

# **“Modificaciones pulmonares y del Sistema Nervioso Central tras diversas estrategias de ventilación mecánica”**

**Tutores: Francisco Valladares Parrilla y Ricardo Gutiérrez García**

**Alumna: Sarai Negrín González**

**Agradecimientos**

En primer lugar quiero expresar mi más profundo agradecimiento a los Doctores Ricardo Gutiérrez García y Francisco Valladares Parrilla por su dedicación, tiempo, esfuerzo y por darme la oportunidad de aprender, especialmente al Prof. Valladares quien ha dedicado muchas horas, nunca ha perdido la paciencia y por su actitud positiva en todo momento.

Asimismo los consejos y el apoyo de Milagros López Hernández (Doctoranda del Departamento) y del Dr. Justo Hernández González han sido muy importantes para mí a lo largo de todo el desarrollo de este Trabajo de Fin de Grado

Finalmente, a mis padres por su apoyo incondicional en cada reto, sin dudar ni un solo segundo.

## **Introducción**

## Generalidades

La **ventilación mecánica** es un procedimiento de sustitución temporal de la función ventilatoria normal realizada en situaciones en las que ésta por distintos motivos patológicos no cumple los objetivos fisiológicos que le son propios (Andrés y cols., 2012).

## Consideraciones previas sobre la PEEP

El uso de Presión positiva espiratoria en la vía aérea fue usada por primera vez por Barach y colaboradores en 1938 y también por Ashbaugh y colaboradores descrito para el Síndrome de Distrés respiratorio usado en la ventilación y en la oxigenoterapia (Villar y cols, 2009).

En 1974, Webb y Tierney estableció la primera demostración de la PEEP como beneficiosa. Más tarde Dreyfuss y colaboradores siguiendo esta línea también demostraron que reducía el edema alveolar en ratas con ventilación mecánica (Villar y cols, 2009).

Pero fue en el 2009 con el estudio “Experimental Ventilator-induced Lung Injury” que se pone en duda el efecto totalmente beneficioso de la PEEP, en la ventilación a volumen alto y PEEP alta. Causando daño en animales sanos.

Actualmente lo más aceptado es establecer una PEEP de 10 cm H<sub>2</sub> O (Herrera y cols, 2003).

## Características histológicas del Pulmón

La tráquea termina abriéndose en dos bronquios que se ramifican sucesivamente formando un árbol bronquial. Los bronquios primarios son extrapulmonares y penetran en ellos por la raíz pulmonar junto con vasos sanguíneos. Los bronquios secundarios o lobulares se encuentran en número de 5: 3 en el pulmón derecho y 2 en el izquierdo. Los bronquios terciarios o segmentarios son 8 en el pulmón izquierdo y 10 en el pulmón derecho. A partir de la ramificación 12 hablamos de bronquiolo y de bronquiolo terminal, en número de 65.000 a partir de la división 16. Los bronquios existen ya en el cuarto mes de vida. Cuando estudiamos el árbol bronquial hablamos de segmentos broncopulmonares: la suma de un bronquio segmentario y su parénquima pulmonar asociado. Cada segmento tiene su propia irrigación y estroma, de modo que la extirpación (por ejemplo, en casos de tumores) se realiza a nivel de los segmentos. (Welsch, 2009)



**Figura A:** Esquema del Árbol bronquial.

## **Bronquios**

Los bronquios constan de una mucosa, una capa muscular, una submucosa, una capa cartilaginosa y una capa adventicia.

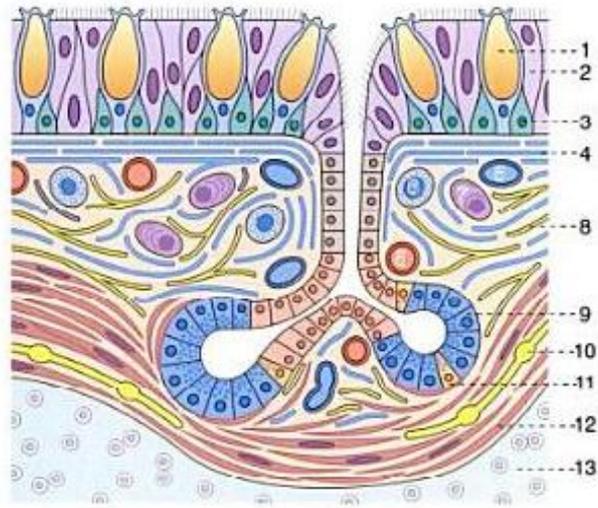
### **1. Mucosa**

La mucosa muestra un epitelio de tipo respiratorio con células ciliadas, caliciformes, basales (células madre) y endocrinas. Encontramos también una importante cantidad de linfocitos y mastocitos. Esta estructura se mantiene en las sucesivas ramificaciones bronquiales, si bien la altura de las células va disminuyendo. Las células principales de la mucosa son las células ciliadas. Son células epiteliales con citoqueratina 8 (K8) y un considerable número de cilios, que baten a mayor frecuencia que en la mucosa nasal o traqueal (25 veces por segundo). Las células caliciformes son abundantes y dispersas, con microvellosidades más o menos numerosas. Las células basales son células madre y suponen un 30% del epitelio. Su marcador es citoqueratina 14 (K14). Las células endocrinas forman parte del sistema endocrino difuso o APUD y se denominan células de Kulchitsky. Secretan

serotonina, calcitonina, somatostatina, ADH (hormona antidiurética) y ACTH. Forman cuerpos neuroepiteliales (cúmulos celulares) en los puntos de ramificación del árbol bronquial. Estas células son las que con mayor frecuencia se malignizan formando carcinoides y carcinomas: crecen aumentando el tamaño de los cuerpos neuroepiteliales y se liberan después, metastatizando. (Kierszenbaum, 2012)

La lámina propia es un conjuntivo laxo con fibras elásticas. Encontramos BALT y linfocitos T dispersos. Se produce además secreción de IgA, que pasa a través de las células epiteliales y es liberada como IgA secretor a la luz bronquial. En casos de alergia, se produce también IgE. También encontramos vénulas de endotelio alto donde hay cúmulos de linfocitos T. Esta presencia de folículos linfoides aumenta con la edad y tiende a situarse en los puntos de ramificación de los bronquios. Encontramos células M en las zonas donde se disponen las BALUs. En la lámina propia hay abundantes glándulas seromucosas, con células secretoras y mioepiteliales. (Kierszenbaum, 2012)

### **2. Capa muscular**



**Figura B;**Capas de la pared de un bronquio;Epitelio de revestimiento con células caliciformes(1),células ciliadas(2), y células basales(3);4 fibrillas colágenas; vasos sanguíneos;(6)mastocito;(7)plasmocito;(8)fibras elásticas;(9)glándula seromucosa que contienen células endocrinas(11);(10)nervio autónomo;(12) músculo liso;(13)cartílago hialino.

La capa muscular es continua, y los miocitos lisos están dispuestos en espiral. La liberación de la péptido intestinal vasoactivo (VIP) produce broncodilatación, aunque no se sabe cuál es la procedencia de esta sustancia (Kierszenbaum, 2012).

La submucosa es un tejido conjuntivo laxo con glándulas, sobre todo en los bronquios iniciales. Aquí se sitúan también las placas cartilagosas, discontinuas e irregulares, de cartílago hialino. Según avanzamos en el árbol bronquial, va disminuyendo la altura del epitelio, el número de glándulas y la cantidad de cartílago, y va aumentando la capa muscular (Kierszenbaum, 2012).

## **Bronquíolos**

### **1. Mucosa**

Su mucosa consta de un epitelio prismático ciliado. En este epitelio encontramos células endocrinas, formando cuerpos neuroepiteliales, escasas células caliciformes (más abundantes en fumadores) y células de Clara. La cantidad de células de Clara aumenta según avanzamos en el árbol bronquial, de modo que en los bronquiolos terminales alcanzan ya el 80%. Son células prismáticas, no ciliadas, con una zona apical abultada. Varían en las distintas especies (Welsch, 2009).

Estas células de Clara sintetizan un producto de naturaleza lipoproteica, no pegajoso, que recubre la superficie del bronquiolo de manera que rebaja la tensión superficial, evitando el colapso en espiración. El marcador de estas células es CC16 (Welsch, 2009).

La lámina propia de la mucosa bronquiolar es parecida a la de los bronquios: conjuntivo laxo con fibras elásticas, si bien en los bronquiolos no encontramos glándulas seromucosas. (Welsch, 2009)

### **2. Capa muscular**

La capa muscular la compone el músculo de Reisseisen, resultando una capa gruesa pero no continua. Ello contribuye a la distribución homogénea del aire inspirado. El bronquiolo ya no presenta cartílago, pero sí capa adventicia. Según avanzamos en los bronquiolos, disminuye la altura del epitelio y aumenta la cantidad de músculo y de células de Clara (Kierszenbaum, 2012).

### **Bronquíolo terminal**

Presenta un epitelio cúbico bajo, con células de Clara y células ciliadas, pero sin células caliciformes. Las células claras aumentan en cantidad mientras que las células ciliadas disminuyen a lo largo del bronquíolo. De vez en cuando también aparecen células en cepillo y células de gránulos pequeños. Debajo del epitelio hay una pequeña cantidad de tejido conjuntivo y debajo de este se halla una capa circunferencial de músculo liso en las porciones conductoras. (Kierszenbaum, 2012)

Las células claras son células no ciliadas que exhiben una prominencia característica redondeada o con forma de cúpula de la superficie apical. Tienen características de células secretoras de proteínas. Posee un RER basal bien desarrollado, un aparato de Golgi lateral o suprenuclear, gránulos de secreción que contienen proteínas y muchas cisternas de REL en el citoplasma apical. Las células Claras secretan un

agente tensioactivo, una lipoproteína que impide la adhesión luminal si la pared de la vía aérea se colapsa, en particular durante la espiración. Además producen una proteína conocida como proteína de la célula Clara (CC16). El CC16 se utiliza como marcador medible en el líquido de lavado broncoalveolar y en el suero. (Kierszenbaum, 2012)

### **Bronquiolo respiratorio**

El bronquiolo respiratorio tiene un diámetro inferior a 0.2 mm y se encuentran en número de 130.000. Su pared está interrumpida por la presencia de alveolos. La pared bronquiolar muestra aquí un epitelio cúbico con células ciliadas, si bien la altura y el número de cilios van decreciendo. El epitelio de los segmentos iniciales contiene células ciliadas y células Claras. Hacia el área distal predominan las células Claras. A lo largo de bronquiolo también aparecen células en cepillo y células de gránulos pequeños (células con gránulos de centro denso). También encontramos miocitos lisos dispersos, que ya no forman una capa continua. Se ramifica hasta 3 veces para dar paso a los conductos alveolares. Constituyen la primera parte del árbol bronquial que permite el intercambio gaseoso. (Kierszenbaum, 2012).

### **Conducto alveolar**

Este conducto tiene, asociada a su pared, una enorme cantidad de alvéolos, de modo que tiene como pared solo los bordes libres de los tabiques interalveolares. Se ramifica 2 o 3 veces para dar lugar al saco alveolar, vestíbulo del que se abren numerosos alvéolos. (Welsch, 2009)

### **Alvéolos**

El alvéolo es la unidad funcional del pulmón, lugar donde ocurre el intercambio gaseoso entre el aire y la sangre. Es un espacio aéreo de formas poligonales y pared delgada. Se abren en las paredes de los bronquiolos respiratorios y los conductos alveolares; y también se disponen formando sacos. En la pared alveolar encontramos los poros de Kohn, con un diámetro de 8  $\mu\text{m}$ . Estos poros permiten que el aire se comunique con los alveolos adyacentes, dando lugar a la circulación colateral del aire. A través de estos poros se pueden diseminar microorganismos. En los alvéolos encontramos una capa de surfactante, una secreción grasa que evita el colapso alveolar. Es un agente tensoactivo sintetizado por los neumocitos tipo II. El alvéolo está tapizado por un epitelio simple plano formado por neumocitos tipo I y II. Bajo el epitelio encontramos una lámina basal y bajo ella un intersticio de tejido conjuntivo (Kierszenbaum, 2012).

