta factores relacionados con el manejo del enfermo crítico, como es la prolongación de la VM. Una vez más, la optimización de la estrategia ventilatoria, puede ser un factor clave en la prevención del desarrollo y en la atenuación de la propagación de la infección.

1.2.3. ESTRATEGIAS DE VENTILACIÓN PROTECTORA

Como se ha descrito anteriormente, la VM puede dar lugar a complicaciones en los pacientes críticos. Por esta razón la optimización en la elección del patrón ventilatorio puede tener una repercusión directa en el pronóstico y la morbi-mortalidad de los mismos.

En la práctica clínica, se han implementado numerosas estrategias de ventilación destinadas a prevenir el desarrollo de VILI en lo que se define como estrategias de ventilación protectora. Estas estrategias, suelen caracterizarse por el uso de volúmenes corriente (V_C) moderados-bajos en combinación con un nivel óptimo de PEEP, con el fin de minimizar la sobredistensión pulmonar y a la vez evitar ciclos de colapso y reapertura alveolar [31]. Se ha demostrado que el uso de este tipo de patrón protector, puede mejorar la función pulmonar, las tasas de éxito en el proceso de retirada de la VM (*“weaning”*) y la supervivencia de los pacientes. Resultados de estudios prospectivos que analizan grandes poblaciones de pacientes críticos, han demostrado que el uso de estrategias de ventilación con bajos V_C y PEEP moderadas, se asocia a una reducción de hasta el 10% en la mortalidad en pacientes con SDRA [35-38]. En línea con estos resultados, Villar y col.[39] demostraron que el uso de bajo V_C con PEEP ligeramente superiores a las utilizadas habitualmente, disminuía la incidencia de fallo multiorgánico y un 21% la mortalidad absoluta, en pacientes con SDRA establecido.

Los efectos beneficiosos derivados de la VM protectora, están relacionados con la prevención del daño pulmonar mediada por la reducción de las fuerzas de estiramiento, la prevención del riesgo de barotrauma y la reducción de la respuesta inflamatoria.

A pesar de que existen evidencias del beneficio de su uso, desde hace tiempo existe una cierta controversia sobre el nivel óptimo de PEEP y los criterios de selección de la misma. Idealmente, el nivel de PEEP óptimo sería aquel capaz de reclutar completamente el pulmón lesionado sin producir sobredistensión en el pulmón sano [27], sin embargo a nivel práctico, no existe ningún sistema que pueda definir con absoluta certeza cuál es esa presión. El ajuste de los parámetros ventilatorios de forma individualizada, atendiendo las características de cada paciente y su mecánica pulmonar, sigue siendo la mejor opción en la implementación de las estrategias protectoras.

Diversos estudios han explorado mediante modelos experimentales, el efecto de las estrategias de ventilación protectoras en la patogénesis de las infecciones respiratorias durante la VM [40-43]. El lipopolisacárido (LPS) es el componente principal de la pared celular de las bacterias gramnegativas y constituye el antígeno superficial más importante de este tipo de bacterias, ejerciendo una importante función en la activación del sistema inmune. La administración intratraqueal de LPS de *E.Coli* se ha utilizado ampliamente como modelo experimental de inflamación y lesión pulmonar [44]. La exposición de LPS en pulmones, ya sea por instilación intratraqueal o inhalación, produce la activación del sistema inmune innato, iniciando el reclutamiento de neutrófilos y la liberación de TNF- α y IL-1 β , principalmente [45].

Whitehead [46] evaluó el efecto de diferentes estrategias de VM en la respuesta inflamatoria, en un modelo de instilación intratraqueal de LPS en pulmones aislados. Contrariamente a lo esperado, los autores no hallaron grandes diferencias en los niveles de mediadores inflamatorios entre los distintos grupos experimentales. En cambio, sí observaron que los pulmones ventilados con V_C elevado presentaban un menor número de macrófagos alveolares al compararlos con los ventilados con V_C bajos. Estos resultados parecían concordar con los hallazgos obtenidos por Imanaka y col. [47] y que

sugerían una asociación entre la ventilación con altas presiones y la reducción del número de macrófagos alveolares. Whitehead y col. sugieren que la reducción de la población de macrófagos, además de estar relacionada con la aplicación de V_C lesivos, podría contribuir a incrementar la susceptibilidad a la infección bacteriana, puesto que los macrófagos juegan un papel clave en la respuesta inmune temprana del pulmón frente a los patógenos. También el grupo de Hall y col. [40], observó en un modelo experimental en conejos, que la VM con bajo V_C , prevenía de la lesión pulmonar así como de la diseminación inflamatoria tras la instilación intratraqueal de LPS.

Otras investigaciones recientes, se han centrado en el estudio de los efectos de las estrategias ventilatorias protectoras sobre el sistema nervioso central (SNC), en la búsqueda de los mecanismos implicados en las alteraciones neurocognitivas desarrolladas en los supervivientes críticos. Bickenbach y col. [48] demostraron en un modelo porcino, que la ventilación con bajo V_C resultaba en una mejora de la oxigenación tisular cerebral y una menor acumulación de metabolitos anaeróbicos, además de conllevar un menor impacto inflamatorio sistémico. Una posible explicación sería que las alteraciones observadas en el metabolismo neuronal podrían ser consecuencia de la mayor respuesta inflamatoria originada durante la ventilación con alto V_C . A pesar de no poder establecer una asociación causal directa entre los hallazgos observados en el tejido cerebral y el desarrollo de alteraciones cognitivas, los autores sugieren que el efecto modulador sobre la respuesta inflamatoria que ejerce la ventilación protectora, podría tener un impacto sobre el desarrollo de procesos neuroinflamatorios.

1.3. INTERACCIÓN PULMÓN-CEREBRO EN EL PACIENTE VENTILADO

1.3.1. DE CEREBRO A PULMÓN

El análisis de la compleja interacción entre órganos en el enfermo crítico es de crucial importancia para garantizar una optimización del abordaje clínico de estos pacientes, que debe enfocarse a minimizar las complicaciones derivadas de su manejo. En esta línea, el estudio del eje pulmón-cerebro ha sido objeto de atención en los últimos años [49].

En el área de la medicina intensiva, existen multitud de trabajos clínicos y experimentales, que han investigado los mecanismos fisiológicos y moleculares que se desencadenan como consecuencia de la existencia de lesiones cerebrales [50-54]. Numerosos estudios describen el desarrollo de complicaciones pulmonares en pacientes con lesión cerebral aguda y se ha visto, que existe una relación entre la lesión cerebral aguda y el aumento de la susceptibilidad del pulmón a la lesión inducida por la VM o por isquemia-reperusión, entre otros fenómenos [52, 55-57]. Según dos estudios retrospectivos de Pelosi [52] y Kahn [58], hasta 1/3 de pacientes con lesión cerebral desarrollan LPA, resultando en un peor pronóstico y un aumento de la mortalidad. A nivel experimental, en un modelo de conejos llevado a cabo por nuestro grupo, la inducción de lesión cerebral masiva incrementó la susceptibilidad del pulmón al desarrollo de edema y VILI [51].

Las complicaciones pulmonares secundarias al desarrollo de lesión cerebral pueden asociarse a diversas causas. En primer lugar, el edema pulmonar neurogénico, probablemente relacionado con la lesión del centro vasomotor hipotalámico, produce una liberación masiva de catecolaminas. Esta activación adrenérgica, induce una fuerte vasoconstricción pulmonar, que favorece el incremento de la presión hidrostática pudiendo derivar en la disrupción de la barrera alvéolo-capilar, incrementando la permeabilidad y la extravasación de agua y proteínas [53, 54]. En segundo lugar, la propia respuesta inflamatoria secundaria a la lesión cerebral podría inducir la activación de las células de la microglía y astrocitos, que son claves en la respuesta del SNC [59]. Una vez activados, ambos subtipos celulares son

capaces de producir y liberar una gran variedad de moléculas implicadas en la iniciación y regulación de la respuesta inflamatoria (entre otras, citoquinas pro y anti inflamatorias, quimiocinas, moléculas de adhesión celular, prostaglandinas y tromboxanos). Uno de los posibles efectos de esta liberación de moléculas proinflamatorias, es el aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica. La extravasación de mediadores inflamatorios al sistema circulatorio puede contribuir a su vez la propagación de la inflamación en órganos dístales y en última instancia, al desarrollo de SDMO.

Wu S y col. [53], evaluaron en un modelo experimental de hemorragia cerebral masiva, el papel de la cascada inflamatoria originada en el cerebro, sobre la respuesta inflamatoria pulmonar. En aquellos grupos sometidos a hemorragia cerebral, se observó un aumento significativo de moléculas proinflamatorias (principalmente ICAM-1 y factor tisular) tanto a nivel cerebral como en pulmón. La histopatología pulmonar reveló a su vez signos de daño pulmonar, incluyendo infiltración de neutrófilos y ruptura de estructuras alveolares. Estos resultados avalan la teoría sobre el papel de los mediadores inflamatorios en la inducción de la lesión pulmonar secundaria a la hemorragia cerebral (Figura 2).

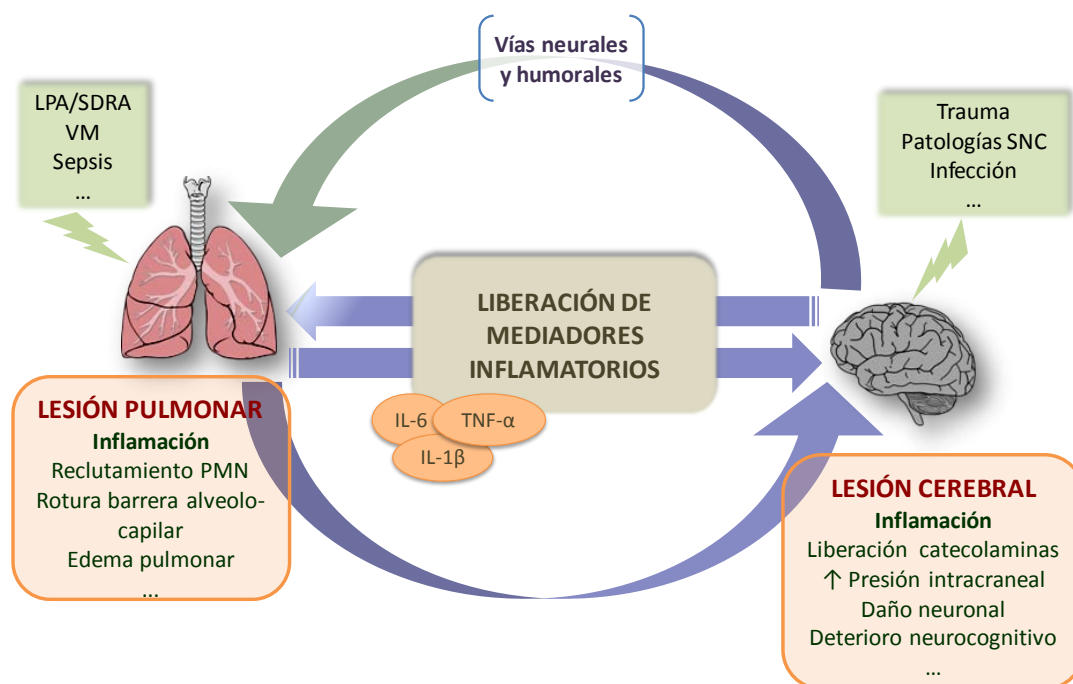


Figura 2. Esquema representativo de la comunicación cerebro-pulmón en el paciente crítico. LPA= lesión pulmonar aguda, SDRA= Síndrome de distrés respiratorio agudo, VM= Ventilación mecánica, PMN= células polimorfonucleares, SNC= sistema nervioso central.

1.3.2. DE PULMÓN A CEREBRO

Si bien parece evidente la existencia de un eje de comunicación cerebro-pulmón en el contexto del daño pulmonar secundario en el paciente neurológico, los datos existentes sobre los mecanismos de comunicación en sentido contrario son más escasos. Pocos estudios han explorado los circuitos a través de los cuales lesiones en órganos dístales como el pulmón, pueden llegar a afectar al SNC, incluyendo los efectos neurológicos tempranos asociados a la VM y la importancia de la estrategia ventilatoria utilizada [2, 48].

Algunos aspectos del manejo ventilatorio pueden tener implicaciones patofisiológicas relevantes en aquellos pacientes críticos con lesión pulmonar o neurológica. La hipoxemia, la duración de la VM o el desarrollo de inflamación, son factores de riesgo que han sido relacionados con los déficits neuropsicológicos descritos en los pacientes post-UCI [20] y que están estrechamente relacionados con la ventilación. El efecto de la hipoxia cerebral y su relación con déficits en la memoria, ha sido ampliamente estudiado tanto en pacientes con diversas patologías como en modelos animales [7, 15, 16, 48, 60]. Aunque los mecanismos fisiopatológicos de esta asociación no están del todo claros, una de las teorías más aceptada es que los déficits cognitivos, podrían ser consecuencia de lesiones en el hipocampo, un área especialmente vulnerable a la hipoxia y uno de los principales centros de memoria y aprendizaje [48, 61-63]. Es difícil concluir si en los pacientes de SDRA, la hipoxemia refractaria, un fenómeno común en esta patología, es el principal mecanismo responsable del deterioro neurológico. Posiblemente, el deterioro observado no es un efecto exclusivo de la hipoxia, y podría incluir otros aspectos relacionados con la VM y sus efectos sobre la respuesta inflamatoria.

La estrategia ventilatoria puede afectar al SNC no sólo por su efecto sobre los niveles de oxigenación cerebral sino también a través de la modificación de la respuesta inflamatoria y/o la alteración del flujo sanguíneo cerebral. Acorde con esa hipótesis, Bickenbach y col. [7] demostraron en un modelo experimental en cerdos, que la combinación de VM e hipoxia por LPA, resultaba en un mayor compromiso neurológico funcional, que la VM e hipoxia *per se* (sin lesión pulmonar). Además de los déficits neurológicos, los animales con LPA mostraron signos de infiltración perivascular en determinadas áreas

del hipocampo y núcleo estriado, así como un ligero aumento en los niveles de mediadores inflamatorios plasmáticos. En síntesis, los autores postulan que las deficiencias neurocognitivas observadas en los pacientes con LPA/SDRA, podrían estar más relacionados con los efectos inflamatorios derivados de la VM, que no con los mecanismos de lesión neurológicos asociados propiamente a la hipoxia. A pesar de estos hallazgos, no se puede descartar que la hipoxemia influya en el desarrollo de la afectación neurológica ya que posiblemente, el deterioro cognitivo del paciente, sea el resultado de la sinergia de varios factores simultáneos.

También el eje neuroinmunoendocrino puede tener un papel relevante en la comunicación pulmón-cerebro durante la VM. Entre el SNC y el sistema inmune existe una interacción dinámica y bidireccional, en la que las citoquinas ejercen como los mediadores principales [64]. Estas moléculas inflamatorias pueden llegar al cerebro a través de rutas humorales o neurales (principalmente a través del nervio vago), provocando una reacción de respuesta del SNC ante el proceso inflamatorio. En este contexto, sabemos que la VM es capaz de desencadenar una respuesta inflamatoria con la consiguiente liberación de citoquinas al torrente sanguíneo. Algunas de estas citoquinas, como el TNF- α , la IL-1 β o la IL-6, pueden alcanzar el cerebro atravesando la barrera hematoencefálica (BHE) mediante sistemas de transporte activo o bien introduciéndose a través de los denominados órganos circunventriculares (CVO) [59, 65] (áreas cerebrales donde la BHE es inexistente o discontinua). Se ha demostrado que el complejo vagal dorsal, formado por el núcleo del tracto solitario (NTS), el núcleo motor dorsal del vago y el área postrema (un CVO), es capaz de responder a un aumento de los niveles de TNF- α circulantes, alterando la actividad motora del vago [64].

La información del estado inflamatorio periférico también puede llegar al SNC a través de señales sensitivas aferentes del nervio vago (vía neural), así como por otras vías ascendentes. Estudios electrofisiológicos han indicado que las aferencias vagales pueden ser activadas por citoquinas así como por mecanorreceptores, quimiorreceptores y otros sensores de temperatura y osmolaridad [64]. Estas vías, actúan como sensores del estado general del organismo, y son capaces de activar rápidas respuestas, en presencia de bajos

niveles de mediadores inflamatorios. Una vez activadas, las señales viajan a través de las fibras sensitivas ascendentes del vago, realizando sinapsis en el NTS y desde allí la información es transferida a otras estructuras cerebrales [66]. En respuesta a estas señales, el SNC responde ejerciendo un efecto neuroinmunomodulador en la inflamación local y sistémica a través de la llamada “vía colinérgica antiinflamatoria” [64]. Las eferencias vagales estimulan la liberación de acetilcolina (ACh), uno de los principales neurotransmisores parasimpáticos y ésta, a su vez, actúa uniéndose a la subunidad $\alpha 7$ del receptor nicotínico de ACh de los macrófagos activados e inhibe la producción de citoquinas proinflamatorias como la IL-1 y TNF- α , entre otras [64].

Además de la vía antiinflamatoria colinérgica, la regulación neuronal de la respuesta inmune incluye la acción de otras rutas centrales simultáneas. El NTS puede transmitir las señales aferentes recibidas a otras áreas cerebrales involucradas en la activación del eje hipotalámico-hipofisario- adrenal o el sistema nervioso simpático, con la subsecuente liberación de glucocorticoides y catecolaminas. Estos mediadores, también actúan como neuroinmunomoduladores de la inflamación, inhibiendo la liberación de citoquinas por los macrófagos [64].

El descubrimiento de los mecanismos de modulación de la inflamación por la vía colinérgica antiinflamatoria ha supuesto un importante avance en el estudio de patologías asociadas a procesos inflamatorios y representa una importante diana en el desarrollo de nuevas terapias. Dos Santos et al [67] demostraron en un modelo experimental de VILI, que así como la inhibición de la actividad del vago potenciaba los efectos deletéreos de la VILI, su estimulación reducía los efectos apoptóticos e inflamatorios derivados de la misma. Los mismos autores, proponen la potenciación del reflejo colinérgico, mediante estimulación eléctrica o farmacológica, como posible tratamiento en pacientes con VILI.

A pesar de los progresos en la comprensión del papel de la vía colinérgica, aún existen muchos interrogantes sobre los mecanismos involucrados en la interacción pulmón-cerebro en el contexto de la VM. En este sentido, son pocos los estudios que han investigado a nivel molecular, el efecto de la VM sobre el cerebro. Un mayor conocimiento de los procesos que

convergen en el pulmón ventilado y su potencial rol patogénico sobre el cerebro, podría ser fundamental a la hora de definir las estrategias terapéuticas capaces de minimizar el impacto de la ventilación en el paciente crítico tanto a nivel pulmonar como neurológico.

1.4. C-FOS

En 1982 Curran y colaboradores aislaron por primera vez el gen viral “v-fos”, identificándolo como el elemento responsable de inducir el osteosarcoma murino FBJ (Finkel, Biskis y Jinkins) [68]. Poco después, el mismo grupo demostró la existencia de su variante celular, el protooncogen c-fos. Este gen, codifica para la proteína c-Fos, una fosfoproteína nuclear de 62kDa, que actúa formando heterodímeros con proteínas de la familia c-Jun, para formar el complejo de transcripción funcional AP-1 (del inglés “*Activator Protein 1*”). AP-1 participa en la regulación de la transcripción de múltiples genes involucrados tanto en procesos de proliferación, diferenciación celular o apoptosis, como en la respuesta a diferentes estímulos como factores de crecimiento, citoquinas, neurotransmisores, radiación ultravioleta o estrés [69, 70].

Tanto *c-fos* como *c-jun* pertenecen a la extensa familia de genes de expresión temprana IEG (de sus siglas en inglés “*Inmediately Early Genes*”). Los IEG se activan rápida y temporalmente en respuesta a cascadas de señalización intracelular originadas por múltiples estímulos fisiopatológicos externos. La rápida inducción de los IEG se explica por la presencia de factores de transcripción constitutivos preexistentes en la célula quiescente o no estimulada, que se activan en respuesta a determinadas señales, de manera que no se requiere la síntesis previa de proteínas [71]. Aunque existen algunos tejidos o condiciones bajo los cuales hay una expresión constitutiva relativamente elevada de *c-fos*, como es el caso de determinados tejidos embrionarios o células tumorales, en la mayoría de células, los niveles de expresión de *c-fos* son prácticamente indetectables. En estos casos, su expresión es inducida por una amplia variedad de estímulos, que permiten a la célula integrar cambios que se producen a nivel extracelular [72].

La regulación de la expresión del gen *c-fos* se encuentra sujeta a un estricto control orquestado a varios niveles. A nivel transcripcional, el heterodímero formado por c-Fos y c-Jun actúa como inhibidor de su propia expresión. Una vez transcrito, el ARN mensajero (ARNm) resultante se transloca desde el núcleo hasta al citoplasma para ser traducido a proteína y posteriormente degradarse, situándose su vida media entre los 10 y 15 min.

Una vez sintetizada, la proteína c-Fos, migra rápidamente al interior del núcleo donde formará dímeros con miembros de la familia Jun para producir el factor AP-1. Al igual que su mensajero, la proteína c-Fos es altamente inestable, encontrándose su pico máximo de expresión entre los 90 y 120 minutos tras el estímulo [73].

Desde su descubrimiento en 1982, la proteína c-Fos ha sido objeto de numerosos estudios. Su rápida inducción tras diferentes estímulos unida a su baja expresión en condiciones basales, lo han convertido en uno de los marcadores de actividad neuronal más utilizados en neurobiología [74]. Se han realizado multitud de estudios de mapeo funcional utilizando c-Fos como marcador de activación neuronal, contribuyendo enormemente en el conocimiento de la respuesta del SNC frente a múltiples situaciones [68, 71, 75-78]. Se ha descrito la implicación de c-Fos en procesos de actividad eléctrica y metabólica así como en condiciones patológicas tales como isquemia o inflamación [72, 77]. Asimismo, diversos estudios neurofisiológicos, han relacionado la inducción de esta proteína con procesos de aprendizaje, memoria o plasticidad neuronal [79, 80].

En base a estas características funcionales y a la dinámica temporal de su expresión, en la presente tesis, se ha utilizado la proteína c-Fos como herramienta para evaluar los posibles cambios neurológicos tempranos asociados a la aplicación de VM.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2.1. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

Hasta un tercio de pacientes críticos presentan alteraciones neuropsicológicas al alta de su estancia en UCI [4, 9]. Este porcentaje se ve aumentado en aquellos pacientes que han requerido soporte ventilatorio [7]. Muchos aspectos del manejo de la VM, tienen implicaciones relevantes en los pacientes críticos, tanto a nivel pulmonar como en órganos distales [32, 33, 81]. La estrategia ventilatoria utilizada, puede desencadenar una respuesta inflamatoria que podría llegar a afectar al SNC y estar involucrada en el desarrollo de los déficits neurocognitivos observados en estos pacientes. En este contexto, numerosos estudios clínicos y experimentales han demostrado que el uso de estrategias de ventilación protectora, basadas en la aplicación de V_C y una PEEP adecuada, tiene un efecto beneficioso en la función pulmonar y el pronóstico de los pacientes con lesión pulmonar. Es necesario conocer los factores que pueden intervenir en el desarrollo de las alteraciones cognitivas adquiridas en el paciente crítico. Según nuestra hipótesis, la optimización de la estrategia ventilatoria podría tener efectos beneficiosos, más allá de la función pulmonar, en la prevención de la aparición de futuras alteraciones neurocognitivas.

2.2. OBJETIVOS

Teniendo en cuenta los antecedentes anteriormente descritos, los objetivos de la presente tesis son:

OBJETIVO GENERAL

Investigar la influencia del patrón ventilatorio en la respuesta inflamatoria (local y sistémica) y en la activación neuronal en dos modelos experimentales en ratas.

OBJETIVOS CONCRETOS

1. Explorar el efecto de un patrón ventilatorio lesivo por V_C elevado. (Trabajo I)
2. Evaluar el efecto modulador de la PEEP durante la ventilación con V_C bajo, en un modelo experimental de instilación intratraqueal de LPS. (Trabajo II)

3. METODOLOGIA

Todos los experimentos incluidos en esta tesis doctoral fueron aprobados por la Comisión de Ética en Experimentación animal de la Universidad Autónoma de Barcelona y se han llevado a cabo de acuerdo con las directrices de la normativa europea ("*Principles of laboratory animal care*", *European Communities Council Directive 86/609/EEC* y "*European Commission Directive 2010/63/EU for animal experimentation*").

Sujetos a estudio

En todos los experimentos presentados en esta tesis se utilizaron ratas macho adultas de la cepa Sprague-Dawley de aproximadamente 350 gramos de peso (348 ± 32 gr.), estabuladas en condiciones estándar, a temperatura de 22°C, ciclo de luz/oscuridad de 12 horas y con acceso *ad libitum* a comida y agua.

3.1. PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO Y MONITORIZACIÓN

En este apartado se describen los procedimientos comunes a los dos trabajos que integran esta tesis.

3.1.1. ANESTESIA, CIRUGÍA E INSTRUMENTACIÓN

Los animales fueron anestesiados con una combinación de ketamina (75mg/kg, Parke-Davis, España) y xilacina (10mg/kg, Rompun, Bayer, España) por vía intraperitoneal (i.p). Una vez comprobado un nivel de anestesia profundo y en posición supina, se iniciaba el siguiente procedimiento quirúrgico:

1. Disección de arteria carótida izquierda e inserción de catéter para la monitorización de la presión arterial y para la extracción de muestras a lo largo del estudio para la valoración del intercambio gaseoso.
2. Canulación de la vena yugular derecha para la administración de fluidos a razón de 10 ml/kg/hora a lo largo de todo el procedimiento experimental.

3. Traqueotomía e inserción de un tubo endotraqueal de 22 mm de diámetro, fijado a la tráquea con una seda para evitar fugas de aire y conexión del tubo endotraqueal al ventilador Servo 300 (Siemens, Solna, Sweden)
4. Relajación muscular mediante succinilcolina por vía intravenosa (i.v) (2 ml/kg) al iniciar la ventilación mecánica en modalidad controlada por volumen (VCV) fijando el volumen corriente (V_C) en el ventilador, según el protocolo experimental.

3.1.2. MONITORIZACIÓN

- Presión de la vía aérea: se monitorizó a nivel de tubo traqueal mediante un transductor de presión (Valydine MP45, Valydine Engineering, Northridge, CA) y se amplificó (Presograph, Gould Godart, Netherlands).
- Presión arterial: el catéter insertado en la arteria carótida se conectó a un transductor de presión (Transpac Monitoring Kit; Abbot, Sligo, Ireland).

Las señales de presión sanguínea y de la vía aérea, fueron digitalizadas y almacenadas en formato electrónico para su posterior análisis (Anadat-Labdat Software, RTH InfoDat, Montreal, QC, Canadá).

3.1.3. VARIABLES FISIOLÓGICAS EVALUADAS

- Hemodinámica y mecánica pulmonar: Se tomaron registros de los valores de presión arterial media (PAM) y parámetros indicativos de la mecánica del sistema respiratorio, al final del período de estabilización (valores basales) y cada hora tras la randomización.
- Gasometrías arteriales: Los valores de PO_2 , PCO_2 y pH se obtuvieron en muestras de sangre arterial (0,2 ml) que se analizaron en un equipo Radiometer NPT7 (Radiometer, Copenhagen, Dinamarca).

Los datos de mecánica pulmonar nos aportan información precisa sobre el estado del sistema respiratorio y permiten explorar su evolución a lo largo de todo el procedimiento experimental.

Las determinaciones de la mecánica pulmonar se obtuvieron analizando los registros de las maniobras de oclusión inspiratoria y espiratoria, con el fin de adquirir los siguientes valores:

- Presión pico: presión máxima generada en la vía aérea al introducir el aire en cada ciclo respiratorio (Figura 3).
- Presión meseta o *plateau* (Pplat): Durante la pausa inspiratoria, el sistema individuo - ventilador queda cerrado y en condiciones estáticas, de forma que el aire introducido, se distribuye por los alvéolos permitiendo el equilibrio de presiones entre las diferentes zonas pulmonares. La presión que se mide en ese momento se denomina presión meseta o *plateau* y se corresponde con la presión alveolar máxima (Figura 3).
- Compliancia del sistema respiratorio ($C_{rs_{est}}$) o distensibilidad pulmonar: se define como el cambio de volumen secundario a un cambio de presión aplicado en el sistema respiratorio o viceversa. En VM, la $C_{rs_{est}}$ se calcula según la fórmula: $C_{rs_{est}} = V_C / (P_{plat} - PEEP)$

Un aumento de la presión transtorácica para un V_C y un nivel de PEEP determinados, es indicativo de una disminución de la $C_{rs_{est}}$ y por tanto refleja menor distensibilidad del pulmón.

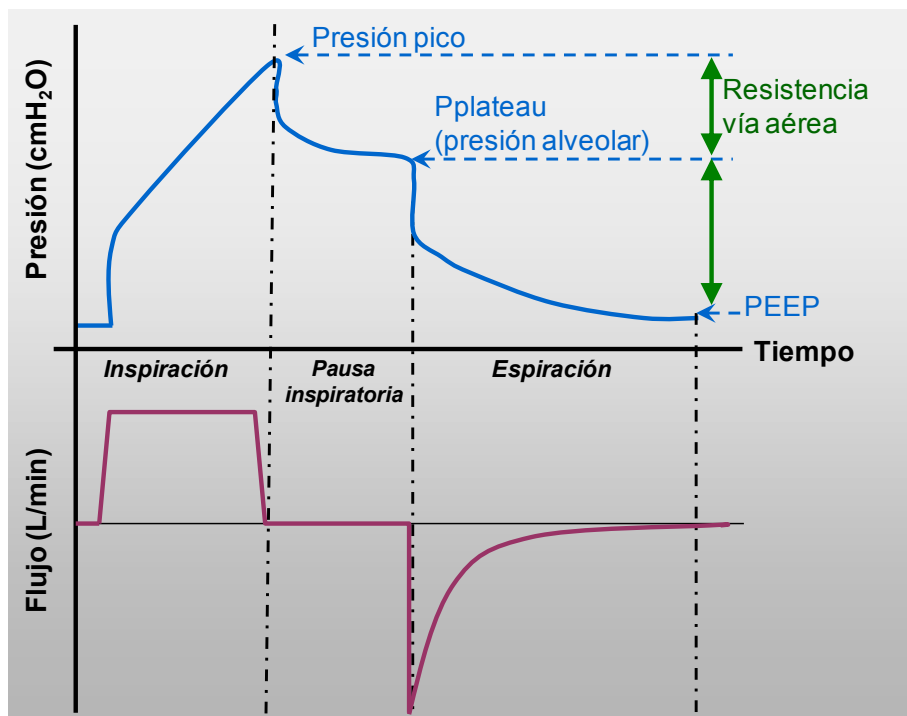


Figura 3. Curva presión-flujo durante la VM en modo de ventilación controlada por volumen.

3.2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

- Plasma: Al final del período experimental los animales fueron eutanasiados por exanguinación a través de la vía de la arteria carótida izquierda. El volumen de sangre recuperado de cada animal fue de aproximadamente unos 7 ml. Tras centrifugación de la sangre durante 10 minutos a 3500 rpm y 4°C, se recuperó la fracción correspondiente al plasma, que fue congelado en alícuotas a -80°C para posteriores determinaciones.
- Pulmón: Se extrajo el bloque pulmón-corazón.
 - o Pulmón izquierdo: se procesó para análisis histológico
 - o Pulmón derecho: se congeló inmediatamente para su conservación hasta las determinaciones moleculares
- Cerebro: fue extraído cuidadosamente y congelado en baño de isopentano enfriado con nitrógeno líquido, para conservación a -80°C hasta el momento de su procesamiento y análisis.

3.3. ANÁLISIS HISTOLÓGICOS Y MOLECULARES

3.3.1. HISTOLOGÍA PULMONAR

Los pulmones izquierdos se fijaron mediante instilación traqueal de formaldehído al 4% (Panreac, Spain) a una presión de 5 cmH₂O e inmersión en el mismo fijador durante 24 horas. Posteriormente, se incluyeron en parafina y se realizaron cortes de 5 µm, que fueron teñidos con hematoxilina-eosina para su posterior análisis microscópico. Dos investigadores ajenos a los grupos experimentales, calcularon el grado de lesión histológica y la infiltración intraalveolar de neutrófilos. Para determinar el grado de lesión histológica se utilizó un *score* de lesión pulmonar (LIS, del inglés *Lung Injury Score*) basado en la puntuación del 0 al 4 de los siguientes parámetros:

- a) Infiltración de neutrófilos
- b) Edema alveolar
- c) Hemorragia perivascular
- d) Engrosamiento de la pared alveolar

De esta manera, la puntuación máxima que se obtenía era de 16 (daño histológico severo) y la menor de 0 (sin lesión aparente). La infiltración intraalveolar se evaluó contabilizando el número de neutrófilos presentes en 50 campos a 400 aumentos. Las imágenes eran capturadas digitalmente utilizando una cámara DFC320 acoplada a un microscopio óptico (Leica DM2500) y posteriormente, eran analizadas utilizando el programa de análisis de imagen ImageJ v1.40g (Wayne Rasband, NIH, USA).

3.3.2. EVALUACIÓN DE LA APOPTOSIS EN PULMÓN MEDIANTE ENSAYO TUNEL

El ensayo enzimático de TUNEL (del inglés *Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)- mediated dUTP nick end-labeling*) se utiliza para el estudio de la apoptosis, mediante la detección directa del DNA fragmentado, característico de las células apoptóticas. En los extremos 3'-OH de las cadenas de ADN rotas, se incorpora desoxiuridina trifosfato (dUTP) marcada con fluorescencia, utilizando una enzima transferasa terminal (TdT). La fluorescencia emitida se puede valorar mediante microscopía.

Se utilizó el Kit comercial "In situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein" (Roche Applied Science, Spain), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron secciones parafinadas de pulmón de 5 µm de grosor. Tras desparafinar e hidratar, los cortes se permeabilizaron mediante incubación con proteinasa K (Dako, Agilent Technologies, Spain) a 37°C durante 30 min. Tras lavados en tampón fosfato salino (PBS), las secciones fueron incubadas con la mezcla de reacción de TUNEL, formada por dUTP y la enzima TdT, durante 1 hora a 37°C y en oscuridad. Tras parar la reacción mediante lavados de PBS, las preparaciones fueron montadas con medio Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium (Sigma-Aldrich) y visualizadas bajo microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse Ti, Nikon Corp., Tokyo, Japan) utilizando una onda de excitación de 450nm. Se capturaron imágenes de entre 10 y 15 campos de cada sección de pulmón a 100 aumentos de magnitud y se cuantificaron las células positivas para TUNEL (ImageJ 1.40g, Wayne Rasband, NIH, USA). Los resultados se expresaron en número de células positivas por campo.

3.3.3. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO DE C-FOS EN CEREBRO

3.3.3.a. Procesamiento del cerebro y selección de las áreas de interés

En primer lugar, se seleccionaron las áreas de interés y se localizaron utilizando un atlas estereotáxico (*“The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates”* [82]) con el fin de acotar las zonas de corte (Tabla 3). Se realizaron secciones coronales del cerebro, de 20 μm de grosor siguiendo el eje rostrocaudal mediante un criostato Leica CM1900 (Leica Microsystems, Spain). De cada área, se recogieron varios cortes correlativos, una parte se utilizó para la identificación de las áreas de interés (tinción con violeta de cresilo) mientras que el resto se reservó para inmunohistoquímica (IHQ) de c-Fos.

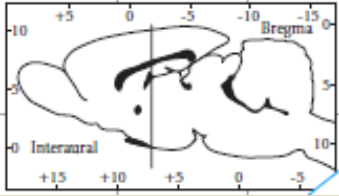
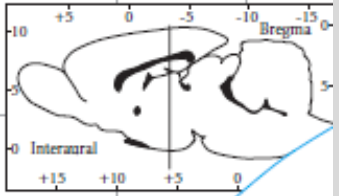
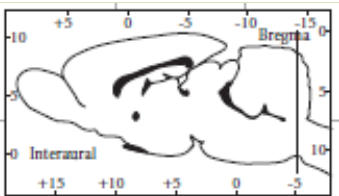
Zona	Localización	Área
1	 <p>Bregma -1,80</p>	Núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN)
		Amígdala central (CeA)
		Núcleo supraóptico (SON)
2	 <p>Bregma -3,36</p>	Hipocampo (HC)
		Tálamo
		Corteza Retrosplenial (RS)
3	 <p>Bregma -14,04</p>	Núcleo del Tracto Solitario (NTS)

Tabla 3. Localización de las áreas cerebrales de estudio. En las figuras de la sección sagital, la línea perpendicular al plano indica la localización de la zona de corte y sus coordenadas respecto el punto Bregma. Las tres zonas seleccionadas, incluían todas las áreas de interés. (*Sagittal section figures. Paxinos & Watson, 2007*)

3.3.3.b. Protocolo de inmunohistoquímica para c-Fos

La técnica de IHQ se basa en la capacidad de los anticuerpos de unirse específicamente a un antígeno de la proteína contra la que van dirigidos. El complejo antígeno-anticuerpo primario, puede visualizarse de forma indirecta utilizando un anticuerpo secundario capaz de unirse específicamente al anticuerpo primario. Para poder detectarlo, el anticuerpo secundario debe estar previamente conjugado con alguna molécula que permita su detección. En nuestro caso, utilizamos un anticuerpo secundario conjugado con biotina y la detección se llevó a cabo mediante el método inmunohistoquímico de la avidina-biotina-peroxidasa (método ABC). Este complejo avidina-biotina-peroxidasa se une fuertemente al anticuerpo secundario biotinilado a través de las moléculas de avidina, que tienen una alta afinidad por la biotina. Finalmente, se añade un sustrato de la enzima peroxidasa (el peróxido de hidrógeno) y la reacción resultante hace precipitar un cromógeno. En este ensayo, utilizamos el cromógeno tetraclorhidrato de 3,3' diaminobencidina (DAB), cuyo precipitado tiene una coloración marronácea, fácilmente detectable por microscopía.

Como control positivo, se añadió una sección del mismo tejido (cerebro de rata), en la que se había caracterizado anteriormente la presencia de la proteína c-Fos.

En primer lugar, las secciones se post-fijaron en una solución de paraformaldehído al 4% (Panreac, Spain) en PBS durante 15 minutos. Tras varios lavados en PBS, se incubaron en una solución de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 1,5% en PBS, con el fin de inactivar la actividad de la peroxidasa endógena. Posteriormente, se bloquearon las uniones inespecíficas con una solución compuesta por suero normal de cabra al 5%, clara de huevo al 3,5% y Tritón X-100 al 0,35% en PBS. Seguidamente se les aplicó una solución de Biotina al 0,01% (Biotin, $\geq 99\%$ (TLC), Sigma-Aldrich) para saturar los sitios de unión de la biotina. Tras varios lavados con PBS, las secciones se incubaron overnight a 4°C en cámara húmeda, con un anticuerpo policlonal contra c-Fos hecho en conejo (sc-52, Sta Cruz Biotechnology, USA), a una concentración de 1:250 en solución de PBS. Como control negativo, se añadió una muestra sin anticuerpo primario. Tras ese tiempo, las secciones se lavaron en PBS, y se

sometieron a incubación de 1 hora y temperatura ambiente con el anticuerpo secundario, un anti-IgG de conejo biotinilado desarrollado en cabra (Vector Lab, USA). Tras lavados, las secciones se trataron con el reactivo ABC (compuesto por avidina y peroxidasa biotinilada) del kit Vectastain Elite kit (Vector Laboratories, USA) durante 30 minutos a temperatura ambiente. El revelado de la actividad peroxidasa se realizó con DAB al 0,05% (Sigma-Aldrich, Spain) y H₂O₂ al 0,01% en PBS, durante 4 minutos y en oscuridad. Una vez transcurrido el tiempo de revelado, la reacción era detenida mediante lavados en PBS y agua corriente.

Por último, las secciones fueron deshidratadas pasando por una batería de alcoholes a concentraciones crecientes (50%, 70%, 80%, 96% y 100%) y xileno, y finalmente, montadas con cubreobjetos utilizando medio de montaje hidrofóbico DPX (Panreac, Spain).

3.3.3.c. Captura de imágenes, análisis y cuantificación de c-Fos

Las imágenes se capturaron mediante microscopio óptico Leica DM2500 equipado con una cámara digital DFC320 (magnificación 20X). Las imágenes digitalizadas se analizaron utilizando el software de análisis ImageJ v1.40g (Wayne Rasband, NIH, USA). Previo a la cuantificación de células positivas para c-Fos, se delimitaba el área de estudio de cada una de las regiones de interés, con el fin de que el contaje fuera equivalente en todas las secciones.

Se consideraron que las células eran inmunopositivas tomando como criterios la intensidad de la señal y el tamaño de los núcleos celulares. Para semicuantificar automáticamente las células positivas, las imágenes fueron procesadas utilizando el software ImageJ. Los resultados se expresan como número de células positivas por área o región de interés.