- ***Neumocito tipo I***

Los neumocitos tipo I suponen un 95% de la superficie del alvéolo y un 40% del número de células epiteliales. Son células aplanadas, con un grosor de 0.2  $\mu\text{m}$ . y escasos orgánulos. Están unidos mediante uniones estrechas entre sí y con los neumocitos tipo II por uniones ocluyentes. No tienen capacidad de división. (Ross y Pawlina, 2009)

- ***Neumocito tipo II***

Los neumocitos tipo II suponen un 60% del total de células del epitelio alveolar. Son células de morfología cúbica o redondeada, es decir, sobresalen sobre el resto del epitelio. Se sitúan sobre todo en los ángulos de los tabiques alveolares. Presentan microvellosidades apicales cortas, un núcleo basófilo y redondeado, así como abundancia de RER, REL y aparato de Golgi, puesto que son células muy activas. Presentan mitocondrias y vesículas densas y cuerpos laminares densos. De contenido no uniforme. El neumocito tipo II es la célula encargada de sintetizar y secretar surfactante. Son marcadamente específicas para la tinción IHQ del Factor de transcripción tiroidea (TTF1) (Ross y Pawlina, 2009)

En la microscopía electrónica se observa una superficie apical en forma de cúpula con algunas microvellosidades cortas en su periferia y un centro bastante liso. Las superficies laterales están cubiertas en grado variable por extensiones de las células alveolares tipo I que se unen a las células de tipo II a través de zonulae ocludentes. Ambos tipos celulares están apoyados sobre la lámina basal. Los componentes proteicos del surfactante son producidos por el RER y almacenados en el citoplasma dentro de los cuerpos laminares que se vacían a la luz del alvéolo. Por esta razón en microscopia vemos en patrón laminar típico de las vesículas de secreción de las células alveolares tipo II. (Ross y Pawlina, 2009)

Los neumocitos II son activos ya en la semana 35. Su crecimiento está controlado por insulina, cortisol y tiroxina. Tienen capacidad de división, de manera que son las células que mantienen y reparan el alvéolo, actuando como células madres. (Ross y Pawlina, 2009)

- Las células en cepillo también están presentes en la pared alveolar pero en una cantidad escasa. Servirían como receptores que verificarían la calidad del aire en los pulmones. (Ross y Pawlina, 2009)

### **Intersticio**

El intersticio es un tejido conjuntivo fino con abundantes fibroblastos, leucocitos y mastocitos. Encontramos en él fibras colágenas y reticulares de sostén. Así como fibras elásticas que permiten la expansión de la pared alveolar en inspiración y contribuyen a la espiración. Evitan el colapso bronquiolar y alveolar (Welsch, 2009)

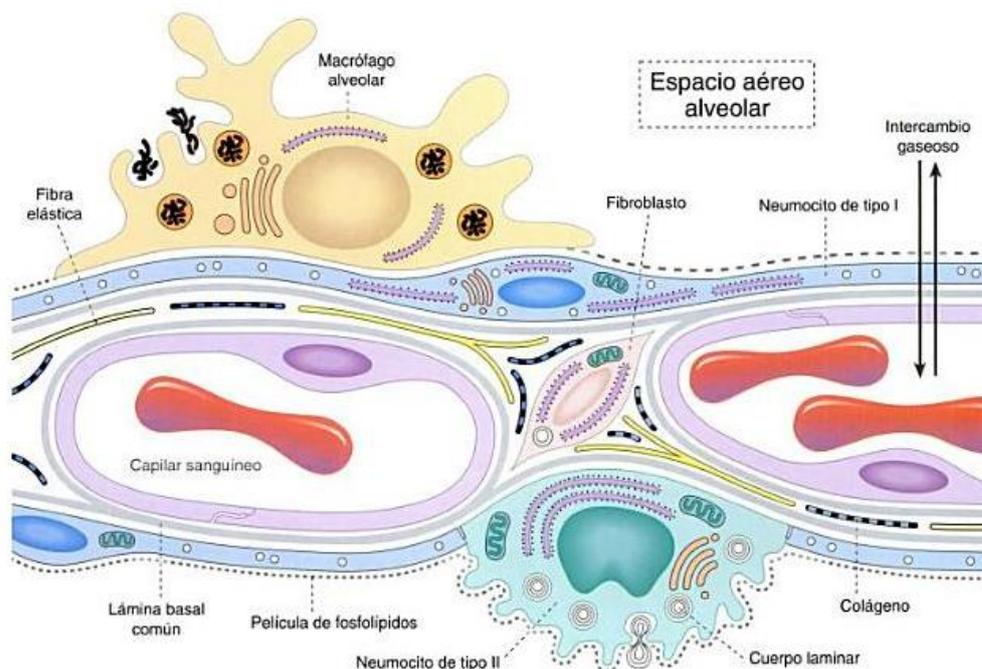
- **Macrófagos**

Los macrófagos proceden de monocitos y se encuentran dentro del intersticio o en la luz alveolar. Son células libres y móviles y son capaces de atravesar el epitelio y situándose en la superficie alveolar. Entonces migran hacia la tráquea. En este ascenso colabora su capacidad móvil y el movimiento de la capa de moco batida por los cilios. Se eliminan por tos y deglución a un ritmo de 2 millones por hora). Se piensa que también tienen capacidad de retornar al intersticio, puesto que aparecen en la pleura y la pared de bronquios cargados de carbón que ha sido inhalado por las vías superiores. Los macrófagos alveolares tienen una alta tasa de recambio. Sus marcadores son CD68 y CD74 Presentan un núcleo irregular y un marcado nucléolo. Tienen un alto desarrollo del aparato de Golgi, mitocondrias y ribosomas. Presentan inclusiones de glucógeno y lisosomas heterogéneos. (Welsch, 2009)

Los macrófagos alveolares tienen una función defensiva frente a restos celulares en el intersticio, polvo, polen, tóxicos y microorganismos del aire, manteniendo la superficie alveolar estéril. Si reconoce un antígeno o toxina, segrega quimiocinas que atraen a los leucocitos hasta el epitelio alveolar. (Welsch, 2009)

- **Macrófagos intersticiales**

En un estudio realizado por Moldobaeva y colaboradores (2011) se observa como los macrófagos intersticiales no solo son elementos fagocíticos sino que además actúan en la angiogénesis tras isquemia pulmonar. Para ello utilizaron distintas técnicas inmunohistoquímicas donde identificaron a todos los macrófagos (MHCII int, CD11C+) macrófagos alveolares (CD11B-) y macrófagos intersticiales maduros (MHCCII int, CD11C+, CD11B+) Obstruyen de forma completa la arteria pulmonar en rata y se observan los cambios en el pulmón desde las 0 horas hasta las 24 horas. Concluyen que los macrófagos intersticiales secretan la quemokina MIP-2 $\alpha$  (ELISA). Este hecho sugiere que la isquemia en el pulmón contribuye a la diferenciación de los monocitos en macrófagos intersticiales que secretan MIP-2 $\alpha$ . Incrementos del número de macrófagos pulmonares pueden ser críticos en la neovascularización del pulmón. Resulta interesante este hecho puesto que su regulación podría atenuar de forma funcional la angiogénesis.



**Figura C:** Ultraestructura de un tabique alveolar.

### Vascularización

En el intersticio no encontramos vasos linfáticos, pero sí una extensa vascularización de redes capilares de endotelio continuo. En la red de capilares es donde se produce el intercambio de gases por difusión pasiva. (Welsch, 2009)

La enzima anhidrasa carbónica favorece la liberación de O<sub>2</sub> (Welsch,2009).

### **Barrera de difusión**

Es una barrera muy delgada, de 0.2 μm. Se compone, desde la luz hacia la profundidad, de surfactante, epitelio alveolar, láminas basales alveolar, capilar fusionada y un endotelio. Es aquí donde se produce la mayor parte del intercambio hematogaseoso. Existe una parte más gruesa, la barrera de difusión gruesa, donde el intercambio se da en menor medida. En esta zona las láminas basales del alveolo y el capilar no están fusionadas porque entre ambas media un intersticio. En este intersticio se puede acumular líquido que no puede ser drenado (no hay vasos linfáticos), por lo que circula libremente hasta llegar a los capilares linfáticos próximos, en los bronquiolos terminales. La pared alveolar presenta, pues, dos zonas funcionales (Welsch, 2009).

### **Toll-like receptor**

Las células del pulmón expresan un importante repertorio de genes bajo el control transcripcional de infecciones bacterianas o fuerzas biomecánicas. Los lipopolisacáridos (LPS) tienen un rol importante en la sepsis uniéndose a receptores de superficie celular y ejerciendo un efecto proinflamatorio. Sin embargo, no hay suficientes evidencias para usarlo clínicamente como marcador específico. (Villar y cols, 2010)

Proteínas de enlace Lipopolisacáridos (LBP) participan en la respuesta inflamatoria a la infección siendo un marcador para el diagnóstico y pronóstico de pacientes con infección bacteriana. (Villar y cols, 2009)

Los LBP son un tipo de proteína producida por los hepatocitos, células epiteliales respiratorias y otro tipo de células, se enlazan reconociendo endotoxinas y patógenos por el sistema inmune. LBP se adhieren a las bacterias vía lípido A del polisacárido el cual mediante enlaces a receptores celulares de CD14 presentan a monocitos y macrófagos. La activación de los Toll-like receptors producen citocinas proinflamatorias que agravan la presentación clínica de la sepsis. Villar y colaboradores (2009) publican un estudio donde se demuestra que los niveles de lipopolisacáridos en el suero predicen la lesión pulmonar severa del pulmón y la mortalidad en pacientes con sepsis severa. (Villar y cols, 2009)

Los Toll-like receptor (TLRs) regulan una serie de proteínas intracelulares como son la interleukina-1 (IL-1) y el receptor asociado a quinasas (IRAK) En la activación del TLR-4, la IkappaB quinasa (IKK) completa la fosforilación para la inhibición de las proteínas kappaB (IκB). Esto causa degradación de inhibidores citoplasmáticos del factor nuclear kappaB (NF-κB) y la traslocación nuclear de NF-κB. NF-κB está normalmente localizado en el citoplasma a través de la asociación con IκBα. Después de la estimulación celular, IκBα es degradado, permitiendo al NF-κB moverse hacia el núcleo, donde se une a un promotor específico e inicia la transcripción; el resultado es la expresión de citoquinas como IL-6 y Factor de necrosis alfa (TNF-α). Hay codificados 4 genes para las cuatro proteínas IRAK. IRAK 3 (también conocido como IRAK-M) inhibe la activación de NF-κB y negativiza la señal de los TLR. (Villar y cols, 2010)

Held y colaboradores (2001) comentan que la respuesta inflamatoria inducida por alto volumen es similar a la evocada por los LPS. Mientras Moriyama y colaboradores (2004) postulan que el alto volumen en ventilación mecánica hace que los LPS reconozcan el camino de regulación de los CD14. El estudio de Villar y cols (2010) sugiere que el camino de señalización de los TLR juega un importante papel en la perpetuación de la inflamación pulmonar que depende de la estrategia ventilatoria usada durante la Sepsis, induciendo lesión pulmonar.

En el 2010 publican en la revista “Intensive Care Medicine” Villar y colaboradores un estudio en el que muestran que la ventilación es protectora usando una estrategia de bajo volumen con PEEP reduciendo la inflamación y el daño. Por el contrario una estrategia de ventilación mecánica con alto volumen y cero PEEP causa un daño sustancial en el pulmón y el incremento de genes de expresión de citocinas inflamatorias. En otros estudios se ha hecho especial énfasis en el camino de modulación del TLR4. Una ventilación mecánica perjudicial aumenta la expresión de TLR4 en el pulmón y reduce la expresión de “antiinflamatorios” I $\kappa$ B $\alpha$ .

El grupo de investigación de Villar y colaboradores postulan al  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  quien habla del TLR4 como una posible diana terapéutica. Por una parte puede ser que la ventilación mecánica induzca a la sobreexpresión nuclear de los TLR4 o bien que ellos sean más sensibles a los ligandos endógenos, llamados “alarminas” Entre los posibles ligandos de los TLR destacan las proteínas de alta movilidad del grupo box 1 (HMGB-1)

También ha sido investigado el papel de otros TLRs, especialmente TLR2 encontrándose asociaciones con la inflamación del pulmón y con la prevaencia de patógenos gram positivos en neumonía severa (Villar y cols, 2009).

Por tanto se deja la puerta abierta a un futuro desarrollo de terapias que consigan modular la señal de los TLR en el pulmón.

No solamente se han descrito modificaciones de los TLRs; Herrera y colaboradores en 2003 publican un trabajo donde observan cómo se modifica la expresión del TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y IL-6 en animales ventilados durante tres horas con alto volumen. Mientras en los animales ventilados durante tres horas con bajo volumen la expresión del TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y IL-6 es similar a los encontrados en el plasma en pulmones normales.

### **Transición epitelial-mesenquimal**

Muchos pacientes que han hecho uso de la ventilación mecánica por distrés respiratorio han desarrollado fibrosis pulmonar. El estrés inducido por la ventilación mecánica puede explicar el desarrollo de esta fibrosis por diferentes mecanismos; daño alveolar epitelial, biotrauma ... ) A pesar de los mayores avances, la mortalidad asociada al Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo (ARDS) continua siendo alta siendo del 44% en estudios observacionales. (Cabrera- Benítez y cols, 2012)

Cabrera-Benítez y colaboradores (2012) publican un estudio en el que observan un incremento de la expresión del TGF- $\beta$ 1 y de la  $\beta$ -catenina en animales ventilados. Dichos niveles retornan al estado basal

pasados 15 días. La expresión de la citoqueratina-8, E-cadherina y pro-SP-B disminuyen mientras la expresión de  $\alpha$ -SMA y vimentina aumenta. Esto demuestra un incremento de los marcadores tumorales y una disminución de los marcadores epiteliales.

Con el análisis inmunohistoquímico se examinó como las células del epitelio pulmonar se diferenciaban a miofibroblastos utilizando marcadores como  $\alpha$ -SMA y citoqueratina (Cabrera-Benítez y cols, 2012).

Es común encontrar fibrosis pulmonar en pacientes con ARDS en fase post-aguda, sin embargo no son bien conocidos todos los mecanismos por los cuales ocurre este hecho. Lo que sí está claro es el importante papel que existe en la iniciación y en la propagación de la fibrosis (Cabrera-Benítez y cols, 2012).

### **Wnt/ $\beta$ -Catenina**

La vía Wnt/ $\beta$ -Catenina actúa regulando la proteólisis de la  $\beta$ -catenina; en esta vía Wnt se une tanto a la proteína Frizzled como a la proteína receptora relacionada con el receptor de LDL (Hatsell y cols., 2003).

La regeneración de las células del epitelio alveolar y la de la matriz son controladas por vías que con frecuencia son importantes en la morfogénesis y en el desarrollo del pulmón. La desregularización de estas vías resulta de la amplificación del daño inicial con desorden en la reparación, con células de la inflamación y desarrollo de fibrosis pulmonar. Hay evidencias de que la vía WNT juega un importante rol en los fenómenos inflamatorios que se desarrollan en la sepsis. Esta vía está involucrada en el daño de las células epiteliales y en la hiperplasia durante la inflamación y la sepsis (Villar y cols, 2011).

La señalización del WNT produce secreción de factores de crecimiento que controlan la proliferación, diferenciación y migración. WNT5A es una molécula sintetizada por los macrófagos específicos para la propia activación de macrófagos y está implicada en el desorden pulmonar. Los niveles altos en el suero de WNT5A están implicados en desordenes pulmonares. WNT5A activa la vía no estándar y también activa e inhibe la vía estándar. Los genes que activan la vía estándar de  $\beta$ -catenina incluyen metaloproteasas (MMPs), las cuales contribuyen a la inflamación y destrucción tisular. Los macrófagos pulmonares y las células epiteliales tipo II bloquean la producción de MMPs, como la MMP7, llave reguladora de la fibrosis pulmonar (Villar y cols., 2011).

Villar y colaboradores (2011a) avalan la hipótesis de que la vía Wnt/ $\beta$ -catenina puede ser modulada por la ventilación mecánica. La activación de esta vía puede jugar un papel importante en la progresión del daño pulmonar y en su reparación. Para ello realizan un modelo experimental con sepsis inducida en ratas adultas. Los daños histopatológicos son atelectasias, edema pulmonar e infiltrados de células inflamatorias. En cuanto a la mayor elevación de la proteína WNT5A fue encontrada en ratas sépticas ventiladas con alto volumen.

Villar y colaboradores (2011b) asimismo publican otro estudio donde demuestran que la vía Wnt/ $\beta$ -catenina es activada por ventilación mecánica y que esta asociación induce fibrosis pulmonar en animales sanos. Por lo tanto la vía Wnt/ $\beta$ -Catenina es modulada sin que exista enfermedad preexistente. La

modulación de esta vía puede presentar una opción terapéutica para la prevención del daño pulmonar producido por el ventilador.

### **Regulación de la respiración**

Las funciones homeostáticas y conductuales del aparato respiratorio están reguladas por el sistema nervioso central (SNC), donde se origina el ritmo respiratorio básico. (García-Cabrera y cols, 2011)

#### **Centros Bulbares:**

Estudios electrofisiológicos han mostrado la existencia de varios grupos neuronales en distintos núcleos bulbares, capaces de aumentar su actividad (frecuencia de disparo de potenciales de acción) durante la inspiración; sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en el corazón, no parece que haya un grupo único de células marcapasos en el bulbo donde se origina el ritmo respiratorio básico; por el contrario, el patrón de inspiración-espriación es generado neuronas interconectadas, las cuales forman redes que actúan como circuitos oscilantes.

Existe un *Grupo respiratorio dorsal* que está formado por neuronas localizadas en la región dorso medial del bulbo y forma parte del núcleo del tracto solitario (NTS). Contiene fundamentalmente neuronas inspiratorias de distintos tipos, clasificadas teniendo en cuenta el momento de la inspiración en el que aumenta su actividad y el patrón de esta. Envían proyecciones a las motoneuronas de los nervios frénicos e intercostales y son, por tanto, las responsables de la actividad mantenida del diafragma durante la inspiración; también establecen conexiones con el grupo respiratorio ventral (García-Cabrera y cols, 2011).

El NTS es una estructura de tamaño pequeño que contiene un número limitado de neuronas; éstas están dispersas en un plexo fibrilar más o menos denso. La distribución y la organización tanto de las células y la red fibrilar no son homogéneas y el NTS se ha dividido en varias subnúcleos citoarquitectónicos, que se correlacionan parcialmente con las zonas de proyección de las terminaciones aferentes periféricas. A nivel ultraestructural, NTS muestra varias conexiones sinápticas complejas en forma de glomérulos (Jean, 1991)

El núcleo del tracto solitario recibe la primera sinapsis de las fibras aferentes de O<sub>2</sub> de los cuerpos carotídeos. Los quimiorreceptores sensibles al CO<sub>2</sub> en el núcleo del tracto solitario no disminuyen su sensibilidad al CO<sub>2</sub> tras sufrir lesiones. No hay un marcador inequívoco de células quimiorreceptoras que haya sido identificado todavía, pero otros grupos han utilizado el receptor de la neuroquinina - 1 del receptor (NK1R) como un marcador candidato para lesionar los quimiorreceptores centrales en el tronco cerebral (Wilkinson y cols., 2011).

Las lesiones de hipoxia incrementan significativamente los niveles de glutamato, óxido nítrico y factor de crecimiento endotelial en este núcleo. Por microscopía electrónica, Kaur y cols., en 2011, observaron que

las neuronas y sus dendritas se encontraban dilatadas así como mostraban, degeneración de los axones, interrupción de las vainas de mielina y procesos de astrocitos reactivos.

El núcleo del tracto solitario también se encuentra involucrado en el control del apetito así como otras funciones homeostáticas por las neuronas catecolaminérgicas A2/C2 ( Mönnikes y cols.,1997; Willing y cols., 1997; Rinaman y cols., 1998). La hormona Grelina puede regular estas neuronas; Grelina inhibe de forma espontánea los inputs de glutamato en neuronas tirosina hidroxilasa positivas (Cui y cols., 2011).

Rooszendaal y cols., en 1999 muestran la activación de receptores glucocorticoides en el núcleo del tracto solitario para facilitar la consolidación de la memoria de evitación inhibitoria. Mello-Carpes (2012) postulan que este tipo de memoria requiere la vía del núcleo del tracto solitario-núcleo paragigantoceluris-locus Coeruleus-hipocampo.

Además del Núcleo del Tracto solitario existe otro núcleo formado por el núcleo motor dorsal del Vago. El nervio vago traslada información desde los receptores de distensión pulmonar. Es el lugar de integración de muchos reflejos cardiopulmonares que afectan el ritmo respiratorio (Puelles-López. y cols. 2008).

*El Grupo respiratorio ventral* tiene una distribución anatómica más difusa que la del dorsal y está constituido por agregados de células que se extienden longitudinalmente por el bulbo, desde su zona caudal hasta la más ventral. Se puede dividir en tres regiones (Puelles-López. y cols. 2008):

- Parte caudal, denominada **núcleo retroambiguo**, por su relación con el núcleo ambiguo contiene fundamentalmente neuronas espiratorias. Las zonas de muchas de estas neuronas establecen sinapsis con las motoneuronas que controlan los músculos espiratorios intercostales y abdominales (espiración forzada) (Puelles-López. y cols. 2008).

- Parte intermedia, denominada **núcleo paraambiguo**. Por su distribución paralela al núcleo ambiguo contiene fundamentalmente neuronas inspiratorias, pero incluye también las propiobulbares, las cuales coordinan la actividad de los músculos respiratorios con el control de la resistencia de las vías aéreas superiores y desempeñan una función clave dentro del CPG. (Puelles-López. y cols. 2008)

- Parte más ventral, se localiza en la vecindad del núcleo facial e incluye una densa población de neuronas que se agrupan y forman el llamado complejo de Bötzing. Éste está formado por diversos tipos funcionales de neuronas espiratorias, algunas motoneuronas que inervan la laringe y la faringe y otras son interneuronas. (Puelles-López. y cols. 2008)

## **Hipocampo**

El hipocampo es la parte principal de la arquicorteza .Está situado en la cara medial del lóbulo temporal, a nivel profundo, y en su mayor parte se halla recubierto por el giro parahipocampal. Su coloración es amarillenta ya que está cubierto por los axones neuronales. (Puelles-López. y cols. 2008)

En el hipocampo se ha estudiado el efecto de la hipoxia sobre la fisiología de sus neuronas. (Ota y cols, 1999). El hipocampo desempeña un papel crucial en los sistemas neuronales para la memoria a largo plazo, pero poco o ningún papel en la retención a corto plazo de algunos tipos de estímulos (Harteley y cols, 2009)

Dentro del hipocampo vamos a destacar dos áreas claramente diferenciadas; el asta de Ammon y el giro dentado.

El asta de Ammon se divide en:

- La región CA1, contiene células piramidales pequeñas.
- La región CA2, se caracteriza por ser una banda angosta con alta densidad de células piramidales grandes.
- La región CA3, que se caracteriza por ser una banda ancha con baja densidad de las células piramidales grandes.
- La región CA4, que constituye la terminación laxa. De nuevo se plantean dudas sobre si es posible separar una región CA4 independiente de la región CA3.

El giro dentado está formado por tres capas:

1. Una capa molecular superficial, con escasas interneuronas.
2. Una densa capa granular, con abundantes células conocidas como “granos del hipocampo”( en realidad son células pequeñas modificadas, con un árbol dendrítico apical ramificado en la capa molecular en forma cónica, con vértice en el soma, y prácticamente no tienen dendritas basales). Hay diversas neuronas entremezcladas.
3. Una capa polimórfica profunda (hilo del giro dentado) con interneuronas más grandes, que reciben colaterales de las fibras musgosas y en parte interconectan entre sí diversas partes del giro dentado y a lo largo del eje septotemporal.

La delgada banda con alta densidad del giro dentado rodea a la banda aferente de las células piramidales. El giro dentado se fusiona con la superficie enrollada del asta de Ammón. El giro dentado está separado del giro parahipocampal por el surco del hipocampo y de la fimbria por el surco fimbriodentado. La delgada capa que limita con el ventrículo es el Áveo donde se acumulan las fibras eferentes antes de dejar el hipocampo e ingresar en la fimbria. El área de transición entre el Asta de Ammón y la corteza entorrinal contigua se denomina subículo (Puelles-López. y cols. 2008).

## **Objetivos**

- En el presente trabajo se valorarán, desde el punto de vista histológico, las modificaciones – si las hubiesen – en diferentes áreas del Sistema Nervioso Central, relacionadas con la función respiratoria, al ventilar ratas sanas con distintas concentraciones de oxígeno
- También estudiaremos el papel que juegan los neumocitos II al instalarse, en el pulmón, un lesión pulmonar aguda a consecuencia de la acción combinada de la ventilación mecánica y la hiperoxia.

## **Material y Método**

### *Preparación animal*

El presente fue realizado con ratas Sprague-Dawley (CRIFFA, Barcelona, España) con un peso de 300-350gr (n=24). Los animales fueron anestesiados con bromuro de pancuronio y propofol y distribuidos aleatoriamente en 4 grupos: ratas ventiladas al 21% de oxígeno, al 40%, al 60% y al 100%

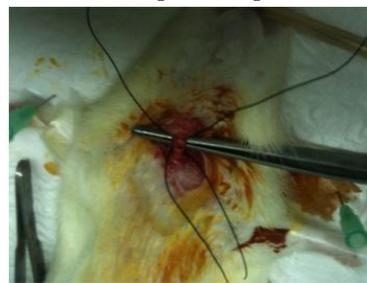


**Figura D:**  
Ventilador Ugo  
Basile, Italia.

El protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Cuidado Animal del Hospital Universitario Dr. Negrín Las Palmas de Gran Canaria, España, y el comité ético de la Universidad de La Laguna, en concordancia con la Directiva 86/609/EEC para animales experimentales (aprobado ID: CEEBA-HUGCDN 003/10).