3.3.4. DETERMINACIÓN DE CITOQUINAS Y QUIMIOCINAS EN PLASMA Y PULMÓN

3.3.4.a. Extracción y cuantificación de proteínas en tejido pulmonar

Las muestras de tejido pulmonar se homogeneizaron en un buffer de lisis (Tris pH=7,4, 150 mM NaCl, 1% Tritón X-100, CaCl₂, 1mM de ortovanadato de sodio) con cóctel inhibidor de proteasas (Complete Mini EDTA-free, Roche), mediante un sistema de homogeneización mecánico. A continuación, los homogeneizados se centrifugaron a 12000rpm y 4° C durante 20 minutos. Se recuperó el sobrenadante con la fracción proteica y se congeló en alícuotas a -80°C hasta el momento de su utilización para cuantificación de proteínas totales y determinación de citoquinas.

La cuantificación de proteínas totales, se llevó a cabo por el método colorimétrico de Bradford utilizando el reactivo de Bio-Rad (Protein Assay Dye Reagent Concentrate, Bio-Rad). Éste método se basa en la unión del colorante Comassie Blue G-250 a las proteínas. El colorante sin proteínas presenta una coloración anaranjada, pero una vez se une a los grupos amino de las proteínas, vira a un color azul intenso en proporción de la cantidad de proteína. Esta reacción se mide por absorbancia a 595nm y tiene una reacción lineal dentro de determinadas concentraciones. Los datos de absorbancia son referidos a una curva de calibración construida con diferentes concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina. La reacción se llevó a cabo en microplaca de 96 pocillos y para su lectura se utilizó un lector de microplacas MultiSkan Ex (Thermo Scientific).

3.3.4.b. Ensayo ELISA y Tecnología LUMINEX

En el Trabajo I, las determinaciones de los niveles de: TNF- α , MIP-2, IL-6, IL-1 β , MCP-1 y IL-10 en plasma y tejido pulmonar, se realizaron mediante técnica de ELISA (del inglés “Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay”, Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas). Esta técnica permite fijar a un soporte sólido un anticuerpo monoclonal frente a la citoquina de interés; a continuación se añade un segundo anticuerpo marcado enzimáticamente que cataliza esa

reacción y se genera un producto cuya intensidad de color se mide por espectrofotometría.

Se utilizaron kits comerciales de ELISA del proveedor Biosource (Biosource, Camarillo, USA). Todas las muestras, estándares y controles se analizaron por duplicado en microplacas de 96 pocillos, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los resultados fueron leídos con un lector de microplacas (Bio-Rad) a una longitud de onda de 550nm.

En el Trabajo II, las mediciones de citoquinas y quimiocinas se llevaron a cabo mediante un inmunoensayo multiplexado utilizando la tecnología Luminex® (Luminex 200 System, Luminex, Austin, TX, USA). Este sistema, basado en los principios de la citometría de flujo, permite analizar hasta cien analitos simultáneamente, en una misma muestra/pocillo. Diseñamos un panel personalizado para determinar las citoquinas IL-1 β , IL6, IL-10, MCP-1 y TNF- α en un mismo ensayo (RCYTO-80K MILLIPLEX MAP Rat Cytokine/Chemokine Panel, Millipore Corp., Billerica, MA). Todas las muestras, estándares y controles se analizaron por duplicado y siguiendo las instrucciones del fabricante.

En ambos ensayos (ELISA y Luminex®) las concentraciones de citoquinas se expresaron en pg/ml en las muestras de plasma y pg/mg de proteína total en las muestras de tejido pulmonar.

3.4. PROTOCOLOS DE VM Y GRUPOS EXPERIMENTALES

3.4.1. TRABAJO I. EFECTOS DE UN PATRÓN DE VENTILACIÓN LESIVO MEDIANTE V_C ELEVADO

Una vez finalizado el procedimiento quirúrgico y la instrumentación (descrita anteriormente), los animales fueron distribuidos aleatoriamente, en función de la modalidad ventilatoria aplicada, en los siguientes grupos experimentales (8 animales por grupo)

1. Basal (BAS): Animales no ventilados mecánicamente. Los animales se sometieron a eutanasia por exanguinación inmediatamente después de la anestesia.
2. V_C bajo (LVt): Animales ventilados con un V_C de 8 ml/kg y PEEP de 0 cmH₂O (ZEEP), durante 3 horas.
3. V_C elevado (HVt): Animales ventilados con un V_C de 30 ml/kg y ZEEP, durante 3 horas. Para mantener la normocapnia sin tener que disminuir la frecuencia respiratoria en este grupo, aumentamos el espacio muerto instrumental.

A posteriori se incorporó un grupo adicional de ratas en respiración espontánea (grupo Spont) con el objetivo de discriminar el efecto de la instrumentación (traqueostomía, VM y canulación) sobre la activación neuronal. Los animales de este grupo, fueron anestesiados y sometidos al mismo procedimiento quirúrgico que los animales ventilados (canulación y traqueotomía), pero no se conectaron al respirador, y se mantuvieron en respiración espontánea.

Tanto los grupos ventilados como el grupo de respiración espontánea, recibieron idénticos patrones de anestesia e infusión de fluidos (Ringer-Lactato, a razón de 10ml/kg/h) durante las 3 horas del protocolo experimental.

En un paso previo al inicio del estudio, todos los animales de los grupos ventilados (LVt y HVt) se sometieron a un periodo de estabilización en el que se recibían una VCV con V_C de 8 ml/kg, PEEP 2 cmH₂O, fracción inspirada de oxígeno (FiO₂) de 0.4, ratio de tiempo inspiración/expiración (I:E) 1:2 y frecuencia respiratoria ajustada para mantener normocapnia. Tras un período de estabilización de 15 minutos en estas condiciones, los animales de los grupos LVt y HVt fueron ventilados siguiendo el patrón anteriormente descrito. En la figura 4 se representa un esquema del procedimiento experimental así como de los grupos a estudio.

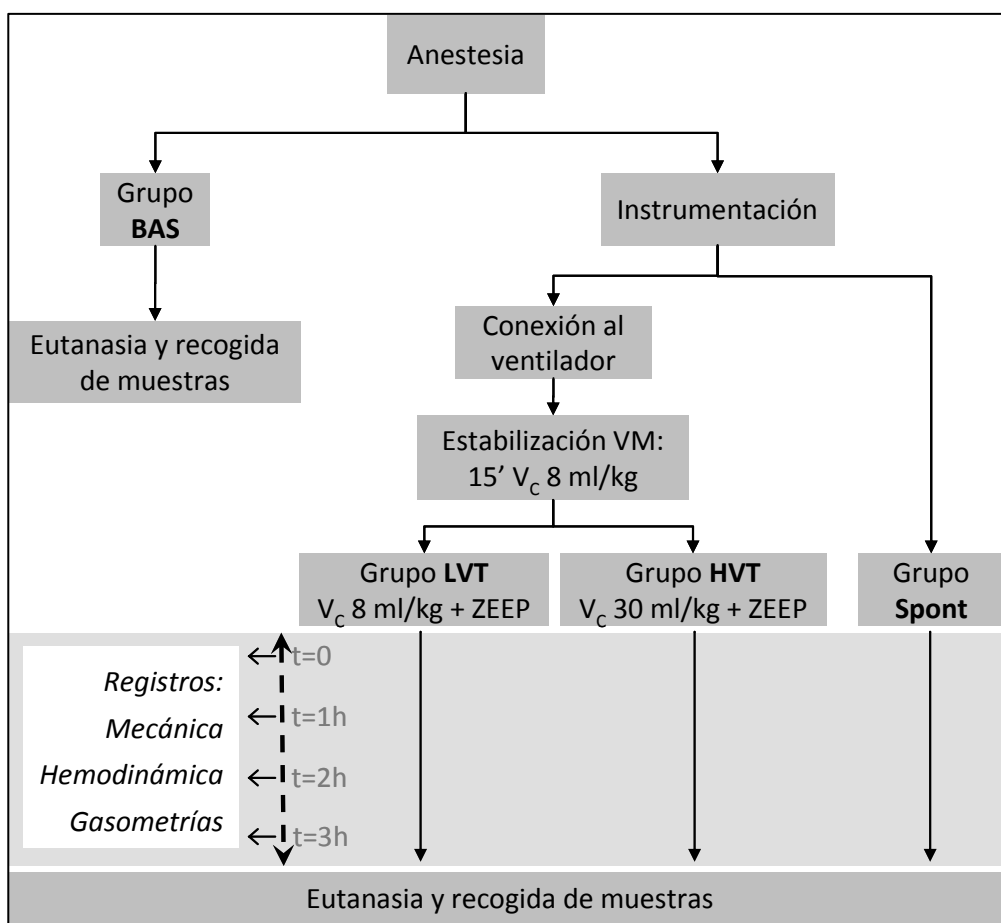


Figura 4. Esquema del procedimiento experimental de VM lesiva y distribución de grupos experimentales. VM= ventilación mecánica, V_C = volumen corriente, ZEEP= Presión positiva al final de la espiración de 0 cmH₂O.

3.4.2. TRABAJO II. EFECTO DE LA PEEP EN UN MODELO DE VENTILACIÓN CON BAJO V_C

Los procedimientos de anestesia e instrumentación, son comunes a los practicados en el Trabajo I. Igual que en el trabajo anterior, una vez finalizado el procedimiento quirúrgico, los animales fueron aleatorizados en los 5 grupos experimentales que se resumen a continuación (Tabla 4):

Grupo experimental	VM V_C 7 ml/kg	PEEP (cmH ₂ O)	Instilación intratraqueal	n/grupo
BAS	–	–	–	6
SAL-2	+	2	Sol. salina	8
SAL-7	+	7	Sol. salina	8
LPS-2	+	2	LPS	8
LPS-7	+	7	LPS	8

Tabla 4. Distribución de los grupos experimentales. Los grupos instilados recibieron un volumen total de 200µl de la solución correspondiente. VM= ventilación mecánica, V_C = volumen corriente, PEEP= Presión positiva al final de la espiración.

Como en el estudio 1, todos los animales con VM superaron una fase de estabilización donde fueron ventilados con un V_C de 7 ml/kg, PEEP= 2 cmH₂O, una frecuencia de 46 respiraciones/minuto, $FiO_2=0.4$ y ratio I/E 1:2. Una vez finalizado este período de estabilización (15 minutos), los animales recibían por instilación intratraqueal 200 µg/kg de LPS de *E.Coli* (serotipo O55:B5, Sigma-Aldrich, Spain), disuelto en un volumen total de 200 µl de solución salina atemperada. En los grupos salinos se instilaba el mismo volumen de la solución vehículo (200 µl de suero salino fisiológico). Para facilitar que el instilado tuviese una distribución homogénea en el pulmón, los animales eran movilizadas a ambos lados en decúbito-lateral.

A continuación, los animales recibían el patrón de ventilación descrito anteriormente (consistente en un V_C de 7ml/kg y PEEP de 2 ó 7 cmH₂O) según el grupo experimental, durante 3 horas. Finalizado este tiempo, se registraban valores de gasometrías arteriales y mecánica pulmonar. La PAM era monitorizada continuamente a lo largo de todo el proceso.

En la figura 5 se representa el esquema del procedimiento experimental y la distribución de los grupos a estudio.

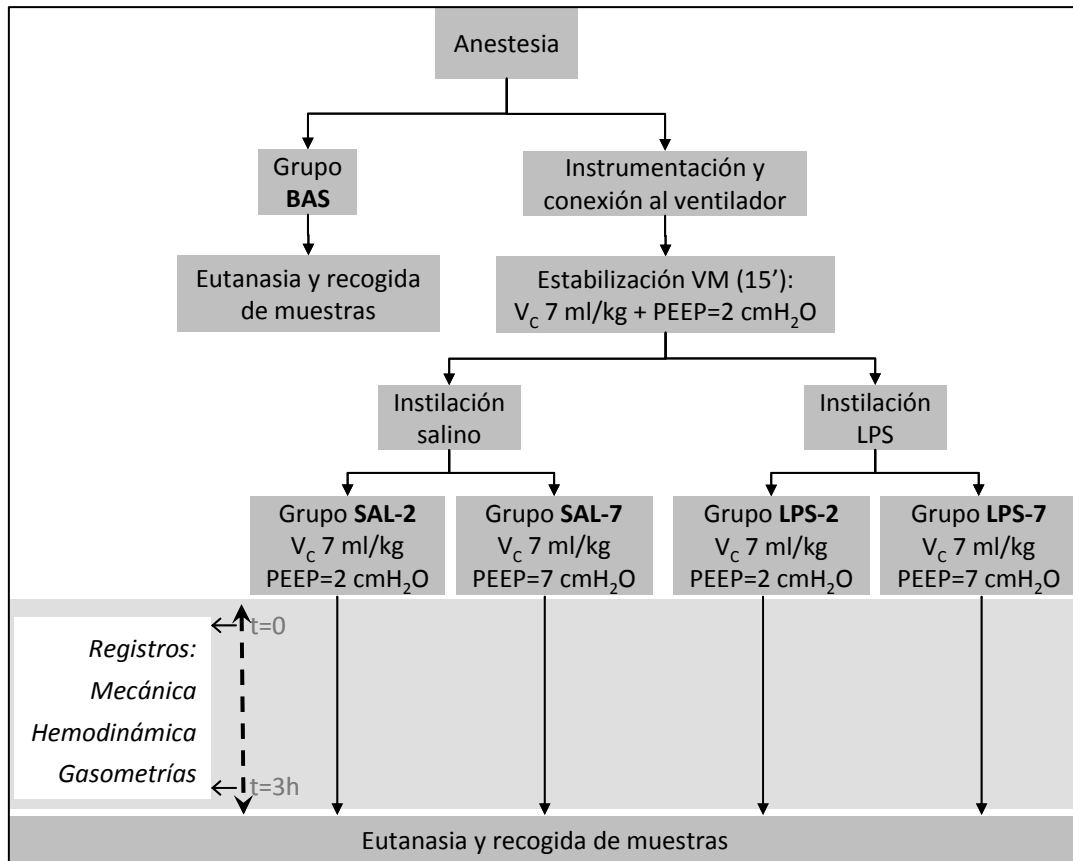


Figura 5. Esquema del procedimiento experimental de VM con dos niveles de PEEP tras instilación intratraqueal de LPS. VM= ventilación mecánica, V_c= volumen corriente, PEEP= Presión positiva al final de la espiración, LPS= lipopolisacárido.

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En ambos trabajos el tamaño de muestra se calculó mediante el programa GRANMO (Granmo 5.2 software, Barcelona, Spain), asumiendo un error alfa bilateral del 0.5 y un error beta de 0.2. El análisis estadístico se realizó mediante el programa estadístico SPSS (versión 17.0 y 21.0, SPSS Inc. Chicago, IL, USA) y bajo la supervisión de un experto estadístico. Los resultados están expresados como la media \pm el error estándar de la media (SEM). La homogeneidad de las varianzas de las variables de estudio se comprobó mediante el test de Levene para aplicar posteriormente el test adecuado (paramétrico o no paramétrico). Las variables fisiológicas registradas a lo largo de todo el procedimiento experimental (PAM, pH, Pa/FiO₂, PaCO₂ y Crs_{est}) se compararon utilizando un análisis univariante de la varianza (ANOVA) de una vía para medidas repetidas. Se consideró significativo un valor de $p < 0.05$ mientras que valores de $p < 0.1$ fueron considerados una tendencia aunque sin alcanzar la significación estadística.

En el primer trabajo, las variables relacionadas con la inflamación, la histología y la activación neuronal, fueron analizadas mediante el test no paramétrico U-Mann-Whitney.

En el segundo trabajo, las diferencias entre los animales ventilados y el grupo basal (no ventilado) se comprobaron mediante un ANOVA seguido de un test de Dunnett. Las diferencias entre los dos niveles de PEEP (2 y 7 cmH₂O) se analizaron mediante el test t-Student de forma independiente para aquellos animales que fueron instilados con salino o LPS. El efecto de la administración de LPS se evaluó también mediante el test t-Student.

4. RESULTADOS

4.1. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA VM EN LA ACTIVACIÓN NEURONAL Y LA RESPUESTA INFLAMATORIA LOCAL Y SISTÉMICA, EN UN MODELO DE VM LESIVA EN RATAS

Los resultados de este primer trabajo, se recogen en la publicación:

Injurious mechanical ventilation affects neuronal activation in ventilated rats. Quílez ME, Fuster G, Villar J, Flores C, Martí-Sistac O, Blanch L, López-Aguilar J. *Crit Care*. 2011;15 (3):R124. Epub 2011 May 13. (ANEXO I, artículo 1)

4.1.1. RESUMEN

En un primer abordaje sobre los posibles efectos de patrones de ventilación mecánica lesiva sobre el cerebro, se compararon dos grupos de ratas ventiladas respectivamente con $V_C = 30$ ml/kg (grupo HVt) y $V_C = 8$ ml/kg (grupo LVt). Para ello, analizamos el patrón de expresión de la proteína c-Fos, un conocido marcador de activación neuronal, en diferentes áreas encefálicas. Asimismo, evaluamos la respuesta inflamatoria desencadenada a nivel local (pulmón) y sistémico (plasma). El grupo control basal (BAS), formado por animales sanos no ventilados e inmediatamente exanguinados tras inducción anestésica, se utilizó como grupo de referencia para obtener los valores basales de las diferentes variables estudiadas. Se añadió también un grupo con respiración espontánea (Spont), con el fin de discriminar el efecto del procedimiento quirúrgico y la anestesia sobre la activación neuronal.

4.1.2. RESULTADOS

4.1.2.a. Variables fisiológicas, hemodinámicas y mecánica respiratoria

En todos los grupos, la PAM se mantuvo estable y dentro del rango de la normalidad a lo largo de toda la fase experimental. En el grupo HVt, los valores de $C_{rs_{est}}$ y de P_{plat} aumentaron al incrementar el V_C en 30ml/kg, pero una vez fijado el V_C , ambas permanecieron estables. Respecto las gasometrías arteriales, en el grupo LVt se observó una disminución significativa de la

PaO₂/FiO₂ y pH, acompañado de un incremento progresivo de la PaCO₂ al final del período de ventilación (Figura 6). Los animales con respiración espontánea mostraron valores de pH ligeramente superiores a los registrados en los grupos ventilados (ANEXO I, artículo 1, fig. 1).

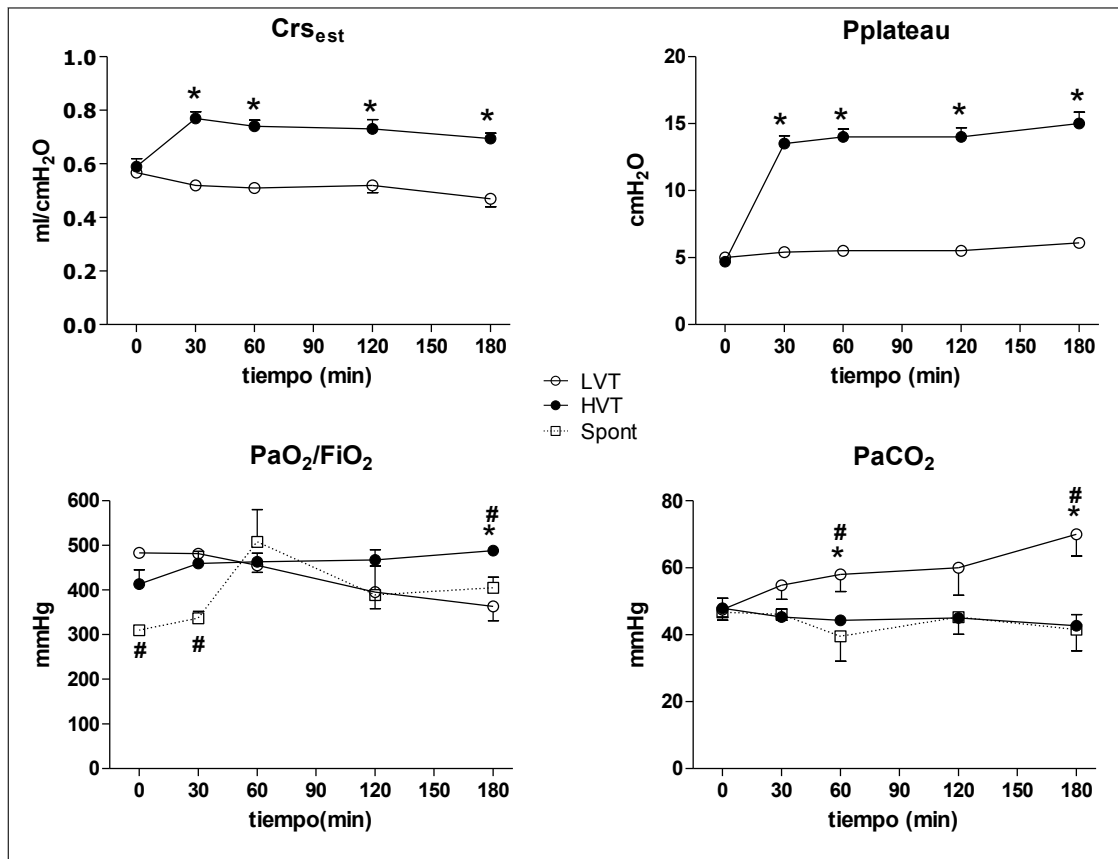


Figura 6. Variables del sistema respiratorio durante la fase de ventilación mecánica. Los datos se expresan como media \pm SEM. * $p < 0.05$ vs grupo HVT y # $p < 0.05$ vs grupo Spont.

4.1.2.b. Histología pulmonar

Se observó un aumento en la infiltración alveolar de neutrófilos y el grado de lesión pulmonar en los grupos sometidos a VM en comparación con los grupos no ventilados. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el grado de lesión o infiltración entre los grupos ventilados con volumen corriente elevado (HVT) y volumen corriente bajo (LVT) (ANEXO I, artículo 1, fig. 2).

4.1.2.c. Inmunohistoquímica de c-Fos en cerebro

En los grupos con VM se hallaron células inmunopositivas para c-Fos en la CeA, PVN (Figura 7) y SON (no se muestran los datos), aunque no se encontraron diferencias en el nivel de activación neuronal entre los grupos HVt y LVt. Al igual que el grupo BAS, los animales con respiración espontánea mostraron niveles casi indetectables de c-Fos en la CeA y el PVN (ANEXO 1, artículo1, fig. 3,4 y 6).

En la RS y el Tálamo, el grupo HVt mostró un incremento notable del marcaje de c-Fos, siendo prácticamente indetectable en los grupos LVt o BAS (Figura 7). También se observó actividad neuronal en estas áreas en el grupo de respiración espontánea, aunque en menor medida. No se encontraron diferencias en el grado de activación neuronal en otras áreas corticales o en el hipocampo entre los distintos grupos experimentales (No se muestran los datos).

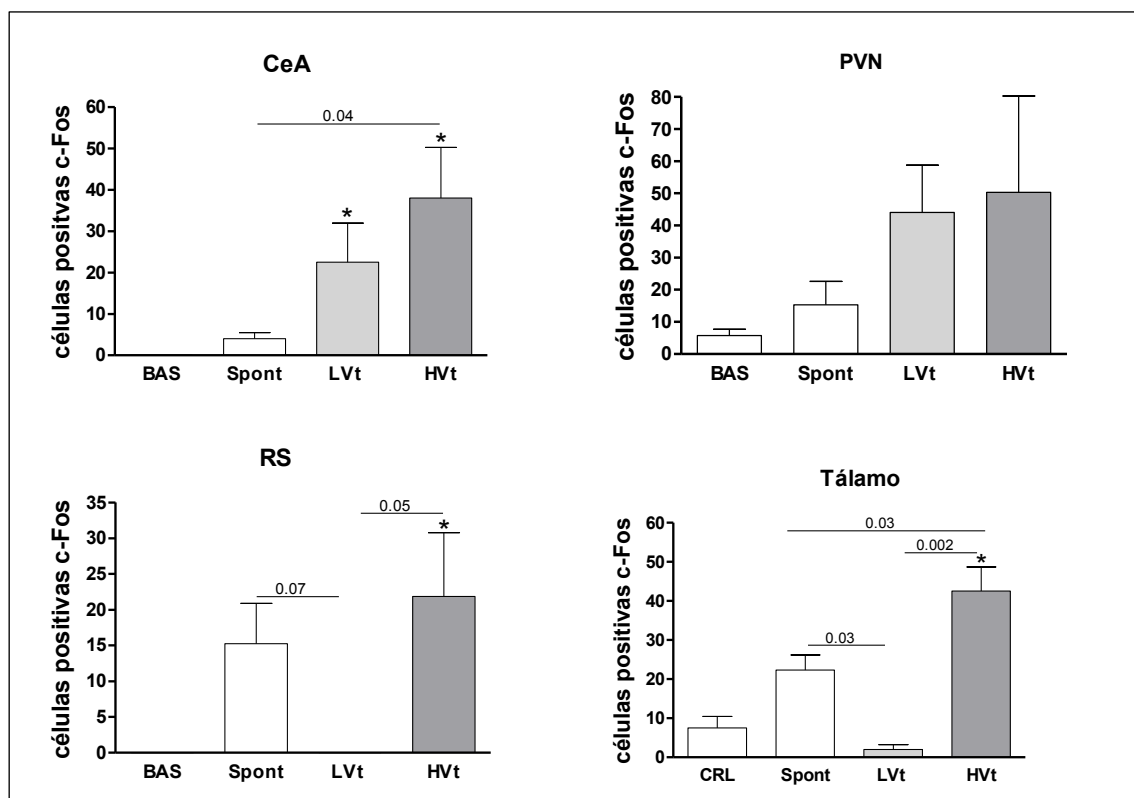


Figura 7. Cuantificación de células inmunopositivas para c-Fos en la Amígdala Central (CeA), núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN), Corteza Retrosplenial (RS) y Tálamo. Los valores están expresados como la media \pm error SEM. * $p < 0.05$ respecto el grupo BAS.

4.1.2.d. Mediadores inflamatorios en plasma y pulmón

En plasma, se observó un aumento de los niveles de IL-6, IL-10, IL-1 β , MCP-1 y MIP-2 en los grupos sometidos a VM independientemente del nivel de V_C utilizado. En cambio, los niveles de TNF- α , solamente se encontraron aumentados significativamente en el grupo HVt (p= 0.005) (Figura 8).

A nivel pulmonar, se observó un incremento en los niveles de IL-6, IL-10, IL-1 β , y MIP-2 en los grupos HVt y LVt, aunque sin llegar alcanzar diferencias significativas entre ambos grupos. En este caso, los niveles de TNF- α fueron similares en los animales ventilados y el grupo BAS. Se observó una tendencia al aumento de los niveles de la quimiocina MCP-1 en el grupo HVt respecto el grupo LVt, aunque sin llegar a la significación estadística.

En términos generales, podemos decir que de entre los dos grupos ventilados, el grupo HVt fue quien mostró una respuesta inflamatoria más acentuada, pero a su vez más variable.

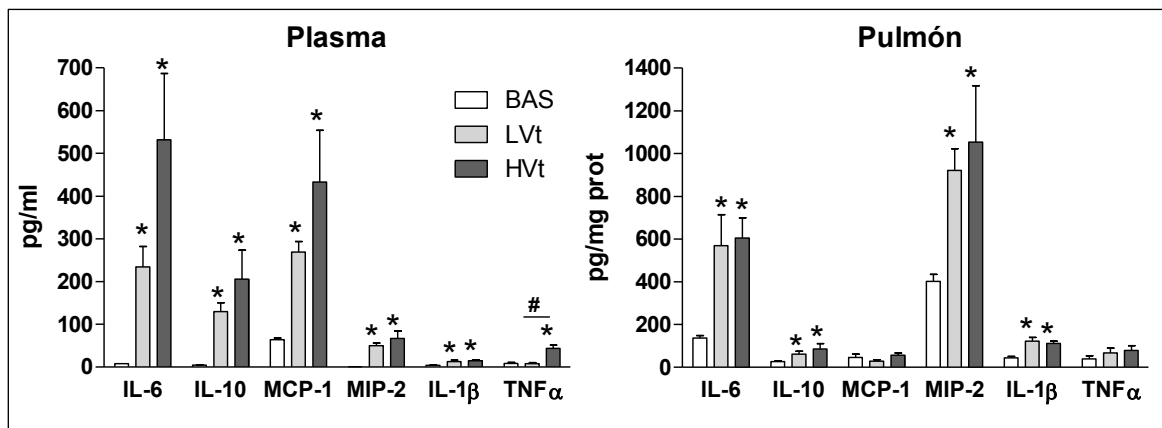


Figura 8. Niveles de los mediadores inflamatorios en plasma y pulmón. Los datos se expresan como media \pm SEM. * p<0.05 vs grupo BAS y # p<0.05 vs LVt.

4.2. EVALUACIÓN DEL EFECTO MODULADOR DE LA PEEP EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA Y LA ACTIVACIÓN NEURONAL, EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE VM CON BAJO V_C E INSTILACIÓN DE LIPOPOLISACÁRIDO

Este segundo estudio se desarrolla en la publicación:

Moderate PEEP after tracheal lipopolysaccharide instillation prevents inflammation and modifies the pattern of brain neuronal activation. Quilez ME, Rodríguez-González R, Turon M, Fernandez-Gonzalo S, Villar J, Kacmarek RM, Gómez MN, Oliva JC, Blanch L, López-Aguilar J. *Shock*. 2015 Dec; 44(6):601-8. (ANEXO I, artículo 2)

4.2.1. RESUMEN

En nuestro trabajo anterior, observamos un patrón diferencial de activación neuronal, utilizando dos niveles de volumen corriente (V_C) en un modelo de VM lesiva en ratas.

La VM con V_C moderado y PEEP, es considerada una estrategia de ventilación protectora en pacientes críticos, y especialmente, en aquellos con patologías respiratorias severas. Aunque parece evidente el beneficio de su uso, hay una cierta controversia sobre cuál es el nivel PEEP óptimo. Asimismo, su contribución en la modulación de la interacción pulmón-cerebro, está aún por explorar. Por todo ello, en este segundo trabajo, decidimos comparar los efectos de dos niveles de PEEP, sobre la activación neuronal y la respuesta inflamatoria, en un modelo de lesión pulmonar por VM e instilación intratraqueal de LPS en ratas.

Según nuestra hipótesis, la optimización del nivel de PEEP podría ser crucial para prevenir la inflamación local y sistémica secundaria a la instilación de LPS y la VM, además de modificar el patrón de activación neuronal.

4.2.2. RESULTADOS

4.2.2.a. Variables fisiológicas, hemodinámicas y mecánica respiratoria

En todos los grupos experimentales la PAM fue similar y se mantuvo estable a lo largo del procedimiento. El pH en los grupos VM con PEEP= 7 fue significativamente menor que en los ventilados con PEEP= 2 (ANEXO I, artículo 2, Fig. 1). En los grupos con PEEP= 7 cmH₂O (LPS-7 y SAL-7) se observó un aumento de la Pplat así como una disminución de la Crs_{est}. Las gasometrías arteriales revelaron una disminución de la ratio PaO₂/FiO₂ y un aumento de la PaCO₂ en el grupo LPS-7 respecto al grupo LPS-2 (Figura 9).

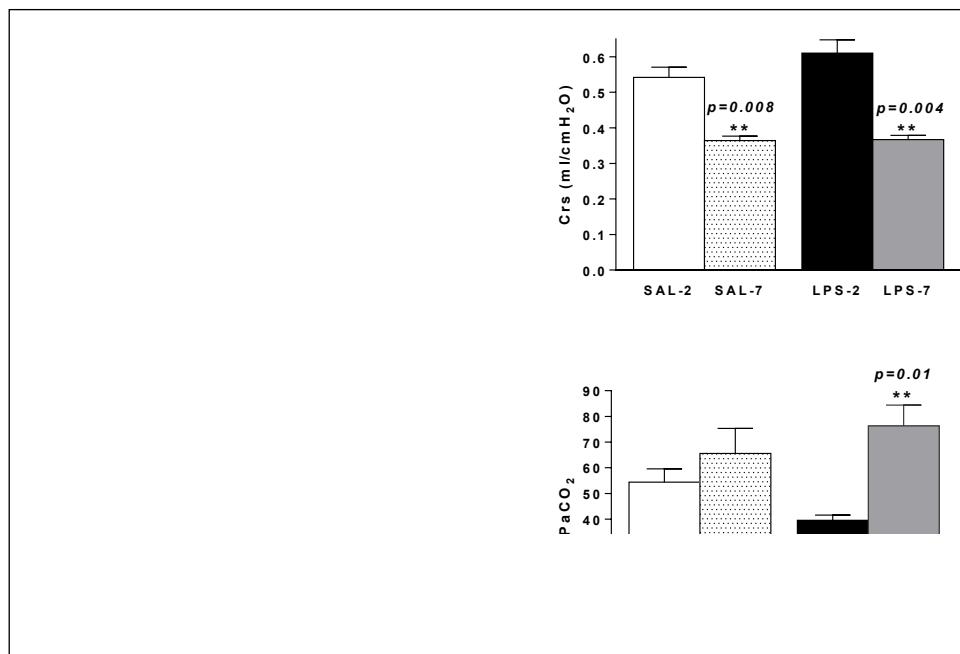


Figura 9. Parámetros respiratorios al final del periodo de ventilación. Las barras representan la media \pm SEM. ** $p < 0.05$ PEEP-7 vs PEEP-2.

4.2.2.b. Respuesta inflamatoria

En el grupo BAS, los niveles plasmáticos de TNF- α , IL1- β , MCP-1 y IL-10 fueron prácticamente indetectables. Por el contrario, todos los animales sometidos a instilación intratraqueal y VM presentaron una respuesta inflamatoria. En plasma, el tratamiento con LPS, resultó en un incremento significativo de la quimiocina MCP-1 en el grupo con PEEP= 2. De los grupos instilados con LPS; el grupo con PEEP= 2 es el que mostró mayor inflamación.

De forma similar, de los grupos instilados con salino, los tratados con PEEP=2 fueron los que presentaron niveles superiores de IL-6 y IL-10 (Figura 10).

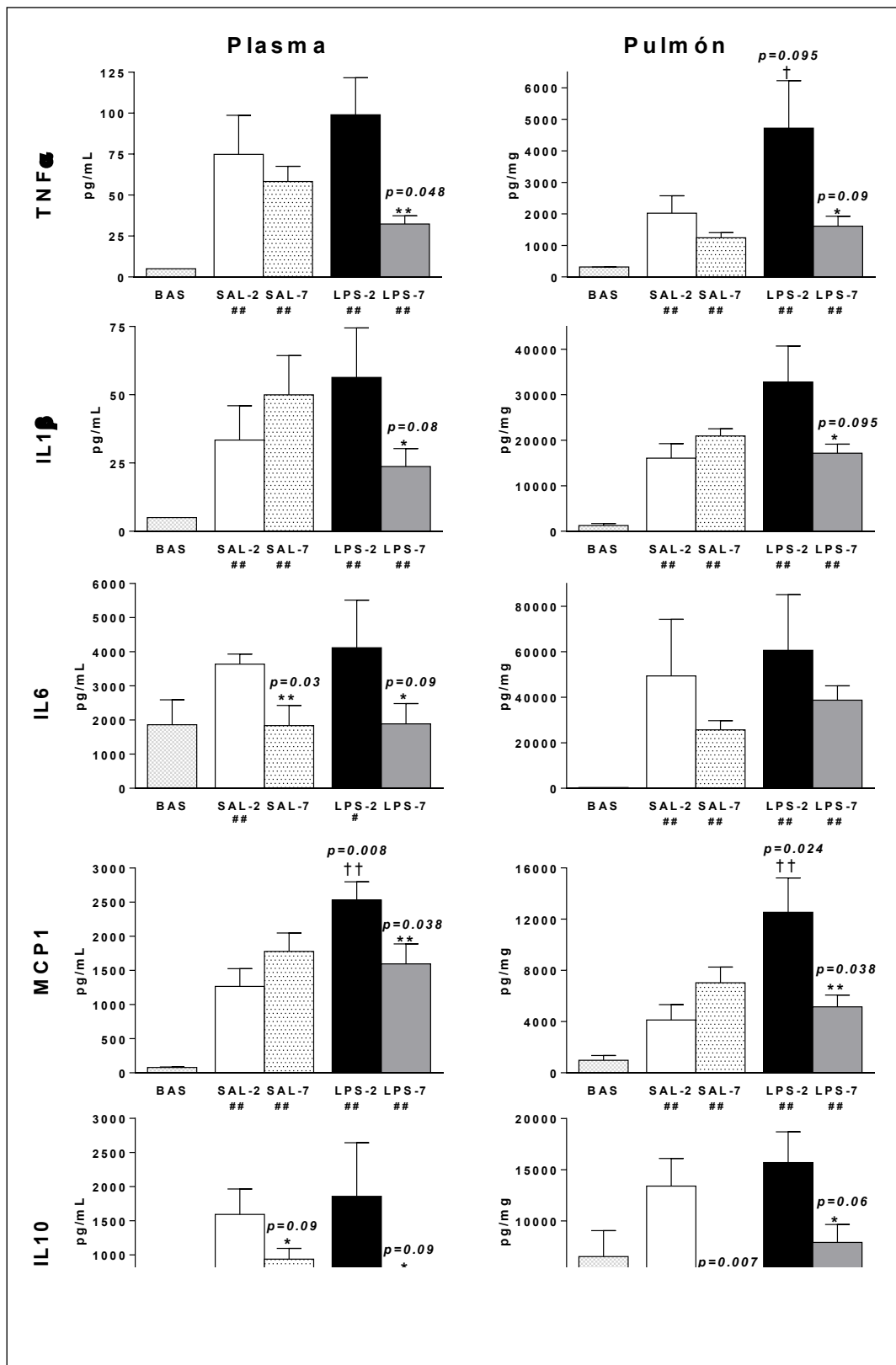


Figura 10. Niveles de citoquinas en plasma y pulmón. Las barras representan la media \pm SEM. # $p < 0.1$ y ## $p < 0.05$ respecto grupo BAS; † $p < 0.1$ y †† $p < 0.05$ LPS vs SAL; * $p < 0.1$ y ** $p < 0.05$ PEEP 7 cmH_2O vs PEEP 2 cmH_2O .

En pulmón, se obtuvieron resultados similares a los hallados en plasma. El grupo BAS, presentó niveles muy bajos de TNF- α , IL1- β , MCP-1 y IL-10. Los animales instilados con LPS presentaron un incremento significativo de los niveles de MCP-1 y TNF- α . Dentro de estos grupos, en los tratados con PEEP=7 se detectaron menores niveles de TNF- α , IL1- β , MCP-1 y IL-10. De los grupos instilados con salino, los animales ventilados con PEEP=7 mostraron menores niveles de IL-10 (Figura 10).

4.2.2.c. Infiltración de neutrófilos y apoptosis en pulmón

Tal como se esperaba, en el grupo BAS apenas se percibieron signos histológicos de lesión pulmonar (infiltración de neutrófilos o apoptosis). Se observó mayor infiltración de neutrófilos en los pulmones de los animales instilados con LPS en comparación con los instilados con salino. Entre los dos grupos con LPS, el tratado con PEEP=7 fue quien presentó menor infiltración de neutrófilos.

Todos los grupos experimentales ventilados, presentaron un mayor número de células positivas para TUNEL respecto el grupo BAS. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas en función del nivel de PEEP al comparar los animales tratados con LPS. Por el contrario, sí observamos una disminución del número de células apoptóticas en el grupo salino con PEEP=7 respecto el grupo salino con PEEP=2, aunque sin llegar a alcanzar significación estadística ($p=0.092$). (Figura 11)

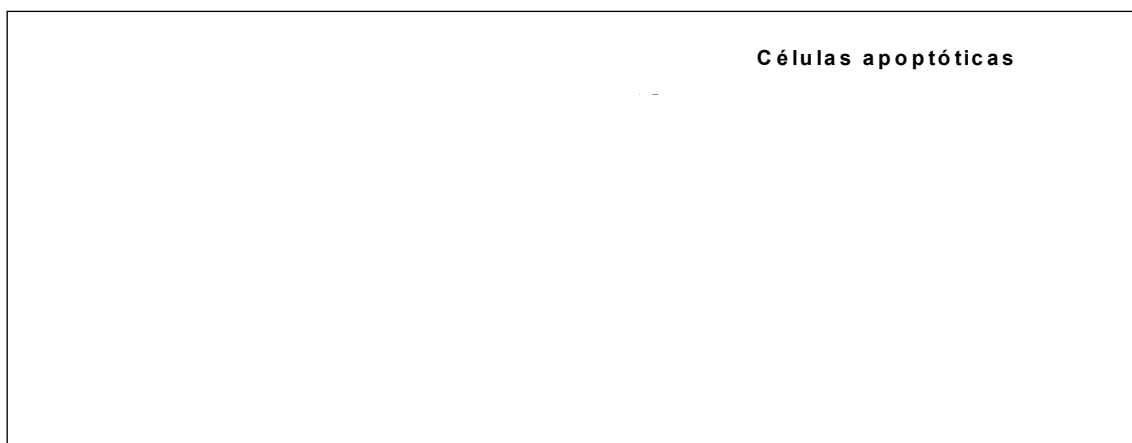


Figura 11. Infiltración de neutrófilos y apoptosis en pulmón. Las barras representan la media \pm SEM. ## $p<0.05$ respecto grupo BAS; †† $p<0.05$ LPS vs SAL; * $p<0.1$ y ** $p<0.05$ PEEP 7 cmH_2O vs PEEP 2 cmH_2O .