### *Protocolo experimental*

Antes de iniciar la ventilación se practicó a los animales una traqueotomía necesaria para realizar la intubación. Los 4 grupos fueron ventilados durante 4 horas con un ventilador específico para roedores (Ugo Basile, Italia) y mantenidos en decúbito supino con una inclinación de 20 grados de acuerdo con la horizontal. La presión pulmonar fue continuamente monitorizada al igual que la saturación de oxígeno mediante un pulxiosímetro, manteniéndose siempre por encima del 90%



**Figura E:** Iniciación de Traqueotomía.

### *Preparación patológica*

Las ratas seleccionadas fueron sacrificadas con una sobredosis de Halotano, y posteriormente se les practicó una toracoscopia. Previamente a la extracción del paquete cardiopulmonar, se procedió a la obtención del cerebro para el estudio de diferentes áreas relacionadas con la función respiratoria; el corazón y los pulmones fueron extraídos de la cavidad torácica en bloque y, a continuación, los pulmones fueron aislados del corazón, la tráquea fue canulada, y el pulmón derecho fue instilado intratraquealmente con formol al 10% tamponado; una vez fijadas las muestras (SNC y pulmones) fueron procesadas de manera habitual, es decir, incluidas en parafina y cortadas a 3 micras de grosor con un micrótopo de parafina. Las técnicas de tinción convencionales empleadas fueron: Hematoxilina-Eosina y Tricrómico de Masson-Goldner; las técnicas inmunohistoquímicas fueron la Proteína ácida gliofibrilar (PAGF), Mieloperoxidasa (MPx) y Factor de transcripción tiroideo 1 (TTF1). Finalmente los cortes fueron examinados en un microscopio óptico *Nikon optiphot-2* y fotografiados a distintos aumentos con una cámara fotográfica *Nikon* acoplada al microscopio.



**Figura F:** Rata conectada al ventilador.

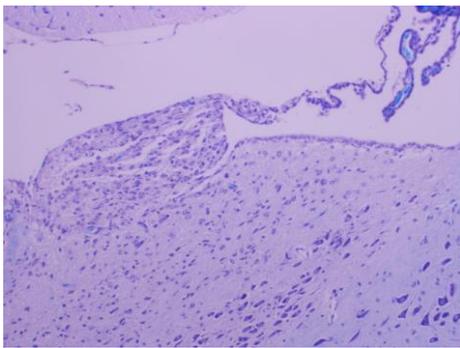
## **Resultados**

### **Grupo ventilado al 21%**

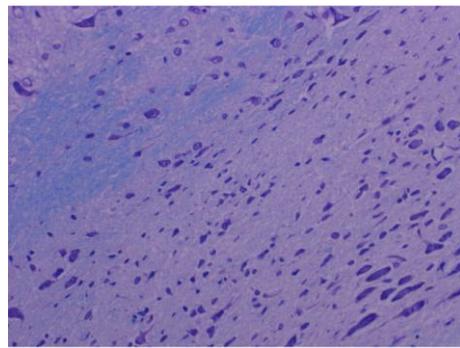
En este grupo, las estructuras del SNC estudiadas, presentaban unas características histológicas similares a las observadas en animales a los que no se les había sometido a ventilación mecánica. Los componentes neurales estudiados fueron: área postrema, núcleo del tracto solitario (NTS), núcleo motor dorsal del vago (NMDV) e hipocampo.

El estudio del área postrema, así como del NTS y NMDV, no fue concluyente; ninguna de dichas estructuras mostraba modificaciones histológicas valorables, en las observaciones realizadas, tanto con técnicas convencionales de HE y Klüver-Barrera, como inmunohistoquímicas; no se observaron fenómenos de necrosis, ni de apoptosis en las neuronas constituyentes de los núcleos ni tampoco ningún tipo de alteración en la sustancia blanca.

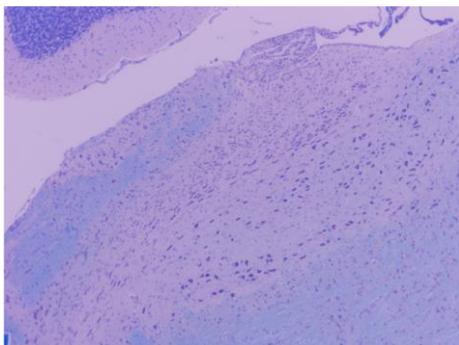
Seguidamente presentamos una serie de imágenes correspondientes a estas formaciones nerviosas: área postrema (*Figura 1*), núcleo del tracto solitario (*Figura 2*), núcleo motor dorsal del vago (*Figura 3*) e hipocampo (*Figura 4*)



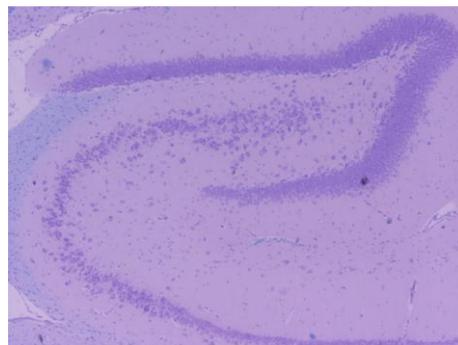
*Figura 1 x100 (KB)*



*Figura 2 x200 (KB)*



*Figura 3 x40 (KB)*

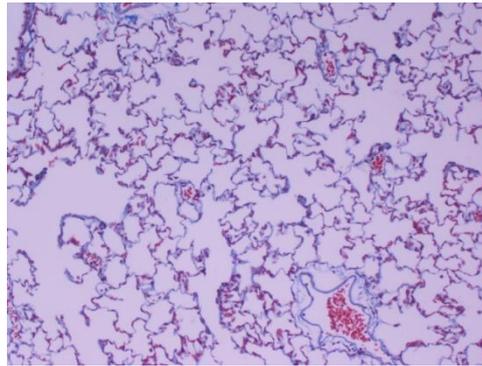


*Figura 4 x40 (KB)*

Respecto a las características histológicas del pulmón vienen representadas por los siguientes componentes: las células epiteliales alveolares (neumocitos I y neumocitos II), constituyentes de los

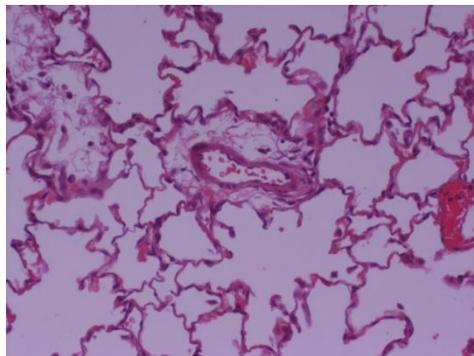
alvéolos y sacos alveolares, el tabique interalveolar con fibroblastos/miofibroblastos, capilares sanguíneos, mastocitos, macrófagos, las vías aéreas mayores (bronquios y bronquiolos) y finalmente estructuras vasculares.

En la Figura 5 se aprecian algunos de los hechos previamente citados: alvéolos, sacos alveolares, vasos sanguíneos y en algunas de dichas estructuras de mayor calibre podemos observar un marcado edema; estas características histológicas se corresponden prácticamente con la estructura normal pulmonar.



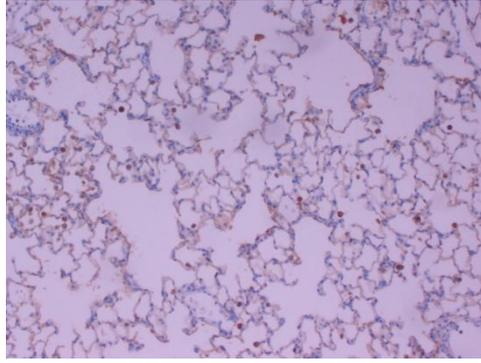
*Figura 5 x100 (Masson-Goldner)*

Cuando observamos estos hechos a mayor aumento es de destacar la presencia de elementos celulares inflamatorios que se localizan principalmente en las ya citadas áreas de edema perivascular (*Figura 6*).



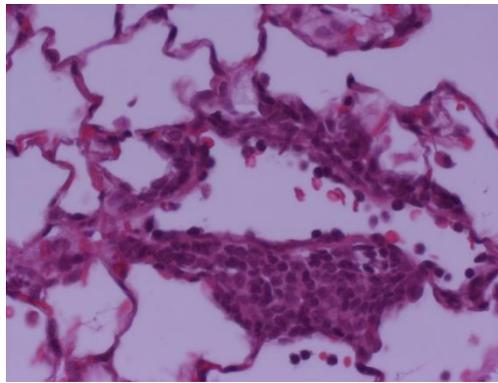
*Figura 6 x200 (HE)*

Como ya hemos señalado, otro de los componentes habituales de los alvéolos son los macrófagos, tanto los dispuestos en la luz alveolar, como los intersticiales (*Figura 7*).



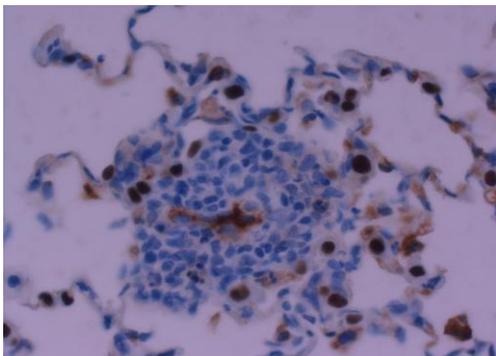
*Figura 7 x100 (MPx)*

Ocasionalmente se observan infiltrados inflamatorios de naturaleza mononuclear, los cuales son muy evidentes en la Figura 8.

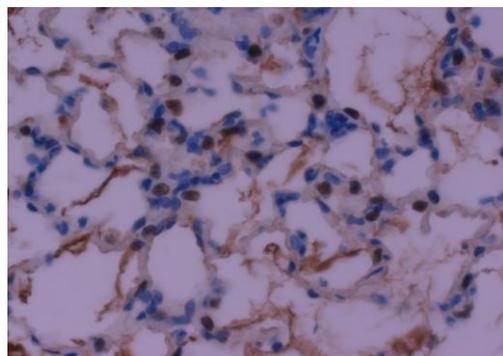


*Figura 8 x400 (HE)*

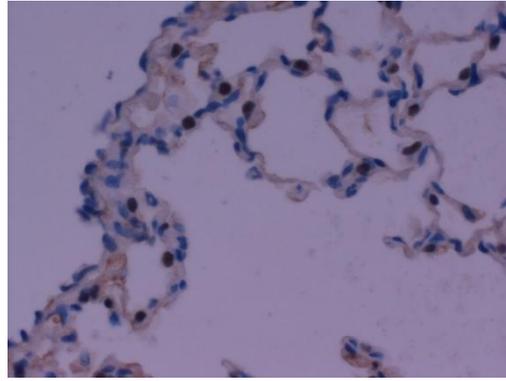
Con respecto a los neumocitos II son claramente puestos de manifiesto en las paredes alveolares con la técnica inmunohistoquímica del TTF1 (*Figuras 9 y 10*); el revestimiento pleural consiste en una capa simple de células mesoteliales subyacente a las cuales se disponen fibrillas colágenas e, inmediatamente por debajo, el componente alveolar (*Figura 11*).



*Figura 9 x400 (TTF1)*



*Figura 10 x400 (TTF-1)*

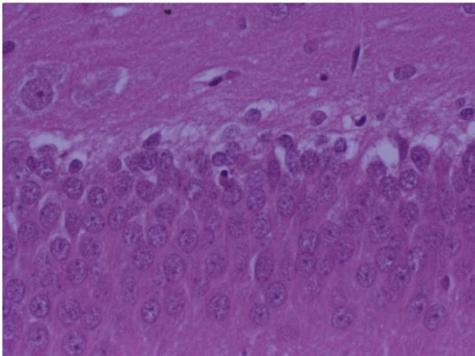


*Figura 11 x400 (TTF-1)*

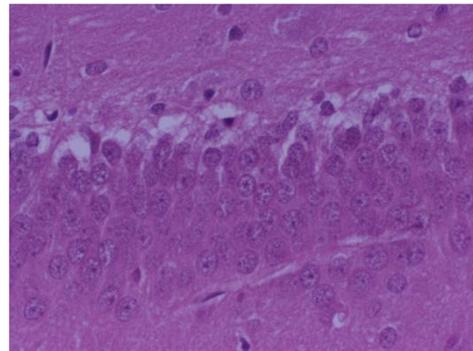
### **Grupo ventilado al 40%**

En este grupo, las modificaciones observadas se correspondían únicamente con el hipocampo, permaneciendo el resto de formaciones inalteradas (área postrema, NTS y NMDV).

Las citadas modificaciones histológicas venían representadas por fenómenos de apoptosis en las áreas basales del giro dentado del hipocampo; estos cuerpos mostraban una coloración eosinófila, núcleo hiper cromático, así como un pequeño tamaño celular, siendo también evidente la constitución de edema perineuronal (*Figuras 12 y 13*).