4.2.2.d. Inmunohistoquímica de c-Fos en cerebro

En el grupo BAS, no se hallaron células inmunopositivas para c-Fos en ninguna de las áreas cerebrales estudiadas. Por el contrario, todos los grupos experimentales ventilados mostraron inmunoreactividad, en diferentes grados, en todas las áreas de estudio (ANEXO I, *Supplemental Digital Content*, artículo 2).

En general, se observó un mayor número de células inmunopositivas para c-Fos, en la CeA y el NTS, en los grupos tratados con LPS en comparación con los salinos. El marcaje de c-Fos en estas áreas fue más notable en el grupo SAL-7 que en el grupo SAL-2 (Figura 12). En el PVN no se hallaron diferencias entre los grupos experimentales. En el resto de estructuras estudiadas: RS, SON y tálamo, el grupo LPS con PEEP=7 mostró un incremento significativo de células positivas para c-Fos respecto el grupo LPS con PEEP=2. Estas diferencias, sin embargo, no se encontraron al comparar entre los grupos tratados con salino (ANEXO I, artículo 2, fig. 5 y 6).

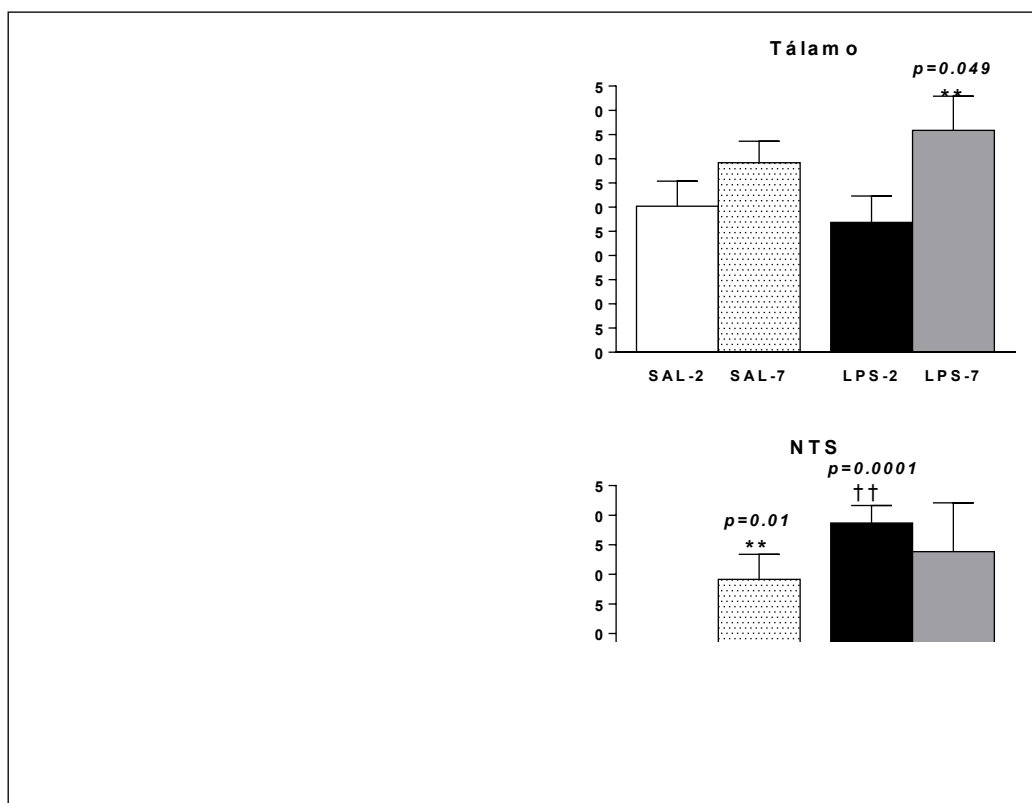


Figura 12. Cuantificación de células inmunopositivas para c-Fos en amígdala central (CeA), Tálamo, Corteza Retrosplenial (RS) y núcleo del tracto solitario (NTS). Los valores están expresados como la media \pm SEM. †† $p<0.05$ LPS vs SAL; * $p<0.1$ y ** $p<0.05$ PEEP 7 cmH₂O vs PEEP 2 cmH₂O

5. DISCUSIÓN

Los estudios que integran esta tesis doctoral evalúan el efecto de diferentes estrategias de VM en la respuesta inflamatoria (local y sistémica) y en la actividad cerebral (en términos de la expresión de la proteína c-Fos, un conocido marcador de activación neuronal). En el primer trabajo, analizamos los posibles efectos de un patrón de ventilación mecánica lesiva sobre el cerebro y la respuesta inflamatoria, comparando dos grupos de ratas ventiladas con alto y bajo volumen corriente. En el segundo trabajo, nuestro objetivo principal fue evaluar el posible efecto modulador de la PEEP tanto en la inflamación como en el patrón de activación neuronal. Para ello, comparamos los efectos de dos niveles de PEEP, en un modelo de lesión pulmonar por VM e instilación intratraqueal de LPS en ratas.

En ambos trabajos los resultados indican que la VM, *per se*, puede modificar el patrón de expresión de c-Fos en distintas áreas del cerebro. En concreto en el primer modelo, la ventilación con V_C elevado sin PEEP, genera una mayor expresión de la proteína c-Fos, que la ventilación con V_C bajo. En el segundo modelo comprobamos que la aplicación de PEEP tras la instilación intratraqueal de LPS, previene la inflamación pulmonar y la consecuente diseminación de mediadores inflamatorios al sistema circulatorio, además de modular el patrón de activación neuronal asociado a la instilación de LPS y a la VM.

Trabajo I

La ventilación con alto V_C y sin PEEP se considera una estrategia ventilatoria de riesgo, y se asocia a una mayor respuesta inflamatoria, tal y como ya han descrito diversos autores [30, 83, 84]. Los resultados de este estudio corroboran esta evidencia científica y además, como novedad, describen un incremento de la activación neuronal en determinadas áreas del cerebro en relación a este patrón ventilatorio. En cerebro, se sabe que la expresión de la proteína c-Fos se induce rápidamente por una amplia variedad de estímulos y condiciones como potenciales de acción, inflamación o isquemia, entre otros [72, 77]. En este sentido, son diversos los mecanismos que podrían explicar los altos niveles de proteína c-Fos observados en los animales ventilados con V_C elevado. Los pulmones disponen de mecanorreceptores que actúan como sensores de estiramiento y que son

capaces de transmitir señales aferentes al cerebro y producir la activación de diversas áreas [85]. El sistema nervioso autónomo se encuentra igualmente involucrado en esta comunicación pulmón-cerebro [50, 67, 85].

La aplicación de estrategias de ventilación no protectoras (bajo V_C sin PEEP) o incluso lesivas (alto V_C sin PEEP) genera un aumento de la respuesta inflamatoria tanto a nivel local como sistémico. La respuesta proinflamatoria desarrollada en el grupo HVt fue más intensa a nivel sistémico y se acompañó de un marcado incremento de TNF- α , lo que concuerda con los datos publicados por otros autores [23, 83, 86]. Diversos hallazgos sugieren que la estrategia ventilatoria también podría tener un efecto sobre el SNC a través de mecanismos relacionados con la inflamación [24, 25, 86]. La liberación de mediadores inflamatorios u otros metabolitos al torrente circulatorio puede propagarse hasta el cerebro alterando la permeabilidad de la BHE o incluso modificando el flujo cerebral [50, 83, 87]. En nuestro modelo experimental no hemos estudiado los mecanismos por los que se produce la activación cerebral, centrándonos exclusivamente en examinar el patrón de síntesis de la proteína c-Fos. Tras 3 horas de VM potencialmente lesiva (con alto y bajo V_C) se produjo una hiperactivación en la CeA, SON y PVN, que no se observó en los animales no ventilados. Curiosamente tanto la VM con V_C elevado como la respiración espontánea, resultó en un incremento significativo de c-Fos en la RS y el tálamo, mientras que estas áreas no se activaron en los grupos LVt o BAS. Estos resultados, no nos permiten esclarecer qué papel concreto podrían jugar los procedimientos anestésicos y quirúrgicos en la señal observada, dado que esta activación es mínima tanto en el grupo LVt (instrumentado) como en el BAS (no instrumentado). Es probable pues, que la activación observada en la RS y el tálamo en estos dos grupos, sea inducida por distintos mecanismos.

La hipercapnia desarrollada en el grupo LVt se debe probablemente a la existencia de un progresivo desreclutamiento alveolar relacionado con la ausencia de PEEP en estos animales. Teniendo en cuenta esta condición fisiológica, no podemos descartar que la activación cerebral observada en la CeA, SON y PVN en el grupo LVt esté relacionada con la hipercapnia desarrollada en estos animales. Sin embargo, bajo este argumento, la activación neuronal observada en el grupo HVt, que se mantiene en

normocapnia, sugiere que en este caso el estrés mecánico pulmonar inducido por el V_C elevado sin PEEP podría inducir la síntesis de c-Fos en esas áreas cerebrales, a través de otras vías.

Los estudios realizados sobre VM con altos V_C han reportado respuestas fisiológicas diversas [44, 86, 88, 89]. Algunos autores han descrito efectos negativos de este tipo de ventilación en la presión arterial media [90] que podrían tener repercusión a nivel cerebral. Dado que los resultados hallados en el presente estudio, se han obtenido en el contexto de una hemodinámica y función pulmonar preservadas, no es posible atribuir los efectos observados en el cerebro a diferencias en la perfusión entre los grupos experimentales.

De igual manera, hay que tener en cuenta que algunos fármacos pueden modificar la respuesta cerebral. En este modelo, sin embargo, el uso de un idéntico patrón de anestesia y relajación neuromuscular en los grupos experimentales que reciben VM, evita las posibles diferencias intergrupales en ese aspecto.

A pesar de no tener relevancia clínica por estar lejos de la aplicación en pacientes, el uso de un V_C de 30ml/kg en nuestro modelo experimental, se justifica porque permite simular qué ocurre en aquellas zonas del pulmón que se someten a altas presiones locales, en el contexto de la lesión pulmonar. Curiosamente, en nuestro modelo de VM lesiva, la aplicación de este elevado V_C resultó solamente en un aumento moderado de la $P_{plateau}$, en comparación con otros modelos más agresivos descritos en la literatura [84, 91]. La explicación de esta observación *a priori* paradójica, puede estar en que el uso de elevado V_C en animales con pulmones sanos y en ausencia de otro insulto, no es suficiente para producir una lesión importante en el tejido pulmonar, en un periodo de tiempo limitado a 3 horas. Su aplicación, por el contrario, sí es capaz de activar los mecanismos de inicio de la lesión pulmonar consistentes en la liberación de citoquinas y la activación y reclutamiento de neutrófilos hacia el espacio alveolar.

En este modelo, la ausencia de alteraciones pulmonares funcionales junto a la corta duración de la VM (3 horas), delimita el análisis de las alteraciones cerebrales a fenómenos moleculares tempranos, como la activación neuronal determinada por la inducción de c-Fos. Como ya se ha

dicho anteriormente, este diseño no permite establecer cuáles son los mecanismos o vías a través de los cuales la respuesta inflamatoria o la sobredistensión pulmonar producen la activación cerebral observada, dejando ese aspecto para futuras investigaciones.

Trabajo II

En el segundo trabajo, nuestro mayor hallazgo es que la aplicación de PEEP, inmediatamente tras la instilación intratraqueal de LPS, previene la inflamación pulmonar y su diseminación al sistema circulatorio y a la vez modifica el patrón de activación neuronal asociado a la instilación de LPS.

La instilación intratraqueal de LPS ha sido utilizada en modelos experimentales de LPA/SDRA para mimetizar fenómenos de contaminación del tubo endotraqueal y de las vías respiratorias superiores, así como para analizar la respuesta inflamatoria secundaria al desarrollo de infecciones locales [92]. En nuestro modelo, la instilación de LPS contribuye a la inflamación local y al reclutamiento de neutrófilos en los pulmones de los animales ventilados con un nivel de PEEP bajo (2 cmH₂O). Estos hallazgos concuerdan con lo descrito en otros modelos experimentales donde se ha visto que la exposición intratraqueal de LPS desencadena una respuesta inflamatoria aguda en pulmón, mediada por la activación de macrófagos y el reclutamiento de células polimorfonucleares (PMN) [92]. Los macrófagos activados por LPS, liberan una gran variedad de citoquinas como TNF- α , IL-1 β , IL-6 y MCP-1 que contribuyen al reclutamiento de neutrófilos al espacio alveolar. No sólo los macrófagos alveolares intervienen en esta respuesta inflamatoria. También las células epiteliales alveolares y las células endoteliales vasculares actúan liberando mediadores inflamatorios y factores de adhesión celular, que contribuyen a la migración de PMN hacia el lugar de la lesión, perpetuando la respuesta inflamatoria [93, 94].

En un estudio experimental en cerdos, Fodor y col. [95] evaluaron el uso de niveles de PEEP elevados como medida para proteger de los efectos adversos derivados de la instilación de LPS. La aplicación de un nivel moderado-alto de PEEP disminuyó las heterogeneidades en la ventilación en las primeras dos horas tras broncoaspiración, sin afectar a la mecánica

pulmonar, parámetros cardiovasculares o los índices de oxigenación. En nuestro modelo experimental, una PEEP de 7 cmH₂O, a pesar de asociarse a un cierto grado de sobredistensión pulmonar, resulta beneficiosa al prevenir la respuesta inflamatoria local y sistémica secundaria a la administración de LPS. Se observa, además, una disminución de la compliance estática pulmonar (distensibilidad) probablemente relacionada con un incremento del espacio muerto alveolar [96, 97]. Esta sobredistensión podría ser consecuencia de la expansión de espacios alveolares ya aireados, debido al bajo potencial de reclutamiento presente en estos pulmones.

El desequilibrio de la relación ventilación/perfusión debido al grado de hiperinflación, podría justificar la hipercapnia y acidosis respiratoria progresivas observadas en los animales ventilados con PEEP de 7 cmH₂O [98]. Se ha descrito que la acidosis hipercápnica puede modular la inflamación durante la VILI [99] pero en cambio no en la lesión pulmonar producida por neumonía bacteriana [100]. Estos resultados estarían en consonancia con otras investigaciones publicadas donde se ha evidenciado que las células pulmonares responden de manera diferente a distintos tipos de insultos [101]. Teniendo en cuenta estas evidencias y en vista de nuestros resultados, no podemos descartar que en este modelo experimental, la acidosis hipercápnica observada en los grupos con PEEP 7 cmH₂O, contribuya en parte a proteger de la inflamación. En este sentido sólo podemos demostrar que el uso de PEEP de 7 cmH₂O tras la instilación con LPS en nuestro modelo, previene la respuesta inflamatoria local y sistémica, incluso en presencia de cierto grado de sobredistensión. Una posible explicación de éste fenómeno, podría residir en un efecto estabilizador de la PEEP de 7 cmH₂O. Este nivel de PEEP podría reducir el estrés mecánico derivado del cierre y apertura cíclicos de las unidades alveolares y prevenir el desarrollo de atelectrauma [102, 103].

Por otro lado, la instilación intratraqueal de LPS indujo a su vez una respuesta del SNC en términos de inmunoreactividad de c-Fos en la CeA y el NTS. La CeA está involucrada en el procesamiento de información autonómica y recibe, entre otras, señales directas del NTS. El NTS es en sí mismo un detector de citoquinas circulantes [104], por lo que esta respuesta podría estar relacionada con la inflamación. La inervación vagal, también podría explicar

cómo el LPS intratraqueal es capaz de provocar activación neuronal, antes incluso de que se haya desencadenado una respuesta inflamatoria sistémica [65], ya que las vías aferentes del vago, pueden ser activadas por la presencia de LPS periférico. Estos resultados estarían de acuerdo con los publicados en un estudio reciente, donde demostramos que tras la estimulación con LPS, las células epiteliales pulmonares, liberaban mediadores inflamatorios, capaces de afectar de manera significativa células cerebrales en cultivo [105].

Los resultados obtenidos en el segundo estudio, corroboran los hallazgos del primer trabajo en relación a que la VM, puede inducir la síntesis de c-Fos en determinadas áreas cerebrales. Los datos de este segundo estudio señalan además, que la PEEP puede contribuir a una regulación de la actividad neuronal, que acompañaría las cascadas inflamatorias pulmonares y sistémicas. Diversos autores han sugerido que la activación neuronal observada podría estar asociada a los efectos de la PEEP sobre la circulación cerebral por mecanismos hemodinámicos y mediados por CO₂ [96, 106]. Sin embargo, en nuestro estudio, niveles de hipercapnia similares han resultado en diferentes patrones de activación en el cerebro, dependiendo de si habían recibido LPS o solución salina. Aunque se sabe que el cerebro es sensible a los niveles de CO₂, no podemos discriminar si la activación neuronal diferencial observada en el grupo LPS-7, está relacionada con la hipercapnia desarrollada o con la evitación del atelectrauma.

Incluso en ausencia de LPS, la PEEP de 7 cmH₂O resultó en un incremento de la activación neuronal en la CeA y el NTS. Asimismo, también observamos células inmunopositivas en el PVN y la CeA en el grupo LPS-7, pese a tener una débil respuesta inflamatoria. Como explicación a estas respuestas, postulamos que la sobredistensión asociada a la PEEP podría promover la activación neuronal, antes de manifestarse siquiera una respuesta inflamatoria sistémica, probablemente a través de vías neurales. Las terminaciones nerviosas del vago son sensibles a estímulos mecánicos periféricos, que por vías aferentes son transmitidas al NTS [65]. En este sentido Gourine y col [107] demostraron que la activación de mecanorreceptores pulmonares podía incrementar la activación del NTS mediante la liberación de neurotransmisores como el glutamato.

También la vía vagal juega un papel crucial en la comunicación pulmón-cerebro a través de la activación del reflejo colinérgico antiinflamatorio, el cual se ha demostrado que puede atenuar la VILI [67, 108]. La estimulación de aferencias vagales desencadena una respuesta antiinflamatoria que cursa a través de la liberación de acetilcolina (ACh) por neuronas eferentes (reflejo colinérgico antiinflamatorio). La ACh, actúa interaccionando con receptores nicotínicos presentes en los macrófagos periféricos, inhibiendo su activación y la consecuente producción de citoquinas. Este tipo de regulación neural permite un control rápido y localizado de la lesión, actuando específicamente en el mantenimiento de la integridad del tejido diana sin que haya un compromiso de la respuesta global inmune [64]. Aunque posiblemente esta vía de regulación se encuentre involucrada, en el presente estudio, no es posible determinar qué papel desempeña la señalización vagal en la respuesta a la PEEP. El uso de animales vagotomizados o tratados con antagonistas dopaminérgicos sería una buena estrategia para abordar esta cuestión de cara a futuras investigaciones.

Diversos trabajos han descrito la inducción de c-Fos por fenómenos de estrés en algunas áreas cerebrales como el hipocampo, SON o PVN [70, 109, 110]. En el presente estudio, la señal de c-Fos observada en RS, SON y tálamo, es claramente superior en el grupo LPS-7 que en el LPS-2 o los grupos tratados con solución salina. Esta observación sugiere que la aplicación de un nivel de PEEP moderado podría contribuir tanto a la modulación de la respuesta inflamatoria como en el grado de activación neuronal en esas áreas. Curiosamente, en nuestro primer estudio (trabajo I) también hallamos un incremento en los niveles de c-Fos en la RS y el tálamo de los animales que recibieron elevado V_C y en el grupo con respiración espontánea. Estos resultados, no nos permiten determinar si la activación neuronal observada en la RS, SON y tálamo en los animales con LPS y PEEP de 7 cmH₂O tiene una relación directa con su modulación de la respuesta inflamatoria. El diseño de este estudio proporciona información sobre qué áreas pueden participar en la respuesta a LPS y PEEP, pero no investiga los mecanismos involucrados en esta activación.

Limitaciones de los estudios

Debemos ser cautos a la hora de extrapolar a la práctica clínica los resultados obtenidos en modelos experimentales. Los modelos animales de patologías complejas están limitados por las diferencias interespecie existentes y no tienen una aplicabilidad inmediata en humanos, sin embargo, su uso es ampliamente aceptado como una herramienta válida para la aproximación y el estudio de múltiples condiciones fisiopatológicas. La etiología del deterioro cognitivo en los pacientes críticos es indudablemente multifactorial y hoy en día es objeto de estudio en diferentes ámbitos [8, 15], sin embargo, los conocimientos sobre el *crosstalk* entre el pulmón y el cerebro durante la VM son aún muy limitados [49, 50]. Si bien muchos estudios clínicos han evaluado la eficacia y seguridad de multitud de estrategias de VM en pacientes con SDRA y LPA, son pocos los que han explorado la influencia de los patrones de ventilación en el cerebro, a nivel molecular. Hasta la fecha, los dos estudios que conforman esta tesis son los primeros trabajos publicados sobre activación cerebral en relación a la aplicación de VM. Dado lo novedoso de este campo y las limitaciones del estudio, sólo se puede especular sobre la traslación de estos resultados a los pacientes.

Relevancia clínica

Con estos primeros datos sólo podemos especular sobre los efectos de la activación neuronal observada y su relación con el desarrollo de alteraciones neurocognitivas. Diversas áreas cerebrales evaluadas en los estudios de esta tesis doctoral, están involucradas en procesos de memoria y aprendizaje, precisamente algunas de las capacidades neurocognitivas más afectadas en los supervivientes de UCI. Asimismo, algunas áreas analizadas, intervienen en la integración de señales periféricas o el mantenimiento de la homeóstasis del sistema.

El tálamo, participa en el procesamiento de señales nociceptivas y sensoriales, contribuyendo a la formación de la memoria espacial y a los procesos de adaptación al estrés [91]. También la RS es una estructura relevante en la formación de la memoria y se ha descrito hipoactividad

funcional en esta región, en estadios tempranos de Alzheimer [84, 91]. Tanto el tálamo como la RS están interconectados funcionalmente con el hipocampo, una de las estructuras más importantes en la formación, organización y almacenamiento de la memoria así como en su conexión con las emociones y los sentidos [62, 111, 112]. Existen importantes evidencias científicas acerca de la existencia de alteraciones histopatológicas en el hipocampo en diversas patologías neurocognitivas. Algunos estudios clínicos han descrito una pérdida de volumen y la presencia de lesiones en esta área en pacientes críticos con delirio sometidos a VM [113, 114]. En esta línea, González y col [108] demostraron que la VM era capaz de inducir apoptosis en neuronas del hipocampo y que este efecto podía ser consecuencia de un aumento de la actividad dopaminérgica. En los trabajos aquí presentados, no se ha evaluado la apoptosis a nivel cerebral y no hemos encontrado hallazgos relevantes relativos a la expresión de c-Fos en el hipocampo de los animales ventilados. Sin embargo, la activación neuronal específica observada en tálamo y RS, dos áreas estrechamente conectadas con el hipocampo, podría sugerir la existencia de otras vías de comunicación de las señales derivadas de la VM con el mismo.

Los resultados obtenidos en el primer trabajo podrían ayudar a definir determinadas áreas cerebrales susceptibles de ser activadas por vías relacionadas con la mecanotransducción, en el escenario de una estrategia ventilatoria inadecuada. Estos hallazgos, podrían aportar luz en la comprensión de cómo el cerebro es capaz de detectar las señales provenientes del pulmón, en individuos ventilados.

En el segundo trabajo experimental, se ha demostrado que una PEEP de 7 cmH₂O tras la instilación intratraqueal de LPS, tiene un efecto protector previniendo la respuesta inflamatoria pulmonar, el reclutamiento de neutrófilos y la diseminación de mediadores inflamatorios. Además, el uso de distintos niveles de PEEP, se asoció a una modificación del patrón de activación neuronal en la RS, SON y el tálamo. Estos hallazgos muestran que la VM y el nivel PEEP pueden modificar patrones de activación neuronal en determinadas áreas cerebrales que además están relacionadas con procesos de disfunción de memoria y respuestas a estrés.

En síntesis, los datos obtenidos dan soporte al concepto de la existencia de una interacción pulmón-cerebro durante la VM, subrayando la importancia de la estrategia ventilatoria utilizada. La VM es uno de los factores involucrados en la compleja etiología de las deficiencias neurocognitivas asociadas a la estancia en UCI. La optimización del manejo ventilatorio podría minimizar la deformación y el estiramiento mecánico y la respuesta proinflamatoria derivados, previniendo tanto la patogénesis pulmonar como el desarrollo de futuras alteraciones cognitivas en los pacientes críticos.

6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en los dos estudios experimentales que componen esta tesis doctoral, titulada “Comunicación pulmón-cerebro durante la ventilación mecánica: estudio de la respuesta inflamatoria y la activación neuronal en dos modelos experimentales”, permiten extraer las siguientes conclusiones:

1. La VM *per se* puede producir activación neuronal, en términos de inducción de la síntesis de la proteína c-Fos, en determinadas áreas cerebrales.
2. El uso de un patrón ventilatorio lesivo, basado en la aplicación de volumen corriente elevado sin PEEP, genera una mayor activación neuronal, en términos generales, que la aplicación de un volumen corriente moderado sin PEEP.
3. La aplicación de volumen corriente elevado sin PEEP produce una acentuada respuesta inflamatoria (local y sistémica) posiblemente relacionada con la mecanotransducción derivada del estiramiento y la deformación del tejido pulmonar.
4. La aplicación de una PEEP moderada tras la instilación de LPS previene la inflamación pulmonar, el reclutamiento de neutrófilos y la diseminación sistémica de mediadores inflamatorios. Este efecto beneficioso de la PEEP podría deberse a su papel protector frente al daño pulmonar al evitar ciclos de colapso y reapertura alveolar.
5. El nivel de PEEP tras la instilación de LPS modifica el patrón de activación neuronal en RS, SON y tálamo, áreas relacionadas con procesos de memoria, aprendizaje y respuesta a estrés.
6. Nuestros hallazgos sobre la activación cerebral durante la VM podrían definir algunas áreas cerebrales susceptibles de ser activadas por mecanismos relacionados con la mecanotransducción o la respuesta inflamatoria. Estos datos, podrían ayudar a comprender cómo el cerebro es capaz de detectar las señales provenientes del pulmón, en individuos ventilados.

7. En conjunto, los resultados obtenidos refuerzan el concepto de una comunicación pulmón-cerebro durante la VM. La optimización de la estrategia ventilatoria puede tener implicaciones, no sólo a nivel pulmonar, sino también a nivel sistémico y cerebral.
8. Dado que las deficiencias neurocognitivas en los supervivientes de UCI son de etiología multifactorial, es primordial esclarecer la contribución de cada uno de los factores que intervienen en el desarrollo de las mismas, incluidos los relacionados con la VM. Sólo a partir del conocimiento de los mecanismos subyacentes a estas alteraciones, se podrán diseñar estrategias terapéuticas capaces de prevenir su aparición.

7. ANEXO I

COMPENDIO DE PUBLICACIONES

RESEARCH

Open Access

Injurious mechanical ventilation affects neuronal activation in ventilated rats

María Elisa Quilez^{1,2}, Gemma Fuster^{1,2}, Jesús Villar^{1,3}, Carlos Flores^{1,4}, Octavi Martí-Sistac^{1,2,5}, Lluís Blanch^{1,2} and Josefina López-Aguilar^{1,2*}

Abstract

Introduction: Survivors of critical illness often have significant long-term brain dysfunction, and routine clinical procedures like mechanical ventilation (MV) may affect long-term brain outcome. We aimed to investigate the effect of the increase of tidal volume (Vt) on brain activation in a rat model.

Methods: Male Sprague Dawley rats were randomized to three groups: 1) Basal: anesthetized unventilated animals, 2) low Vt (LVt): MV for three hours with Vt 8 ml/kg and zero positive end-expiratory pressure (ZEEP), and 3) high Vt (HVt) MV for three hours with Vt 30 ml/kg and ZEEP. We measured lung mechanics, mean arterial pressure (MAP), arterial blood gases, and plasma and lung levels of cytokines. We used immunohistochemistry to examine c-fos as a marker of neuronal activation. An additional group of spontaneously breathing rats was added to discriminate the effect of surgical procedure and anesthesia in the brain.

Results: After three hours on LVt, PaO₂ decreased and PaCO₂ increased significantly. MAP and compliance remained stable in MV groups. Systemic and pulmonary inflammation was higher in MV rats than in unventilated rats. Plasma TNF α was significantly higher in HVt than in LVt. Immunopositive cells to c-fos in the retrosplenial cortex and thalamus increased significantly in HVt rats but not in LVt or unventilated rats.

Conclusions: MV promoted brain activation. The intensity of the response was higher in HVt animals, suggesting an iatrogenic effect of MV on the brain. These findings suggest that this novel cross-talking mechanism between the lung and the brain should be explored in patients undergoing MV.

Introduction

Acute lung injury (ALI) and the acute respiratory distress syndrome (ARDS) are associated with high morbidity and mortality [1], and ARDS survivors present significant long-term cognitive impairment [2]. These consequences may result from complex interactions between different clinical protocols and endogenous factors occurring simultaneously in critically ill patients [3]. In this context, mechanical ventilation (MV) is a lifesaving procedure but not without complications. Even in healthy lungs, MV may contribute to a positive feedback loop that starts with mechanotransduction (in lungs) at the epithelial and endothelial levels leading to a deleterious inflammatory cascade that might affect distant organs and systems [4-6]. Moreover, critical care

patients who undergo long-term MV show distinctive neurological impairment, including memory and cognitive decline [7].

Many studies have examined the mechanisms involved in the neuroimmune crosstalk; most focus on the central nervous system (CNS) response to systemic inflammation. However, the mechanisms through which damage to remote organs can reach the brain are poorly understood [8,9], including early neurological effects related to MV and the importance of settings used.

The immediate early gene (IEG) c-fos has been used as a marker of neuronal activity, and correlates with an increase in electrical and metabolic activity in brain cells by pathological situations, also involved in phenomena of neuronal plasticity, amongst others. C-fos is expressed in response to a wide range of stimuli and is implicated in processes such as transcription of genes, apoptosis or proliferation [10]. In order to make a first approximation to the crosstalk between brain-lung

* Correspondence: jlopeza@tauli.cat

¹CIBER de Enfermedades Respiratorias, Instituto de Salud Carlos III. C/ Sinesio Delgado 6, Madrid, 28029, Spain

Full list of author information is available at the end of the article

during MV, we have used this rapidly induced IEG, according to the time course of the study (three hours) as a tool to elucidate early neurological changes that might be associated with lung injury.

The main objective of the present study was to investigate the effect of the increase in tidal volume on activation in some areas of the brain in a rat model of MV, using c-fos. Therefore, we compared rats ventilated with two different injurious ventilatory strategies, a high Vt group vs. a low Vt group and vs. spontaneously breathing or basal rats.

Materials and methods

Animal preparation

This study was approved by the Animal Ethics Committee at the Corporació Sanitaria Parc Taulí, Barcelona, Spain. We studied 24 adult male Sprague-Dawley rats weighing 350 to 370 grams housed in standard conditions with food and water *ad libitum*. Animals were anesthetized with intraperitoneal ketamine (75 mg/kg) and xylazine (10 ml/kg), tracheotomized, and paralyzed with intravenous succinylcholine (2 ml/kg). An endotracheal tube (2 mm inner diameter) was inserted and tightly tied to avoid air leaks, and rats were ventilated using a Servo 300 ventilator (Siemens, Solna, Sweden). Vt was set and measured using the ventilator's pneumotachograph. Airway pressure was monitored via a side port in the tracheal tube using a pressure transducer (Valyline MP45, Valyline Engineering, Northridge, CA, USA). The left carotid artery was cannulated and connected to a pressure transducer (Transpac Monitoring Kit; Abbot, Sligo, Ireland) to monitor mean arterial pressure (MAP). The right jugular vein was cannulated for fluid infusion. Blood and airway pressures were routed to an amplifier (Presograph, Gould Godart, Netherlands), converted to digital (Urelab, Barcelona, Spain), and recorded in a personal computer (Anadat-Labdat Software, RTH InfoDat, Montreal, QC, Canada). Then, animals were randomly assigned to one of three experimental groups ($n = 8$ in each group): (i) Basal group (BAS), unventilated animals, were immediately exanguinated after induction of the anesthesia (ii) Low Vt group (LVt), ventilated with 8 ml/kg and a positive end-expiratory pressure (PEEP) of 0 cmH₂O (ZEEP) for three hours, and (iii) High Vt group (HVt), ventilated with 30 ml/kg and ZEEP for three hours. To maintain normocapnia without decreasing respiratory rate, instrumental dead space was increased in the HVt group. An additional group of spontaneously breathing rats (Spont) was added to discriminate the effect of the surgical procedure and anesthesia on brain activation. The spontaneously breathing animals were anaesthetized and the same surgical procedure as ventilated groups (cannulation and tracheostomy) was performed. No mechanical

ventilation was applied in this group. Identical patterns of fluid infusion and anaesthesia were applied in the three groups maintained in protocol during three hours (spont, LVt, HVt).

Experimental protocol

At baseline, animals in the MV groups underwent volume-controlled ventilation with 8 ml/kg Vt and 2 cmH₂O PEEP. Inspired oxygen fraction (FiO₂) was kept at 0.4 throughout the experiment, and the respiratory rate was adjusted for normocapnia. We measured values of MAP, arterial blood gases, and respiratory system parameters 15 minutes after initiating MV (baseline) and hourly thereafter after randomization. Inspiratory and expiratory pauses were applied to calculate static lung compliance (Crs). Fluid management was identical in all groups (Ringer-lactate, 10 mL/kg/h) to prevent differences that might favour edema formation and vasoactive drugs were not used in any group. At the end of the three-hour period, rats were euthanized by exsanguination. We centrifuged 7 ml of blood from each animal and stored the plasma at -80°C for protein determinations. Hearts and lungs were removed *en bloc*, and the right lung was frozen for additional tissue analyses of proteins. Rats' brains were removed from the cranium by careful dissection and immediately frozen and stored at -80°C.

Histological analysis

Left lungs were fixed by instillation of 4% buffered formaldehyde into the airway at a pressure of 5 cmH₂O and immersed in the same fixative. Two investigators blinded to experimental groups calculated histological scores after hematoxylin-eosin (HE) staining as described elsewhere [11] and assessed intra-alveolar neutrophil infiltration by counting the number of neutrophils in fifty fields per animal at a magnification of X400 using ImageJ v1.40g (Wayne Rasband, NIH, USA).

Lung damage was determined using a Lung Injury Score (LIS), based on the evaluation of alveolar edema, hemorrhage, neutrophil infiltration and alveolar septal thickening in each animal. Each parameter was scored from 0 to 4. Subsequently, the total LIS was calculated by adding the individual score for each parameter, up to a maximum score of 16 [12].

Plasma and lung protein immunoassays

Commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (Biosource, Camarillo, CA, USA) were used to determine the following plasma/lung protein levels: tumor necrosis factor-alpha (TNF)- α , macrophage inflammatory protein (MIP-2), interleukin (IL)-6, IL-1 β , monocyte chemoattractant protein (MCP-1), and IL-10. Analyses of all samples, standards, and controls

were run in duplicate following the manufacturer's recommendations.

Brain immunohistochemistry

The brain areas of interest were cut into 20- μ m coronal sections (CM1900, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) and stored at -80°C. Sections were processed for single immunohistochemistry using a rabbit polyclonal antibody against *c-fos* (*c-fos* (4), Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) diluted 1:250. The immunoreaction was visualized with diaminobenzidine and H₂O₂ [13]. Additional sections were stained with cresyl violet to identify the regions of interest: thalamus, retrosplenial cortex (RS), central amygdala (CeA), hippocampus, paraventricular hypothalamic nuclei (PVN), and supraoptic nucleus (SON). After immunostaining, specific activated areas were identified by light microscopy (DM250, Leica, Wetzlar, Germany) with the aid of a stereotaxic atlas [14]. Brain sections were digitized and *c-fos*-positive cells were evaluated according to the intensity of staining and then semiquantified using Image J software (ImageJ 1.40g, W. Rasband, NIH, USA). An optimal threshold was set for all sections to minimize background signals.

Statistical analysis

We used power analysis for ANOVA designs to estimate the sample size assuming an α error of 0.05 and β error of 0.2 (Granmo 5.2 software, Barcelona, Spain). All values are expressed as mean \pm SEM. U-Mann-Whitney non-parametric tests were used to analyze differences between groups, under the supervision of an expert statistician (SPSS 17.0 software, Chicago, IL, USA). Significance was set at $P < 0.05$.

Results

Animal body weights were similar in all groups. At baseline, no differences in hemodynamics or gas exchange were observed between MV groups. Basal rats were exsanguinated at time zero and were used as the baseline group in comparisons between groups. No animals died during the experimental period.

Physiological variables

MAP remained stable within the normal range throughout the three-hour period in all groups (Figure 1). Respiratory system compliance (Crs) and plateau pressure (P_{plateau}) increased with HVt MV, but both remained unchanged throughout the experimental period (Figure 1). Respiratory rates were not significantly different between LVt and HVt animals (mean 47.3 vs 47, respectively; $P = 0.7$). Significant decreases in PaO₂/FiO₂ and pH and concurrent increases in PaCO₂ were found in LVt animals after three hours of MV (Figure

1). pH in animals spontaneously breathing was slightly higher than in those receiving MV, and remained stable during the experiment.

Histology

Figure 2 shows representative images of lungs in each experimental group. Lung neutrophilic infiltration and LIS were significantly higher in MV rats than in unventilated rats, but no differences between LVt and HVt were found.

c-Fos immunopositive brain areas

Neuronal activation evidenced by an increased number of *c-fos* immunopositive cells was observed in the RS (Figure 3) and thalamus (Figure 4) of HVt rats, but not in LVt or basal rats. *c-fos* expression was also observed in the CeA (Figure 5), PVN (Figure 6), and SON (data not shown) of MV rats, although activation did not differ between HVt and LVt animals. Similarly, no differences in *c-fos* activation in other cortical areas or in the hippocampus were observed between the experimental groups (data not shown).

Animals breathing spontaneously showed similar levels of activation in CeA and PVN than those observed in the basal group (Figures 5 and 6). Conversely, the *c-fos* signal in RS and Thalamus was higher than those found in BAS and LVt groups (Figures 3 and 4).

Inflammatory mediators: plasma and lung protein levels

Figure 7 shows plasma and lung levels of pro- and anti-inflammatory mediators. MV increased plasma levels of IL-6, IL-10, IL-1 β , MCP-1, and MIP-2, irrespective of the Vt level (LVt or HVt) ($P < 0.05$). However, plasma TNF α levels increased significantly after three hours of HVt ventilation ($P = 0.005$) but remained unaltered in the LVt group.

In the lungs, irrespective of the Vt level, MV increased IL-6, IL-10, IL-1 β , and MIP-2 levels (Figure 7). Lung TNF α levels were similar in MV and unventilated animals. We also observed a trend to higher MCP-1 in HVt compared to LVt (Figure 7). Taken all together, the inflammatory response was higher (but also more variable) in the HVt group than in the LVt group.

Discussion

We found that MV induced *c-fos* expression in discrete areas of the brain in healthy and non-hypoxemic rats. Moreover, HVt ventilation caused more *c-fos* expression when compared to LVt ventilation, thus supporting the hypothesis that an iatrogenous effect of MV may affect the brain. These results provide novel and important data that might have clinical relevance during the management of critically ill patients.

The immediate early gene *c-fos* [15] is rapidly induced and can be detected by immunohistochemistry; therefore it is

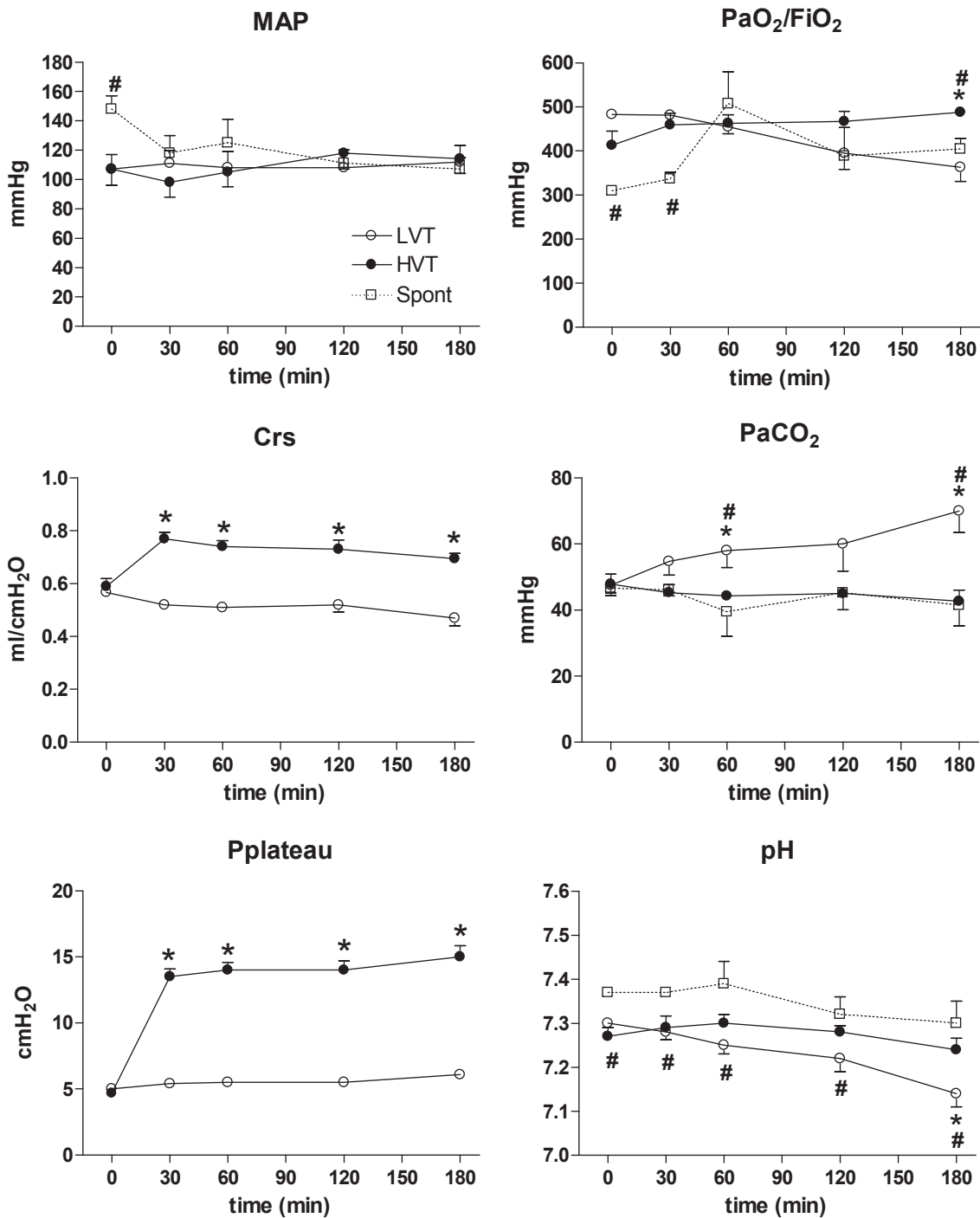
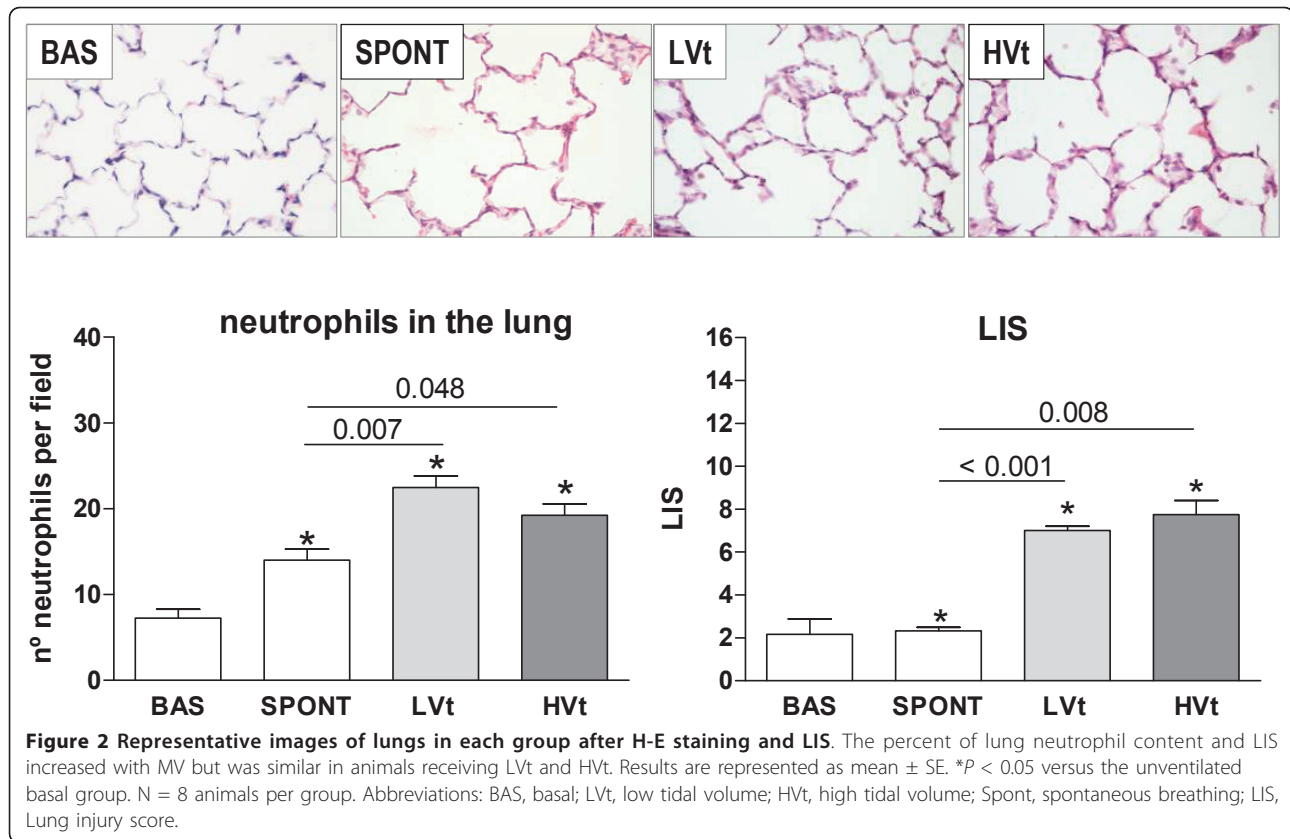


Figure 1 Hemodynamic and respiratory characteristics of rats during the three-hour period. No differences between groups were observed at baseline. MAP remained stable in both groups. Pplateau and Crs increased significantly during HVT ventilation but remained stable during the three-hour period. There were no differences between LVT and HVT in Pa/FiO₂. pH in animals spontaneously breathing was slightly higher than in animals receiving MV. PCO₂ increased only in LVT animals. Data are presented as mean ± SE. *: *P* < 0.05 versus the HVT group, and #: *P* < 0.05 vs Spont group. N = 8 animals per group. Abbreviations: MAP, mean arterial pressure; BAS, basal; LVT, low tidal volume; HVT, high tidal volume; Spont, spontaneous breathing; Pplateau, plateau pressure; Crs, static compliance of the respiratory system.



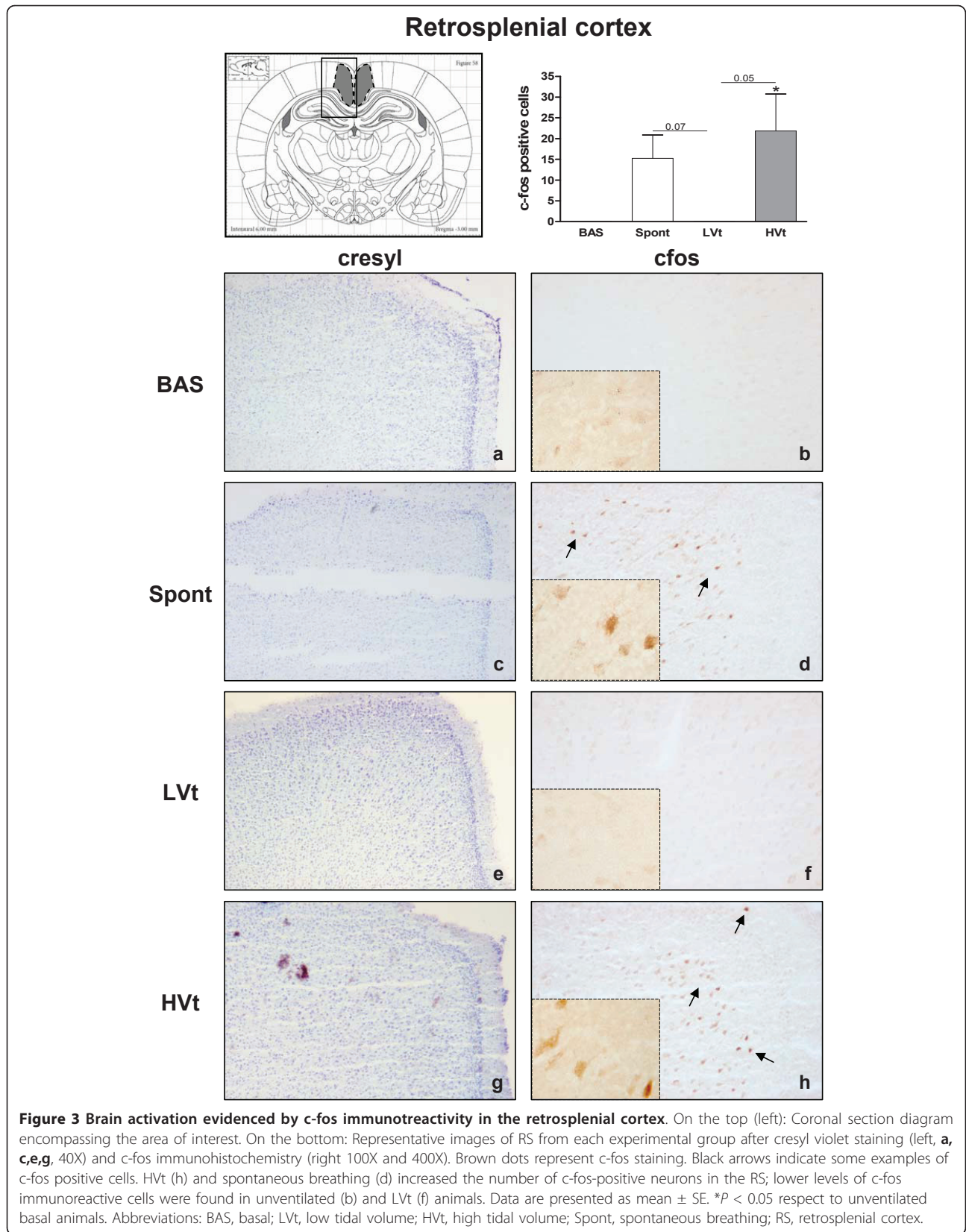
a valuable tool for determining which brain areas are stimulated [16,17]. The basal expression of c-fos is low, but can be dramatically induced by a variety of stimuli and conditions such as metabolic stress, ischemia, and inflammation, among others [18,19]. Various mechanisms are probably involved in the response to MV. Lungs can “sense” mechanical stimuli by lung mechanoreceptors that can communicate to the brain. The autonomic nervous system is also involved in this cross-talk [20-22].

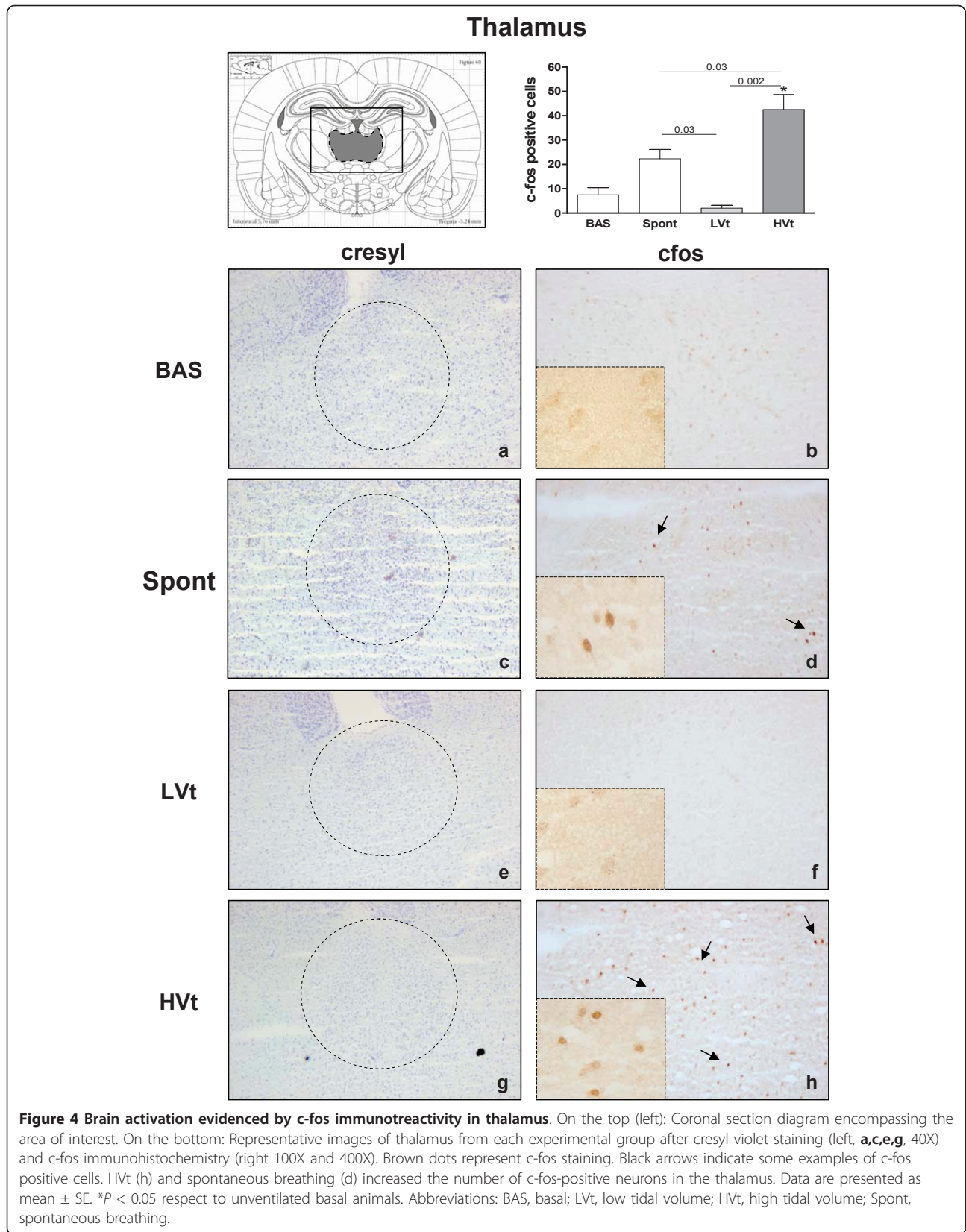
The ventilatory strategy may also affect the CNS by altering the inflammatory response at the lung level. In the present study, as reported elsewhere, we have used two different injurious MV strategies that triggered proinflammatory responses even in subjects receiving LVt [4,5,23]. The proinflammatory response to HVt was found mainly at the systemic level and was mediated by TNF α [6,23,24]. Only minimal differences in other cytokines, lung function parameters or LIS were found between MV groups. The release of inflammatory mediators [23,24] or certain metabolites to the bloodstream can be sensed by the brain, altering the permeability of the blood brain barrier [22,25] or modifying cerebral blood flow. No data are available about the contribution of these two mechanisms in the activation observed in the brain areas studied in our model.

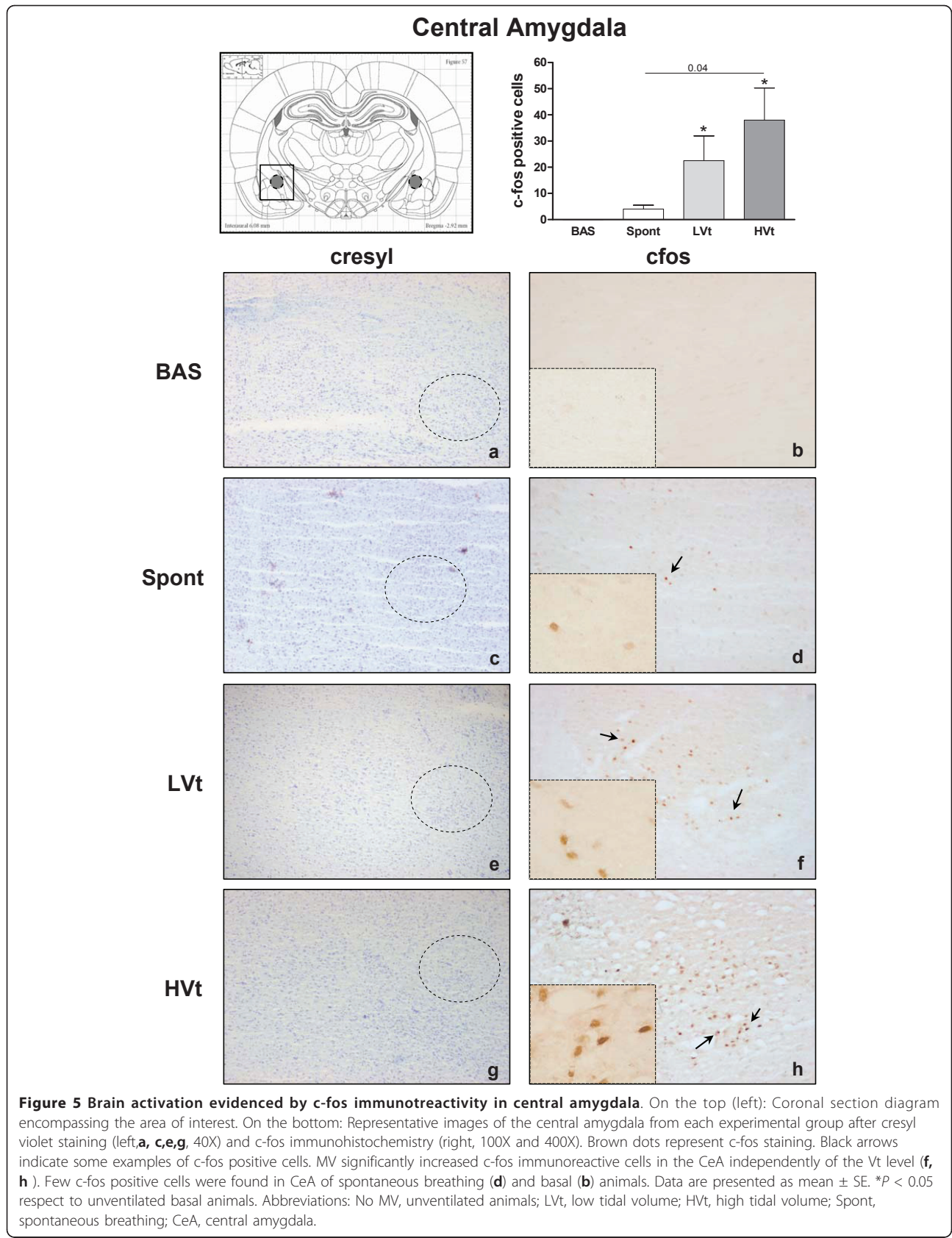
We focused our study on brain areas involved in body homeostasis [26] and related to the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) axis, a major part of the neuroendocrine system that controls reactions to stress and regulates many body processes. In our study, the CeA, SON, and PVN were c-fos immunopositive after three hours of injurious MV but not in BAS or spontaneously breathing animals [25,27].

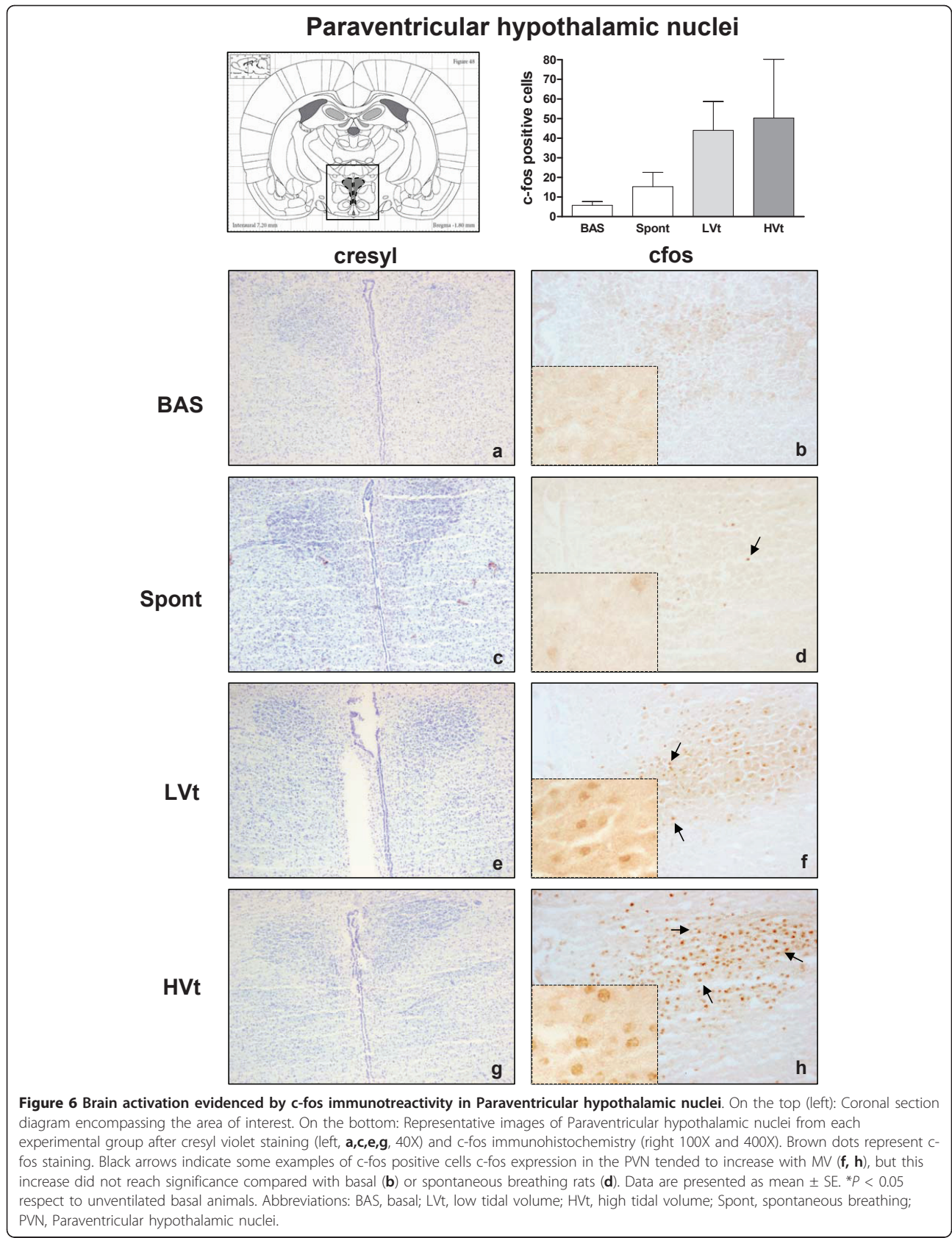
HVt consistently increased c-fos in the RS and thalamus, neither of which were activated in LVt or BAS animals. Interestingly, these two areas have also been activated in the spontaneously breathing animals. These results do not allow us to discriminate the role played by anesthesia and surgical procedures, since activation is minimal in LVT animals, which have been also submitted to the same experimental protocol. All these data suggest that the mechanisms inducing cell activation in these brain areas are different in HVT and spontaneously breathing animals. Moreover, in the literature, RS and thalamus have been linked to neurological disorders after stress [28,29], fatigue-loading in rats [30,31]; emotional or psychological stress might also induce neuronal activation in cortical and limbic regions [16,32].

In the present study we cannot determine whether the regional brain activation observed in LVt group was caused by moderate hypercapnia. This impaired gas









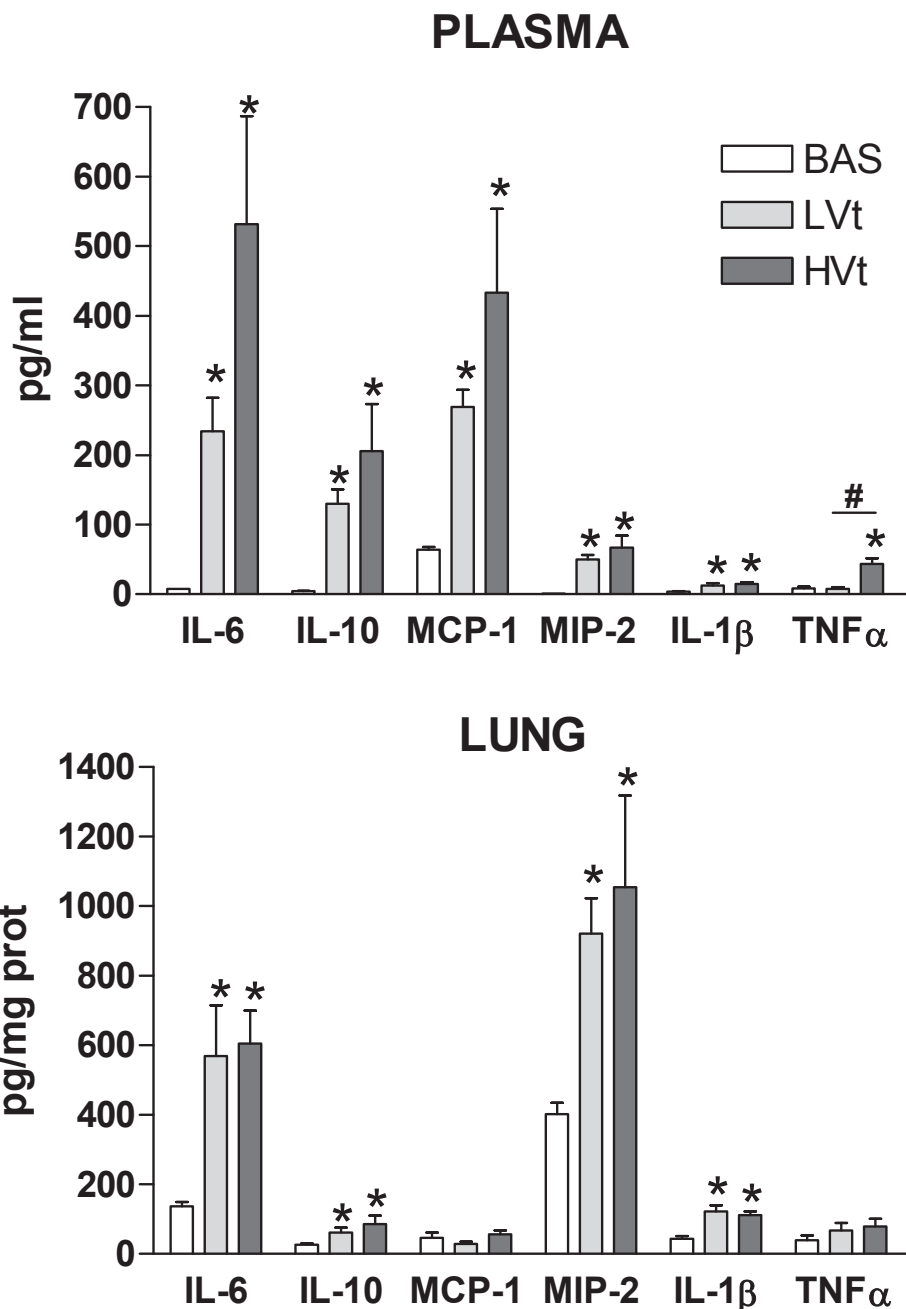


Figure 7 Plasma and lung levels of proteins involved in the inflammatory cascade. Mechanical ventilation triggered lung and systemic inflammatory responses. Compared to LVt, HVt promoted an increase in inflammatory markers mainly mediated by TNF α at the plasma level. Data are presented as mean \pm SE. * $P < 0.05$ respect to unventilated basal animals, # $P < 0.05$ vs LVt. $n = 8$ animals per group. Abbreviations: BAS, basal; LVt, low tidal volume; HVt, high tidal volume; Spont, spontaneous breathing; IL, interleukin, TNF, tumor necrosis factor; MCP, monocyte chemotactic protein; MIP, macrophage-inflammatory protein.

exchange in the LVt group is compatible with progressive alveolar de-recruitment in the absence of PEEP. The higher level of brain activation observed in the HVt group occurred in the context of normocapnia, thus suggesting that mechanically-induced stress in the lung could promote c-fos activation in certain brain areas

through other mechanisms, which deserves being explored in further investigations.

We found no differences between groups in the activation of the hippocampus (data not shown), which plays a role in the negative inhibition of the HPA stress axis through the abundant expression of glucocorticoid

receptors [33] and is considered a potential target for sepsis treatment [8,34].

Our results were obtained in the context of preserved lung function and hemodynamic stability. The magnitude of the response to HVt observed by different authors varies [23,24,35-37], and some authors have reported detrimental effects of HVt on MAP [38]. However, we found that adequate fluid management ensured MAP stability throughout the experimental procedure (three hours), corroborating our previous findings [11,23]. Therefore, the differences in the results could not be attributed to differential organ perfusion.

Limitations of the study

Animal models of complex diseases are potentially limited by interspecies differences and have no immediate applicability to humans; nevertheless, animal models are accepted as a valid strategy for the initial approach to multifactorial conditions. In this sense the HVt level applied in this work is not clinically relevant, but has been used to simulate those areas exposed to locally high pressures in injured lungs. Nevertheless, HVt application in our model of healthy lungs resulted only in a moderated increase in Pplat, compared with other more aggressive models in the literature [39,40]. Whereas this approach did preclude functional lung alterations, the short duration of MV also limited the analysis of brain alterations to early events like neuronal activation detected by *c-fos* immunostaining. Furthermore, our study design does not allow us to conclude whether inflammation and *c-fos* increased expression are mechanistically linked, let alone the nature of this possible link. In fact, as mentioned, hypercapnia would contribute to brain activation by a different mechanism. Moreover, the tight control of anesthesia and neuromuscular paralysis used in MV groups precluded any differences in this regard. Spontaneously breathing animals served to explore the effect of instrumentation and anesthesia, as they were not paralyzed.

Clinical relevance

Due to the novelty of this issue (brain activation and MV) and the limitations of the study, we can only speculate about the translation of these results to the clinical setting. The etiology of cognitive impairment in critically ill patients is undoubtedly multifactorial and is the subject of ongoing discussion [2,3]. Nevertheless, crosstalk between the lung and brain is poorly understood [22], and although many randomized controlled clinical trials have evaluated the efficacy and safety of various methods of MV in ARDS and ALI patients, few studies have explored the influence of MV patterns at the neuronal level. Our findings about regional brain activation during MV could help define particular areas susceptible

to be activated by mechanoreceptors in the lung. Those areas might play a crucial role in regulating early events occurring during the application of non-adequate MV patterns. Our findings might have implications for understanding how the brain senses incoming signals or insults from the lungs in anesthetized and paralyzed subjects.

Conclusions

Our data further support the concept of brain-lung interaction during MV and indicate the importance of the ventilatory settings used. These findings may, therefore, have clinical relevance and emphasize the importance of further research in this field.

Key messages

- Injurious mechanical ventilation might be associated with neuronal activation in discrete areas of the brain
 - A high tidal volume might play a synergistic role on *c-fos* expression in some areas of the brain.
 - The release of inflammatory mediators to the bloodstream could be involved in the lung-to-brain interaction during mechanical ventilation.
 - Lung-brain cross-talking is an emerging area of research in critically ill patients receiving mechanical ventilation.

Abbreviations

ALI: Acute Lung Injury; ARDS: Acute Respiratory Distress Syndrome; BAS: Basal; CeA: Central amygdale; CNS: Central Nervous System; Crs: Compliance of the respiratory system; ELISA: Enzyme-Linked Immunoabsorbent assay; FiO_2 : Inspired oxygen fraction; HE: Hematoxylin-Eosin; HPA axis: Hypothalamic-pituitary-adrenal axis; HVt: High Tidal volume; IEG: immediate early gene; IL: Interleukin; LIS: Lung injury score; LVt: Low Tidal volume; MAP: Mean arterial pressure; MCP-1: Monocyte chemoattractant protein-1; MIP-2: Macrophage inflammatory protein 2; MV: Mechanical ventilation; NTS: Tractus solitarius nucleus; PEEP: End expiratory pressure; Pplateau: Plateau pressure; PVN: Paraventricular nucleus; RS: retrosplenial cortex; SON: Supraoptic nucleus; Spont: Spontaneous breathing; TNF: Tumor necrosis factor; Vt: tidal volume; ZEEP: Zero end expiratory pressure.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Isidre Ferrer for valuable discussions regarding the paper. We thank Neus Gómez, Laila Sakouni and Jessica Tijero for technical assistance.

The study was supported by grants from the Ministry of Science and Education of Spain (BFU2006-07124/BFI) and Fundació Parc Taulí. JLA is supported by Fondo de Investigaciones Sanitarias (Program I3 de Estabilización) and Health Department of the Generalitat de Catalunya. CF is supported by a specific agreement between Instituto de Salud Carlos III and FUNCIS (EMER07/001) under the ENCYT 2015 framework.

Author details

¹CIBER de Enfermedades Respiratorias, Instituto de Salud Carlos III. C/ Sinesio Delgado 6, Madrid, 28029, Spain. ²Critical Care Center, Corporació Sanitaria Parc Taulí, Institut Universitari, Esfera UAB. Parc Taulí sn. Sabadell, 08208, Spain. ³Research Unit, Hospital Universitario Dr.Negrín. Barranco de la Ballena s/n. Las Palmas de Gran Canaria, 35010, Spain. ⁴Research Unit, Hospital Universitario N.S. de Candelaria. Carretera del Rosario 145, Santa Cruz de Tenerife, 38010, Spain. ⁵Universitat Autònoma de Barcelona. Campus de la UAB, Bellaterra, 08193, Spain.

Authors' contributions

MEQ, OMS, JLA and LLB were responsible for the original design. MEQ, GF and JLA were responsible of experimental procedure and analysis. JLA and OMS were responsible for data management. MEQ carried out the statistical analysis and wrote the initial draft supervised by JLA and LLB. JV, CF and OMS critically revised the manuscript. All authors contributed and approved the final version of the manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 17 December 2010 Revised: 14 April 2011

Accepted: 13 May 2011 Published: 13 May 2011

References

1. Rubenfeld GD, Caldwell E, Peabody E, Weaver J, Martin DP, Neff M, Stern EJ, Hudson LD: **Incidence and outcomes of acute lung injury.** *N Engl J Med* 2005, **353**:1685-1693.
2. Hopkins RO, Jackson JC: **Long-term neurocognitive function after critical illness.** *Chest* 2006, **130**:869-878.
3. Jackson JC, Girard TD, Gordon SM, Thompson JL, Shintani AK, Thomason JW, Pun BT, Canonico AE, Dunn JG, Bernard GR, Dittus RS, Ely EW: **Long-term cognitive and psychological outcomes in the Awakening and Breathing Controlled trial.** *Am J Respir Crit Care Med* 2010, **182**:183-191.
4. 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**:R1.
5. Vaneker M, Joosten LA, Heunks LM, Snijdelaar DG, Halbertsma FJ, van Egmond J, Netea MG, van der Hoeven JG, Scheffer GJ: **Low-tidal-volume mechanical ventilation induces a toll-like receptor 4-dependent inflammatory response in healthy mice.** *Anesthesiology* 2008, **109**:465-472.
6. 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, **282**:54-61.
7. Pustavoitau A, Stevens RD: **Mechanisms of neurologic failure in critical illness.** *Crit Care Clin* 2008, **24**:1-24.
8. Akrot N, Sharshar T, Annane D: **Mechanisms of brain signaling during sepsis.** *Curr Neuropharmacol* 2009, **7**:296-301.
9. Quan N: **Brain's firewall: blood-brain barrier actively regulates neuroimmune information flow.** *Brain Behav Immun* 2006, **20**:447-448.
10. Sanz O, Estrada A, Ferrer I, Planas AM: **Differential cellular distribution and dynamics of HSP70, cyclooxygenase-2, and c-Fos in the rat brain after transient focal ischemia or kainic acid.** *Neuroscience* 1997, **80**:221-232.
11. López-Aguilar J, Villagrà A, Bernabé F, Murias G, Piacentini E, Real J, Fernández-Segoviano P, Romero PV, Hotchkiss JR, Blanch L: **Massive brain injury enhances lung damage in an isolated lung model of ventilator-induced lung injury.** *Crit Care Med* 2005, **33**:1077-1083.
12. Murakami K, Bjertnaes LJ, Schmalstieg FC, McGuire R, Cox RA, Hawkins HK, Herndon DN, Traber LD, Traber DL: **A novel animal model of sepsis after acute lung injury in sheep.** *Crit Care Med* 2002, **30**:2083-2090.
13. Morgan JL, Curran T: **Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun.** *Annu Rev Neurosci* 1991, **14**:421-451.
14. Paxinos G, Watson C: *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 6 edition. Academic Press: San Diego, California, USA; 2007.
15. Akazawa KH, Cui Y, Tanaka M, Kataoka Y, Yoneda Y, Watanabe Y: **Mapping of regional brain activation in response to fatigue-load and recovery in rats with c-Fos immunohistochemistry.** *Neurosci Res* 2010, **66**:372-379.
16. Jankord R, Herman JP: **Limbic regulation of hypothalamo-pituitary-adrenocortical function during acute and chronic stress.** *Ann N Y Acad Sci* 2008, **1148**:64-73.
17. Zhang J, Zhang D, McQuade JS, Behbehani M, Tsien JZ, Xu M: **c-fos regulates neuronal excitability and survival.** *Nat Genet* 2002, **30**:416-420.
18. Chaudhuri A, Zangenehpour S, Rahbar-Dehghan F, Ye F: **Molecular maps of neural activity and quiescence.** *Acta Neurobiol Exp* 2000, **60**:403-410.
19. Tracey KJ: **The inflammatory reflex.** *Nature* 2002, **420**:853-859.
20. Dos Santos CC, Shan Y, Akram A, Slutsky AS, Haitsma JJ: **Neuroimmune regulation of ventilator-induced lung injury.** *Am J Respir Crit Care Med* 2010, **183**:471-482.
21. Kubin L, Alheid GF, Zuperku EJ, McCrimmon DR: **Central pathways of pulmonary and lower airway vagal afferents.** *J Appl Physiol* 2006, **101**:618-627.
22. Gonzalvo R, Martí-Sistac O, Blanch L, López-Aguilar J: **Bench-to bedside review: brain-lung interaction in the critically ill—a pending issue revisited.** *Crit Care* 2007, **11**:216.
23. López-Aguilar J, Quilez ME, Martí-Sistac O, García-Martín C, Fuster G, Puig F, Flores C, Villar J, Artigas A, Blanch L: **Early physiological and biological features in three animal models of induced acute lung injury.** *Intensive Care Med* 2010, **36**:347-355.
24. Imai Y, Parodo J, Kajikawa O, de Perrot M, Fischer S, Edwards V, Cutz E, Liu M, Keshavjee S, Martin TR, Marshall JC, Ranieri VM, Slutsky AS: **Injurious mechanical ventilation and end-organ epithelial cell apoptosis and organ dysfunction in an experimental model of acute respiratory distress syndrome.** *JAMA* 2003, **289**:2104-2112.
25. Niimi M, Wada Y, Sato M, Takahara J, Kawanishi I: **Effect of continuous intravenous injection of interleukin-6 and pretreatment with cyclooxygenase inhibitor on brain c-fos expression in the rat.** *Neuroendocrinol* 1997, **66**:47-53.
26. Johnson AK, Gross PM: **Sensory circumventricular organs and brain homeostatic pathways.** *FASEB J* 1993, **7**:678-686.
27. Turrin NP, Gayle D, Ilyin SE, Flynn MC, Langhans W, Schwartz GJ, Plata-Salamán CR: **Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine mRNA induction in the periphery and brain following intraperitoneal administration of bacterial lipopolysaccharide.** *Brain Res Bull* 2001, **54**:443-453.
28. Senba E, Ueyama T: **Stress-induced expression of immediate early genes in the brain and peripheral organs of the rat.** *Neurosci Res* 1997, **29**:183-207.
29. Senba E, Matsunaga K, Tohyama M, Noguchi K: **Stress-induced c-fos expression in the rat brain: activation mechanism of sympathetic pathway.** *Brain Res Bull* 1993, **31**:329-44.
30. Pothuizen HH, Davies M, Aggleton JP, Vann SD: **Effects of selective granular retrosplenial cortex lesions on spatial working memory in rats.** *Behav Brain Res* 2010, **208**:566-575.
31. Dumont JR, Petrides M, Sziklas V: **Fornix and retrosplenial contribution to a hippocampo-thalamic circuit underlying conditional learning.** *Behav Brain Res* 2010, **209**:13-20.
32. Herman JP, Cullinan WE: **Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis.** *Trends Neurosci* 1997, **20**:78-84.
33. Jacobson L, Sapolsky R: **The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis.** *Endocr Rev* 1991, **12**:118-134.
34. Annane D: **Hippocampus: a future target for sepsis treatment.** *Intensive Care Med* 2009, **35**:585-586.
35. Ricard JD, Dreyfuss D, Saumon G: **Ventilator-induced lung injury.** *Eur Respir J* 2003, **42**:2-9.
36. Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR: **Animal models of acute lung injury.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008, **295**:379-399.
37. Dos Santos CC, Slutsky AS: **Mechanisms of ventilator-induced lung injury: A perspective.** *J Appl Physiol* 2000, **89**:1645-1655.
38. Martínez-Caró L, Lorente JA, Marín-Corral J, Sánchez-Rodríguez C, Sánchez-Ferrer A, Nin N, Ferruelo A, de Paula M, Fernández-Segoviano P, Barreiro E, Esteban A: **Role of free radicals in vascular dysfunction induced by high tidal volume ventilation.** *Intensive Care Med* 2009, **35**:1110-1119.
39. Brégeon F, Steinberg JG, Andreotti N, Sabatier JM, Delpierre S, Ravaille S, Jammes Y: **Substance P receptor blockade decreases stretch-induced lung cytokines and lung injury in rats.** *J Physiol* 2010, **588**:1309-1319.
40. Pinheiro de Oliveira R, Hetzel MP, dos Anjos Silva M, Dallegre D, Friedman G: **Mechanical ventilation with high tidal volume induces inflammation in patients without lung disease.** *Crit Care* 2010, **14**:R39.

doi:10.1186/cc10230

Cite this article as: Quilez et al.: Injurious mechanical ventilation affects neuronal activation in ventilated rats. *Critical Care* 2011 **15**:R124.