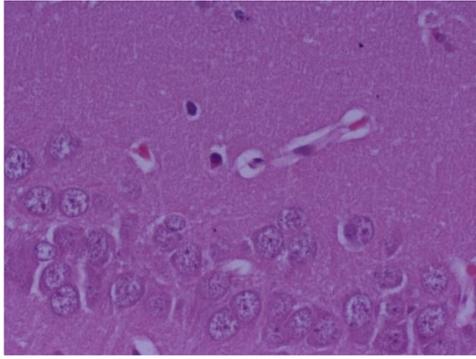


*Figura 12 x400 (HE)*

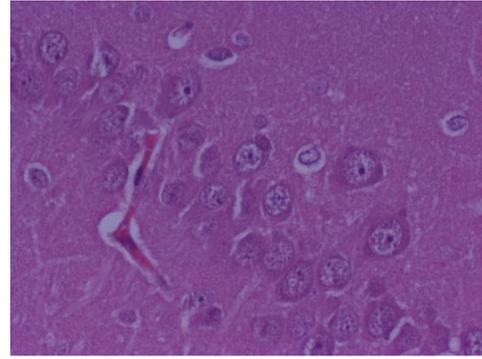


*Figura 13 x400 (HE)*

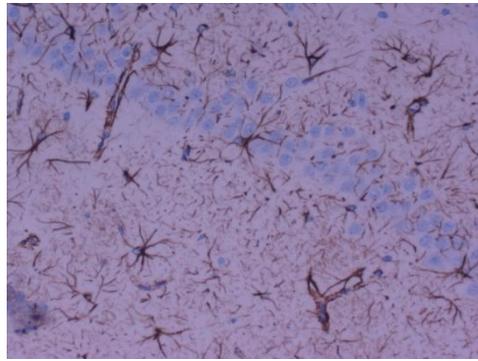
Con respecto al Asta de Ammon y en concreto en la capa CA3 pusimos también de manifiesto los cuerpos apoptóticos y, en ocasiones, en vecindad a capilares sanguíneos (*Figuras 14 y 15*); estos capilares aparecían completamente rodeados por prolongaciones astrocitarias que conforman parte de la barrera hemato-encefálica (*Figura 16*).



*Figura 14 x400 (HE)*

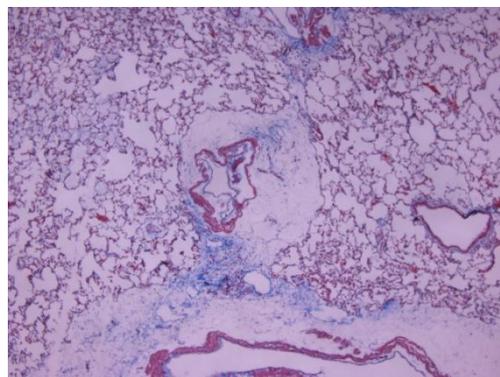


*Figura 15 x400 (HE)*



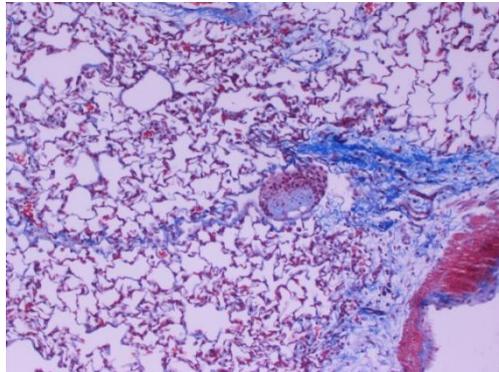
*Figura 16 x400 (PGAF)*

Al respecto de las observaciones realizadas en el pulmón pusimos de manifiesto modificaciones histológicas que afectan tanto al componente vascular como al alveolar, principalmente a los neumocitos II; la gran mayoría de los vasos de gran calibre, tanto arteriales como venosos, presentan un destacado edema perivascular (*Figura 17*).



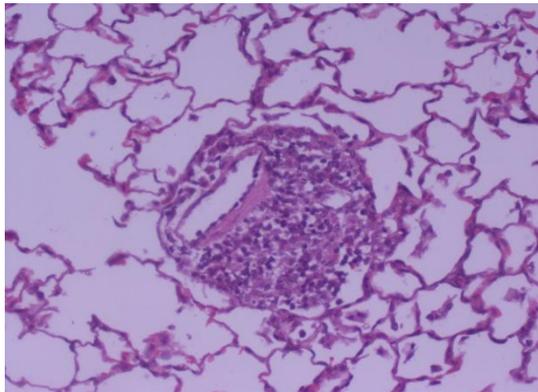
*Figura 17 x40 (Masson-Goldner)*

En otras áreas, se pueden apreciar atelectasias y fenómenos fibróticos que, ocasionalmente, constituirían pequeños nódulos rodeados por elementos de naturaleza inflamatoria (*Figura 18*)



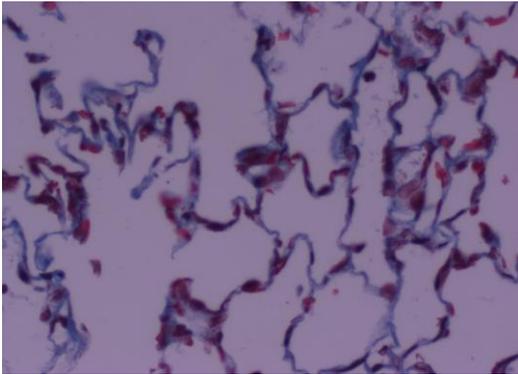
*Figura 18 x100 (Masson-Goldner)*

Estos acúmulos inflamatorios también se disponen alrededor de vasos, principalmente venosos, constituyendo auténticas masas (*Figura 19*).

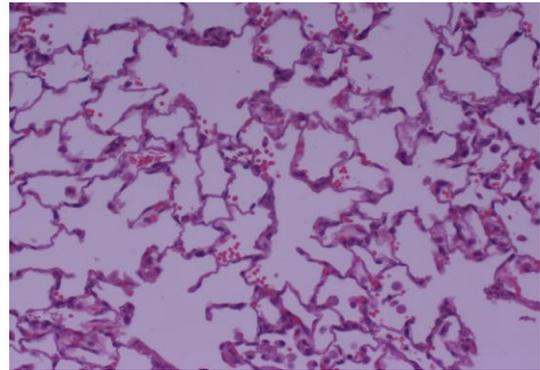


*Figura 19 x200 (HE)*

En algunos alvéolos y sacos alveolares es posible observar modificaciones histológicas del tipo de hemorragias en grado leve (*Figura 20*) así como fibrosis, sobre todo en los alvéolos (*Figura 21*).

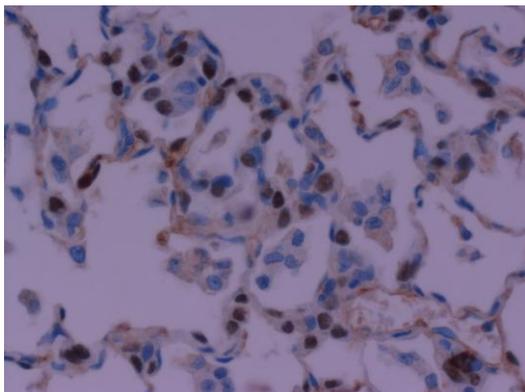


*Figura 21 x400 (Masson-Goldner)*

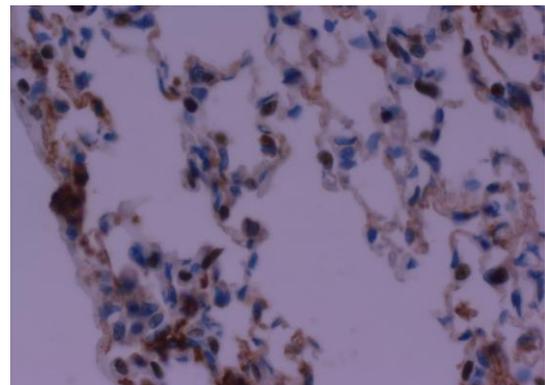


*Figura 20 x200 (HE)*

Con respecto a los neumocitos II y mediante la técnica inmunohistoquímica de TTF-1, observamos una hiperplasia de los mismos; este hecho es general en todo el parénquima pulmonar, aunque se aprecia un ligero predominio en áreas próximas a las atelectasias, así como en localizaciones subpleurales (*Figuras 22 y 23*).



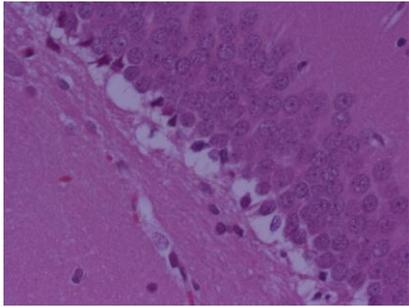
*Figura 22 x 400 (TTF-1)*



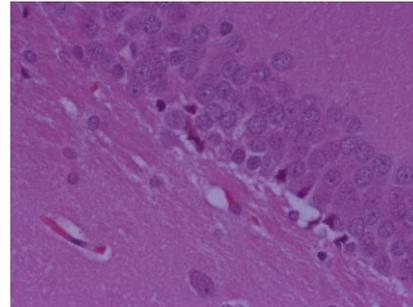
*Figura 23 x400 (TTF-1)*

### **Grupo Ventilado a 60%**

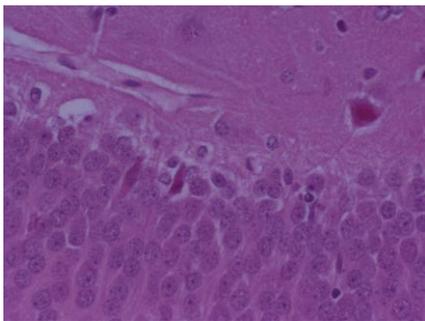
En este grupo se pusieron de manifiesto con mucha mayor nitidez los hechos morfológicos ya observados en el grupo de ventilación mecánica con oxígeno al 40%. Así, el edema perineuronal era muy marcado en la capa subgranular del giro dentado (*Figura 24*), al igual que los fenómenos de apoptosis (*Figuras 25 y 26*).



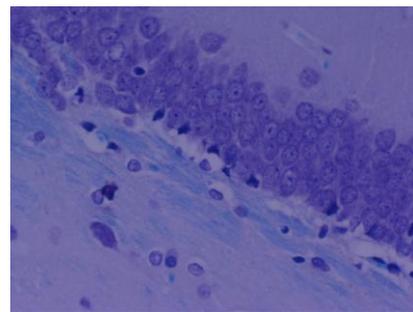
*Figura 24 x400 (HE)*



*Figura 25 x400 (HE)*



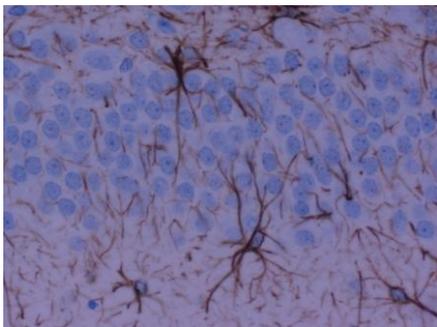
*Figura 26 x400 (HE)*



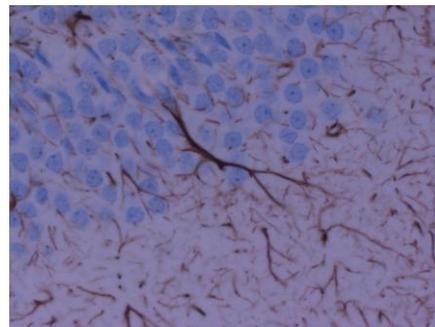
*Figura 27 x400 (KB)*

La apoptosis era incluso observada en áreas de la sustancia blanca próximas a la capa subgranular del giro dentado (*Figura 27*).

El componente astrocitario estaba constituido por astrocitos de naturaleza protoplásmica con finas y largas prolongaciones que se insinuaban entre las células de la capa granular del giro dentado (*Figura 28*); esporádicamente destacamos gruesos tractos de las prolongaciones astrocitarias en la capa subgranular que incluso alcanzaban la sustancia blanca subyacente (*Figura 29*).



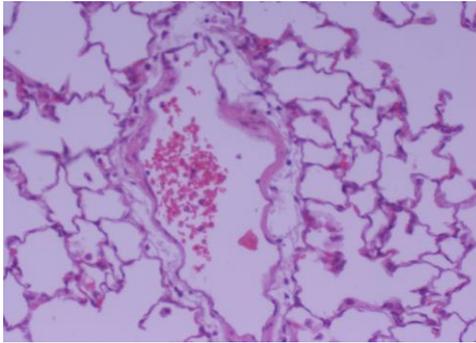
*Figura 28x400 (PAGF)*



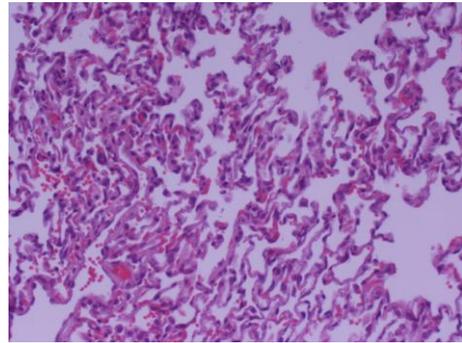
*Figura 29x400 (PAGF)*

En este grupo se manifiestan en mayor medida todos los hechos morfológicos ya observados en el grupo de ventilación con oxígeno al 40%. Así, el edema perivascular es prácticamente general en todas las estructuras vasculares, tanto arteriales como venosas y de diverso calibre (*Figura 30*), marcadas

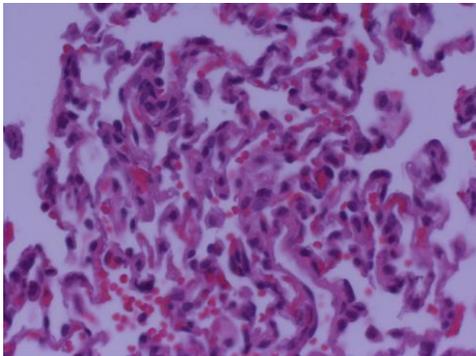
atelectasias (*Figuras 31 y 32*), hemorragia alveolar (*Figura 33*) infiltrados inflamatorios intersticiales (*Figuras 34 y 35*).



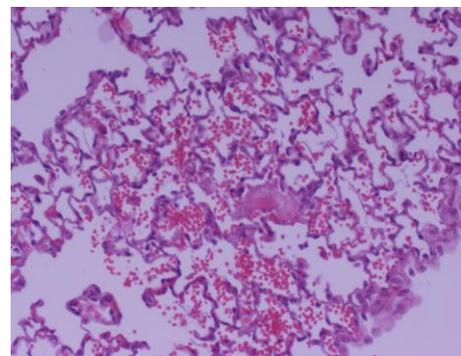
*Figura 30x 200 (HE)*



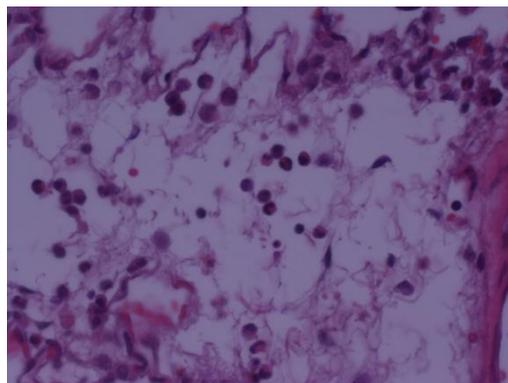
*Figura 31x200 (HE)*



*Figura 32 x 400 (HE)*

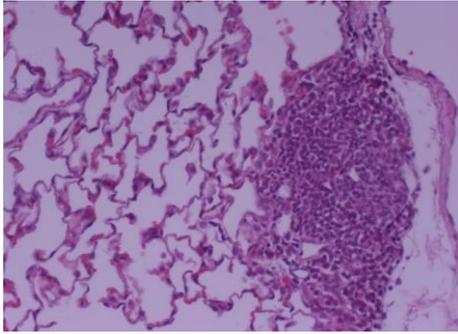


*Figura 33 x200 (HE)*

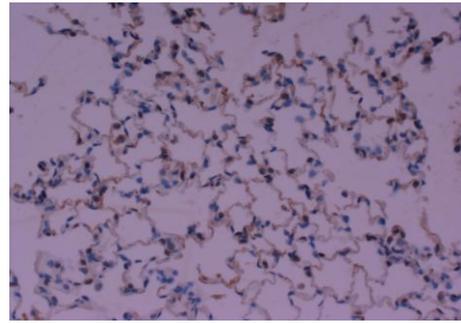


*Figura 34 x 400 (HE)*

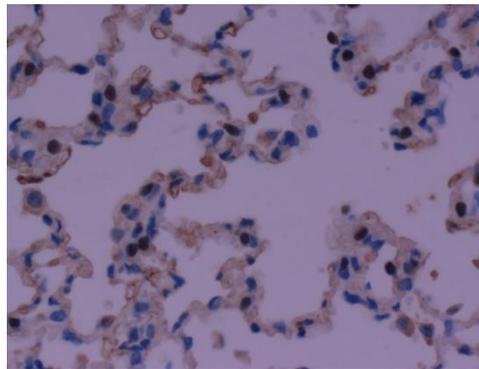
Con respecto a los neumocitos tipo II, observamos un destacado incremento de los mismos, superior incluso a la hiperplasia del grupo de 40% (*Figuras 36 y 37*).



*Figura 35 x 200 (HE)*

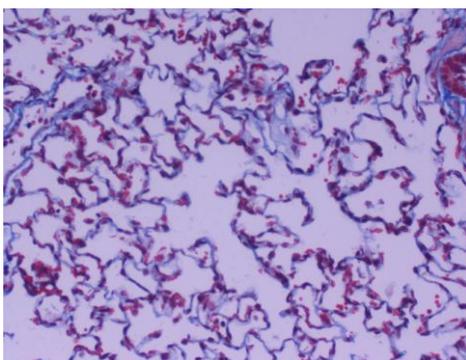


*Figura 36 x200 (TTF1)*

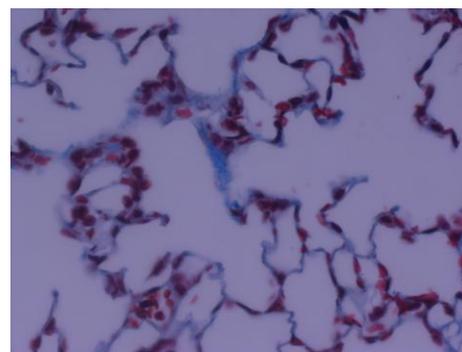


*Figura 37 x400 (TTF-1)*

Uno de los hechos destacados de este grupo es la presencia en mayor proporción de fibrosis alveolar; este hecho se pone claramente de manifiesto cuando se realizaba la técnica de Masson-Goldner, ya que las fibras colágenas captan intensamente el Azul de Anilina (*Figuras 38 y 39*).



*Figura 38 x200 (Masson-Goldner)*

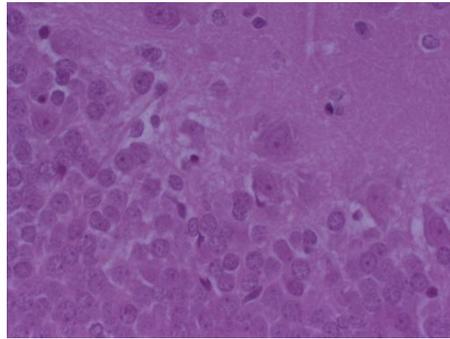


*Figura 39 x400 (Mason-Goldner)*

### **Grupo ventilado al 100%**

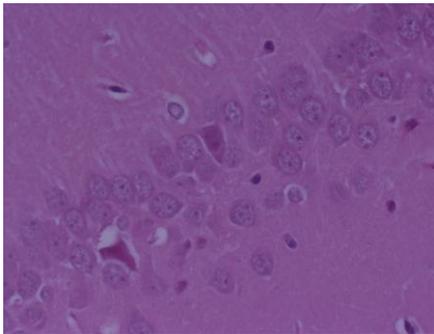
Finalmente, en el grupo al que se aplicó 100% de oxígeno en la ventilación mecánica, los hechos morfológicos ya comentados en grupos anteriores eran muy relevantes. Las neuronas en apoptosis era

mucho más numerosas, sobre todo las localizadas en la capa subgranular del giro dentado, no observándose en ningún caso en estratos superiores de la capa granular del giro dentado (*Figura 40*).

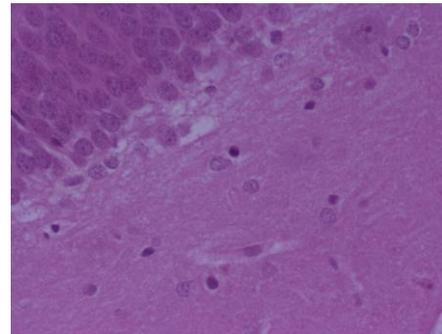


*Figura 40 x400 (HE)*

En el Asta de Ammon pusimos asimismo de manifiesto estas células en apoptosis; en el área CA2 (*Figura 41*), conjuntamente con elementos hipercromáticos, tanto en el citoplasma como en su núcleo, y en el área CA3 incluso en la sustancia blanca subyacente (*Figura 42*).

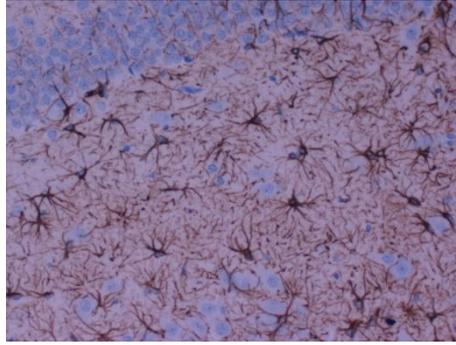


*Figura 41 x400 (HE)*



*Figura 42 x400 (HE)*

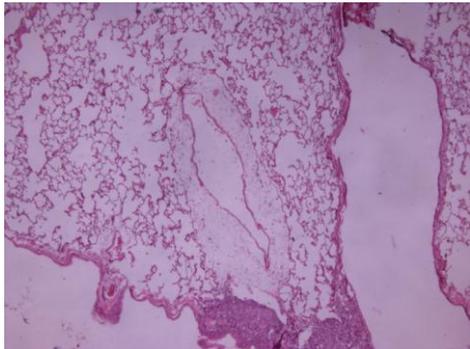
Por último, el componente glial venía representado por una gran proporción de células astrocíticas tal y como podemos poner de manifiesto en la figura 43 en donde vemos una gran proporción de astrocitos fibrosos en la sustancia blanca, localizada entre el giro dentado y la capa CA2 del Asta de Ammon.



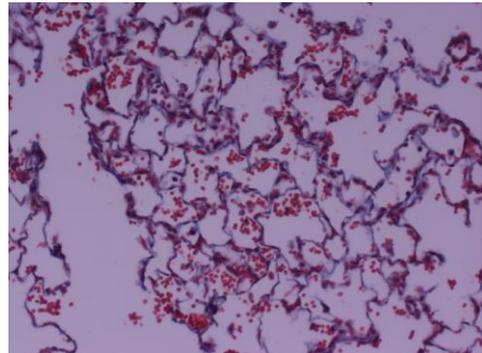
*Figura 43x200 (PAGF)*

En lo referido al tejido pulmonar, este grupo está caracterizado por la máxima expresión de las modificaciones histológicas en los grupos citados previamente.

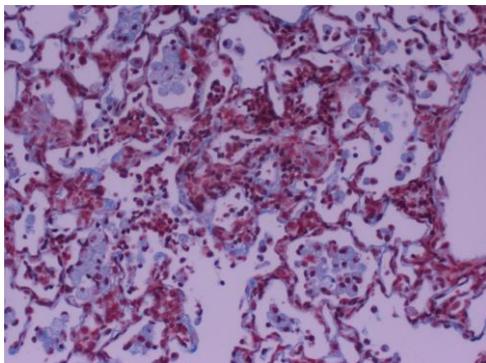
Así, es evidente un destacado edema perivascular (*Figura 44*), hemorragia alveolar (*Figuras 45 y 46*), fenómenos inflamatorios que en ocasiones se disponían periféricamente a algunos vasos los cuales mostraban unos marcados cojinetes musculares (*Figura 47*).



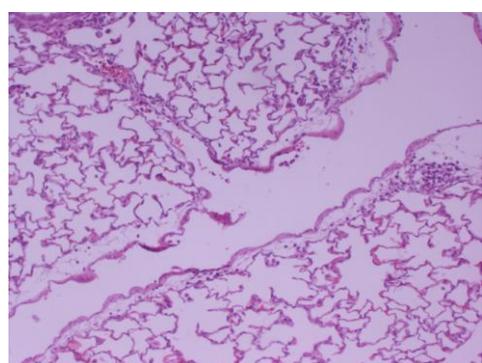
*Figura 44 x40 (HE)*



*Figura 45 x200 (Masson-Goldner)*

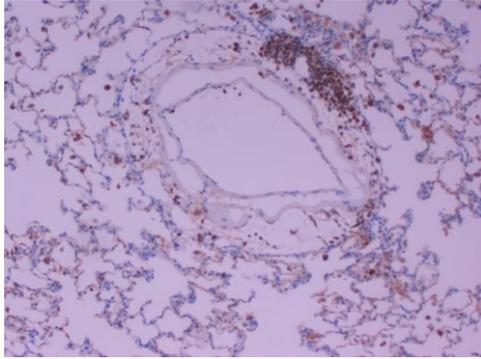


*Figura 46 x200 (Masson-Goldner)*

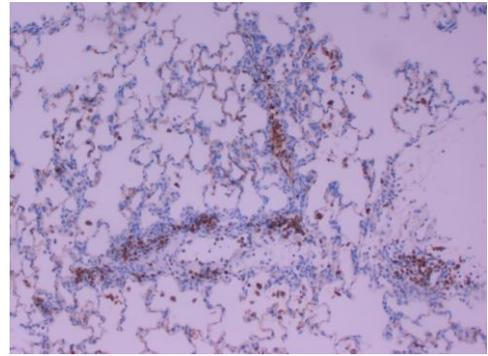


*Figura 47 x200 (HE)*

También los macrófagos alveolares son destacados, tal y como podemos observar en las figuras 48 y 49.