ERRATUM

Open Access



Erratum to: Injurious mechanical ventilation affects neuronal activation in ventilated rats

María Elisa Quilez^{1,2,5}, Gemma Fuster^{1,2}, Jesús Villar^{1,3}, Carlos Flores^{1,4}, Octavi Martí-Sistac^{1,2,5}, Lluís Blanch^{1,2} and Josefina López-Aguilar^{1,2*}

Unfortunately, the original version of this article [1] contained an error. Affiliation no. 5 had been omitted to be included for the first author, María Elisa Quilez. This has now been corrected. The full list of affiliations for the first author are:

María Elisa Quilez^{1,2,5}

¹ CIBER de Enfermedades Respiratorias, Instituto de Salud Carlos III. C/ Sinesio Delgado 6, Madrid, 28029, Spain

² Critical Care Center, Corporació Sanitaria Parc Taulí, Institut Universitari, Esfera UAB. Parc Taulí sn. Sabadell, 08208, Spain

⁵ Universitat Autònoma de Barcelona. Campus de la UAB, Bellaterra, 08193, Spain

Author details

¹CIBER de Enfermedades Respiratorias, Instituto de Salud Carlos III, C/ Sinesio Delgado 6, Madrid 28029, Spain. ²Critical Care Center, Corporació Sanitaria Parc Taulí, Institut Universitari, Esfera UAB. Parc Taulí sn, Sabadell 08208, Spain. ³Research Unit, Hospital Universitario Dr.Negrín, Barranco de la Ballena s/n, Las Palmas de Gran Canaria 35010, Spain. ⁴Research Unit, Hospital Universitario N.S. de Candelaria, Carretera del Rosario 145, Santa Cruz de Tenerife 38010, Spain. ⁵Universitat Autònoma de Barcelona, Campus de la UAB, Bellaterra 08193, Spain.

Received: 17 September 2015 Accepted: 23 September 2015

Published online: 27 October 2015

Reference

1. Quilez ME, Fuster G, Villar J, Flores C, Martí-Sistac O, Blanch L, et al. Injurious mechanical ventilation affects neuronal activation in ventilated rats. *Crit Care*. 2011;15:R124.

* Correspondence: jlopeza@tauli.cat

¹CIBER de Enfermedades Respiratorias, Instituto de Salud Carlos III, C/ Sinesio Delgado 6, Madrid 28029, Spain

²Critical Care Center, Corporació Sanitaria Parc Taulí, Institut Universitari, Esfera UAB. Parc Taulí sn, Sabadell 08208, Spain

Full list of author information is available at the end of the article

MODERATE PEEP AFTER TRACHEAL LIPOPOLYSACCHARIDE INSTILLATION PREVENTS INFLAMMATION AND MODIFIES THE PATTERN OF BRAIN NEURONAL ACTIVATION

María Elisa Quilez,^{*†‡} Raquel Rodríguez-González,^{§||} Marc Turon,^{†‡#}
Sol Fernandez-Gonzalo,^{‡#} Jesús Villar,^{†||} Robert M. Kacmarek,^{**¶}
Ma Nieves Gómez,^{*‡} Joan Carles Oliva,[‡] Lluís Blanch,^{*†‡} and
Josefina López-Aguilar^{*†‡}

**Critical Care Center, Corporació Sanitària Parc Taulí, Institut Universitari Parc Taulí, Universitat Autònoma de Barcelona, Campus d' Excel·lència Internacional, Bellaterra; †CIBER de Enfermedades Respiratorias, Instituto de Salud Carlos III, Madrid; ‡Institut d'Investigació i Innovació Parc Taulí (I3PT), Fundació Parc Taulí, Corporació Sanitària Parc Taulí, Universitat Autònoma de Barcelona, Campus d' Excel·lència Internacional, Bellaterra; §Critical Patient Translational Research Group, Department of Anesthesiology, Intensive Care and Pain Management, Hospital Clínic Universitari, Instituto de Investigación Sanitaria (IDIS), Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela; ||Research Unit, Hospital Universitario Dr. Negrin, Las Palmas de Gran Canaria; #Psychopathology and Neuropsychology Research Unit, Department of Clinical and Health Psychology, Universitat Autònoma de Barcelona, Campus d' Excel·lència Internacional, Bellaterra; **Department of Respiratory Care, Massachusetts General Hospital; and ¶Department of Anesthesiology, Harvard University, Boston, Massachusetts*

Received 22 May 2015; first review completed 12 Jun 2015; accepted in final form 13 Aug 2015

ABSTRACT—Background: Ventilatory strategy and specifically positive end-expiratory pressure (PEEP) can modulate the inflammatory response and pulmonary-to-systemic translocation of lipopolysaccharide (LPS). Both inflammation and ventilatory pattern may modify brain activation, possibly worsening the patient's outcome and resulting in cognitive sequelae. **Methods:** We prospectively studied Sprague–Dawley rats randomly assigned to undergo 3 h mechanical ventilation with 7 mL/kg tidal ventilation and either 2 cmH₂O or 7 cmH₂O PEEP after intratracheal instillation of LPS or saline. Healthy nonventilated rats served as baseline. We analyzed lung mechanics, gas exchange, lung and plasma cytokine levels, lung apoptotic cells, and lung neutrophil infiltration. To evaluate brain neuronal activation, we counted c-Fos immunopositive cells in the retrosplenial cortex (RS), thalamus, supraoptic nucleus (SON), nucleus of the solitary tract (NTS), paraventricular nucleus (PVN), and central amygdala (CeA). **Results:** LPS increased lung neutrophilic infiltration, lung and systemic MCP-1 levels, and neuronal activation in the CeA and NTS. LPS-instilled rats receiving 7 cmH₂O PEEP had less lung and systemic inflammation and more c-Fos-immunopositive cells in the RS, SON, and thalamus than those receiving 2 cmH₂O PEEP. Applying 7 cmH₂O PEEP increased neuronal activation in the CeA and NTS in saline-instilled rats, but not in LPS-instilled rats. **Conclusions:** Moderate PEEP prevented lung and systemic inflammation secondary to intratracheal LPS instillation. PEEP also modified the neuronal activation pattern in the RS, SON, and thalamus. The relevance of these differential brain c-Fos expression patterns in neurocognitive outcomes should be explored.

KEYWORDS—Experimental, inflammation, mechanical ventilation, neuronal activation, PEEP

ABBREVIATIONS—ALI—Acute lung injury; ARDS—Acute respiratory distress syndrome; BAS—Basal; CeA—Central amygdala; IL—Interleukin; LPS—lipopolysaccharide; MAP—Mean arterial pressure; MCP—Monocyte chemoattractant protein; MV—Mechanical ventilation; NTS—Nucleus tractus solitarius; PEEP—Positive end-expiratory pressure; PVN—Paraventricular nucleus; RS—Retrosplenial cortex; SEM—Standard error of the mean; SON—Supraoptic nucleus; TNF—Tumor necrosis factor; VILI—Ventilator-induced lung injury; VT—Tidal volume

Address reprint requests to Josefina López-Aguilar, PhD, Fundació Parc Taulí, c. Parc Taulí, 1, 08208 Sabadell, Spain. E-mail: Jlopeza@tauli.cat.

All authors have read and approved the final version of the manuscript.

JL-A and LB contributed to the conception and design of the study. JL-A, RR-G, MNG, and MEQ were involved in all the experiments and data collection. JL-A and MEQ analyzed and interpreted the data. JCO and JL-A performed the statistical analysis. JL-A and MEQ drafted the manuscript. LB and JL-A coordinated the study and helped to draft the manuscript. MT, SF-G, JV, and RMK critically revised the manuscript.

This work was supported by the Corporative Research Program in Acute Lung Injury from the CIBER de Enfermedades Respiratorias, FIS PI13/02204 Instituto de Salud Carlos III (Madrid, Spain), and I3PT-Fundació Parc Taulí. RR-G is the recipient of a grant from Instituto de Salud Carlos III (Contratos postdoctorales de perfeccionamiento en investigación en salud, Programa Sara Borrell CD11/00104).

Supplemental digital content is available for this article. Direct URL citation appears in the printed text and is provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's Web site (www.shockjournal.com).

The authors report no conflicts of interest.

DOI: 10.1097/SHK.0000000000000469

Copyright © 2015 by the Shock Society. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial-No Derivatives License 4.0 (CCBY-NC-ND), where it is permissible to download and share the work provided it is properly cited. The work cannot be changed in any way or used commercially.

INTRODUCTION

Endotracheal intubation increases the risk of bacterial colonization of the lower respiratory tract, and may eventually lead to pneumonia or pneumonitis (1). This event is clinically relevant in critically ill patients attended in intensive care units (ICU) and can trigger acute lung injury (ALI) or acute respiratory distress syndrome (ARDS) (2,3). Mechanical ventilation (MV) also increases the risk of infection and can contribute to the dissemination of bacteria or bacterial products (3–6). The translocation of inflammatory mediators could compromise the functionality of different organs and systems, including the brain, and may be involved in ICU-acquired delirium or post-ICU cognitive decline. The recent literature reflects growing interest in lung–brain crosstalk (7,8), and its possible role in the development and prevention of cognitive impairment (9,10) in mechanically ventilated critically ill patients.

A protective ventilatory strategy with low tidal volume (V_t) prevents ALI and inflammatory decompartmentalization after intratracheal instillation of lipopolysaccharide (LPS) in rabbits (11). Conversely, adverse ventilatory strategies cause pulmonary-to-systemic translocation of LPS or bacteria, thereby promoting the dissemination of inflammation (12,13). Whitehead et al. (4) explored the effect of MV on cytokine response to intratracheal LPS or saline using different ventilatory patterns in an *ex vivo* rat model. They found TNF α levels in bronchoalveolar lavage in lungs from animals instilled with saline undergoing MV were lower with low V_t ; however, this protective effect of low V_t was dampened in animals instilled with LPS. Likewise, optimizing positive end-expiratory pressure (PEEP) could help prevent ALI and inflammation (14,15) and neurological alterations.

The central nervous system (CNS) receives both humoral and sensory inputs, which are regulated through the central autonomic network, and the brain's neuroimmune system helps maintain body homeostasis. In a mouse model of ventilator-induced lung injury (VILI), MV triggered apoptosis in hippocampal neurons via vagal and dopaminergic pathways (16). However, how protective MV can affect brain homeostasis remains unresolved (7). In a previous study using a rodent model of VILI, we found that different levels of V_t resulted in early differential neuronal activation, as reflected in increased expression of *c-Fos* protein (8). The brain can probably sense differential inputs from pulmonary stretch receptors that change with V_t and PEEP level (17).

The optimal PEEP level is a matter of debate, and its contribution in modulating lung–brain crosstalk is unknown. We hypothesize that optimizing PEEP level immediately after tracheal instillation could be crucial to prevent local and systemic inflammation secondary to LPS and MV. Moreover, we postulate that PEEP might also modify the pattern of neuronal activation in the brain and changes in activation patterns could help elucidate which areas of the brain participate in this modulatory response.

In this study, to ascertain the best level of PEEP to prevent local inflammation and systemic dissemination and to explore the influence of PEEP level on neuronal activation, we investigated the effects of two PEEP levels on local, systemic, and brain responses immediately after intratracheal instillation of LPS.

MATERIALS AND METHODS

Animal preparation and measurements

In accordance with the European Commission Directive 2010/63/EU for animal experimentation, the university's animal ethics committee approved the study. We studied 38 adult male Sprague–Dawley rats (mean weight, 348 ± 32 g) housed in standard conditions with a 12-h light–dark cycle and food and water *ad libitum*. Animals were anesthetized with 75 mg/kg ketamine and 10 mL/kg xylazine intraperitoneally, placed supine, and tracheotomized. An endotracheal tube (2 mm inner diameter) was inserted and tightly tied to avoid air leaks, and the rats were ventilated using a Servo-300 ventilator (Maquet; Solna, Sweden) while paralyzed with repeated doses of succinylcholine chloride. Anesthesia and muscle relaxation were administered every 45 min. Airway pressure was monitored via a side port in the tracheal tube using a pressure transducer (Valyline MP45, Valyline Engineering, Northridge, CA). The left carotid artery was cannulated and connected to a pressure transducer (Transpac Monitoring Kit, Abbot, Sligo, Ireland) to monitor mean arterial pressure (MAP). The right jugular vein was cannulated for fluid infusion (10 mL/kg/h). Blood and airway pressures were routed to an amplifier (Presograph, Gould Godart, The Netherlands), converted to digital (Urelab, Barcelona, Spain), and recorded in a personal computer (Anadat-Labdat Software, RTH InfoDat, Montreal, Canada).

Rats were randomly assigned to one of five experimental groups: basal group, in which animals were immediately exsanguinated after anesthesia and no LPS or MV was not administered ($n = 6$); low-PEEP-saline group (SAL-2), in which animals were ventilated with 2 cmH $_2$ O PEEP after saline instillation ($n = 8$); low-PEEP-LPS group (LPS-2), in which animals were ventilated with 2 cmH $_2$ O PEEP after LPS instillation ($n = 8$); moderate-PEEP-saline group (SAL-7), in which animals were ventilated with 7 cmH $_2$ O PEEP after saline instillation ($n = 8$); and moderate-PEEP-LPS group (LPS-7), in which animals were ventilated with 7 cmH $_2$ O PEEP after LPS instillation ($n = 8$). During preparation, all rats were ventilated with 7 mL/kg V_t and 2 cmH $_2$ O PEEP, at 46 breaths/min, FiO $_2 = 0.4$, and 1:2 inspiratory-to-expiratory ratio. Immediately after a 15-min stabilization period, 200 μ g/kg LPS from *Escherichia coli* 055:B5 serotype (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) diluted in a total volume of 200 μ L of sterile saline was intratracheally instilled; animals were rotated in both lateral decubitus positions to facilitate homogeneous distribution. MV with V_t 7 mL/kg was maintained for 3 h, and at the end of this period arterial blood gases and respiratory system mechanics (inspiratory and expiratory pause) were recorded. MAP was continuously monitored.

At the end of the 3-h MV period, rats were euthanized by exsanguination. For protein determinations, 7 mL of blood from each animal was centrifuged and plasma was stored at -80° C. Lungs and brains were removed and frozen for tissue analyses. The left lung was fixed for histological analysis.

Histological analysis

Left lungs were fixed by instillation of 4% buffered formaldehyde at a pressure of 5 cmH $_2$ O and then immersed in the same fixative. Lungs were embedded in paraffin and sliced at 5 μ m for histopathology and for terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL) assay. After hematoxylin-eosin staining, two investigators (MEQ, JLA), blinded to experimental groups, assessed alveolar neutrophil infiltration by counting the neutrophils in 50 random fields per animal at a magnification of $\times 400$ using ImageJ v1.36 (Wayne Rasband, NIH, USA) (18).

TUNEL assays in lung tissue

The TUNEL assay was performed using the In situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein (Roche Applied Science, Barcelona, Spain), according to the manufacturer's protocols. Briefly, deparaffinized sections were permeabilized, rehydrated, and digested with proteinase K (Dako, Agilent Technologies, Barcelona) at 37°C for 30 min and then washed in phosphate buffer saline (PBS) for 15 min. Then, sections were incubated with TUNEL reaction mixture, containing TdT and fluorescein-dUTP, at 37°C for 1 h in the dark. Slides were washed in PBS, mounted with Fluoromount Aqueous Mounting Medium (Sigma-Aldrich), and viewed with a fluorescent microscope (Nikon Eclipse Ti, Nikon Corp., Tokyo, Japan) using an excitation wavelength of 450–500 nm. To identify and count TUNEL-positive cells, 10 to 15 lung fields were captured and examined with a magnifying power of $\times 100$ (ImageJ 1.40 g, Wayne Rasband).

Plasma and lung protein immunoassays

We measured interleukin (IL) IL-1b, IL-6, and IL-10; tumor necrosis factor (TNF) α ; and monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 levels in plasma and

lung tissue homogenates with a rat multiplex immunoassay kit (RCYTO-80K MILLIPLEX MAP Rat Cytokine/Chemokine Panel, Millipore Corp., Billerica, MA) using high-throughput multiplex Luminex technology (Luminex 200 System, Luminex, Austin, TX). Analyses of all samples, standards, and controls were run in duplicate.

Brain immunohistochemistry

To investigate the functional location of neural activity induced by PEEP, we examined brain *c-Fos* expression. C-Fos Protein is the product of the immediate early gene *c-fos*, and it has been widely used as a marker of neuronal activity. Its basal expression is low but increases quickly induced by a variety of stimuli. At the end of the experiments, rats' brains were removed and immediately frozen and stored at -80°C . Later, the brains were cut into 20- μm coronal sections (Cryostat CM1900, Leica Microsystems, Barcelona, Spain) and stored at -80°C . Some sections were stained with cresyl violet to identify the regions of interest, and additional sections were processed for immunohistochemistry to assess *c-Fos* expression in different areas (8): the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN), nucleus tractus solitarius (NTS), supraoptic nucleus (SON), central amygdala (CeA), retrosplenial cortex (RS), and thalamus. After immunostaining, activated areas were identified by light microscopy (DM250, Leica, Wetzlar, Germany) with the aid of a stereotaxic atlas. Brain sections were digitized; the *c-Fos*-positive cells were evaluated according to the staining intensity of cells, and then semiquantified using Image J software (ImageJ 1.40g, Wayne Rasband) (8). An optimal threshold was set for all sections to minimize any background signal.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with SPSS software (version 21; SPSS Inc, Chicago, IL) under the supervision of an expert statistician. Results are reported as mean \pm standard error of the mean (SEM). All data were tested for homogeneity of variance (Levene's test). Statistical analysis was performed with one-way analysis of variance (17) followed by post-hoc Dunnett *t*-test for comparisons between MV groups and the basal group (nonventilated animals). Differences between the two levels of PEEP were assessed by Student *t* tests separately for each saline or LPS instillation groups. MAP was compared by one-way ANOVA for repeated measures. Level of significance was set at $P < 0.05$ and $P < 0.1$ was considered to be a trend, because approaching, although not reaching, the significant level.

RESULTS

Physiological parameters

MAP was similar in all groups. In animals ventilated with 7 cmH_2O PEEP (PEEP-7), respiratory system compliance decreased (Fig. 1) ($P = 0.008$ in SAL; $P = 0.0042$ in LPS). Animals ventilated with PEEP-7 had lower pH ($P = 0.049$ in SAL; $P = 0.0001$ in LPS) and higher PaCO_2 ($P = 0.01$ in LPS) than those ventilated with 2 cmH_2O PEEP (PEEP-2), and LPS-instilled animals receiving PEEP-7 had lower $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ than LPS-instilled animals receiving PEEP-2 ($P = 0.002$).

Inflammatory response

In basal rats, $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, MCP-1, and IL-10 plasma levels were low. By contrast, all rats undergoing tracheal instillation and MV presented a global inflammatory response. Moreover, the administration of LPS increased MCP-1 levels in plasma ($P = 0.008$ in PEEP-2). In LPS-instilled animals, $\text{TNF}\alpha$ ($P = 0.048$), $\text{IL-1}\beta$ ($P = 0.08$), IL-6 ($P = 0.09$), MCP-1 ($P = 0.038$), and IL-10 ($P = 0.09$) levels were higher in PEEP-2 than in PEEP-7 (Fig. 2). In saline-instilled animals, IL-6 ($P = 0.03$) and IL-10 ($P = 0.09$) plasma levels were higher in PEEP-2 than in PEEP-7.

Similar effects were observed in lung tissue homogenates (Fig. 3). $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , and MCP-1 levels were low in lung tissue homogenates of basal rats. Intratracheal instillation of LPS increased MCP-1 ($P = 0.024$) and $\text{TNF}\alpha$ ($P = 0.095$) levels in lungs. In LPS-instilled animals, PEEP-7 reduced

$\text{TNF}\alpha$ ($P = 0.09$), $\text{IL-1}\beta$ ($P = 0.095$), MCP-1 ($P = 0.038$), and IL-10 ($P = 0.06$) levels. In saline-instilled animals, PEEP-7 reduced IL-10 ($P = 0.007$).

Lung neutrophil infiltration and apoptosis

Low levels of neutrophils and apoptotic cells were found in the lungs of basal animals. Neutrophil infiltration was higher in LPS-instilled than in saline-instilled animals ($P = 0.021$) (Fig. 4), but PEEP-7 significantly reduced the number of infiltrated neutrophils in the lung ($P = 0.002$). All instilled-MV rats had TUNEL-positive cells in lung sections. In LPS-instilled rats, there were no differences between the two levels of PEEP; by contrast, in saline-instilled rats, there were fewer TUNEL-positive cells in PEEP-7 than in PEEP-2 ($P = 0.092$) (Fig. 4).

c-Fos immunopositive brain areas

We found no *c-Fos*-immunopositive cells in brains from healthy, nonventilated animals (see Figures, Supplemental Digital Content 1, at <http://links.lww.com/SHK/A324>). By contrast, all rats that underwent instillation and MV presented *c-Fos* immunoreactivity in all areas studied (Figs. 5 and 6 and Figures, Supplemental Digital Content 1, at <http://links.lww.com/SHK/A324>). Neuronal activation was higher in LPS-instilled rats than in saline-instilled rats in CeA ($P = 0.048$) and NTS ($P = 0.0001$). PEEP level had no effect on neuronal activation in these areas in LPS-instilled rats. In saline-instilled rats, however, neuronal activation in the CeA ($P = 0.09$) and NTS ($P = 0.01$) was higher in animals receiving PEEP-7 than in those receiving PEEP-2. In the PVN, no differences in neuronal activation were found between groups. LPS-7 rats had more *c-Fos*-immunopositive cells than LPS-2 rats in the RS ($P = 0.012$), SON ($P = 0.049$), and thalamus ($P = 0.049$), but there were no differences between SAL-7 and SAL-2 rats (Figs. 5 and 6). No differences between brain hemispheres were found. Supplemental Digital Content 1, at <http://links.lww.com/SHK/A324>, contains representative images of *c-Fos*-immunopositive cells in the different areas of the brain explored.

DISCUSSION

The major finding of our study is that applying moderate PEEP immediately after intratracheal LPS instillation prevented lung inflammation and the dissemination of inflammatory mediators. Our results also demonstrate that the pattern of neuronal activation that can be modified by intratracheal instillation of LPS might also be modulated by PEEP.

Intratracheal LPS instillation has been widely used to mimic contamination of the endotracheal tube and upper airways and the inflammatory response secondary to local infection in animal models of ALI/ARDS (19). In the present study, intratracheal LPS instillation contributed to local inflammation and neutrophil recruitment in the lungs of animals undergoing MV with low PEEP.

Regarding the use of higher levels of PEEP to protect from the adverse effects of LPS instillation, a recent experimental study demonstrated that higher PEEP decreased ventilation heterogeneities in the first 2 h following bronchoaspiration (20). In the present study, we found PEEP-7 was beneficial in preventing the inflammatory response secondary to LPS

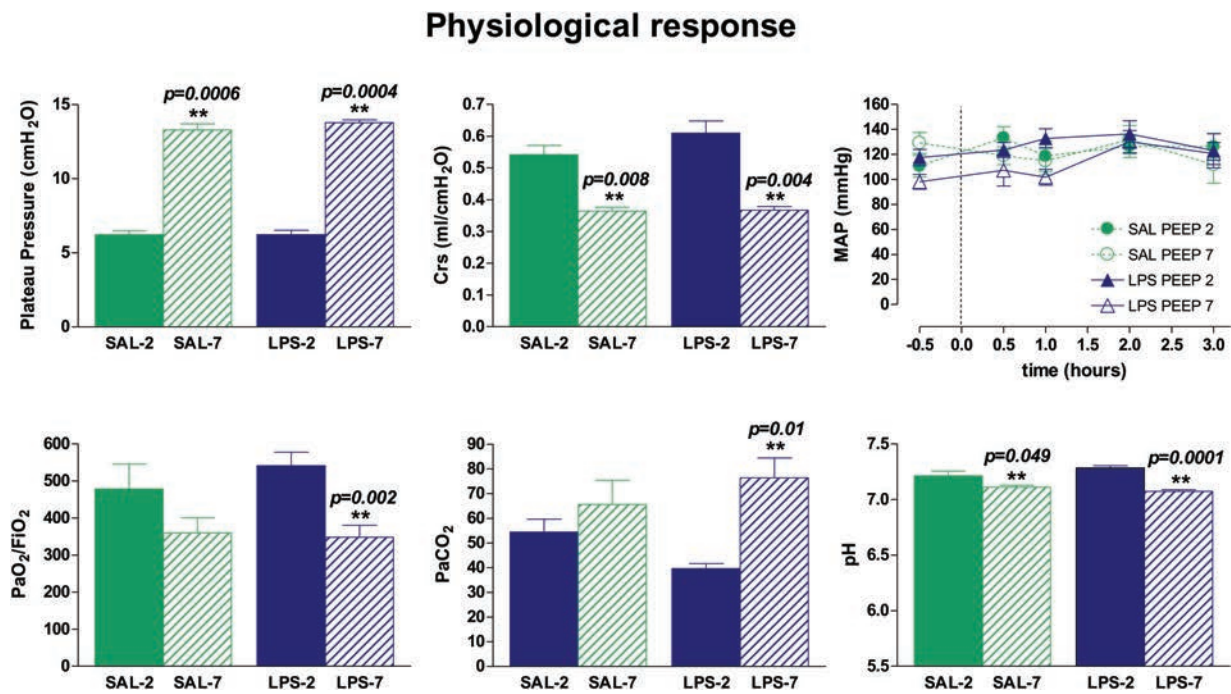


FIG. 1. Course of mean arterial pressure (MAP) and respiratory characteristics after mechanical ventilation. MAP was similar in all experimental groups. Plateau pressure after 3 h of mechanical ventilation was higher in animals receiving 7 cmH₂O PEEP (PEEP-7). Respiratory system compliance (Crs), pH, and PaO₂/FiO₂ were lower and PaCO₂ was higher in PEEP-7 than in those receiving 2 cmH₂O PEEP (PEEP-2). Bars represent means \pm SEM. ** $P < 0.05$ PEEP-7 vs. PEEP-2.

administration, despite a certain degree of lung overdistension in these rats. PEEP-7 decreased static lung compliance, probably by increasing alveolar dead space (21,22). PEEP-7 may have expanded aerated airspaces, inducing overinflation, probably because of the low potential of recruitment in these lungs. The height of the rat thorax is around 2 cm (compared with 8 cm in humans), so PEEP-7 level would correspond to 26–28 cmH₂O in humans, which is excessive (23). This could favor ventilation/perfusion mismatch and might contribute to the hypercapnia and respiratory acidosis observed in both saline- and LPS-instilled rats receiving PEEP-7. PEEP decreased both the local inflammatory and systemic inflammatory responses to LPS; we hypothesize that this trend to decrease resulted from PEEP's effect of reducing strain and shear stresses during the repeated opening and closing of lung units (15,24). Several authors have also reported that pulmonary cells respond differently to different insults (25). Hypercapnic acidosis modulates inflammation in VILI (26) but not in lung injury caused by bacterial pneumonia (27). In view of our results, we cannot rule out a protective contribution from hypercapnic acidosis in our model. We postulate that in the rats receiving LPS instillation and MV PEEP-7 prevented both local and systemic inflammatory responses induced by LPS, even when these PEEP levels promoted overdistension.

Intratracheal LPS also induced a CNS response evidenced by c-Fos immunoreactivity in the CeA and NTS, corroborating organ cross-talk in the proinflammatory response. The CeA is involved in processing autonomic information and receives sensory inputs and inputs from the NTS, which is itself a primary detector of cytokines (28). Vagal afferent neurons can be activated by peripheral LPS, so vagal innervation could

explain how intratracheal LPS could cause neuronal activation before a systemic response develops (29). In fact, in a recent study we showed that after stimulation with LPS, pulmonary epithelial cells release different mediators that significantly affect brain cells in culture (30).

Furthermore, the results of the present study corroborate our previous finding that MV in itself promotes c-Fos immunoreactivity in several areas of the brain (8). Beyond this finding, our results show that PEEP can contribute to the differential regional regulation of neuronal activity that accompanies the pulmonary and systemic inflammatory cascades. Although PEEP may affect the cerebral circulation by hemodynamic (31) and CO₂-mediated mechanisms (21), in our study, similar levels of hypercapnia in PEEP-7 animals resulted in different activation patterns in the brain depending on whether they received LPS or saline. Even in the absence of LPS instillation, PEEP-7 resulted in increased neuronal activation in the NTS and CeA. We also observed neuronal activation in PVN and CeA independent of inflammatory mediators in the LPS-7 group. PEEP-7 immediately after tracheal LPS instillation prevents the proinflammatory cascade. We speculate that PEEP results in neuronal activation before a systemic response is manifest, and this neuronal activation is achieved through neural pathways. The NTS controls the response to baroreflex stimuli (29), so information about lung stretching could reach the NTS in the brain stem via the vagus nerve (32).

The vagal pathway plays a crucial role in lung–brain communication by activating the cholinergic anti-inflammatory reflex, which attenuates VILI (16,32). The sensory nerves respond to mechanical forces and to tissue damage by inhibiting the local activation of macrophages, enabling targeted control of the damage focused only on maintaining local

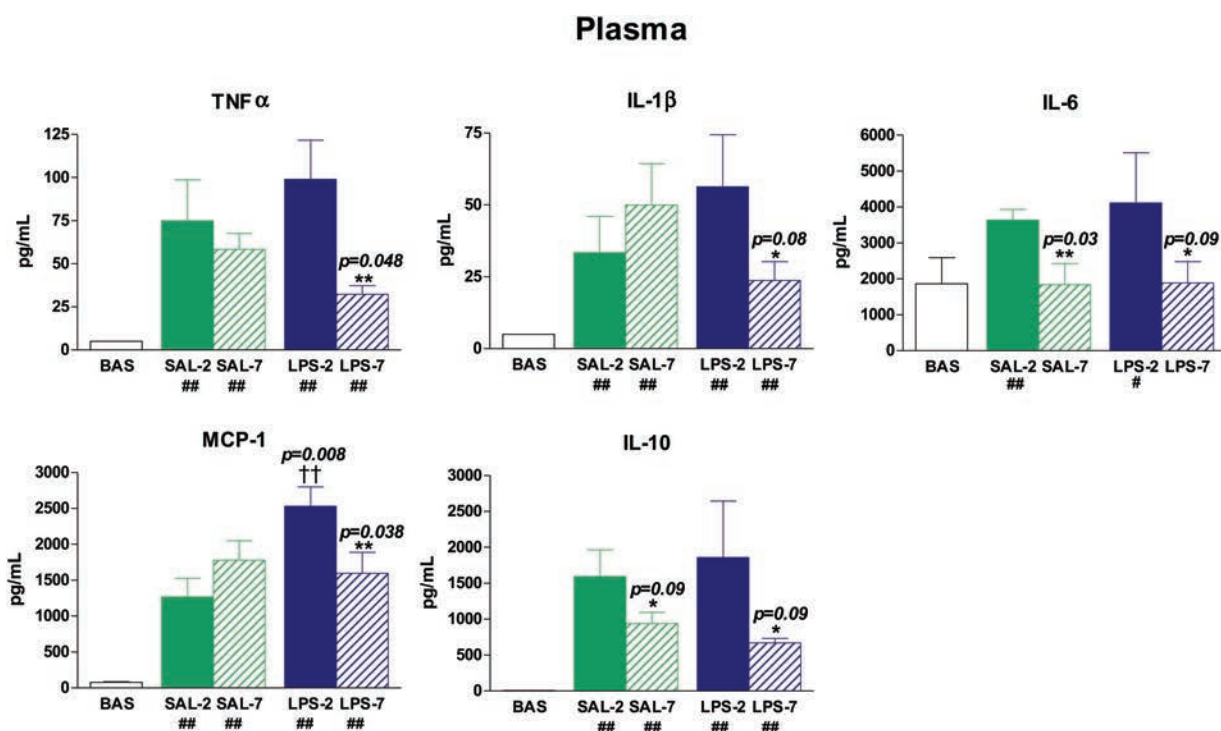


FIG. 2. **Plasma levels of cytokines.** After 3 h of mechanical ventilation, plasma levels of inflammatory cytokines were higher than in basal (BAS) nonventilated animals ($\# P < 0.1$ and $\#\# P < 0.05$ compared with BAS). LPS-instilled rats receiving 7 cmH₂O PEEP (LPS-7) presented lower levels of inflammatory mediators than those receiving 2 cmH₂O PEEP (LPS-2). The application of 7 cmH₂O PEEP (PEEP-7) reduced IL-10 levels in both saline-instilled and LPS-instilled animals. The application of PEEP-7 also reduced IL-6 levels in saline-instilled rats. Bars represent means \pm SEM. * $P < 0.1$ and ** $P < 0.05$ comparing PEEP-7 vs. 2 cmH₂O PEEP.

tissue integrity without compromising the global immune response.

Various studies indicate that brain regions (hippocampal nuclei, SON, and PVN) respond to acute stress by increasing immunoreactivity to c-Fos (33,34). In the present study, RS, SON, and thalamus immunoreactivity to c-Fos was clearly higher in LPS-instilled rats receiving PEEP-7 than in LPS-instilled rats receiving PEEP-2 or in saline-instilled rats receiving either PEEP level. Thus, it seems that moderate PEEP could contribute to modulating not only the inflammatory response but also neuronal activation in these discrete areas. Interestingly, in our previous study (8), we also observed increased immunoreactivity to c-Fos in the RS and thalamus in rats receiving high Vt without PEEP and in spontaneously breathing rats. Our present data cannot determine whether neuronal activation in RS, SON, and thalamus is definitely linked with the modulation of inflammation observed in LPS-7 animals, and future studies should clarify this point.

Limitations of the study

Caution is warranted in extrapolating the results obtained with experimental animal models into the clinical setting. Nevertheless, intratracheal LPS instillation is a widely accepted model to mimic tracheal contamination. Moreover, although the 3-h experimental period is short, it is sufficient to examine the early effects of our ventilatory strategies (8,18). Animals receiving 7 cmH₂O PEEP presented hypercapnia, probably associated with lung overdistension. The brain is sensitive to CO₂ (35) and we cannot rule out some

overlooked effects in this regard. This study provides information about which areas in the brain participate in the response to LPS and PEEP, but it does not explore the mechanisms involved in lung-to-brain communication. The use of vagotomized or haloperidol-treated animals could address the role of vagal signaling in the response to PEEP in future studies (16,32).

Clinical relevance

Cytokine release has negative effects on emotional and memory functions and can compromise outcomes in critically ill patients (36). Despite the recovery of lung function, survivors of critical disease often fail to recover their previous functional status and have cognitive impairment, memory deficits, or emotional disturbances (9,36). Brain–lung cross-talk during MV is a novel but growing area of research (7,8,16,32,37,38). We can only speculate about how changes in *c-fos* expression in different areas of the brain could modify susceptibility to long-term neurocognitive disorders. In this regard, the thalamus is involved in processing nociceptive signals and contributes to spatial memory and adaptation to stress (39). The RS is vital for memory, and RS hypoactivity has been reported in the early stages of Alzheimer's disease (39,40). Both the thalamus and RS are functionally connected with the hippocampus (40), which is involved in forming, organizing, and storing memories and also in connecting emotions and senses to memories.

Characterizing the mechanisms underlying these CNS alterations could help improve strategies to prevent cognitive impairment. Management strategies that contribute to reducing

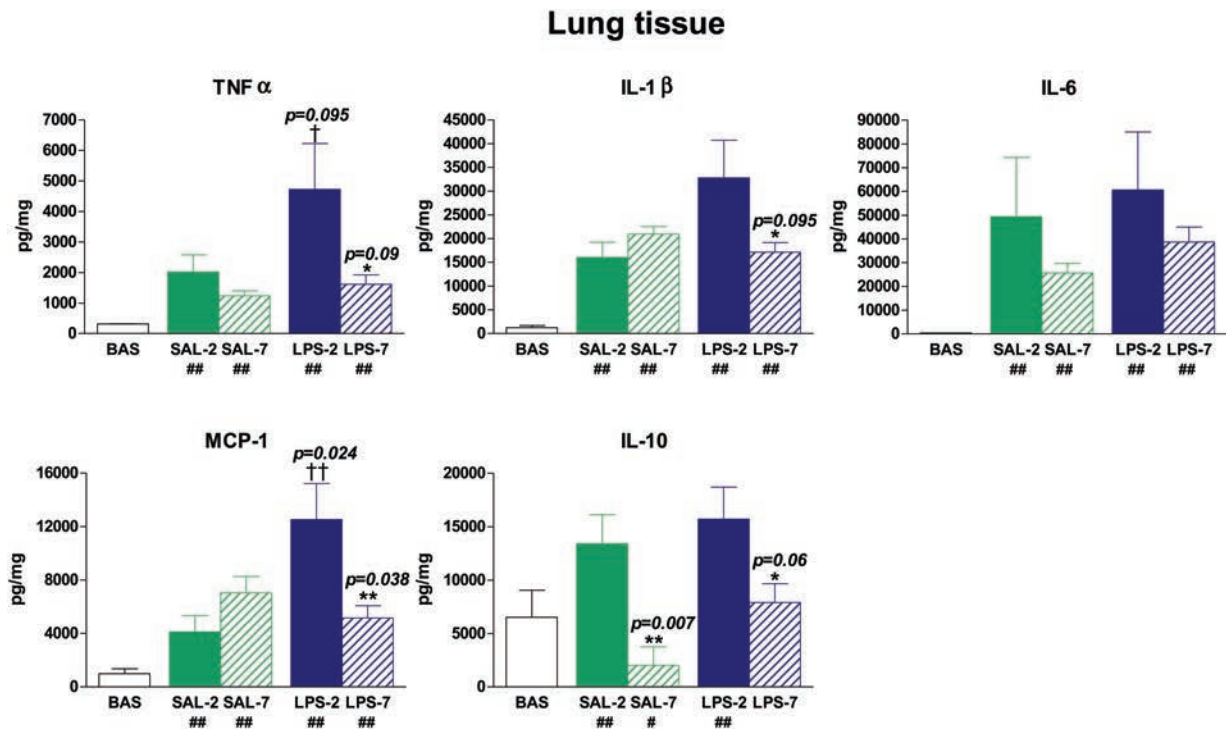


FIG. 3. Lung levels of cytokines. After 3h of mechanical ventilation, lung levels of cytokines were higher than in basal (BAS) non-ventilated animals (# $P < 0.1$ and ## $P < 0.05$ compared with BAS). LPS-instilled rats had higher MCP-1 and TNF α levels than saline-instilled rats ($\dagger P < 0.1$ and $\dagger\dagger P < 0.05$). LPS-instilled rats receiving 7 cmH $_2$ O PEEP (LPS-7) presented lower levels of TNF α , IL-1 β , MCP-1, and IL-10 than those receiving 2 cmH $_2$ O PEEP (LPS-2). The application of 7 cmH $_2$ O PEEP reduced IL-10 levels in both saline-instilled and LPS-instilled animals. Bars represent means \pm SEM. * $P < 0.1$ and ** $P < 0.05$ comparing 7 cmH $_2$ O PEEP vs. 2 cmH $_2$ O PEEP.

inflammation might somehow help prevent cognitive impairment in intensive care survivors.