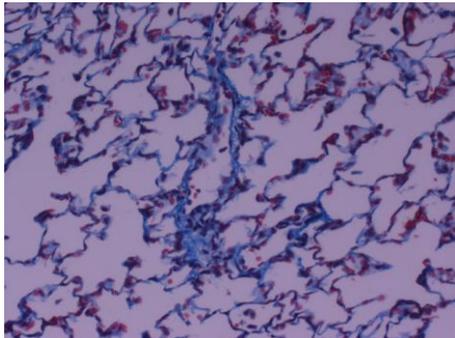


*Figura 48 x 100 (MPx)*

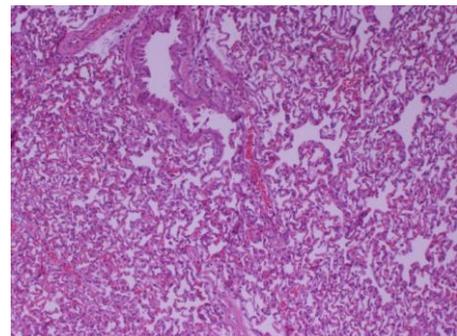


*Figura 49 x100 (MPx)*

Con respecto a la fibrosis, alcanza su máximo desarrollo en este grupo (*Figura 50*), al igual que las atelectasias (*Figura 51*).

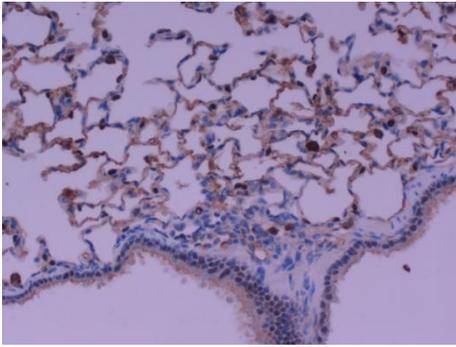


*Figura 50 x 200 (Masson-Goldner)*

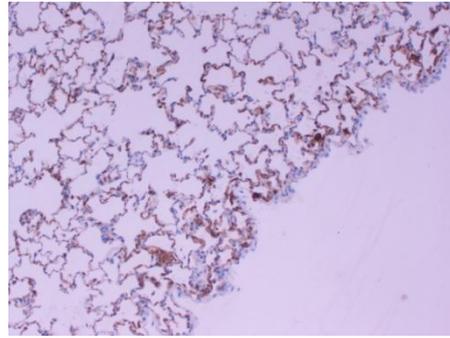


*Figura 51 x100 (HE)*

Finalmente los neumocitos II mostraban una marcada hiperplasia, puesta de manifiesto con la técnica inmunohistoquímica del TTF1; estas células se podían observar con un ligero incremento en áreas peribronquiolares y subpleurales (*Figuras 52 y 53*).

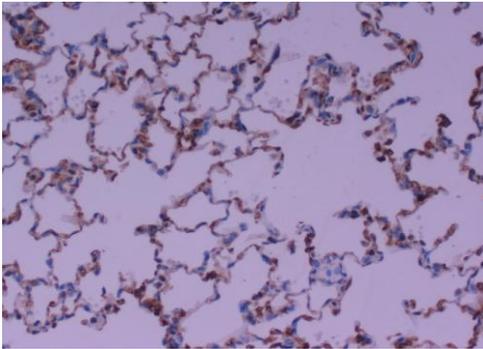


*Figura 52 x200 (TTF1)*

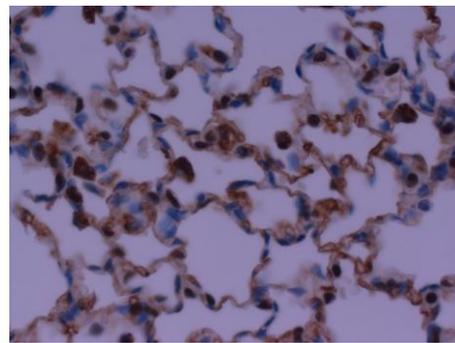


*Figura 53 x100 (TTF1)*

Con respecto al resto del parénquima pulmonar mostraba un intenso marcaje de estas células aunque sin presentar ya una distribución específica, pudiendo apreciarse su distribución como células aisladas o formando pequeños acúmulos (*Figuras 54 y 55*).



*Figura 54 x200 (TTF1)*



*Figura 55 x400 (TTF1)*

**Discusión**

## *Sistema Nervioso Central*

En el presente trabajo hemos estudiado, desde el punto de vista histológico, las repercusiones que pudieran producirse en determinadas áreas del Sistema Nervioso Central, tras ventilación mecánica con diferentes proporciones de oxígeno (21%, 40%, 60% y 100%) en ratas sanas.

Como áreas neurales de estudio elegimos el área postrema, el núcleo del tracto solitario, el núcleo motor dorsal del vago y el hipocampo, todas ellas relacionadas, en mayor o menor medida, con la función respiratoria.

Es conocido que el área postrema (AP) es una zona implicada en la regulación nerviosa autónoma, así como en el control cardiovascular y funciones digestivas y metabólicas (Kanda y cols., 2010; Price y cols., 2008); por otro lado está densamente vascularizado y posee abundantes neuronas catecolaminérgicas las cuales son inmunorreactivas para tirosin-hidroxilasa, y posee conexiones con el núcleo motor dorsal del vago y el núcleo del tracto solitario (Kanda y cols., 2010; Lorke y cols., 2003); en líneas generales el área postrema está considerada como “zona gatillo quimiorreceptora” y puede estar implicada en el reflejo emético, que controla el centro del vómito (Hesketh y cols., 2008).

Con respecto al núcleo del tracto solitario (NTS), está marcadamente implicado en funciones cardiovasculares y respiratorias, siendo el primer eslabón para las terminaciones sensitivas del cerebro (Kline, 2010; Andresen y Kunze, 1994); el NTS recibe señales aferentes procedentes de los barorreceptores y quimiorreceptores de una manera continua y procesa toda esta información para modular los sistemas respiratorio y nervioso autónomo (Kline, 2010; Andresen y Kunze, 1994; van Giersbergen y cols., 1992); al ser la primera zona de procesamiento de la información de los reflejos cardiorrespiratorios, es asimismo el primer sitio donde dicho procesamiento puede ser modulado por ácido clorhídrico (HCl) (Kline, 2008).

El núcleo motor dorsal del vago (viscero-sensitivo) se corresponde con el ala gris del suelo del IV ventrículo y, en ciertos animales como el cerdo, diversos estudios realizados con técnicas inmunohistoquímicas han puesto de manifiesto la expresión de sustancia P, leucoencefalina y óxido nítrico sintetasa como reguladores en la señalización vago-visceral, especialmente en el páncreas (Mussa y Verberne, 2008; Ganko y cols., 2013); por otro lado, existen neuronas en el NMDV que expresan ciertos péptidos, tales como el péptido activador de la adenil ciclasa pituitaria (PACAP), péptido intestinal vasoactivo (VIP), óxido nítrico sintetasa (NOS) y Galanina, que son mediadores de la respuesta neural en determinados estados inflamatorios del tubo digestivo, como en el caso de la inflamación gástrica inducida por la aspirina (Ganko y Calka, 2014).

En nuestro trabajo, tras un detallado estudio microscópico de estas áreas (AP, NTS y NMDV), no encontramos modificaciones histológicas en su composición; tanto el componente celular, neuronas y glía, como la sustancia blanca correspondiente y las estructuras vasculares mostraban su organización normal, sin signos de necrosis, apoptosis, inflamación o edema; este hecho era constante en todos los grupos experimentales diseñados con diversas concentraciones de oxígeno en la ventilación mecánica (21%, 40%, 60% y 100%).

En cuanto al hipocampo, como es sabido, comprende el Asta de Ammón (CA) y el giro dentado; ambas estructuras están en íntima conexión con la corteza entorrinal adyacente; el asta de Ammón se divide, según la clasificación que hiciera Rafael Lorente de Nó en 1934, en varias zonas de neuronas piramidales denominadas CA1, CA2, CA3 y CA4; CA1 y CA2 constituyen el suelo medio del asta temporal del ventrículo lateral; CA2, situada dorsalmente es reconocible por la gran compactación de la capa de neuronas piramidales, sobre todo si se la compara con la capa CA1; CA3 forma un arco descendente medial que finaliza en el hilio del giro dentado; el segmento final del asta de Ammón, CA4, se apoya en el ya citado hilio del giro dentado y a menudo es reconocido como el final de esta estructura (Sternberg, 1992); el (giro dentado, por el contrario, posee numerosas neuronas granulares (Felten y Shetty, 2010); esta compleja estructura participa en la consolidación de la memoria a corto plazo para generar recuerdos a largo plazo, función en la que cuenta con la participación de amplias regiones de la neocorteza (Felten y Shetty, 2010).

Se ha comprobado, en estudios recientes, que la VM inicia la apoptosis hipocámpica como resultado de la activación del receptor de dopamina tipo 2, y en respuesta a una señalización vagal (González-López y cols., 2013); usando cerdos con 7 días de vida como animales de experimentación, se ha demostrado que al inocularles el virus del síndrome reproductivo y respiratorio se originaba activación de la microglía e infiltrado inflamatorio en el hipocampo (Elmore y cols., 2014).

La aspiración de meconio induce lesión pulmonar, especialmente cuando está en conexión con asfisia perinatal, estando este acontecimiento asociado con daño cerebral; la lesión del SNC está restringida al hipocampo, en concreto al área CA3 del asta de Ammón (Aaltonen y cols., 2005).

En nuestro trabajo el hipocampo fue la única estructura nerviosa de las estudiadas que, tras la ventilación mecánica, presentaba modificaciones histológicas, salvo en el grupo con concentración de oxígeno al 21%, que podría ser considerado como control.

En el resto de los grupos ventilados se presentaron siempre alteraciones morfológicas que aumentaban proporcionalmente a medida que el porcentaje de oxígeno era mayor.

Así, en el grupo del 40%, estas modificaciones consistieron en fenómenos apoptóticos en la capa subgranular del giro dentado, así como en la capa CA3 del asta de Ammón; este hecho es similar a lo descrito en el hipocampo cuando se aspira meconio (Aaltonen y cols., 2005; Cleary y cols., 1998).

En el grupo de ventilación mecánica con oxígeno al 60%, tal y como expusimos en el apartado de Resultados, los hechos morfológicos se incrementan notablemente, con mayor proporción de figuras de apoptosis en las áreas basales subgranulares del giro dentado y presencia en la misma de edema perineuronal; esto se corresponde con lo observado por (Dinkel y cols., 2005) en estudios llevados a cabo con cultivos de neuronas granulares del hipocampo.

Finalmente en el grupo de ventilación al 100% todos los cambios histológicos ya reseñados previamente alcanzaron su máxima expresión con apoptosis en el giro dentado y en las capas CA2 y CA3 del asta de Ammón, edema perineuronal en la capa subgranular; las neuronas piramidales de las capas CA2 y CA3

presentaban hipercromatismo nuclear y citoplásmico, al igual que describieron Fries y cols. en 2005, aunque estos investigadores encontraron el mismo hecho en experiencias con cerdos hipoxémicos.

Un gran número de trabajos han sido realizados acerca de las lesiones neurológicas tras fenómenos de hipoxia y VILI (Böttiger y cols. 2001, Ishida y cols. 2004, Nollert y cols. 1999, Shuptrine y cols., 1984); nuestros hallazgos histológicos coinciden en ocasiones con éstos, ya que en última instancia el elemento diana principal de estas lesiones es la neurona y esta responde de forma similar ante una gran variedad de noxas.

Por otro lado, en nuestro trabajo no observamos activación microglial, al contrario de lo comunicado por Elmore y cols., (2014), quienes describen una marcada activación de la microglía tras la inoculación del virus del síndrome reproductivo y respiratorio y no comunican la presencia de apoptosis en las neuronas hipocampales.

Finalmente postulamos que las modificaciones que hemos observado se deben al efecto deletéreo del oxígeno, ya que cuanto mayor proporción del mismo se ventile mas daño neuronal y por tanto mayor daño observado en la histología; estos hallazgos morfológicos están, si no en desacuerdo, si son completamente diferentes a lo observado en el pulmón, en donde se establece una lesión pulmonar aguda que se va agudizando a medida que aumenta el porcentaje de oxígeno ventilado.

### *Pulmón*

Hemos estudiado las modificaciones que se pudieran establecer en los diferentes constituyentes del parénquima pulmonar cuando, tras la práctica de una traqueotomía a los animales de experimentación, los sometíamos a ventilación mecánica con diferentes concentraciones de oxígeno; desde el punto de vista microscópico hemos valorado diversos parámetros, entre los que destacan los siguientes: atelectasias, edema vascular, fibrosis, fenómenos inflamatorios y papel de los neumocitos II.