CONCLUSIONS

In our experimental model, applying moderate PEEP immediately after intratracheal LPS instillation showed a

tendency to prevent lung inflammation, neutrophil recruitment, and the dissemination of inflammatory mediators. Moreover, PEEP modified the neuronal activation pattern in particular areas of the brain, such as the RS, SON, and thalamus. Although neuronal activation in some specific areas might also be explained by the inflammatory response, PEEP might help

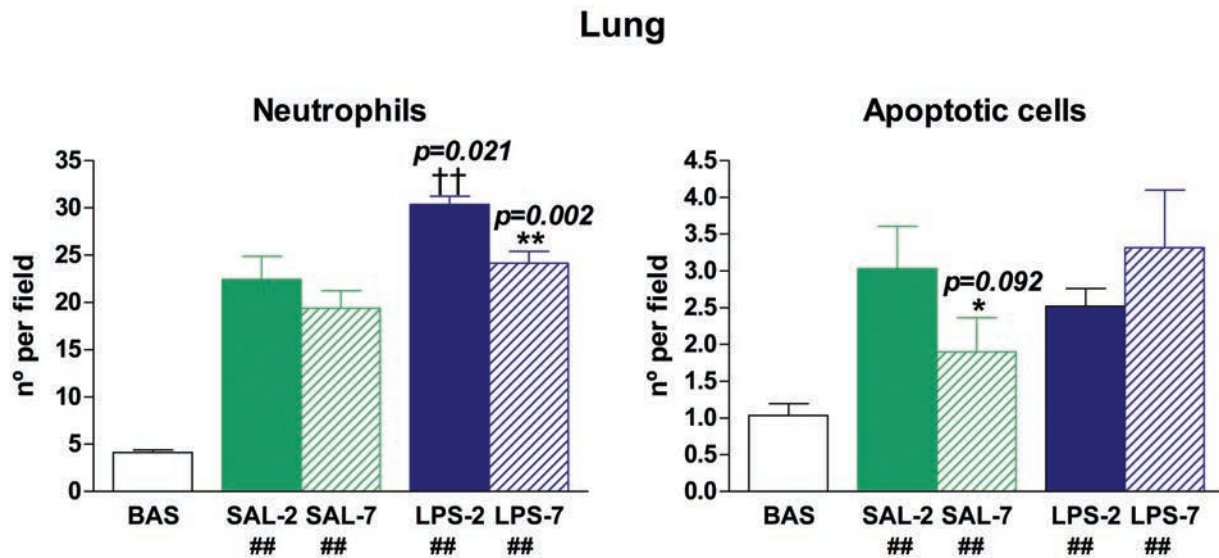


FIG. 4. Neutrophilic infiltration and apoptotic cell counts in lung. Mechanical ventilation promotes lung neutrophilic infiltration and apoptosis (## $P < 0.05$ compared with BAS group). LPS-instilled rats had higher lung neutrophil infiltration than saline-instilled rats ($\dagger\dagger P < 0.05$), but there were no differences in apoptosis rates. LPS-instilled rats receiving 7 cmH $_2$ O PEEP presented lower levels of neutrophils than those receiving cmH $_2$ O PEEP. Bars represent means \pm SEM. * $P < 0.1$ and ** $P < 0.05$ comparing 7 cmH $_2$ O PEEP vs. 2 cmH $_2$ O PEEP.

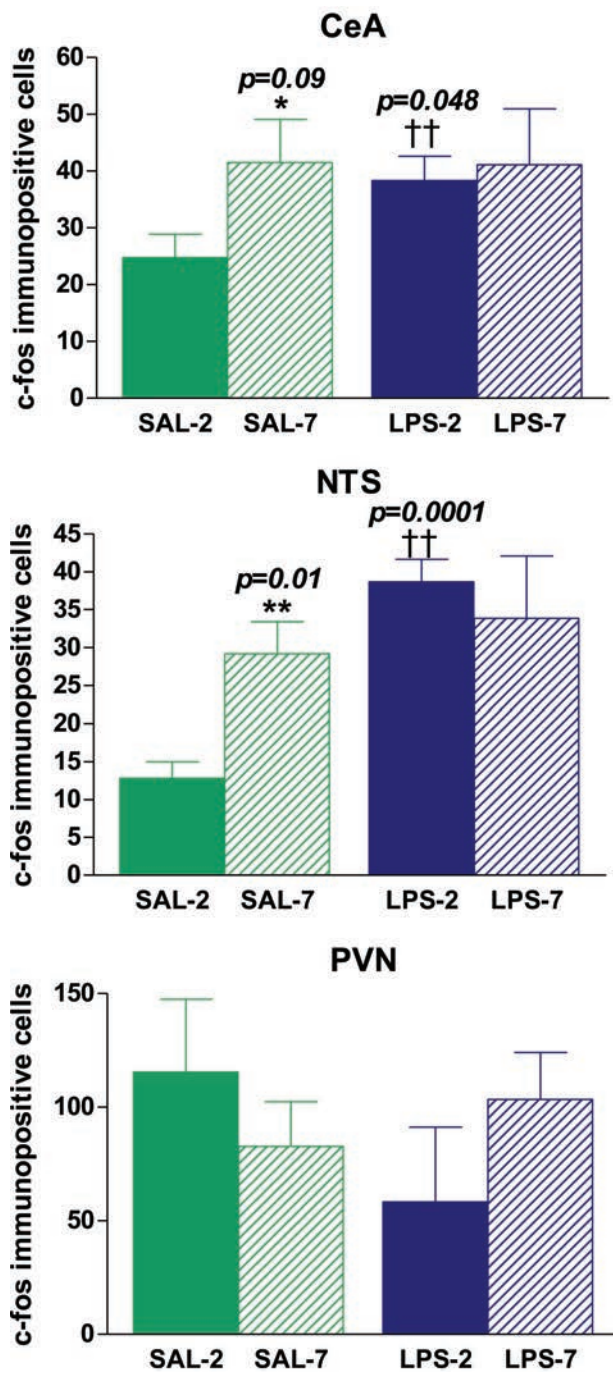


FIG. 5. Quantification of c-Fos immunopositive cells per field in different areas of the brain. No immunopositive cells were found in non-ventilated rats. LPS-instilled rats had more immunopositive cells in the CeA and NTS than saline-instilled rats (†† $P < 0.05$). Saline-instilled rats receiving 7 cmH₂O PEEP had more immunopositive cells in the CeA and NTS than saline-instilled rats receiving 2 cmH₂O PEEP (* $P < 0.1$ and ** $P < 0.05$). No differences between groups were found in the PVN. Bars represent means \pm SEM.

prevent inflammation by protecting against injury from repeated opening and closing of alveoli.

Cognitive impairment after discharge from intensive care is undoubtedly multifactorial. Our findings show that MV and PEEP level could modulate neuronal activity in some areas in the brain that are related to memory impairment and responses to stress. Further studies are necessary to understand the

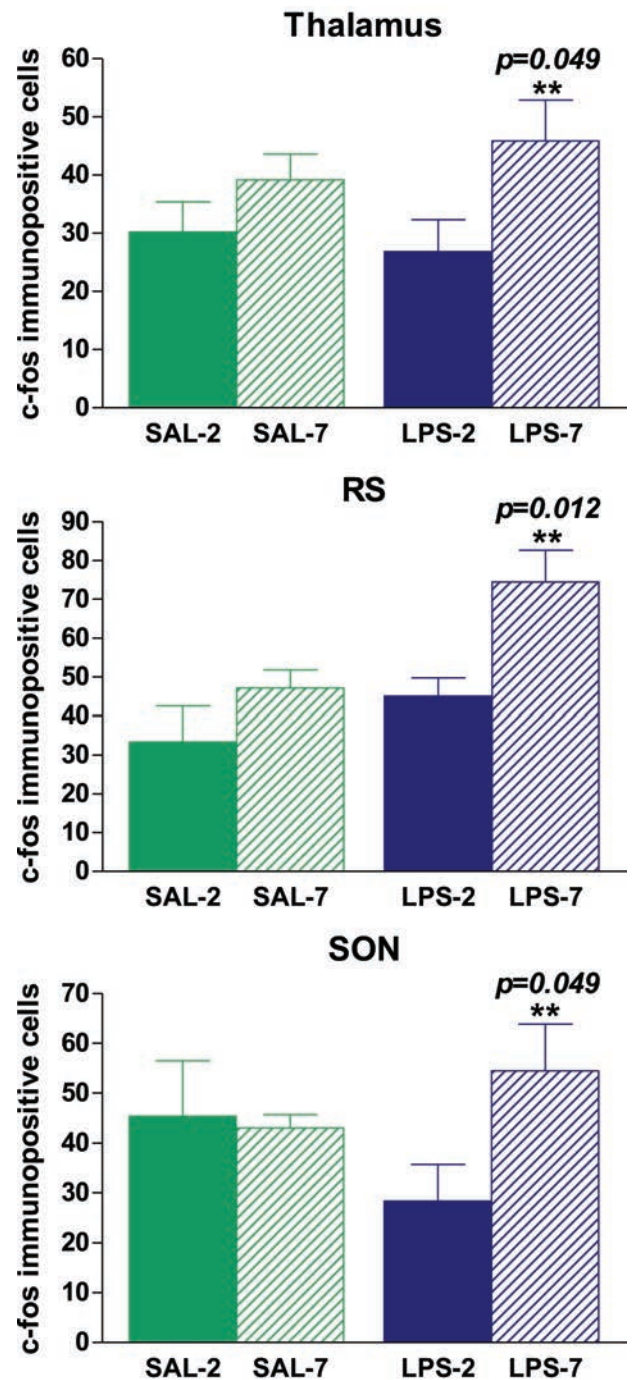


FIG. 6. Quantification of c-Fos-immunopositive cells per field in different areas of the brain. No immunopositive cells were found in non-ventilated BAS rats. The administration of LPS did not modify the number of immunopositive cells in the thalamus, RS, or SON. LPS-instilled rats receiving 7 cmH₂O PEEP had more immunopositive cells in the thalamus, RS, and SON than those receiving 2 cmH₂O PEEP (** $P < 0.05$). Bars represent means \pm SEM.

complex lung-brain interactions in mechanically ventilated patients and to prevent neurocognitive impairment in these patients.

Key messages

PEEP modulates inflammation and the pattern of neuronal activation in the brain.

Lung-brain cross-talk in critically ill patients receiving mechanical ventilation is clinically relevant and deserves special attention in the intensive care unit.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank John Giba for language revision and Jessica Tijero for technical assistance.

REFERENCES

- Marik PE: Aspiration pneumonia and aspiration pneumonia. *N Engl J Med* 344(9):665–671, 2001.
- Ware LB, Matthay MA: The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 342(18):1334–1349, 2000.
- Villar J, Blanco J, Anon JM, Santos-Bouza A, Blanch L, Ambros A, Gandia F, Carriedo D, Mosteiro F, Basaldua S, et al.: The ALIEN study: incidence and outcome of acute respiratory distress syndrome in the era of lung protective ventilation. *Intensive Care Med* 37(12):1932–1941, 2011.
- Whitehead TC, Zhang H, Mullen B, Slutsky AS: Effect of mechanical ventilation on cytokine response to intratracheal lipopolysaccharide. *Anesthesiology* 101(1):52–58, 2004.
- Chastre J, Fagon JY: Ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 165(7):867–903, 2002.
- Lin CY, Zhang H, Cheng KC, Slutsky AS: Mechanical ventilation may increase susceptibility to the development of bacteremia. *Crit Care Med* 31(5):1429–1434, 2003.
- Lopez-Aguilar J, Fernandez-Gonzalo MS, Turon M, Quilez ME, Gomez-Simon V, Jodar MM, Blanch L: Lung-brain interaction in the mechanically ventilated patient. *Med Intensiva* 37(7):485–492, 2013.
- Quilez ME, Fuster G, Villar J, Flores C, Marti-Sistac O, Blanch L, Lopez-Aguilar J: Injurious mechanical ventilation affects neuronal activation in ventilated rats. *Crit Care* 15(3):R124, 2011.
- Pandharipande PP, Girard TD, Jackson JC, Morandi A, Thompson JL, Pun BT, Brummel NE, Hughes CG, Vasilevskis EE, Shintani AK, et al.: Long-term cognitive impairment after critical illness. *N Engl J Med* 369(14):1306–1316, 2013.
- Turon M, Fernandez-Gonzalo S, Gomez-Simon V, Blanch L, Jodar M: Cognitive stimulation in ICU patients: should we pay more attention? *Crit Care* 17(3):158, 2013.
- Hall NG, Liu Y, Hickman-Davis JM, Davis GC, Myles C, Andrews EJ, Matalon S, Lang Jr JD: Bactericidal function of alveolar macrophages in mechanically ventilated rabbits. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34(6):719–726, 2006.
- Lachmann RA, van Kaam AH, Haitsma JJ, Lachmann B: High positive end-expiratory pressure levels promote bacterial translocation in experimental pneumonia. *Intensive Care Med* 33(10):1800–1804, 2007.
- Murphy DB, Cregg N, Tremblay L, Engelberts D, Laffey JG, Slutsky AS, Romaschin A, Kavanagh BP: Adverse ventilatory strategy causes pulmonary-to-systemic translocation of endotoxin. *Am J Respir Crit Care Med* 162(1):27–33, 2000.
- Briel M, Meade M, Mercat A, Brower RG, Talmor D, Walter SD, Slutsky AS, Pullenayegum E, Zhou Q, Cook D, et al.: Higher vs lower positive end-expiratory pressure in patients with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: systematic review and meta-analysis. *JAMA* 303(9):865–873, 2010.
- Gonzalez-Lopez A, Garcia-Prieto E, Batalla-Solis E, Amado-Rodriguez L, Avello N, Blanch L, Albaiceta GM: Lung strain and biological response in mechanically ventilated patients. *Intensive Care Med* 38(2):240–247, 2012.
- Gonzalez-Lopez A, Lopez-Alonso I, Aguirre A, Amado-Rodriguez L, Batalla-Solis E, Astudillo A, Tomas-Zapico C, Fueyo A, dos Santos CC, Talbot K, et al.: Mechanical ventilation triggers hippocampal apoptosis by vagal and dopaminergic pathways. *Am J Respir Crit Care Med* 188(6):693–702, 2013.
- Aleksandrov VG, Mercuriev VA, Ivanova TG, Tarasievich AA, Aleksandrova NP: Cortical control of Hering-Breuer reflexes in anesthetized rats. *Eur J Med Res* 14(Suppl 4):1–5, 2009.
- Lopez-Aguilar J, Quilez ME, Marti-Sistac O, Garcia-Martin C, Fuster G, Puig F, Flores C, Villar J, Artigas A, Blanch L: Early physiological and biological features in three animal models of induced acute lung injury. *Intensive Care Med* 36(2):347–355, 2010.
- Vernooij JH, Dentener MA, van Suylen RJ, Buurman WA, Wouters EF: Long-term intratracheal lipopolysaccharide exposure in mice results in chronic lung inflammation and persistent pathology. *Am J Respir Cell Mol Biol* 26(1):152–159, 2002.
- Fodor GH, Petak F, Erces D, Balogh AL, Babik B: Lung mechanical changes following bronchoaspiration in a porcine model: differentiation of direct and indirect mechanisms. *Respir Physiol Neurobiol* 199:41–49, 2014.
- Blanch L, Fernandez R, Benito S, Mancebo J, Net A: Effect of PEEP on the arterial minus end-tidal carbon dioxide gradient. *Chest* 92(3):451–454, 1987.
- Lucangelo U, Blanch L: Dead space. *Intensive Care Med* 30(4):576–579, 2004.
- Passaro CP, Silva PL, Rzezinski AF, Abrantes S, Santiago VR, Nardelli L, Santos RS, Barbosa CM, Morales MM, Zin WA, et al.: Pulmonary lesion induced by low and high positive end-expiratory pressure levels during protective ventilation in experimental acute lung injury. *Crit Care Med* 37(3):1011–1017, 2009.
- Lopez-Aguilar J, Lucangelo U, Albaiceta GM, Nahum A, Murias G, Canizares R, Oliva JC, Romero PV, Blanch L: Effects on lung stress of position and different doses of perfluorocarbon in a model of ARDS. *Respir Physiol Neurobiol* 210C:30–37, 2015.
- Woods SJ, Waite AA, O'Dea KP, Halford P, Takata M, Wilson MR: Kinetic profiling of in vivo lung cellular inflammatory responses to mechanical ventilation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 308(9):L912–L921, 2015.
- Sinclair SE, Kregenow DA, Lamm WJ, Starr IR, Chi EY, Hlatala MP: Hypercapnic acidosis is protective in an in vivo model of ventilator-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 166(3):403–408, 2002.
- O'Croinin DF, Hopkins NO, Moore MM, Boylan JF, McLoughlin P, Laffey JG: Hypercapnic acidosis does not modulate the severity of bacterial pneumonia-induced lung injury. *Crit Care Med* 33(11):2606–2612, 2005.
- Reyes EP, Abarzua S, Martin A, Rodriguez J, Cortes PP, Fernandez R: LPS-induced c-Fos activation in NTS neurons and plasmatic cortisol increases in septic rats are suppressed by bilateral carotid chemodenervation. *Adv Exp Med Biol* 758:185–190, 2012.
- Akrout N, Sharshar T, Annane D: Mechanisms of brain signaling during sepsis. *Curr Neuropharmacol* 7(4):296–301, 2009.
- Rodriguez-Gonzalez R, Ramos-Nuez A, Martin-Barrasa JL, Lopez-Aguilar J, Baluja A, Alvarez J, Rocco PR, Pelosi P, Villar J: Endotoxin-induced lung alveolar cell injury causes brain cell damage. *Exp Biol Med (Maywood)* 240(1):135–142, 2015.
- Mascia L, Grasso S, Fiore T, Bruno F, Berardino M, Ducati A: Cerebro-pulmonary interactions during the application of low levels of positive end-expiratory pressure. *Intensive Care Med* 31(3):373–379, 2005.
- dos Santos CC, Shan Y, Akram A, Slutsky AS, Haitsma JJ: Neuroimmune regulation of ventilator-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 183(4):471–482, 2011.
- Lu CL, Li ZP, Zhu JP, Zhao DQ, Ai HB: Studies on functional connections between the supraoptic nucleus and the stomach in rats. *J Physiol Sci* 61(3):191–199, 2011.
- Ma Y, Matsuwaki T, Yamanouchi K, Nishihara M: Differential roles of cyclooxygenase-2-related signaling in regulating hypothalamic neuronal activity under various acute stresses. *J Vet Med Sci* 76(2):219–227, 2014.
- Brannan S, Liotti M, Egan G, Shade R, Madden L, Robillard R, Abplanalp B, Stofer K, Denton D, Fox PT: Neuroimaging of cerebral activations and deactivations associated with hypercapnia and hunger for air. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(4):2029–2034, 2001.
- Reichenberg A, Yirmiya R, Schuld A, Kraus T, Haack M, Morag A, Pollmacher T: Cytokine-associated emotional and cognitive disturbances in humans. *Arch Gen Psychiatry* 58(5):445–452, 2001.
- Lopez-Aguilar J, Villagra A, Bernabe F, Murias G, Piacentini E, Real J, Fernandez-Segoviano P, Romero PV, Hotchkiss JR, Blanch L: Massive brain injury enhances lung damage in an isolated lung model of ventilator-induced lung injury. *Crit Care Med* 33(5):1077–1083, 2005.
- Quilez ME, Lopez-Aguilar J, Blanch L: Organ crosstalk during acute lung injury, acute respiratory distress syndrome, and mechanical ventilation. *Curr Opin Crit Care* 18(1):23–28, 2012.
- Poirier GL, Amin E, Good MA, Aggleton JP: Early-onset dysfunction of retrosplenial cortex precedes overt amyloid plaque formation in Tg2576 mice. *Neuroscience* 174:71–83, 2011.
- Keene CS, Bucci DJ: Involvement of the retrosplenial cortex in processing multiple conditioned stimuli. *Behav Neurosci* 122(3):651–658, 2008.

Moderate PEEP after tracheal lipopolysaccharide instillation prevents inflammation and modifies the pattern of brain neuronal activation

María Elisa Quilez, MS^{1,2,3}, Raquel Rodríguez-González, PhD^{4,5}, Marc Turon^{3, 4}, Sol Fernandez-Gonzalo, PhD^{3, 4}, Jesús Villar, MD PhD ^{2,5}, Robert M. Kacmarek, PhD, RTT^{7,8}, M^a Nieves Gómez^{1,3}, Joan Carles Oliva, MS³, Lluís Blanch, MD PhD^{1,2,3}, Josefina López-Aguilar, PhD^{1,2,3}

(1) Critical Care Center, Corporació Sanitària Parc Taulí, Institut Universitari Parc Taulí, Universitat Autònoma de Barcelona, Campus d' Excel·lència Internacional, Bellaterra, Spain

(2) CIBER de Enfermedades Respiratorias, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

(3) Institut d'Investigació i Innovació Parc Taulí (I3PT), Fundació Parc Taulí, Corporació Sanitària Parc Taulí, Universitat Autònoma de Barcelona, Campus d' Excel·lència Internacional, Bellaterra, Spain

(4) Psychopathology and Neuropsychology Research Unit, Department of Clinical and Health Psychology, Universitat Autònoma de Barcelona, International Excellence Campus. 08193 Bellaterra, Spain

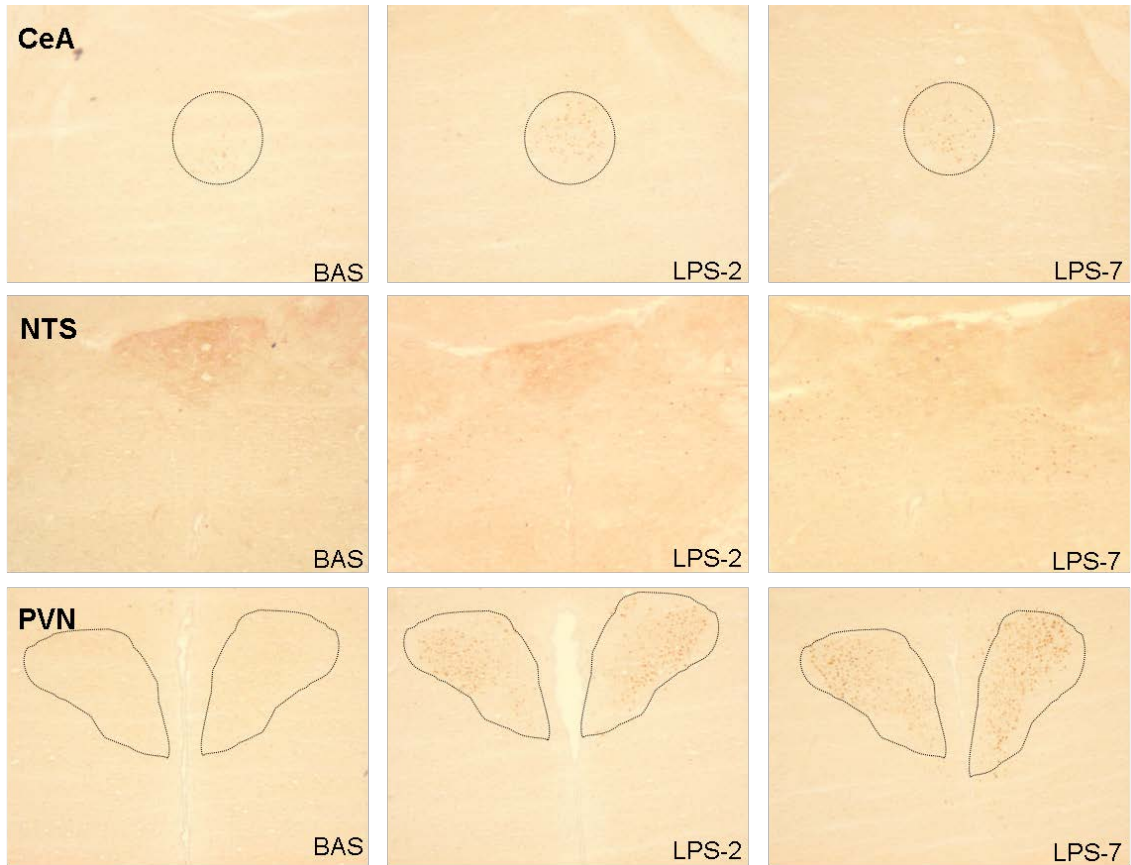
(5) Research Unit, Hospital Universitario Dr. Negrin, Las Palmas de Gran Canaria, Spain

(6) Critical Patient Translational Research Group, Department of Anesthesiology, Intensive Care and Pain Management, Hospital Clínico Universitario, Instituto de Investigación Sanitaria (IDIS), University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

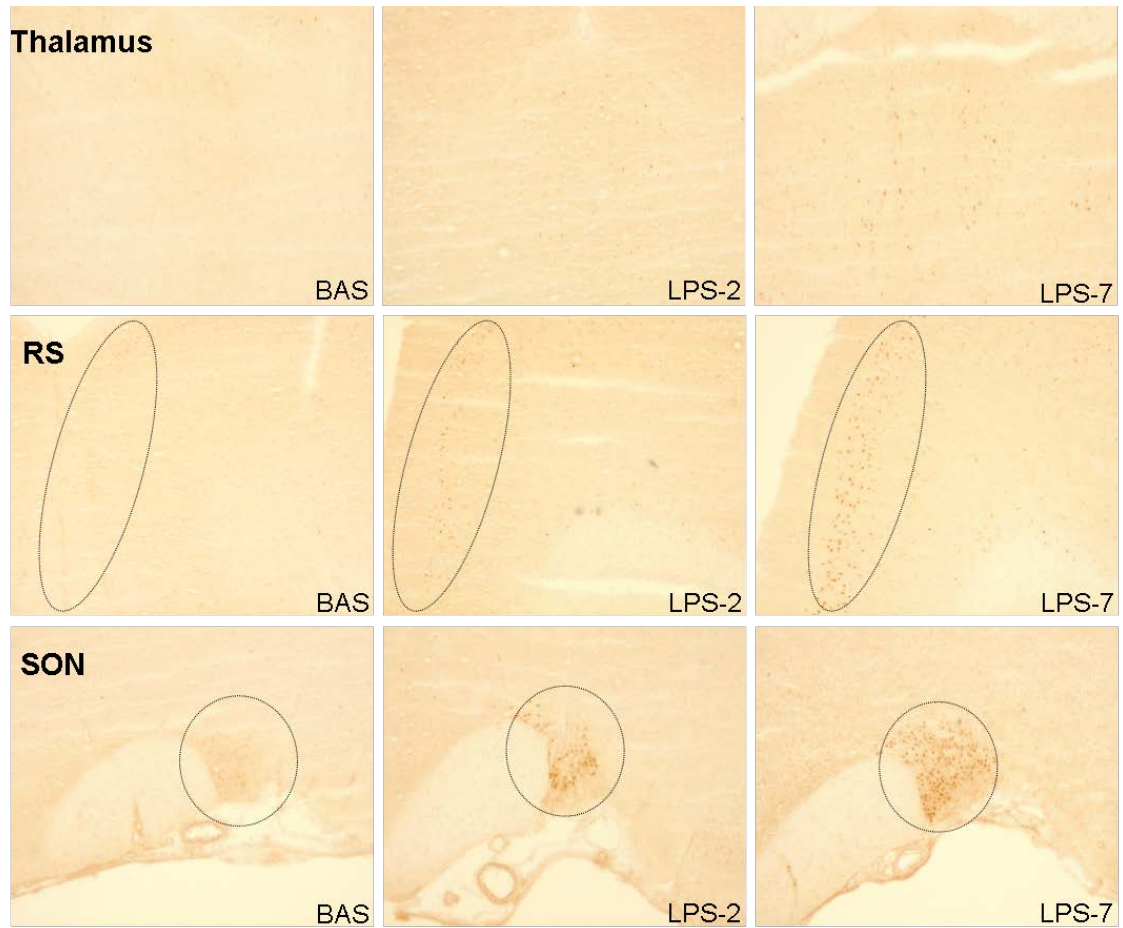
(7) Department of Respiratory Care, Massachusetts General Hospital, Boston, MA, USA

(8) Department of Anesthesiology, Harvard University, Boston, MA, USA

F1. Representative images of c-Fos-immunopositive cells in different areas of the brain corresponding to the quantification depicted in Figure 5 in the main text.



F2. Representative images of c-Fos-immunopositive cells in different areas of the brain corresponding to Figure 6 in the main text.



8. ANEXO II

OTRAS PUBLICACIONES



Organ crosstalk during acute lung injury, acute respiratory distress syndrome, and mechanical ventilation

Maria E. Quílez^a, Josefina López-Aguilar^{a,b}, and Lluís Blanch^{a,b}

Purpose of review

Multiple organ failure is the main cause of morbidity and mortality in acute lung injury (ALI) and acute respiratory distress syndrome (ARDS) patients. Moreover, survivors of both ALI and ARDS often show significant neurocognitive decline at discharge. These data suggest a deleterious organ crosstalk between lungs and distal organs. This article reviews the recent literature concerning the role of this organ crosstalk during ALI, ARDS, and mechanical ventilation, especially focusing on brain–lung communication.

Recent findings

Numerous pulmonary and extrapulmonary disorders could predispose critically ill patients to ALI and ARDS. Mechanical ventilation, although a lifesaving intervention, could contribute by modulating the mechanisms involved in the pathophysiology of lung damage and their impact on remote organs. Emerging clinical and experimental evidence supports the hypothesis of a multidirectional organ crosstalk between lungs and distal organs.

Summary

Organ crosstalk is an emerging area of research in lung disease in critically ill patients. The findings of these studies are clinically relevant and show the importance of an integrative approach in the management of critical patients. However, further studies are necessary to understand the complex interactions concurring in these pathologies.

Keywords

acute lung injury, inflammation, mechanical ventilation, organ crosstalk

INTRODUCTION

Acute lung injury (ALI) and its most severe form, acute respiratory distress syndrome (ARDS), are common in critically ill patients. Both syndromes are associated with high morbidity and mortality and constitute a major healthcare burden in intensive care units [1*].

Numerous pulmonary and nonpulmonary disorders (e.g., trauma and sepsis) could predispose critically ill patients to ALI and ARDS. The pathophysiology of both conditions includes inflammation of alveoli resulting in diffuse alveolar injury, recruitment of neutrophils to lung parenchyma, release of cytokines, and the loss of the alveolar–epithelial barrier. As a consequence of these phenomena, ALI and ARDS are characterized by severe hypoxemia and alterations in lung function that result from increased lung permeability. In addition, in recent years, numerous studies have established that long-term survivors of ALI/ARDS

often have significant neurocognitive and emotional morbidity, and decreased quality of life at hospital discharge.

The aim of this review is to update the recent information in the literature concerning the role of organ crosstalk, paying special attention to brain–lung communication, in critically ill patients with lung injury.

^aCIBER de Enfermedades Respiratorias, Instituto de Salud Carlos III, Madrid and ^bCritical Care Center, Corporació Sanitària i Universitària Parc Taulí, Sabadell, Spain

Correspondence to Lluís Blanch, MD, PhD, c. Parc Taulí, s/n. 08208 Sabadell, Barcelona, Spain. Tel: +34 687731269; e-mail: lblanch@tauli.cat

Curr Opin Crit Care 2012, 18:23–28

DOI:10.1097/MCC.0b013e32834ef3ea

KEY POINTS

- Organ crosstalk is an emerging, interesting, and clinically relevant field, in which the brain plays an essential role.
- The direct or differed damage of the central nervous system has detrimental effects on remote organs and systems, and could lead to multiple organ dysfunction in the critically ill patient.
- Mechanical ventilation may affect the central nervous system by modifying expression patterns in the brain, thus underlining the importance of an adequate ventilatory management to prevent worsening outcomes in the critical patient.
- The intrinsic pathways and biological mechanisms through which information from remote injured organs can reach the brain, and produce neurological or multiorgan impairment, remain to be elucidated.

FROM ACUTE LUNG INJURY, ACUTE RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME, AND MECHANICAL VENTILATION TO MULTIPLE ORGAN FAILURE

Although mechanical ventilation provides essential life support for critically ill patients, it can also cause or aggravate lung damage. This damage, called ventilator-induced lung injury (VILI), may result in pulmonary changes that mimic the clinical features of ALI and ARDS [2¹¹].

Several experimental and clinical studies have demonstrated that mechanical ventilation may trigger a biological response involving the release of inflammatory mediators that can aggravate lung injury and be propagated to distal organs, sometimes leading to systemic organ dysfunction. This set of biological processes is called biotrauma [3,4].

The use of inappropriate ventilatory patterns may cause changes in global and/or regional stress and strain in the lungs, which could result in cells releasing inflammatory mediators (mechanotransduction) and the disruption of the alveolar barrier. The increased permeability resulting from this structural damage can lead to edema and cyclical alveolar collapse and reopening [5].

This inflammatory cascade primarily initiated in the lungs is propagated into the circulation and can reach distal organs, playing a key role in the development of multiple organ dysfunction syndrome (MODS). In fact, MODS is the main cause of morbidity and mortality in ALI/ARDS patients, supporting the idea of a deleterious organ crosstalk between lungs and distal organs. Although the release of cytokines triggered by lung injury seems to be one of the most important mechanisms in the

development of extrapulmonary organ dysfunction, the intrinsic pathways through which the inflammatory mediators exert their detrimental effects have yet to be established (Fig. 1).

After an experimental study of alveolar stretch due to mechanical ventilation, Hegeman *et al.* [4] proposed that the activation of endothelial cells in distal organs is an essential step in the development of multiple organ failure. Moreover, some experimental studies and clinical trials in ALI/ARDS have shown that the application of protective ventilatory strategies is associated with a decrease in extrapulmonary organ dysfunction and mortality [6]. Imai *et al.* [7¹¹] found that injurious mechanical ventilation increased epithelial cell apoptosis in the kidney and small intestine and led to abnormal elevations of biochemical markers for organ dysfunction. These authors suggested that increased levels of inflammatory mediators and circulating proapoptotic soluble factors (such as soluble Fas ligand) may be involved in this process and lead to multiple organ dysfunction.

ORGAN CROSSTALK: EMERGING CLINICAL AND EXPERIMENTAL EVIDENCE

ARDS and acute kidney injury are frequent complications in critically ill patients with MODS. Pannu and Mehta [8¹¹] proposed a number of mechanisms to explain the effects of positive pressure ventilation on renal function, including a reduction in cardiac output, redistribution of intrarenal blood flow, stimulation of sympathetic and hormonal pathways, and release of systemic inflammatory mediators as a consequence of VILI. A prospective study by Ranieri *et al.* [9] found a higher incidence of renal failure in patients ventilated using conventional strategies than in those ventilated with a lung protective strategy [low tidal volume and high positive end-expiratory pressure (PEEP) ventilation]. This observation was confirmed in the randomized controlled Acute Respiratory Distress Syndrome Network trial [6]. Recent experimental data also suggest that the development of renal failure adversely affects lung function by altering the permeability of the pulmonary vessels. However, the clinical importance of this observation needs to be determined. Similarly, Guery *et al.* [10] found an increase in plasma TNF-alpha and gut permeability in a high tidal volume injury model, supporting the hypothesis of a crosstalk between the lungs and the gastrointestinal tract. Moreover, there is increasing evidence that prolonged rest or reduced activity of the diaphragm induced by mechanical ventilation triggers ventilator-induced diaphragm dysfunction. Hussain *et al.* [11] demonstrated that diaphragm

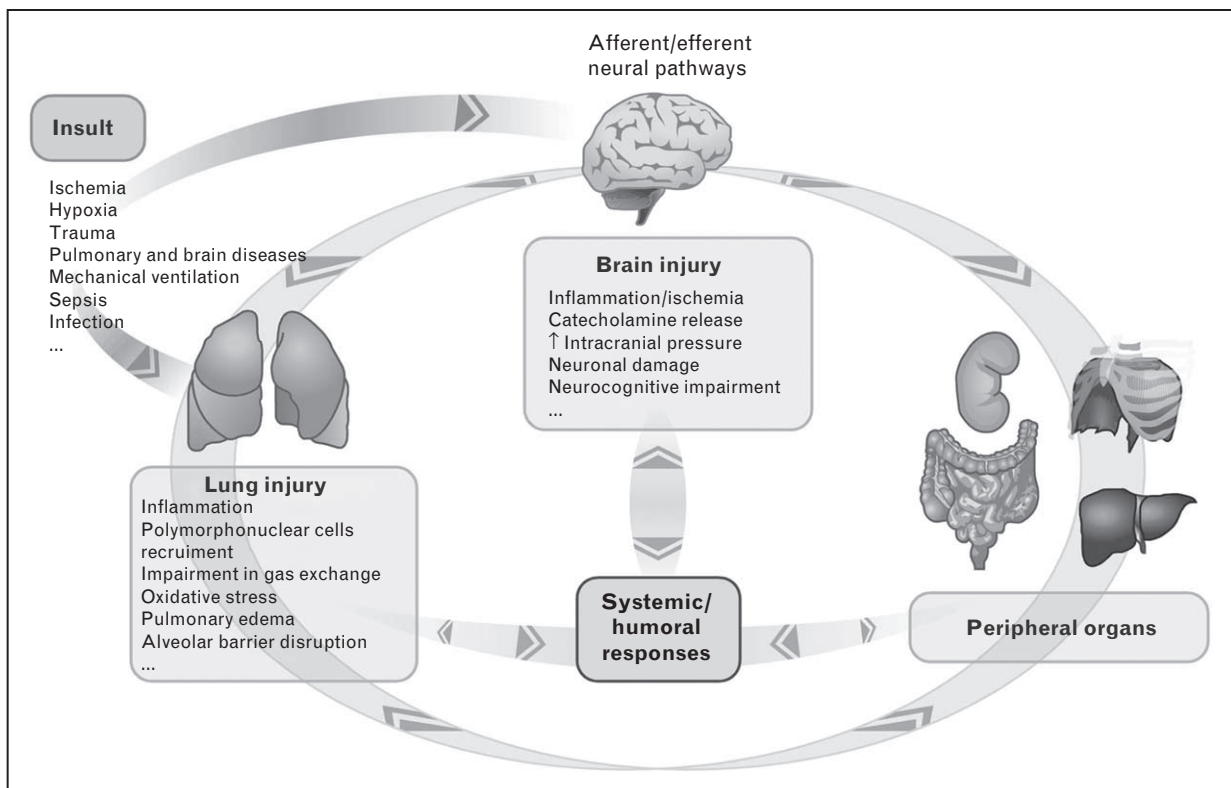


FIGURE 1. Schematic representation of organ crosstalk during acute lung injury, acute respiratory distress syndrome, and mechanical ventilation.

disuse leads to activation of the autophagy–lysosome pathway through oxidative stress and the induction of the FOXO1 transcription factor. Therefore, mechanical ventilation can have adverse effects in organs like muscles, intestines, and kidneys that are necessary for normal life.

Recently, studies in experimental models of isolated ventilated and perfused heart–lung blocks have demonstrated that the lung hemodynamics may interact with tidal ventilation to modulate lung injury [12]. Inflation of the lungs above their functional residual capacity results in an increase in pulmonary vascular resistance [13], and the increase in vascular resistance is largely the result of compression of the alveolar microcirculation by tidal increase in alveolar and thus extramural pressure. Tidal alveolar vessel compression is opposed by the alveolar vessel intramural pressure, which, everything else being equal, varies in parallel with left atrial pressure. In other words, the alveolar vessel compression from positive pressure ventilation is opposed by increases in left atrial pressure and is enhanced by decreases in left atrial pressure [14]. Recent data support the concept that lung vessels exposed to injurious ventilatory patterns behave like material prone to fatigue and failure in similar experimental conditions. Thus, it seems that both high and low capillary pressures should be avoided

to limit the risk of VILI [12,14]. Moreover, these effects are aggravated by ventilation at rapid respiratory rates with concomitant increases in pulmonary artery pressure [15^{*}] and by high cardiac output [16,17]. In this context, PEEP reduces transmural pressure (decreases strain) and attenuates edema formation and lung hemorrhage [18]. These data highlight the interactive nature of the processes and cofactors involved in the modulation of VILI, like global and/or regional pulmonary hemodynamics; the presence, type, and timing of secondary lung insults; and interactions between regional heterogeneity of pulmonary perfusion and regionally heterogeneous peak airspace strains. Lastly, these vascular variables also point to potential difficulties in designing appropriate trials of ‘lung protective’ ventilatory strategies.

THE IMPORTANCE OF BRAIN–LUNG CROSSTALK

Brain injury triggers extracerebral dysfunctions and its neurological sequels are the main causes of death or disability in this context [19]. Various authors have reported that a significant portion of patients with acute brain injury develop pulmonary complications, but the causes of these complications are unclear [20–23]. In a review published in 2005,

Pelosi *et al.* [20] categorize three major causes of pulmonary complications in these patients: neurogenic pulmonary edema, alterations in ventilation–perfusion mismatch, and structural parenchyma abnormalities. In addition, the authors emphasize the increased risk of ventilator-associated pneumonia in brain-injured patients and recommend some strategies (such as prone positioning or earlier weaning from mechanical ventilation) to avoid respiratory dysfunction or prevent lung infection. Careful management of brain-injured patients aims to both prevent respiratory failure and ameliorate neurologic outcome [24].

Brain injury may also predispose lungs to subsequent injurious mechanical or ischemic insults that increase susceptibility to respiratory failure. In a model of massive brain injury in rabbits, our group found increased vulnerability to VILI in brain-damaged rabbits compared with those with intact brains [25²²]. These findings might result from multiple mechanisms related to massive brain injury. One such mechanism is brain injury-triggered sympathetic activation, which correlates with the release of catecholamines. This increase in catecholamine levels leads to a phase characterized by hypertension, vasoconstriction, and increased systemic and pulmonary vascular resistance and may incite endothelial damage ultimately resulting in pulmonary edema. Moreover, models of experimental brain injury have also shown that neurokinins and neuropeptides also play a role in bronchoconstriction, mucosal edema, and leukocyte adhesion. Lastly, acute brain injury is associated with high levels of proinflammatory cytokines in the brain that may trigger the release of systemic inflammatory mediators and cause a severe systemic imbalance associated with an elevated risk of complications [26]. All together, clinical and experimental data support the idea that damage to the central nervous system can have detrimental effects on remote organs and systems; however, little is known about the mechanisms through which injury to distal organs may affect the brain [27].

In this sense, because clinical evidence suggests that pulmonary disorders may also worsen and trigger brain injury, resulting in distinctive poor neurocognitive outcomes, recent studies have focused on lung-to-brain communication [28]. Critical care patients who undergo long-term mechanical ventilation and ARDS survivors have distinctive neurological impairment including memory and cognitive decline at discharge [19,29]. Furthermore, Hopkins *et al.* [30²³] found that more than 20% of ARDS survivors had a reduced quality of life with a significantly elevated rate of depression and anxiety.

Again, the biological mechanisms involved in these outcomes remain to be elucidated.

In a recent experimental study in pigs, Heuer *et al.* [31] analyzed the mutual and synergistic effects of acute intracranial hypertension and ARDS on neuronal and pulmonary damage. Not only did they find that acute intracranial hypertension induced damage in healthy lungs and worsened lungs with preexisting lesions, but also they found that ARDS exacerbated cerebral damage during intracranial hypertension. These authors evaluated brain damage by examining the hippocampus, as this area is highly vulnerable to ischemic injury, trauma, or hypoxia. However, the design of the study did not allow them to determine whether ARDS or acute intracranial hypertension alone were able to cause hippocampal damage. Regardless of these unresolved issues, these results suggest the existence of organ crosstalk and hint at the knowledge that might be obtained from studying the molecular mediators in the brain.

In a first approach to investigate a potential neuronal response to injurious mechanical ventilation, Quilez *et al.* [1²⁴] assessed neuronal activation in a rat model of injurious mechanical ventilation. They measured the expression of c-fos protein in the brain to elucidate early neurological changes that might be associated to lung injury. The c-fos protein is a member of the family of immediate early genes and its expression increases quickly and often dramatically after a variety of stimuli and conditions (metabolic stress, ischemia, and inflammation) [32]; its role in the nervous system has been widely studied, and it is considered an early marker of neuronal activation. Quilez *et al.* [1²⁴] found only minimal differences in the systemic inflammatory response or lung function between rats ventilated with high tidal volume and those ventilated with low tidal volume; however, rats ventilated with high

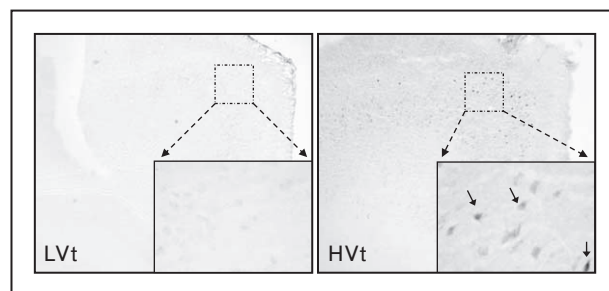


FIGURE 2. Representative images of c-fos immunostaining on rat brain. In an experimental model of mechanical ventilation in rats, high tidal volume (HVt) ventilation increased c-fos expression in the retrosplenial cortex compared with low tidal volume (LVt). Black arrows indicate some examples of c-fos-positive cells. Data from Quilez *et al.* [1²⁴].

tidal volume had increased c-fos expression in discrete areas of the brain (Fig. 2). Although the design of this study makes it impossible to ascertain the mechanism connecting lung overstretching and increased c-fos expression, these data suggest a synergistic role of high tidal volume in the activation of these brain areas, underlining the importance of ventilatory settings [1[■]].

Several aspects of ventilation management in critical care have implications in both brain-injured and lung-injured patients. Ventilatory strategy may affect the central nervous system by modifying the inflammatory response, as occurs in other distal organs, and by altering regional cerebral blood flow and oxygenation. Regarding the relevance of oxygen depletion in cerebral tissue and cognitive impairment, hypoxic damage to hippocampal structures is clearly associated with memory impairment. In a porcine model of ALI, Bickenbach *et al.* [33] showed that the inflammatory response with low tidal volume ventilation was more attenuated compared with high tidal volume ventilation, resulting in improved cerebral tissue oxygenation and cerebral metabolism.

Sepsis-associated brain injury has been widely studied [34]. Recently, Stevens and Puybasset [28] suggested that some of the effects of sepsis on the brain may be relevant to brain dysfunction encountered in ALI/ARDS, given the mechanistic and epidemiologic similitude between the two pathologies. Similarly, Villar *et al.* [35[■]] hypothesize that injurious mechanical ventilation could be responsible for the perpetuation and worsening of sepsis in some patients and for the development of sepsis-like syndromes in others. In an earlier study [36], the same group found that mechanical ventilation in the absence of a previous infection induced an increase in the TLR4-signaling pathway, a receptor implicated in signal transduction events induced by endotoxin. Thus, they reason that, in the absence of a previous pulmonary infection, the epithelial and endothelial damage induced by mechanical ventilation could be responsible for the translocation of soluble mediators and may start early inflammatory responses similar to those evoked by endotoxin or during infections.

Although many other studies have investigated the neuroimmune crosstalk, usually focused on the response of the central nervous system to systemic inflammation [34,37,38], the mechanisms through which information from remote injured organs can reach the brain are poorly understood (Fig. 1).

Lungs and brain share some identical biochemical mediators of inflammation that can be released to the bloodstream and sensed at a distance through the interaction with specific receptors. As

the blood–brain barrier protects the brain against the immune system, the circumventricular organs have been postulated to act as communicating structures between the brain and the bloodstream [19].

The autonomic nervous system should also be considered in this neuroimmune crosstalk. Peripheral inflammatory signals can reach the central nervous system through the vagus nerve, which in turn controls the systemic inflammatory response (the cholinergic inflammatory pathway) [39[■]]. To gain insight into this matter, Dos Santos *et al.* [40[■]] performed an experimental study, demonstrating that the stimulation of the cholinergic anti-inflammatory reflex may be an alternative treatment for ventilated patients with ARDS/ALI [39[■],40[■]].

CONCLUSION

Data from recent studies demonstrate a perceptible crosstalk between distal damaged organs. These findings may have clinical relevance in the management and outcome of critically ill patients; however, further studies are necessary to elucidate the mechanisms involved in this communication.

Acknowledgements

The authors would like to thank the grants from CIBER de Enfermedades Respiratorias (Instituto de Salud Carlos III) and Fundació Parc Taulí.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no competing interests.

REFERENCES AND RECOMMENDED READING

Papers of particular interest, published within the annual period of review, have been highlighted as:

- of special interest
- of outstanding interest

Additional references related to this topic can also be found in the Current World Literature section in this issue (p. 106).

1. Quílez ME, Fuster G, Villar J, *et al.* Injurious mechanical ventilation affects neuronal activation in ventilated rats. *Crit Care* 2011; 15:R124. In this experimental study, the authors show a link between injurious mechanical ventilation and early neuronal activation in particular brain areas.
2. Dreyfuss D, Saumon G. Ventilator-induced lung injury: lessons from experimental studies. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:294–323. This nice review widely describes the complications associated to mechanical ventilation.
3. Gharib SA, Liles WC, Klaff LS, Altemeier WA. Noninjurious mechanical ventilation activates a proinflammatory transcriptional program in the lung. *Physiol Genomics* 2009; 37:239–248.
4. Hegeman MA, Hennus MP, Heijnen CJ, *et al.* Ventilator-induced endothelial activation and inflammation in the lung and distal organs. *Crit Care* 2009; 13:R182.
5. Ricard JD, Dreyfuss D, Saumon G. Ventilator-induced lung injury. *Curr Opin Crit Care* 2002; 8:12–20.
6. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2000; 342:1301–1308.

7. Imai Y, Parodo J, Kajikawa O, *et al*. Injurious mechanical ventilation and end-organ epithelial cell apoptosis and organ dysfunction in an experimental model of acute respiratory distress syndrome. *JAMA* 2003; 289:2104–2112.

In this brilliant experimental work, the authors showed that an injurious ventilatory strategy led to epithelial cell apoptosis in the kidney and small intestine accompanied by evidence of organ dysfunction.

8. Pannu N, Mehta RL. Effect of mechanical ventilation on the kidney. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 2004; 18:189–203.

An excellent review on the effect of mechanical ventilation on the kidney.

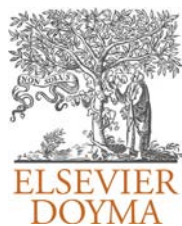
9. Ranieri VM, Giunta F, Suter PM, Slutsky AS. Mechanical ventilation as a mediator of multisystem organ failure in acute respiratory distress syndrome. *JAMA* 2000; 284:43–44.
10. Guery BP, Welsh DA, Viget NB, *et al*. Ventilation-induced lung injury is associated with an increase in gut permeability. *Shock* 2003; 19:559–563.
11. Hussain SN, Mofarrahi M, Sigala I, *et al*. Mechanical ventilation-induced diaphragm disuse in humans triggers autophagy. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 182:1377–1386.
12. Marini JJ, Hotchkiss JR, Broccard AF. Bench-to bedside review: microvascular and airspace linkage in ventilator-induced lung injury. *Crit Care* 2003; 7:435–444.
13. Fu Z, Costello ML, Tsukimoto K, *et al*. High lung volume increases stress failure in pulmonary capillaries. *J Appl Physiol* 1992; 73:123–133.
14. Broccard AF, Vannay C, Feihl F, Schaller MD. Impact of low pulmonary vascular pressure on ventilator-induced lung injury. *Crit Care Med* 2002; 30:2183–2190.
15. Hotchkiss JR Jr, Blanch L, Murias G, *et al*. Effects of decreased respiratory frequency on ventilator-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161 (2 Pt 1):463–468.
- The authors demonstrated that decreasing respiratory frequency and limiting peak pulmonary artery pressure and flow diminished lung damage for a given ventilatory pattern in an experimental study.
16. Broccard AF, Hotchkiss JR, Kuwiyama N, *et al*. Consequences of vascular flow on lung injury induced by mechanical ventilation. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157 (6 Pt 1):1935–1942.
17. Lopez-Aguilar J, Piacentini E, Villagra A, *et al*. Contributions of vascular flow and pulmonary capillary pressure to ventilator-induced lung injury. *Crit Care Med* 2006; 34:1106–1112.
18. Piacentini E, Lopez-Aguilar J, Garcia-Martin C, *et al*. Effects of vascular flow and PEEP in a multiple hit model of lung injury in isolated perfused rabbit lungs. *J Trauma* 2008; 65:147–153.
19. Gonzalez R, Marti-Sistac O, Blanch L, Lopez-Aguilar J. Bench-to bedside review: brain–lung interaction in the critically ill – a pending issue revisited. *Crit Care* 2007; 11:216.
20. Pelosi P, Severgnini P, Chiaranda M. An integrated approach to prevent and treat respiratory failure in brain-injured patients. *Curr Opin Crit Care* 2005; 11:37–42.
21. Holland MC, Mackersie RC, Morabito D, *et al*. The development of acute lung injury is associated with worse neurologic outcome in patients with severe traumatic brain injury. *J Trauma* 2003; 55:106–111.
22. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, *et al*. The American–European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149 (3 Pt 1): 818–824.
23. Kahn JM, Caldwell EC, Deem S, *et al*. Acute lung injury in patients with subarachnoid hemorrhage: incidence, risk factors, and outcome. *Crit Care Med* 2006; 34:196–202.

24. Martinez-Perez M, Bernabe F, Pena R, *et al*. Effects of expiratory tracheal gas insufflation in patients with severe head trauma and acute lung injury. *Intensive Care Med* 2004; 30:2021–2027.

25. Lopez-Aguilar J, Villagra A, Bernabe F, *et al*. Massive brain injury enhances lung damage in an isolated lung model of ventilator-induced lung injury. *Crit Care Med* 2005; 33:1077–1083.

In this experimental rabbit model, the authors evidenced that massive brain injury increases lung vulnerability to subsequent injurious mechanical or ischemia–reperfusion insults, increasing the risk of clinical posttransplant graft failure.

26. Lopez-Aguilar J, Quilez ME, Marti-Sistac O, *et al*. Early physiological and biological features in three animal models of induced acute lung injury. *Intensive Care Med* 2010; 36:347–355.
27. Pelosi P, Rocco PR. The lung and the brain: a dangerous cross-talk. *Crit Care* 2011; 15:168.
28. Stevens RD, Puybasset L. The brain–lung–brain axis. *Intensive Care Med* 2011; 37:1054–1056.
29. Pustavoitau A, Stevens RD. Mechanisms of neurologic failure in critical illness. *Crit Care Clin* 2008; 24:1–24; vii.
30. Hopkins RO, Weaver LK, Collingridge D, *et al*. Two-year cognitive, emotional, and quality-of-life outcomes in acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171:340–347.
- In this clinical study, the authors show that ARDS survivors present long-term significant neurocognitive impairment and decreased quality of life after hospital discharge.
31. Heuer JF, Pelosi P, Hermann P, *et al*. Acute effects of intracranial hypertension and ARDS on pulmonary and neuronal damage: a randomized experimental study in pigs. *Intensive Care Med* 2011; 37:1182–1191.
32. Pozas E, Ballabriga J, Planas AM, Ferrer I. Kainic acid-induced excitotoxicity is associated with a complex c-Fos and c-Jun response which does not preclude either cell death or survival. *J Neurobiol* 1997; 33:232–246.
33. Bickenbach J, Zoremba N, Fries M, *et al*. Low tidal volume ventilation in a porcine model of acute lung injury improves cerebral tissue oxygenation. *Anesth Analg* 2009; 109:847–855.
34. Sharshar T, Hopkinson NS, Orlikowski D, Annane D. Science review: the brain in sepsis – culprit and victim. *Crit Care* 2005; 9:37–44.
35. Villar J, Blanco J, Zhang H, Slutsky AS. Ventilator-induced lung injury and sepsis: two sides of the same coin? *Minerva Anesthesiol* 2011; 77:647–653.
- In this interesting study, the authors hypothesize that injurious mechanical ventilation could be responsible for the perpetuation and worsening of sepsis and for the development of a sepsis-like syndrome in critical patients based on current scientific evidence.
36. Villar J, Cabrera NE, Casula M, *et al*. Mechanical ventilation modulates TLR4 and IRAK-3 in a noninfectious, ventilator-induced lung injury model. *Respir Res* 2010; 11:27.
37. Hopkins SJ. Central nervous system recognition of peripheral inflammation: a neural, hormonal collaboration. *Acta Biomed* 2007; 78 (Suppl. 1):231–247.
38. Quan N. Brain’s firewall: blood–brain barrier actively regulates neuroimmune information flow. *Brain Behav Immun* 2006; 20:447–448.
39. Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature* 2002; 420:853–859.
- ■ ■
- This key study describes how the nervous system modulates acute inflammation, paying special attention to the cholinergic inflammatory pathways.
40. Dos Santos CC, Shan Y, Akram A, *et al*. Neuroimmune regulation of ventilator-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183:471–482.
- In this study, the authors suggest that stimulation of the cholinergic anti-inflammatory pathway may attenuate lung inflammatory injury induced by mechanical ventilation with high tidal volume.



PUESTA AL DÍA EN MEDICINA INTENSIVA: VENTILACIÓN MECÁNICA EN DIFERENTES ENTIDADES

Interacción pulmón-cerebro en el paciente ventilado mecánicamente

J. López-Aguilar^{a,b,c,d}, M.S. Fernández-Gonzalo^{a,e}, M. Turon^{a,e}, M.E. Quílez^c,
V. Gómez-Simón^{a,b,d}, M.M. Jódar^{e,f}, L. Blanch^{a,b,c,d,*} y GT-IRA de la SEMICYUC

^a Fundació Parc Taulí, Corporació Sanitària Parc Taulí, Sabadell, Barcelona, España

^b Institut Universitari Parc Taulí, Universitat Autònoma de Barcelona, Campus d' Excel·lència Internacional, Bellaterra, Barcelona, España

^c Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España

^d Servicio de Medicina Intensiva, Hospital de Sabadell, Corporació Sanitària Parc Taulí, Sabadell, Barcelona, España

^e Departament de Psicologia Clínica i de la Salut, Universitat Autònoma de Barcelona, Campus d' Excel·lència Internacional, Bellaterra, Barcelona, España

^f Servicio de Neurología, Hospital de Sabadell, Corporació Sanitària Parc Taulí, Sabadell, Barcelona, España

Recibido el 18 de septiembre de 2012; aceptado el 11 de octubre de 2012

PALABRAS CLAVE

Lesión pulmonar aguda;
Síndrome de distrés respiratorio agudo;
Ventilación mecánica;
Alteraciones neuropsicológicas y cognitivas;
Interacción pulmón-cerebro;
Síndrome confusional;
Delirio;
Sistema nervioso central;
Unidad de cuidados intensivos

Resumen Los pacientes con lesión pulmonar aguda o síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA) ingresados en unidades de cuidados intensivos (UCI) presentan alteraciones neuropsicológicas que en la mayoría de los casos se extienden más allá de la fase aguda, acarreado importantes déficits en su calidad de vida. El objetivo de la presente puesta al día es profundizar en el análisis de la compleja interacción entre el pulmón y el cerebro en el enfermo crítico sometido a ventilación mecánica. Inicialmente se describen las alteraciones neuropsicológicas asociadas tanto durante la fase aguda de estancia en la UCI como al alta hospitalaria. En un segundo apartado se analiza la interacción pulmón-cerebro durante la ventilación mecánica y, finalmente, se explora la etiología y los mecanismos que dan lugar a las alteraciones neurológicas que se observan en estos pacientes. El manejo del paciente crítico requiere de una visión integradora enfocada a minimizar los efectos deletéreos a corto, medio o largo plazo.

© 2012 Elsevier España, S.L. y SEMICYUC. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: Lblanch@tauli.cat (L. Blanch).

KEYWORDS

Acute lung injury;
Acute respiratory
distress syndrome;
Mechanical
ventilation;
Neuropsychological
and cognitive
impairment;
Lung-brain
interaction;
Confusional
syndrome;
Delirium;
Central nervous
system;
Intensive care unit

Lung-brain interaction in the mechanically ventilated patient

Abstract Patients with acute lung injury or acute respiratory distress syndrome (ARDS) admitted to the ICU present neuropsychological alterations, which in most cases extend beyond the acute phase and have an important adverse effect upon quality of life. The aim of this review is to deepen in the analysis of the complex interaction between lung and brain in critically ill patients subjected to mechanical ventilation. This update first describes the neuropsychological alterations occurring both during the acute phase of ICU stay and at discharge, followed by an analysis of lung-brain interactions during mechanical ventilation, and finally explores the etiology and mechanisms leading to the neurological disorders observed in these patients. The management of critical patients requires an integral approach focused on minimizing the deleterious effects over the short, middle or long term.

© 2012 Elsevier España, S.L. and SEMICYUC. All rights reserved.

Introducción

Los importantes avances desarrollados en el manejo del paciente crítico a lo largo de la última década han mejorado los índices de supervivencia de los mismos pero han puesto de relevancia la necesidad de velar también por reducir la morbilidad de estos pacientes. La lesión pulmonar aguda (LPA) y el síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA) se asocian aún a elevados índices de morbilidad^{1,2}. Entre otras, los supervivientes de estas enfermedades presentan alteraciones neuropsicológicas que se extienden más allá de la fase aguda y de la estancia hospitalaria y conducen a importantes déficits en su calidad de vida que pueden perdurar a lo largo del tiempo. Estas secuelas neurocognitivas generan no solo un problema socio sanitario, sino también económico dada la gran cantidad de recursos que deben destinarse a compensar las situaciones de dependencia de los supervivientes. Por ello, el análisis de la compleja interacción entre órganos en el enfermo crítico es de crucial importancia para garantizar la optimización del abordaje clínico de estos pacientes y para minimizar las complicaciones derivadas de su manejo.

Las alteraciones cerebrales adquiridas en el paciente crítico son fruto tanto de las múltiples disfunciones orgánicas derivadas de la enfermedad como de su manejo durante la estancia en la unidad de cuidados intensivos (UCI)³. En la presente puesta al día focalizaremos nuestro interés en el eje pulmón-cerebro con la finalidad de identificar qué factores implicados en la LPA y en su manejo ventilatorio pueden conllevar la aparición de alteraciones neuropsicológicas. El objetivo es revisar la literatura más reciente relativa a la comunicación pulmón-cerebro en el paciente crítico, no neurológico. En un primer enfoque se describirán, desde el punto de vista clínico, las alteraciones psicológicas y neuropsicológicas que se observan en el paciente crítico y que ocurren tanto durante la fase aguda de estancia en la UCI como al alta hospitalaria. En un segundo apartado se analizarán los factores implicados en la interacción pulmón-cerebro ahondando tanto en los mecanismos fisiopatológicos relacionados con la enfermedad como en los derivados de su manejo clínico, prestando especial interés al papel que tiene la ventilación mecánica (VM). Para

finalizar, se explorarán las posibles vías de señalización y las bases moleculares e histopatológicas de las alteraciones neurológicas descritas.

Alteraciones neuropsicológicas en el paciente crítico

El manejo médico y quirúrgico del paciente ingresado en la UCI se asocia frecuentemente con la presencia de déficits neurocognitivos¹, incluso en aquellos pacientes sin alteraciones cognitivas previas. Además, recientemente, se ha puesto de manifiesto que la VM, a pesar de ser una herramienta de soporte vital para el paciente crítico, se relaciona con frecuencia con el desarrollo de déficits neuropsicológicos¹.

Es posible distinguir 2 tipos de alteraciones neurocognitivas en el paciente crítico que recibe VM asociadas tanto a la fase aguda como a la fase crónica. El síndrome confusional es el cuadro neuropsiquiátrico más comúnmente observado durante la fase aguda del paciente crítico^{4,5}. Se caracteriza por una alteración del nivel de alerta con disminución en la habilidad de focalizar, mantener y/o cambiar la atención, cambios en otras funciones cognitivas y/o el desarrollo de alteraciones perceptivas. Suele manifestarse durante un corto periodo de tiempo y muestra un curso fluctuante a lo largo del día. El síndrome confusional en pacientes de la UCI es una de las causas más frecuentemente relacionadas con la presencia de deterioro cognitivo a largo plazo⁶⁻⁸. En un estudio reciente se ha demostrado que en pacientes con VM la duración del síndrome confusional es, en sí misma, un predictor independiente del déficit cognitivo a los 3 y 12 meses tras el alta hospitalaria⁹. La prevalencia del síndrome confusional se sitúa, aproximadamente, entre un 50-70% en los pacientes de la UCI no ventilados mecánicamente y aumenta hasta un 60-80% en los pacientes ventilados mecánicamente¹⁰⁻¹³.

El interés por el estudio de los déficits cognitivos observados a largo plazo y asociados a la estancia en la UCI es relativamente reciente. Atendiendo a la última revisión de Hopkins y Jackson sobre el tema¹⁴, actualmente solo

existen 10 cohortes con un total de 450 pacientes donde se han estudiado estos déficits neuropsicológicos en pacientes críticos tras su estancia en la UCI¹⁵. Los estudios se centraron en pacientes con SDRA^{15,16}, LPA¹⁷, en pacientes con fallo respiratorio¹⁸, un solo estudio con pacientes de UCI médicas y otros 2 estudios incluían todos los pacientes críticos de la UCI^{19,20}. Los datos sugieren que al menos un tercio de los pacientes de la UCI desarrollan déficits neurocognitivos crónicos de una magnitud similar al déficit cognitivo observado en las demencias leves y moderadas²¹. Esta prevalencia aumenta hasta en un 80% en aquellos pacientes que durante su estancia hospitalaria presentan SDRA¹⁵.

Las alteraciones neuropsicológicas asociadas a la estancia en la UCI han sido descritas en pacientes con SDRA tanto al alta hospitalaria como a los 2 meses tras el alta¹⁹, a los 6 meses, al año¹⁶, a los 2 años¹⁸ e incluso hasta 6 años después de la estancia en la UCI. Tales secuelas cognitivas suelen mejorar durante los primeros 6-12 meses posteriores al alta hospitalaria²² pero tienden a permanecer estables y a cronificarse a partir del año. Se ha observado que la prevalencia de estas alteraciones afectan a un 78% de los pacientes en el momento del alta hospitalaria, a un 47% a los 2 años y a un 25% a los 6 años tras la estancia en la UCI¹.

Los déficits neuropsicológicos que pueden observarse en los supervivientes de la UCI se relacionan con una amplia variedad de dominios cognitivos. Hopkins et al.¹ refieren que, en general, en la población crítica de la UCI, el déficit de memoria es la alteración que se presenta con más frecuencia, seguida del déficit en las funciones ejecutivas, la velocidad de procesamiento de la información y las alteraciones en la capacidad atencional. La comparación de las secuelas cognitivas entre grupos de pacientes distintos resulta una tarea difícil debido a las diferencias metodológicas de los estudios, a la discrepancia en el consenso de definición de secuelas cognitivas, a la variabilidad de pruebas neuropsicológicas administradas, al tiempo de seguimiento, al tipo de paciente en la UCI y a la gravedad de la enfermedad crítica. No obstante, algunos autores han sugerido un perfil neuropsicológico común a los pacientes que han permanecido ingresados en estas unidades. Larson et al.²² observaron un peor rendimiento en el funcionamiento intelectual general, las funciones ejecutivas, la velocidad de procesamiento de la información y la memoria verbal en pacientes con SDRA. Estos resultados concuerdan con otros estudios previos realizados en pacientes con SDRA y con supervivientes de UCI médicas^{8,21}.

El paciente ventilado mecánicamente, además de presentar alteraciones cognitivas, también puede manifestar síntomas psicopatológicos como ansiedad y depresión^{23,24}. Los estudios sobre el tema estiman la prevalencia de depresión y ansiedad de un 10 a un 58% en este tipo de pacientes. Hopkins et al.²⁵ observaron que aproximadamente un 23% de los pacientes con SDRA presentaban síntomas de ansiedad al año y a los 2 años tras la estancia en el hospital y un 16% de esos mismos pacientes presentaron depresión al año del alta, aumentando hasta un 23% a los 2 años. La presencia de depresión y de secuelas cognitivas al año tras la estancia hospitalaria resultaron ser los mejores predictores de depresión a largo plazo. Este estudio sugiere una posible relación entre neurocognición y trastornos afectivos en los supervivientes de la UCI. No obstante, Larson et al. no

encontraron influencia de las alteraciones emocionales en los resultados neurocognitivos en los pacientes de la UCI²².

Por el contrario, las consecuencias de los déficits neurocognitivos y psicopatológicos crónicos sí han sido ampliamente estudiadas. Hoy en día, se sabe que todos estos déficits tienen un gran impacto en la vida de los pacientes y contribuyen a disminuir su capacidad para llevar a cabo las actividades de la vida diaria, empeoran la calidad de vida de pacientes y familiares, suponen un aumento de los costes médicos asociados a su tratamiento y dificultan la vuelta al trabajo y a su vida diaria previa al ingreso en la UCI^{1,18,26}. En un estudio de seguimiento de supervivientes de enfermedades críticas cerca del 50% de los pacientes no habían podido volver al trabajo debido principalmente a los efectos de los déficits cognitivos 6 años después de su estancia en la UCI¹⁷.

Factores implicados en la interacción pulmón-cerebro durante la ventilación mecánica

El fracaso respiratorio agudo que requiere soporte con VM se produce por una gran variedad de factores, incluyendo enfermedades propias pulmonares, shock, necesidad de protección de la vía aérea o aplicación transitoria después de un procedimiento quirúrgico mayor²⁷. El descenso de la presión pleural durante la respiración espontánea se sustituye por la aplicación de una presión positiva generada por el respirador a fin de suministrar un volumen corriente (VT) eficaz para oxigenar y eliminar anhídrido carbónico que sea confortable para el paciente. A pesar de ser una herramienta de soporte vital para muchos pacientes críticos, la VM no está exenta de complicaciones y *per se* puede agravar e incluso inducir lesión pulmonar *de novo*, pudiendo llegar a propagarse a otros órganos, entre ellos el cerebro, y conduciendo finalmente al fallo multiorgánico.

Años de investigaciones han derivado en un descenso progresivo de la mortalidad de estos pacientes. En la actualidad, se utilizan patrones de ventilación que protegen al pulmón del daño asociado a la excesiva sobredistensión producida por elevados VT y presiones alveolares, a la vez que minimizan patrones de reclutamiento y desreclutamiento alveolar durante cada ciclo respiratorio^{28,29}. Además, la liberación de la VM debe conllevar una eficiente interacción paciente-ventilador ya que de lo contrario el paciente presenta frecuentes episodios de inadaptación y disincronías, prolongación del tiempo de VM, episodios de miedo, ansiedad, pánico y síndrome confusional, necesidad de aumentar sedantes y opioides y, finalmente, incremento tanto de la mortalidad^{30,31} como de las secuelas neuropsicológicas^{23,24}. Un estudio reciente ha mostrado que la presencia de disnea es frecuente, intensa y se asocia a fenómenos de ansiedad en pacientes de intensivos sometidos a VM³². La intrínseca relación fisiológica y clínica entre ansiedad, disnea y dolor es un denominador común en pacientes de Medicina Intensiva donde médicos y enfermeros tratan de acortar tiempos de estancia y exposición a la VM aunque ello conlleve el riesgo de exponer a estos pacientes a estímulos disneicos por periodos prolongados.

Una buena adaptación del paciente intubado a la VM conlleva una adecuación de los parámetros ventilatorios a fin de normalizar el intercambio gaseoso y

proporcionar confort al paciente. Este aspecto conlleva un preciso análisis de la fisiología respiratoria, la mecánica del sistema respiratorio y de los requerimientos metabólicos del paciente. Estudios recientes han demostrado que los pacientes en VM presentan de forma frecuente asincronías en su interacción con el ventilador (modo y parámetros). Estas asincronías acontecen durante todo el ciclo respiratorio y están relacionadas con el trigger inspiratorio, la duración de la inspiración del ventilador, el paso de inspiración a espiración, el atrapamiento aéreo y la presencia de esfuerzos inspiratorios no efectivos durante todo el ciclo respiratorio. Un análisis detallado de estas asincronías, sus mecanismos de aparición y su tratamiento puede encontrarse en artículos recientes³³⁻³⁷.

La relación entre las distintas formas de asincronía del paciente con el respirador y su posible relación con el desarrollo de disnea, de alteraciones neurocognitivas tanto a corto como a medio plazo y la presencia de síndrome confusional durante el ingreso en Medicina Intensiva no es muy bien conocida. Estudios recientes demuestran que las asincronías paciente-ventilador pueden presentarse al inicio de la VM relacionadas con el nivel de sedación y al inicio de la liberación de la VM³⁸. La presencia de asincronías se ha asociado a una mayor duración de la VM, mayor incidencia de traqueostomía, mayor estancia en la UCI y se ha sugerido un incremento de mortalidad^{34,35}. Un estudio reciente de nuestro grupo donde se registraron de forma continua y durante todo el periodo de VM las asincronías paciente-ventilador demostró que estas acontecen en cualquier momento del día como de la estancia del paciente³⁶. Por lo tanto, y al igual que la disnea, puede tratarse de un fenómeno muy infravalorado en Medicina Intensiva.

Factores asociados al desarrollo de disnea y asincronías paciente-ventilador son la ventilación a elevada presión transpulmonar, que puede darse tanto en respiración espontánea como asistida, el atrapamiento aéreo por limitación al flujo aéreo espiratorio y la disminución de los volúmenes pulmonares^{32,39}. Aunque estas relaciones nacen de la fisiología básica aplicada al paciente con enfermedades respiratorias crónicas, es perfectamente extrapolable al enfermo en VM con elevado estímulo ventilatorio al inicio de una insuficiencia respiratoria grave, al paciente ventilado con excesivos volúmenes minuto y al paciente que debe interaccionar con un ventilador mecánico. Resulta interesante remarcar que la disnea resultante de la «falta de aire» (air hunger) asociada a la hipercapnia es más intensa que aquella que resulta de un trabajo respiratorio elevado en normocapnia⁴⁰. Esta avidez de aire produce la activación de las vías aferentes, a través de quimio o barorreceptores, denotando un incremento de la señal en la resonancia magnética en las áreas cerebrales relacionadas con el sistema límbico y conlleva trastornos psicológicos, emocionales y alteraciones de memoria⁴¹.

El modelo neurofisiológico de respuesta al disconfort respiratorio (disnea) que puede acontecer en el enfermo crítico responde a estímulos neurales que alcanzan el córtex somatosensorial y proceden de distintos orígenes: 1) impulsos del tronco cerebral y centros corticales motores; 2) vías aferentes procedentes de mecanosensores respiratorios situados en los músculos respiratorios, el pulmón, la vía aérea y la caja torácica; 3) disminución de los reflejos inhibidores hacia el centro respiratorio desde el vago y las vías aferentes

de los nervios intercostales como resultado de la ventilación protectora que limita el VT y 4) la activación del sistema límbico y paralímbico cuyo resultado es el desarrollo de un conjunto de alteraciones neuropsicológicas y delirio por parte del paciente crítico sometido a VM^{26,32,39,42}.

Etiología, vías de señalización y mecanismos implicados en la interacción pulmón-cerebro durante la ventilación mecánica

Diversos autores han descrito el desarrollo de complicaciones pulmonares en pacientes con lesión cerebral aguda que se relacionan con un aumento en la susceptibilidad del pulmón a la VM⁴³⁻⁴⁵ y un incremento del riesgo de fallo respiratorio. Estos estudios avalan la existencia de un eje de comunicación cerebro-pulmón⁴⁶⁻⁴⁸ que podría estar relacionado con la liberación de catecolaminas, neurokininas y neuropéptidos.

La comunicación en sentido contrario, partiendo desde órganos periféricos, y en concreto del pulmón, hasta el sistema nervioso central (SNC) ha sido menos explorada, a pesar de que el deterioro cognitivo que se observa en el paciente crítico, a corto o a largo plazo, es una manifestación aguda cerebral secundaria a mecanismos patofisiológicos subyacentes cuyo origen puede situarse en la periferia.

La etiología de los déficits neurocognitivos observados tras la estancia en la UCI probablemente presenta una causa multifactorial²¹. Diferentes factores de riesgo como la hipoxemia¹⁵, el uso de sedantes y/o analgésicos, la hipotensión¹⁶, la desregularización de los niveles de glucosa en sangre, la duración de la VM⁴⁹, el tiempo de estancia en la UCI y la presencia de síndrome confusional^{8,21} han sido asociados con los déficits neuropsicológicos descritos en los pacientes post-UCI. El aumento del nivel de citocinas y de indicadores inflamatorios también se ha relacionado con un aumento del déficit cognitivo y, más en concreto, con el déficit de memoria⁵⁰. Por este motivo, la exploración de las vías de señalización implicadas en esta comunicación se sitúa entre las líneas de investigación más innovadoras en este campo.

Existe una relación causal entre los cambios en el consumo de oxígeno en el parénquima cerebral y el deterioro cognitivo y cabe tener en cuenta que la estrategia ventilatoria puede ocasionar modificaciones en el flujo sanguíneo regional y en la oxigenación cerebral. En este sentido Bickenbach et al.^{51,52} han descrito en un modelo porcino de LPA cómo la aplicación de la VM con VT bajo se traduce en una mejoría en el metabolismo y la oxigenación tisular cerebral sin analizar sus consecuencias a nivel cognitivo. También hay que destacar en este punto la asociación entre la hipoxia y las lesiones a nivel del hipocampo⁵³. El hipocampo es la estructura cerebral más relacionada con la capacidad de aprendizaje y la memoria y, al mismo tiempo, es sabido que las neuronas del hipocampo son las más vulnerables a la hipoxia^{54,55}. No solo la hipoxia conlleva alteraciones neuro-patológicas, también existe evidencia de que el SDRA y la LPA pueden provocar alteraciones estructurales en el hipocampo, con el consiguiente déficit de memoria secundario, y con independencia del grado de hipoxemia⁵⁶. Además, se han descrito

otras alteraciones estructurales en el cerebro entre las cuales destacan el aumento del tamaño ventricular y la atrofia generalizada⁵⁷. Todas estas lesiones estructurales han sido relacionadas con el déficit neuropsicológico a largo plazo observado en los supervivientes de la UCI⁵⁸.

Múltiples estudios clínicos y experimentales han demostrado que la VM *per se* desencadena una respuesta biológica que cursa con infiltración de monocitos y macrófagos y liberación de mediadores inflamatorios que puede agravar la lesión pulmonar y favorecer la propagación a órganos distales. La encefalopatía séptica ha sido ampliamente estudiada^{59,60} y algunos autores han sugerido que puede cursar por mecanismos comunes a la disfunción cerebral observada en pacientes con LPA y SDRA, tanto por sus similitudes mecánicas como epidemiológicas («*sepsis-like syndrome*»)⁶¹.

A pesar de ello, las vías intrínsecas a través de las cuales los mediadores inflamatorios pueden ejercer sus efectos deletéreos en otros órganos y, en concreto, las vías de comunicación pulmón-cerebro son aun desconocidas. Durante la VM se produce una estimulación de los mecanorreceptores (barorreceptores/receptores de estiramiento) o quimiorreceptores ubicados en el pulmón cuya información alcanza el SNC por diversas vías⁶². El uso de una estrategia ventilatoria inadecuada desencadena la liberación de determinados mediadores inflamatorios⁴³ o metabolitos al torrente sanguíneo que es detectada por el SNC⁶².

El cerebro puede responder alterando la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE)⁴⁶ o modificando el flujo sanguíneo cerebral. Estos mismos estímulos también pueden ocasionar alteraciones neuronales. En un primer abordaje, Quilez et al.⁶³ evaluaron la activación neuronal en un modelo de VM lesiva en ratas. En ese trabajo los autores analizaron los niveles del factor de transcripción de c-fos, miembro de la familia de los genes de expresión temprana y considerado marcador rápido de activación neuronal, para valorar cambios neuronales tempranos que podrían estar asociados con la LPA inducida por la VM en diversas áreas cerebrales. Los autores no encontraron grandes diferencias en la respuesta inflamatoria o en la función pulmonar entre los grupos ventilados con VT elevado y VT bajo. Sin embargo, los animales ventilados con alto VT presentaron mayor expresión de la proteína c-fos en determinadas áreas cerebrales, lo cual sugiere un papel sinérgico del volumen elevado y subraya la importancia que puede tener la estrategia ventilatoria más allá de su efecto directo sobre el pulmón⁶³.

Las vías de comunicación entre la periferia y el SNC⁶⁴⁻⁶⁶, y viceversa, son diversas (fig. 1). En primer lugar cabría destacar la vía humoral, a través de la cual los mediadores inflamatorios, la interleuquina-6 (IL-6), el factor de necrosis tumoral α (TNF α) e IL-1 β , generados por el reclutamiento de monocitos o macrófagos en la periferia, podrían alcanzar directamente el cerebro. La BHE funciona como una barrera protectora y es impermeable a una gran mayoría de moléculas, incluidas las células del sistema inmune^{66,67}, pero los mediadores pueden alcanzar el cerebro a través de los órganos circunventriculares (OCV) o el plexo coroideo⁶⁸⁻⁷⁰ que están desprovistos de BHE (fig. 1). Pulmón y cerebro comparten idénticos mediadores inflamatorios y estos, al ser liberados a la circulación, pueden también entrar en contacto con el cerebro a través de la interacción con

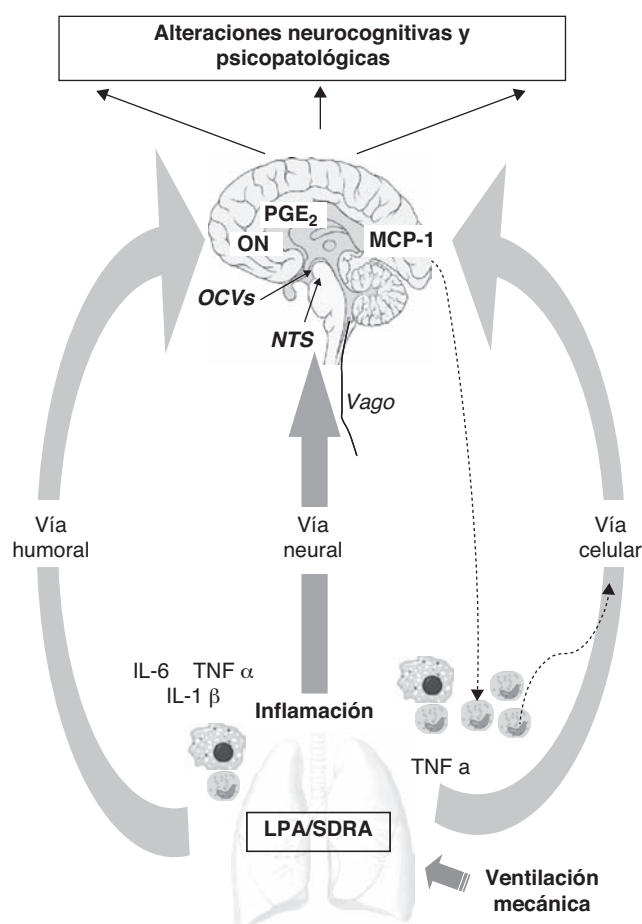


Figura 1 Vías de comunicación entre la periferia (pulmón) y el sistema nervioso central (SNC) durante la ventilación mecánica. El sistema nervioso central recibe información de la periferia del organismo a través de 3 vías: humoral, neural y celular. 1) El reclutamiento de monocitos o macrófagos en el pulmón incrementa los niveles de mediadores inflamatorios (IL-6, TNF α , IL-1 β) que por vía humoral pueden alcanzar directamente el SNC a través de los órganos circunventriculares (OCV) sin necesidad de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE). También coexisten otros mecanismos de transporte activo que generan liberación de PGE₂ y de óxido nítrico a nivel cerebral. 2) Las aferencias de la vía vagal alcanzan el cerebro a través del núcleo del tracto solitario (NTS). 3) La vía celular está directamente regulada por la liberación del TNF α en el pulmón que estimula la liberación de MCP-1 a nivel cerebral, que a su vez es capaz de aumentar el reclutamiento de monocitos activados tanto a nivel del SNC como de la periferia.

receptores específicos a nivel del SNC. En esta primera vía también coexisten mecanismos de transporte activo, así como otros relacionados con la activación directa del endotelio cerebral y que generan liberación de prostaglandina E₂ (PGE₂) y de óxido nítrico (ON) (fig. 1).

Estos mismos mediadores inflamatorios pueden estimular el nervio vago (vía neural) cuyas aferencias llegan a alcanzar el cerebro a nivel del núcleo del tracto solitario (NTS)^{70,71}. Por lo tanto, el sistema nervioso autónomo también debería ser considerado en este crosstalk neuroimmune ya que la vía colinérgica antiinflamatoria⁷² puede controlar a su

vez la respuesta inflamatoria sistémica. Con el objeto de profundizar en el papel de esta vía Dos Santos et al. realizaron un estudio experimental⁷³ donde demostraron que, así como la inhibición del vago potenciaba la LPA, la estimulación del reflejo colinérgico antiinflamatorio reducía la misma. Estos autores proponen la estimulación vagal como tratamiento alternativo para los pacientes ventilados de LPA/SDRA^{72,73}, aunque sus efectos a nivel del SNC no han sido explorados.

Aún hay que mencionar una tercera vía que está directamente regulada por la liberación del TNF α (vía celular) a nivel periférico, que genera la liberación de proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1) a nivel cerebral⁷⁴ y que retroalimenta el reclutamiento de monocitos activados tanto a nivel cerebral como periférico multiplicando la respuesta.

Conclusiones

El paciente crítico sometido a VM está expuesto a sufrir alteraciones pulmonares y cerebrales que van más allá de las propias de la enfermedad que ha provocado su ingreso en el Servicio de Medicina Intensiva. La etiología de los déficits neurocognitivos observados tras la estancia en la UCI es multifactorial. A falta de métodos diagnósticos más específicos, los profesionales al cuidado de estos enfermos deben tener los conocimientos fisiológicos necesarios para definir aquellas intervenciones terapéuticas que minimicen los daños pulmonares y cerebrales añadidos a su enfermedad original. Es necesaria una optimización del patrón ventilatorio enfocada a buscar tanto la eficiencia de la ventilación como de la interacción paciente-ventilador, lo que conducirá a minimizar las alteraciones neurocognitivas antes descritas. La aplicación de una visión integradora durante el manejo del paciente crítico garantizará que las intervenciones que se realizan no tengan efectos deletéreos que puedan producir secuelas a corto, medio o largo plazo.

Financiación

Fundació La Marató de TV3 (exp.112810), Proyecto Neurocontent: IPT-300000-2010-030 (Ministerio de Ciencia e Innovación), Fundació MAPFRE, Fundació Parc Taulí.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Hopkins RO, Jackson JC. Long-term neurocognitive function after critical illness. *Chest*. 2006;130:869-78.
- Villar J, Blanco J, Añón JM, Santos-Bouza A, Blanch L, Ambrós A, et al. The ALIEN study: incidence and outcome of acute respiratory distress syndrome in the era of lung protective ventilation. *Intensive Care Med*. 2011;37:1932-41.
- Pustavoitau A, Stevens RD. Mechanisms of neurologic failure in critical illness. *Crit Care Clin*. 2008;24:1-24.
- Pandharipande PP, Pun BT, Herr DL, Maze M, Girard TD, Miller RR, et al. Effect of sedation with dexmedetomidine vs lorazepam on acute brain dysfunction in mechanically ventilated patients: the MENDS randomized controlled trial. *JAMA*. 2007;298:2644-53.
- Pandharipande P, Cotton BA, Shintani A, Thompson J, Pun BT, Morris Jr JA, et al. Prevalence and risk factors for development of delirium in surgical and trauma intensive care unit patients. *J Trauma*. 2008;65:34-41.
- Gunther ML, Jackson JC, Ely EW. The cognitive consequences of critical illness: practical recommendations for screening and assessment. *Crit Care Clin*. 2007;23:491-506.
- MacLulich AM, Beaglehole A, Hall RJ, Meagher DJ. Delirium and long-term cognitive impairment. *Int Rev Psychiatry*. 2009;21:30-42.
- Jackson JC, Gordon SM, Hart RP, Hopkins RO, Ely EW. The association between delirium and cognitive decline: a review of the empirical literature. *Neuropsychol Rev*. 2004;14:87-98.
- Girard TD, Jackson JC, Pandharipande PP, Pun BT, Thompson JL, Shintani AK, et al. Delirium as a predictor of long-term cognitive impairment in survivors of critical illness. *Crit Care Med*. 2010;38:1513-20.
- Ely EW, Margolin R, Francis J, May L, Truman B, Dittus R, et al. Evaluation of delirium in critically ill patients: validation of the Confusion Assessment Method for the Intensive Care Unit (CAM-ICU). *Crit Care Med*. 2001;29:1370-9.
- Pandharipande P, Costabile S, Cotton B, Morris J, Frizzell J, Fraley M, et al. Prevalence of Delirium in Surgical Icu Patients: 167-S. *Crit Care Med*. 2005;33:A45.
- Micek ST, Anand NJ, Laible BR, Shannon WD, Kollef MH. Delirium as detected by the CAM-ICU predicts restraint use among mechanically ventilated medical patients. *Crit Care Med*. 2005;33:1260-5.
- Ely EW, Inouye SK, Bernard GR, Gordon S, Francis J, May L, et al. Delirium in mechanically ventilated patients: validity and reliability of the confusion assessment method for the intensive care unit (CAM-ICU). *JAMA*. 2001;286:2703-10.
- Hopkins RO, Jackson JC. Short- and long-term cognitive outcomes in intensive care unit survivors. *Clin Chest Med*. 2009;30:143-53.
- Hopkins RO, Weaver LK, Pope D, Orme JF, Bigler ED, Larson-LOHR V. Neuropsychological sequelae and impaired health status in survivors of severe acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160:50-6.
- Hopkins RO, Weaver LK, Chan KJ, Orme Jr JF. Quality of life, emotional, and cognitive function following acute respiratory distress syndrome. *J Int Neuropsychol Soc*. 2004;10:1005-17.
- Rothhäusler HB, Ehrentraut S, Stoll C, Schelling G, Kapfhammer HP. The relationship between cognitive performance and employment and health status in long-term survivors of the acute respiratory distress syndrome: results of an exploratory study. *Gen Hosp Psychiatry*. 2001;23:90-6.
- Hopkins RO, Weaver LK, Collingridge D, Parkinson RB, Chan KJ, Orme Jr JF. Two-year cognitive, emotional, and quality-of-life outcomes in acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171:340-7.
- Jones C, Griffiths RD, Slater T, Benjamin KS, Wilson S. Significant cognitive dysfunction in non-delirious patients identified during and persisting following critical illness. *Intensive Care Med*. 2006;32:923-6.
- Sukantarat KT, Burgess PW, Williamson RC, Brett SJ. Prolonged cognitive dysfunction in survivors of critical illness. *Anaesthesia*. 2005;60:847-53.
- Jackson JC, Hart RP, Gordon SM, Shintani A, Truman B, May L, et al. Six-month neuropsychological outcome of medical intensive care unit patients. *Crit Care Med*. 2003;31:1226-34.

22. Larson MJ, Weaver LK, Hopkins RO. Cognitive sequelae in acute respiratory distress syndrome patients with and without recall of the intensive care unit. *J Int Neuropsychol Soc.* 2007;13:595–605.
23. Jubran A, Lawm G, Duffner LA, Collins EG, Lanuza DM, Hoffman LA, et al. Post-traumatic stress disorder after weaning from prolonged mechanical ventilation. *Intensive Care Med.* 2010;36:2030–7.
24. Jubran A, Lawm G, Kelly J, Duffner LA, Gungor G, Collins EG, et al. Depressive disorders during weaning from prolonged mechanical ventilation. *Intensive Care Med.* 2010;36:828–35.
25. Hopkins RO, Key CW, Suchyta MR, Weaver LK, Orme Jr JF. Risk factors for depression and anxiety in survivors of acute respiratory distress syndrome. *Gen Hosp Psychiatry.* 2010;32:147–55.
26. Hopkins RO, Herridge MS. Quality of life, emotional abnormalities, and cognitive dysfunction in survivors of acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. *Clin Chest Med.* 2006;27:679–89.
27. Wunsch H, Linde-Zwirble WT, Angus DC, Hartman ME, Milbrandt EB, Kahn JM. The epidemiology of mechanical ventilation use in the United States. *Crit Care Med.* 2010;38:1947–53.
28. Briel M, Meade M, Mercat A, Brower RG, Talmor D, Walter SD, et al. Higher vs lower positive end-expiratory pressure in patients with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: systematic review and meta-analysis. *JAMA.* 2010;303:865–73.
29. Albaiceta GM, Blanch L. Beyond volutrauma in ARDS: the critical role of lung tissue deformation. *Crit Care.* 2011;15:304.
30. Meade M, Guyatt G, Cook D, Griffith L, Sinuff T, Kergl C, et al. Predicting success in weaning from mechanical ventilation. *Chest.* 2001;120:400S–24S.
31. Ely EW, Shintani A, Truman B, Speroff T, Gordon SM, Harrell Jr FE, et al. Delirium as a predictor of mortality in mechanically ventilated patients in the intensive care unit. *JAMA.* 2004;291:1753–62.
32. Schmidt M, Demoule A, Polito A, Porchet R, Aboab J, Siami S, et al. Dyspnea in mechanically ventilated critically ill patients. *Crit Care Med.* 2011;39:2059–65.
33. Kondili E, Prinianakis G, Georgopoulos D. Patient-ventilator interaction. *Br J Anaesth.* 2003;91:106–19.
34. De Wit M, Miller KB, Green DA, Ostman HE, Gennings C, Epstein SK. Ineffective triggering predicts increased duration of mechanical ventilation. *Crit Care Med.* 2009;37:2740–5.
35. Thille AW, Rodriguez P, Cabello B, Lellouche F, Brochard L. Patient-ventilator asynchrony during assisted mechanical ventilation. *Intensive Care Med.* 2006;32:1515–22.
36. Blanch L, Sales B, Montanya J, Lucangelo U, Garcia-Esquirol O, Villagra A, et al. Validation of the Better Care® system to detect ineffective efforts during expiration in mechanically ventilated patients: a pilot study. *Intensive Care Med.* 2012;38:772–80.
37. Correger E, Murias G, Chacon E, Estruga A, Sales B, López-Aguilar J, et al. Interpretation of ventilator curves in patients with acute respiratory failure. *Med Intensiva.* 2012;36:294–306.
38. De Wit M, Pedram S, Best AM, Epstein SK. Observational study of patient-ventilator asynchrony and relationship to sedation level. *J Crit Care.* 2009;24:74–80.
39. Gilman SA, Banzett RB. Physiologic changes and clinical correlates of advanced dyspnea. *Curr Opin Support Palliat Care.* 2009;3:93–7.
40. Banzett RB, Pedersen SH, Schwartzstein RM, Lansing RW. The affective dimension of laboratory dyspnea: air hunger is more unpleasant than work/effort. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;177:1384–90.
41. Evans KC, Banzett RB, Adams L, McKay L, Frackowiak RS, Corfield DR. BOLD fMRI identifies limbic, paralimbic, and cerebellar activation during air hunger. *J Neurophysiol.* 2002;88:1500–11.
42. O'Donnell DE, Ora J, Webb KA, Laveneziana P, Jensen D. Mechanisms of activity-related dyspnea in pulmonary diseases. *Respir Physiol Neurobiol.* 2009;167:116–32.
43. López-Aguilar J, Quilez ME, Martí-Sistac O, García-Martín C, Fuster G, Puig F, et al. Early physiological and biological features in three animal models of induced acute lung injury. *Intensive Care Med.* 2010;36:347–55.
44. López-Aguilar J, Villagrà A, Bernabé F, Murias G, Piacentini E, Real J, et al. Massive brain injury enhances lung damage in an isolated lung model of ventilator-induced lung injury. *Crit Care Med.* 2005;33:1077–83.
45. Martínez-Pérez M, Bernabé F, Peña R, Fernández R, Nahum A, Blanch L. Effects of expiratory tracheal gas insufflation in patients with severe head trauma and acute lung injury. *Intensive Care Med.* 2004;30:2021–7.
46. Gonzalvo R, Martí-Sistac O, Blanch L, López-Aguilar J. Bench-to-bedside review: brain-lung interaction in the critically ill—a pending issue revisited. *Crit Care.* 2007;11:216.
47. Quilez ME, López-Aguilar J, Blanch L. Organ crosstalk during acute lung injury, acute respiratory distress syndrome, and mechanical ventilation. *Curr Opin Crit Care.* 2012;18:23–8.
48. Stevens RD, Puybasset L. The brain-lung-brain axis. *Intensive Care Med.* 2011;37:1054–6.
49. Jackson JC, Girard TD, Gordon SM, Thompson JL, Shintani AK, Thomason JW, et al. Long-term cognitive and psychological outcomes in the awakening and breathing controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;182:183–91.
50. Reichenberg A, Yirmiya R, Schuld A, Kraus T, Haack M, Morag A, et al. Cytokine-associated emotional and cognitive disturbances in humans. *Arch Gen Psychiatry.* 2001;58:445–52. <http://dx.doi.org/10.1001/archpsyc.58.5.445>.
51. Bickenbach J, Zoremba N, Fries M, Dembinski R, Doering R, Ogawa E, et al. Low tidal volume ventilation in a porcine model of acute lung injury improves cerebral tissue oxygenation. *Anesth Analg.* 2009;109:847–55.
52. Bickenbach J, Biener I, Czaplík M, Nolte K, Dembinski R, Marx G, et al. Neurological outcome after experimental lung injury. *Respir Physiol Neurobiol.* 2011;179:174–80. <http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2011.08.003>.
53. López-Pérez SJ, Morales-Villagrán A, Ventura-Valenzuela J, Medina-Ceja L. Short- and long-term changes in extracellular glutamate and acetylcholine concentrations in the rat hippocampus following hypoxia. *Neurochem Int.* 2012;61:258–65.
54. Li M, Bertout JA, Ratcliffe SJ, Eckenhoff MF, Simon MC, Floyd TF. Acute anemia elicits cognitive dysfunction and evidence of cerebral cellular hypoxia in older rats with systemic hypertension. *Anesthesiology.* 2010;113:845–58.
55. Neves G, Cooke SF, Bliss TV. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat Rev Neurosci.* 2008;9:65–75.
56. Janz DR, Abel TW, Jackson JC, Gunther ML, Heckers S, Ely EW. Brain autopsy findings in intensive care unit patients previously suffering from delirium: a pilot study. *J Crit Care.* 2010;25:538.e7–12.
57. Fries M, Bickenbach J, Henzler D, Beckers S, Dembinski R, Selhaus B, et al. S-100 protein and neurohistopathologic changes in a porcine model of acute lung injury. *Anesthesiology.* 2005;102:761–7.
58. Hopkins RO, Gale SD, Weaver LK. Brain atrophy and cognitive impairment in survivors of Acute Respiratory Distress Syndrome. *Brain Inj.* 2006;20:263–71.

59. Iacobone E, Bailly-Salin J, Polito A, Friedman D, Stevens RD, Sharshar T. Sepsis-associated encephalopathy and its differential diagnosis. *Crit Care Med.* 2009;37:S331–6.
60. Ventrice EA, Martí-Sistac O, Gonzalvo R, Villagrà A, López-Aguilar J, Blanch L. Molecular and biophysical mechanisms and modulation of ventilator-induced lung injury. *Med Intensiva.* 2007;31:73–82.
61. Villar J, Cabrera NE, Casula M, Flores C, Valladares F, Díaz-Flores L, et al. Mechanical ventilation modulates TLR4 and IRAK-3 in a non-infectious, ventilator-induced lung injury model. *Respir Res.* 2010;11:27.
62. Dos Santos CC, Slutsky AS. Mechanotransduction, ventilator-induced lung injury and multiple organ dysfunction syndrome. *Intensive Care Med.* 2000;26:638–42.
63. Quilez ME, Fuster G, Villar J, Flores C, Martí-Sistac O, Blanch L, et al. Injurious mechanical ventilation affects neuronal activation in ventilated rats. *Crit Care.* 2011;15:R124.
64. Capuron L, Miller AH. Immune system to brain signaling: neuropsychopharmacological implications. *Pharmacol Ther.* 2011;130:226–38.
65. Hopkins SJ. Central nervous system recognition of peripheral inflammation: a neural, hormonal collaboration. *Acta Biomed.* 2007;78:231–47.
66. Quan N, Banks WA. Brain-immune communication pathways. *Brain Behav Immun.* 2007;21:727–35.
67. Quan N. Brain's firewall: blood-brain barrier actively regulates neuroimmune information flow. *Brain Behav Immun.* 2006;20:447–8.
68. Plotkin SR, Banks WA, Kastin AJ. Comparison of saturable transport and extracellular pathways in the passage of interleukin-1 alpha across the blood-brain barrier. *J Neuroimmunol.* 1996;67:41–7.
69. Rivest S, Lacroix S, Vallières L, Nadeau S, Zhang J, Laflamme N. How the blood talks to the brain parenchyma and the paraventricular nucleus of the hypothalamus during systemic inflammatory and infectious stimuli. *Proc Soc Exp Biol Med.* 2000;223:22–38.
70. Konsman JP, Parnet P, Dantzer R. Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications. *Trends Neurosci.* 2002;25:154–9.
71. Watkins LR, Goehler LE, Relton JK, Tartaglia N, Silbert L, Martin D, et al. Blockade of interleukin-1 induced hyperthermia by subdiaphragmatic vagotomy: evidence for vagal mediation of immune-brain communication. *Neurosci Lett.* 1995;183:27–31.
72. Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature.* 2002;420:853–9.
73. Dos Santos CC, Shan Y, Akram A, Slutsky AS, Haitsma JJ. Neuroimmune regulation of ventilator-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;183:471–82.
74. D'Mello C, Le T, Swain MG. Cerebral microglia recruit monocytes into the brain in response to tumor necrosis factor alpha signaling during peripheral organ inflammation. *J Neurosci.* 2009;29:2089–102.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. SEMICYUC, [*Intensive medicine in Spain*]. Med Intensiva, 2011. **35**(2): p. 92-101.
2. Lopez-Aguilar, J., et al., [*Lung-brain interaction in the mechanically ventilated patient*]. Med Intensiva, 2013. **37**(7): p. 485-92.
3. Hopkins, R.O. and J.C. Jackson, *Short- and long-term cognitive outcomes in intensive care unit survivors*. Clin Chest Med, 2009. **30**(1): p. 143-53, ix.
4. Jackson, J.C., et al., *Six-month neuropsychological outcome of medical intensive care unit patients*. Crit Care Med, 2003. **31**(4): p. 1226-34.
5. Hopkins, R.O., et al., *Quality of life, emotional, and cognitive function following acute respiratory distress syndrome*. J Int Neuropsychol Soc, 2004. **10**(7): p. 1005-17.
6. Hopkins, R.O., et al., *Neuropsychological sequelae and impaired health status in survivors of severe acute respiratory distress syndrome*. Am J Respir Crit Care Med, 1999. **160**(1): p. 50-6.
7. Bickenbach, J., et al., *Neurological outcome after experimental lung injury*. Respir Physiol Neurobiol, 2011. **179**(2-3): p. 174-80.
8. Hopkins, R.O. and J.C. Jackson, *Long-term neurocognitive function after critical illness*. Chest, 2006. **130**(3): p. 869-78.
9. Hopkins, R.O., et al., *Two-year cognitive, emotional, and quality-of-life outcomes in acute respiratory distress syndrome*. Am J Respir Crit Care Med, 2005. **171**(4): p. 340-7.
10. Larson, M.J., L.K. Weaver, and R.O. Hopkins, *Cognitive sequelae in acute respiratory distress syndrome patients with and without recall of the intensive care unit*. J Int Neuropsychol Soc, 2007. **13**(4): p. 595-605.
11. Jubran, A., et al., *Post-traumatic stress disorder after weaning from prolonged mechanical ventilation*. Intensive Care Med, 2010. **36**(12): p. 2030-7.
12. Jubran, A., et al., *Depressive disorders during weaning from prolonged mechanical ventilation*. Intensive Care Med, 2010. **36**(5): p. 828-35.
13. Ely, E.W., et al., *Evaluation of delirium in critically ill patients: validation of the Confusion Assessment Method for the Intensive Care Unit (CAM-ICU)*. Crit Care Med, 2001. **29**(7): p. 1370-9.
14. Girard, T.D., et al., *Delirium as a predictor of long-term cognitive impairment in survivors of critical illness*. Crit Care Med, 2010. **38**(7): p. 1513-20.
15. Jackson, J.C., et al., *Long-term cognitive and psychological outcomes in the awakening and breathing controlled trial*. Am J Respir Crit Care Med, 2010. **182**(2): p. 183-91.
16. Pustavoitau, A. and R.D. Stevens, *Mechanisms of neurologic failure in critical illness*. Crit Care Clin, 2008. **24**(1): p. 1-24, vii.
17. Reichenberg, A., et al., *Cytokine-associated emotional and cognitive disturbances in humans*. Arch Gen Psychiatry, 2001. **58**(5): p. 445-52.
18. Herridge, M.S., et al., *One-year outcomes in survivors of the acute respiratory distress syndrome*. N Engl J Med, 2003. **348**(8): p. 683-93.
19. Rubenfeld, G.D., et al., *Incidence and outcomes of acute lung injury*. N Engl J Med, 2005. **353**(16): p. 1685-93.
20. Ashbaugh, D.G., et al., *Acute respiratory distress in adults*. Lancet, 1967. **2**(7511): p. 319-23.
21. Bernard, G.R., et al., *The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination*. Am J Respir Crit Care Med, 1994. **149**(3 Pt 1): p. 818-24.
22. Ranieri, V.M., et al., *Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition*. JAMA, 2012. **307**(23): p. 2526-33.
23. Ranieri, V.M., et al., *Effect of mechanical ventilation on inflammatory mediators in patients with acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial*. JAMA, 1999. **282**(1): p. 54-61.

24. Vaneker, M., et al., *Low-tidal-volume mechanical ventilation induces a toll-like receptor 4-dependent inflammatory response in healthy mice*. *Anesthesiology*, 2008. **109**(3): p. 465-72.
25. Wolthuis, E.K., et al., *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): p. R1.
26. Tremblay, L.N. and A.S. Slutsky, *Ventilator-induced lung injury: from the bench to the bedside*. *Intensive Care Med*, 2006. **32**(1): p. 24-33.
27. Muniz-Albaiceta, G., *[Pressure-volume curves in acute pulmonary injury]*. *Med Intensiva*, 2009. **33**(5): p. 243-50.
28. Amato, M.B., et al., *Effect of a protective-ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress syndrome*. *N Engl J Med*, 1998. **338**(6): p. 347-54.
29. Amato, M.B., et al., *Driving pressure and survival in the acute respiratory distress syndrome*. *N Engl J Med*, 2015. **372**(8): p. 747-55.
30. Dreyfuss, D., et al., *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**(5): p. 1159-64.
31. Ventrice, E.A., et al., *[Molecular and biophysical mechanisms and modulation of ventilator-induced lung injury]*. *Med Intensiva*, 2007. **31**(2): p. 73-82.
32. Slutsky, A.S. and L.N. Tremblay, *Multiple system organ failure. Is mechanical ventilation a contributing factor?* *Am J Respir Crit Care Med*, 1998. **157**(6 Pt 1): p. 1721-5.
33. Meduri, G.U., et al., *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. **107**(4): p. 1062-73.
34. Marik, P.E., *Aspiration pneumonitis and aspiration pneumonia*. *N Engl J Med*, 2001. **344**(9): p. 665-71.
35. Briel, M., et al., *Higher vs lower positive end-expiratory pressure in patients with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: systematic review and meta-analysis*. *JAMA*, 2010. **303**(9): p. 865-73.
36. Brower, R.G., et al., *Higher versus lower positive end-expiratory pressures in patients with the acute respiratory distress syndrome*. *N Engl J Med*, 2004. **351**(4): p. 327-36.
37. Meade, M.O., et al., *Ventilation strategy using low tidal volumes, recruitment maneuvers, and high positive end-expiratory pressure for acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial*. *JAMA*, 2008. **299**(6): p. 637-45.
38. Mercat, A., et al., *Positive end-expiratory pressure setting in adults with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial*. *JAMA*, 2008. **299**(6): p. 646-55.
39. Villar, J., et al., *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. **34**(5): p. 1311-8.
40. Hall, N.G., et al., *Bactericidal function of alveolar macrophages in mechanically ventilated rabbits*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2006. **34**(6): p. 719-26.
41. Lachmann, R.A., et al., *High positive end-expiratory pressure levels promote bacterial translocation in experimental pneumonia*. *Intensive Care Med*, 2007. **33**(10): p. 1800-4.
42. Murphy, D.B., et al., *Adverse ventilatory strategy causes pulmonary-to-systemic translocation of endotoxin*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000. **162**(1): p. 27-33.
43. Nahum, A., et al., *Effect of mechanical ventilation strategy on dissemination of intratracheally instilled *Escherichia coli* in dogs*. *Crit Care Med*, 1997. **25**(10): p. 1733-43.
44. Matute-Bello, G., C.W. Frevert, and T.R. Martin, *Animal models of acute lung injury*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008. **295**(3): p. L379-99.

45. Vernooy, J.H., et al., *Intratracheal instillation of lipopolysaccharide in mice induces apoptosis in bronchial epithelial cells: no role for tumor necrosis factor-alpha and infiltrating neutrophils*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001. **24**(5): p. 569-76.
46. Whitehead, T.C., et al., *Effect of mechanical ventilation on cytokine response to intratracheal lipopolysaccharide*. *Anesthesiology*, 2004. **101**(1): p. 52-8.
47. Imanaka, H., et al., *Ventilator-induced lung injury is associated with neutrophil infiltration, macrophage activation, and TGF-beta 1 mRNA upregulation in rat lungs*. *Anesth Analg*, 2001. **92**(2): p. 428-36.
48. Bickenbach, J., et al., *Low tidal volume ventilation in a porcine model of acute lung injury improves cerebral tissue oxygenation*. *Anesth Analg*, 2009. **109**(3): p. 847-55.
49. Quilez, M.E., J. Lopez-Aguilar, and L. Blanch, *Organ crosstalk during acute lung injury, acute respiratory distress syndrome, and mechanical ventilation*. *Curr Opin Crit Care*, 2012. **18**(1): p. 23-8.
50. Gonzalvo, R., et al., *Bench-to-bedside review: brain-lung interaction in the critically ill--a pending issue revisited*. *Crit Care*, 2007. **11**(3): p. 216.
51. Lopez-Aguilar, J., et al., *Massive brain injury enhances lung damage in an isolated lung model of ventilator-induced lung injury*. *Crit Care Med*, 2005. **33**(5): p. 1077-83.
52. Pelosi, P., P. Severgnini, and M. Chiaranda, *An integrated approach to prevent and treat respiratory failure in brain-injured patients*. *Curr Opin Crit Care*, 2005. **11**(1): p. 37-42.
53. Wu, S., et al., *Enhanced pulmonary inflammation following experimental intracerebral hemorrhage*. *Exp Neurol*, 2006. **200**(1): p. 245-9.
54. Zygun, D.A., et al., *Non-neurologic organ dysfunction in severe traumatic brain injury*. *Crit Care Med*, 2005. **33**(3): p. 654-60.
55. Avlonitis, V.S., et al., *The hemodynamic mechanisms of lung injury and systemic inflammatory response following brain death in the transplant donor*. *Am J Transplant*, 2005. **5**(4 Pt 1): p. 684-93.
56. Holland, M.C., et al., *The development of acute lung injury is associated with worse neurologic outcome in patients with severe traumatic brain injury*. *J Trauma*, 2003. **55**(1): p. 106-11.
57. Pelosi, P., et al., *Management and outcome of mechanically ventilated neurologic patients*. *Crit Care Med*. **39**(6): p. 1482-92.
58. Kahn, J.M., et al., *Acute lung injury in patients with subarachnoid hemorrhage: incidence, risk factors, and outcome*. *Crit Care Med*, 2006. **34**(1): p. 196-202.
59. Goehler, L.E., A. Erisir, and R.P. Gaykema, *Neural-immune interface in the rat area postrema*. *Neuroscience*, 2006. **140**(4): p. 1415-34.
60. Hopkins, R.O., R.P. Kesner, and M. Goldstein, *Item and order recognition memory in subjects with hypoxic brain injury*. *Brain Cogn*, 1995. **27**(2): p. 180-201.
61. Hopkins, R.O., R.P. Kesner, and M. Goldstein, *Memory for novel and familiar spatial and linguistic temporal distance information in hypoxic subjects*. *J Int Neuropsychol Soc*, 1995. **1**(5): p. 454-68.
62. Manns, J.R., R.O. Hopkins, and L.R. Squire, *Semantic memory and the human hippocampus*. *Neuron*, 2003. **38**(1): p. 127-33.
63. Lopez-Perez, S.J., et al., *Short- and long-term changes in extracellular glutamate and acetylcholine concentrations in the rat hippocampus following hypoxia*. *Neurochem Int*, 2012. **61**(2): p. 258-65.
64. Tracey, K.J., *The inflammatory reflex*. *Nature*, 2002. **420**(6917): p. 853-9.
65. Akrouf, N., T. Sharshar, and D. Annane, *Mechanisms of brain signaling during sepsis*. *Curr Neuropharmacol*, 2009. **7**(4): p. 296-301.
66. Gaykema, R.P., C.C. Chen, and L.E. Goehler, *Organization of immune-responsive medullary projections to the bed nucleus of the stria terminalis*,

- central amygdala, and paraventricular nucleus of the hypothalamus: evidence for parallel viscerosensory pathways in the rat brain.* Brain Res, 2007. **1130**(1): p. 130-45.
67. dos Santos, C.C., et al., *Neuroimmune regulation of ventilator-induced lung injury.* Am J Respir Crit Care Med, 2011. **183**(4): p. 471-82.
68. Curran, T., et al., *Structure of the FBJ murine osteosarcoma virus genome: molecular cloning of its associated helper virus and the cellular homolog of the v-fos gene from mouse and human cells.* Mol Cell Biol, 1983. **3**(5): p. 914-21.
69. Shaulian, E. and M. Karin, *AP-1 as a regulator of cell life and death.* Nat Cell Biol, 2002. **4**(5): p. E131-6.
70. Valles, A., O. Marti, and A. Armario, *Long-term effects of a single exposure to immobilization stress on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: transcriptional evidence for a progressive desensitization process.* Eur J Neurosci, 2003. **18**(6): p. 1353-61.
71. Herdegen, T. and J.D. Leah, *Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins.* Brain Res Brain Res Rev, 1998. **28**(3): p. 370-490.
72. Ferrara, P., et al., *The structural determinants responsible for c-Fos protein proteasomal degradation differ according to the conditions of expression.* Oncogene, 2003. **22**(10): p. 1461-74.
73. Chaudhuri, A., et al., *Molecular maps of neural activity and quiescence.* Acta Neurobiol Exp (Wars), 2000. **60**(3): p. 403-10.
74. Kovacs, K.J., *Measurement of immediate-early gene activation- c-fos and beyond.* J Neuroendocrinol, 2008. **20**(6): p. 665-72.
75. Akazawa, K.H., et al., *Mapping of regional brain activation in response to fatigue-load and recovery in rats with c-Fos immunohistochemistry.* Neurosci Res, 2010. **66**(4): p. 372-9.
76. Senba, E. and T. Ueyama, *Stress-induced expression of immediate early genes in the brain and peripheral organs of the rat.* Neurosci Res, 1997. **29**(3): p. 183-207.
77. Zhang, J., et al., *c-fos regulates neuronal excitability and survival.* Nat Genet, 2002. **30**(4): p. 416-20.
78. Valles, A., O. Marti, and A. Armario, *Mapping the areas sensitive to long-term endotoxin tolerance in the rat brain: a c-fos mRNA study.* J Neurochem, 2005. **93**(5): p. 1177-88.
79. Sanz, O., et al., *Differential cellular distribution and dynamics of HSP70, cyclooxygenase-2, and c-Fos in the rat brain after transient focal ischemia or kainic acid.* Neuroscience, 1997. **80**(1): p. 221-32.
80. Poirier, G.L., et al., *Early-onset dysfunction of retrosplenial cortex precedes overt amyloid plaque formation in Tg2576 mice.* Neuroscience, 2011. **174**: p. 71-83.
81. Slutsky, A.S., *Ventilator-induced lung injury: from barotrauma to biotrauma.* Respir Care, 2005. **50**(5): p. 646-59.
82. Futier, E., E. Marret, and S. Jaber, *Perioperative positive pressure ventilation: an integrated approach to improve pulmonary care.* Anesthesiology, 2014. **121**(2): p. 400-8.
83. Imai, Y., et al., *Injurious mechanical ventilation and end-organ epithelial cell apoptosis and organ dysfunction in an experimental model of acute respiratory distress syndrome.* JAMA, 2003. **289**(16): p. 2104-12.
84. Pinheiro de Oliveira, R., et al., *Mechanical ventilation with high tidal volume induces inflammation in patients without lung disease.* Crit Care, 2010. **14**(2): p. R39.
85. Kubin, L., et al., *Central pathways of pulmonary and lower airway vagal afferents.* J Appl Physiol (1985), 2006. **101**(2): p. 618-27.

86. Lopez-Aguilar, J., et al., *Early physiological and biological features in three animal models of induced acute lung injury*. Intensive Care Med. **36**(2): p. 347-55.
87. Niimi, M., et al., *Effect of continuous intravenous injection of interleukin-6 and pretreatment with cyclooxygenase inhibitor on brain c-fos expression in the rat*. Neuroendocrinology, 1997. **66**(1): p. 47-53.
88. Ricard, J.D., D. Dreyfuss, and G. Saumon, *Ventilator-induced lung injury*. Eur Respir J Suppl, 2003. **42**: p. 2s-9s.
89. Dos Santos, C.C. and A.S. Slutsky, *Invited review: mechanisms of ventilator-induced lung injury: a perspective*. J Appl Physiol (1985), 2000. **89**(4): p. 1645-55.
90. Martinez-Caro, L., et al., *Role of free radicals in vascular dysfunction induced by high tidal volume ventilation*. Intensive Care Med, 2009. **35**(6): p. 1110-9.
91. Bregeon, F., et al., *Substance P receptor blockade decreases stretch-induced lung cytokines and lung injury in rats*. J Physiol, 2010. **588**(Pt 8): p. 1309-19.
92. Vernooy, J.H., et al., *Long-term intratracheal lipopolysaccharide exposure in mice results in chronic lung inflammation and persistent pathology*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2002. **26**(1): p. 152-9.
93. Beck-Schimmer, B., et al., *Alveolar macrophages regulate neutrophil recruitment in endotoxin-induced lung injury*. Respir Res, 2005. **6**: p. 61.
94. Harris, J.F., et al., *Resolution of LPS-induced airway inflammation and goblet cell hyperplasia is independent of IL-18*. Respir Res, 2007. **8**: p. 24.
95. Fodor, G.H., et al., *Lung mechanical changes following bronchoaspiration in a porcine model: differentiation of direct and indirect mechanisms*. Respir Physiol Neurobiol, 2014. **199**: p. 41-9.
96. Blanch, L., et al., *Effect of PEEP on the arterial minus end-tidal carbon dioxide gradient*. Chest, 1987. **92**(3): p. 451-4.
97. Lucangelo, U. and L. Blanch, *Dead space*. Intensive Care Med, 2004. **30**(4): p. 576-9.
98. Passaro, C.P., et al., *Pulmonary lesion induced by low and high positive end-expiratory pressure levels during protective ventilation in experimental acute lung injury*. Crit Care Med, 2009. **37**(3): p. 1011-7.
99. Sinclair, S.E., et al., *Hypercapnic acidosis is protective in an in vivo model of ventilator-induced lung injury*. Am J Respir Crit Care Med, 2002. **166**(3): p. 403-8.
100. O'Croinin, D.F., et al., *Hypercapnic acidosis does not modulate the severity of bacterial pneumonia-induced lung injury*. Crit Care Med, 2005. **33**(11): p. 2606-12.
101. Woods, S.J., et al., *Kinetic profiling of in vivo lung cellular inflammatory responses to mechanical ventilation*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2015. **308**(9): p. L912-21.
102. Gonzalez-Lopez, A., et al., *Lung strain and biological response in mechanically ventilated patients*. Intensive Care Med, 2012. **38**(2): p. 240-7.
103. Lopez-Aguilar, J., et al., *Effects on lung stress of position and different doses of perfluorocarbon in a model of ARDS*. Respir Physiol Neurobiol, 2015. **210**: p. 30-7.
104. Reyes, E.P., et al., *LPS-induced c-Fos activation in NTS neurons and plasmatic cortisol increases in septic rats are suppressed by bilateral carotid chemodenervation*. Adv Exp Med Biol, 2012. **758**: p. 185-90.
105. Rodriguez-Gonzalez, R., et al., *Endotoxin-induced lung alveolar cell injury causes brain cell damage*. Exp Biol Med (Maywood), 2015. **240**(1): p. 135-42.
106. Mascia, L., et al., *Cerebro-pulmonary interactions during the application of low levels of positive end-expiratory pressure*. Intensive Care Med, 2005. **31**(3): p. 373-9.

107. Gourine, A.V., et al., *Release of ATP and glutamate in the nucleus tractus solitarius mediate pulmonary stretch receptor (Breuer-Hering) reflex pathway*. J Physiol, 2008. **586**(16): p. 3963-78.
108. Gonzalez-Lopez, A., et al., *Mechanical ventilation triggers hippocampal apoptosis by vagal and dopaminergic pathways*. Am J Respir Crit Care Med, 2013. **188**(6): p. 693-702.
109. Lu, C.L., et al., *Studies on functional connections between the supraoptic nucleus and the stomach in rats*. J Physiol Sci, 2011. **61**(3): p. 191-9.
110. Ma, Y., et al., *Differential roles of cyclooxygenase-2-related signaling in regulating hypothalamic neuronal activity under various acute stresses*. J Vet Med Sci, 2014. **76**(2): p. 219-27.
111. Annane, D., *Hippocampus: a future target for sepsis treatment!* Intensive Care Med, 2009. **35**(4): p. 585-6.
112. Dumont, J.R., M. Petrides, and V. Sziklas, *Fornix and retrosplenial contribution to a hippocampo-thalamic circuit underlying conditional learning*. Behav Brain Res, 2010. **209**(1): p. 13-20.
113. Gunther, M.L., et al., *The association between brain volumes, delirium duration, and cognitive outcomes in intensive care unit survivors: the VISIONS cohort magnetic resonance imaging study**. Crit Care Med, 2012. **40**(7): p. 2022-32.
114. Semmler, A., et al., *Long-term cognitive impairment, neuronal loss and reduced cortical cholinergic innervation after recovery from sepsis in a rodent model*. Exp Neurol, 2007. **204**(2): p. 733-40.