Se sabe que la estructura histológica de los alvéolos pulmonares está constituida por los neumocitos I y los neumocitos II como células epiteliales y subyacente a ellas se disponen elementos del tejido conjuntivo, tanto células (macrófagos, mastocitos, fibroblastos/miofibroblastos, etc.) como estructuras vasculares y fibras colágenas, elásticas y reticulares en variable proporción (Corvol y cols., 2009; Welsch, 2009; Kierszenbaum, 2013). Por otro lado en la luz alveolar se disponen macrófagos con capacidad altamente fagocítica y que se aprecian perfectamente cuando se tiñen con las técnicas inmunohistoquímicas de CD68 y mieloperoxidasa (Chen y cols., 2012).

Uno de los aspectos que mas nos interesaba estudiar era el rol que jugaban los neumocitos II cuando se aplicaba el estímulo lesional de la ventilación mecánica; tal y como ya hemos indicado, estas células forman parte del epitelio alveolar y entre sus características citológicas destacan su morfología cilíndrica, y la presencia de numerosos cuerpos lamelares en el citoplasma, que no son otra cosa que los precursores del surfactante pulmonar, producto que evita el colapso de los alvéolos (Welsch, 2014; Kierszenbaum, 2013); por otro lado se sabe que los neumocitos II son considerados como células madre pulmonares, ya

que son capaces de regenerar el alvéolo transformándose en neumocitos I y naturalmente, y por sucesivas divisiones mitóticas, originando nuevos neumocitos II (Guillot y cols., 2013).

Cuando se estudia el pulmón con técnicas inmunohistoquímicas, destaca el factor de transcripción tiroideo 1 como un excelente marcador de las células epiteliales alveolares II en condiciones de normalidad y, en el aspecto patológico, como indicador de un tipo de tumor, el adenocarcinoma pulmonar (Corvol y cols., 2009; La Rosa y cols., 2010), así como de tumores neuroendocrinos pulmonares (La Rosa y cols., 2010).

Existen numerosos trabajos que estudian el papel de los neumocitos II en la hiperoxia, tanto desde el punto de vista experimental “in vitro” como clínico (Liu y cols., 2013; Deubery cols., 2011; Yee y cols., 2006; Yang y cols., 2008; Uno y cols., 2007); en nuestro trabajo hemos encontrado una hiperplasia de estas células que aumentaba progresiva y lentamente desde el grupo ventilado con un 21% de oxígeno hasta el ventilado con el 100%; este hecho contrasta con los hallazgos de Liu y cols., 2013, que informan de una marcada apoptosis de las células epiteliales alveolares II en estudios “in vitro”; estos mismos autores (Liu y cols., 2013) concluyen que la hiperoxia tiene efectos inhibitorios sobre diversas funciones, tales como crecimiento celular, viabilidad celular, proliferación celular y ciclo celular, aunque todos los estudios realizados por este grupo de investigación se realizaron con cultivos celulares.

Por otro lado, los neumocitos II pueden sufrir transición epitelio-mesenquimal, tal y como han puesto de manifiesto trabajos de diversos grupos de investigación (Henson, 2003; Horowitz y Thannickal, 2006; Thannickal y Horowitz, 2006) y entre ellos los de nuestro propio grupo (Cabrera-Benítez y cols., 2012), aunque en nuestro trabajo no hemos llevado a cabo dicho estudio.

Respecto a los fenómenos hemorrágicos, los interpretamos como consecuencia de la distensión mantenida por la ventilación mecánica, lo que provocaría roturas y dehiscencias vasculares con el consiguiente paso de elementos formes de la sangre al intersticio y luz alveolar.

Las atelectasias son claramente evidentes en muchos tipos de cuadros patológicos pulmonares, siendo muy destacadas en el caso de VILI, tal y como han demostrado Villar y cols., 2009 y Cabrera-Benítez y cols., 2012 entre otros; en nuestro caso asistimos a un incremento progresivo de las mismas, sobre todo en áreas subpleurales.

Tal y como indicamos previamente al respecto de las atelectasias, el componente inflamatorio, sobre todo cuando se aplica ventilación mecánica, es muy marcado (Dhanireddy y cols., 2006; Dreyfuss y cols., 2005; Cocanour y cols., 2005; Brun-Buisson y cols., 2004); en nuestros grupos este hecho era similar con incrementos celulares, tanto en los alvéolos, como en el intersticio y perivasculares a partir del grupo del 21% hasta el del 100%.

Respecto a la fibrosis alveolar, consideramos que es una solución reparativa empleando elementos de la estirpe mesenquimal (fibroblastos/miofibroblastos) que bien pueden tener su origen en el propio pulmón o haber sufrido transición epitelio-mesenquimal (Cabrera-Benítez y cols., 2012).

Un punto bastante inespecífico que hemos observado es el edema; este hecho siempre se localizaba en la periferia vascular, tanto de vasos arteriales como venosos; hay que destacar que este edema no estaba nunca presente periférico a las vías aéreas (bronquios y bronquiolos).

Finalmente queremos llamar la atención sobre que los diversos parámetros valorados en nuestro trabajo (fibrosis, atelectasias, neumocitos II, etc.) han ido incrementándose de forma progresiva a medida que la concentración de oxígeno aumentaba.

**Conclusiones**

### *Sistema Nervioso Central*

1. La hiperoxia, mediante ventilación mecánica con diferentes proporciones de oxígeno, de ratas sanas no produjo lesión en determinadas áreas del Sistema Nervioso Central relacionadas con la respiración (área postrema, núcleo del tracto solitario y núcleo motor dorsal del vago).
2. La zona del Sistema Nervioso Central donde la hiperoxia provocó lesión fue el hipocampo, puesta de manifiesto por la presencia de edema perineuronal y cuerpos apoptóticos.
3. Las alteraciones morfológicas fueron constantes en los grupos de ventilación mecánica con proporciones de oxígeno del 40%, 60% y 100%, siendo apreciadas tanto en el giro dentado como en el asta de Ammón
4. Estas modificaciones histológicas eran más graves a medida que el porcentaje de oxígeno ventilado era mayor; esto se observó en los dos componentes hipocampales (giro dentado y capas CA2 y CA3 del asta de Ammón).

### *Pulmón*

5. La hiperoxia en ratas sanas, inducida por ventilación mecánica, produce lesión pulmonar aguda, caracterizada, desde el punto de vista histológico, por edema perivascular, atelectasias, inflamación, fibrosis e hiperplasia de células epiteliales alveolares II.
6. A medida que la concentración de oxígeno se aumentaba en la VM, las modificaciones histopatológicas pulmonares eran más marcadas, alcanzando su punto álgido en el grupo de VM con 100% de oxígeno.
7. Los neumocitos II son las células que más van a modificarse (hiperplasia de las mismas), ya que actúan como células madre pulmonares repoblando los territorios dañados por la acción deletérea combinada de la ventilación mecánica y la hiperoxia.

## **Bibliografía**

- Aatonen M, Soukka H, Halkola, Kalimo H, Holopainen IE, Kääpä PO. Meconium aspiration induces neuronal injury in piglets. *Acta Paediatr.* 94(10) :1468-75. (2005)
- Abraham L. Kierszenbaum y Laura L. Tres. Elsevier 3ª Edición. *Histología y Biología Celular. Introducción a la Anatomía Patológica.* (2012)
- Alarcón Ardite, A. Universidad de Barcelona. III Curso Nacional de Ventilación mecánica. (2007).
- Billig, P. Mello –Carpes C, Izquierdo I. The Nucleus of the Solitary Tract–Nucleus Paragigantocellularis-Locus Coeruleus- CA1 region of dorsal hippocampus pathway is important for consolidation of object recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory* 100 :56-63. (2013)
- Böttiger BW, Möbes S, Glätzer R, Bauer H, Gries A, Bartsch P, Motsch J, Martin E : Astroglial protein S-100 is an early and sensitive marker of hypoxic brain damage and outcome after cardiac arrest in humans. *Circulation.* 103 :2694-8. (2001)
- Brun-Buisson C, Minelli C, Bertolini G, Brazzi L, Pimentel J, Lewandowski K, Bion J, Romand JA, Villar J, Thorsteinsson A, Damas P, Armaganidis A, Lemaire F. Epidemiology and outcome of acute lung injury in European intensive care units. Results from the ALIVE study. *Intensive Care Med.* 30(1):51-61. (2004)
- Buforn Galiana, A, Reina Artacho, C, de la Torre Prados., MV: <http://files.sld.cu/anestesiologia/files/2012/06/ventmeca.pdf>. (2012)
- Cabrera Benítez NE; Matteo Parotto; Martin Post; Bing Han; Peter M. Spieth; Wei-erh Cheng; Francisco Valladares; Jesús Villar; Mingayo Liu; Masaaki Sato; Haibo Zhang; Arthur S. Slutsky: Mechanical stress induces lung fibrosis by epithelial-mesenchymal transition. *Crit Care Med* 2012 Vol.40 (2012)
- Cabrera-Benitez NE, Pérez-Roth E, Casula M, Ramos-Nuez A, Ríos-Luci C, Rodríguez-Gallego C, Sologuren I, Jakubkiene V, Slutsky AS, Padrón JM, Villar J. Anti-inflammatory activity of a novel family of aryl ureas compounds in an endotoxin-induced airway epithelial cell injury model. *PLoS One.* 7(11):e48468. (2012)
- Charles P., Barber S. Toll-like receptors: a link between mechanical ventilation, innate immunity and lung injury? *Intensive Care Med* 36:909-911. (2010)
- Chen C, Zhu YB, Shen Y, Zhu YH, Zhang XG, Huang JA. Increase of circulating B7-H4-expressing CD68+ macrophage correlated with clinical stage of lung carcinomas. *J. Immunother.* 35(4) :354-8. (2012)
- Cleary GM, Wiswell TE. Meconium-stained amniotic fluid and the meconium aspiration syndrome. An update. *Pediatr Clin North* 45; 511-29. (1998)
- Cocanour CS, Ostrosky-Zeichner L, Peninger M, Garbade D, Tidemann T, Domonoske BD, Li T, Allen SJ, Luther KM. Cost of a ventilator-associated pneumonia in a shock trauma intensive care unit. *Surg Infect (Larchmt).* 6(1):65-72. (2005)

- Corvol H, Flamein F, Epaud R, Clement A, Guillot L. Lung alveolar epithelium and interstitial lung disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 41(8-9):1643-51. (2009)
- Cui, RJ ; Li, X ; Appleyard, S : Ghrelin Inhibits Visceral Afferent Activation of Catecholamine Neurons in the Solitary Tract Nucleus. 31(9) :3484-3492. (2011)
- Dhanireddy S, Altemeier WA, Matute-Bello G, O'Mahony DS, Glenny RW, Martin TR, Liles WC. Mechanical ventilation induces inflammation, lung injury, and extra-pulmonary organ dysfunction in experimental pneumonia. *Lab Invest.* 86(8):790-9. (2006)
- Dinkel K, Dhabhar FS, Sapolsky RM : Neurotoxic effect of polymorphonuclear granulocytes on hippocampal primary cultures. *Proc Natl Acad Sci.* 101:331-6. (2004)
- Dreyfuss D, Ricard JD. Acute lung injury and bacterial infection. *Clin Chest Med.* 26(1):105-12. (2005)
- Elmore MR, Burton MD, Conrad MS, Rytych JL, Van Alstine WG, Johnson RW. Respiratory viral infection in neonatal piglets causes marked microglia activation in the hippocampus and deficits in spatial learning. *Neurosci.* 34 (6) :2120-9. (2014)
- Fink DJ, Sternberg LR, Weber PC, Mata M, Goins WF, Glorioso JC. In vivo expression of beta-galactosidase in hippocampal neurons by HSV-mediated gene transfer. *Hum Gene Ther.* (1):11-9. (1992)
- Flores, C., Pino-Yanes, M., Casula, M., Villar, J.: Genetics of acute lung injury: past, present and future. *Minerva Medica* 76:860-4. (2010)
- Fries M, Nickenbach J, Henzler D, Beckers S, Dembinski R, Sellhaus B, Rossaint R, Kuhlen R. *Anesthesiology.* 102(4) :761-7. (2005)
- González-López , López-Alonso I, Aguirre A, Amado-Rodríguez L, Batalla-Solís E, Astudillo A, Tomás-Zapico C, Fueyo A, dos Santos CC, Talbot K, Albaiceta GM. Mechanical ventilation triggers hippocampal apoptosis by vagal and dopaminergic pathways. *Am J Respir Crit Care Med.* Sep 15;188(6):693-702. (2013)
- Guillot, Nathatn N, Tabary O, Thouvenin G, Le Rouzic P, Corvol H, Amselem S, Clement A. Alveolar epithelial cells: Master regulators of lung homeostasis. *Int J Biochem Cell Biol.* 45(11):2568-73. (2013)
- Hatsell, S; Rowlands T, Hiremath M, Cowin P. Beta-catenin and Tcfs in mammary development and cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 8 (2): pp. 145-58. (2003).
- Henson PM. Possible roles for apoptosis and apoptotic cell recognition in inflammation and fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 29(3 Suppl):S70-6. (2003)
- Herrera, MT, Toledo, C, Valladares, F, Muros, M, Díaz-Flores, L, Flores, C , Villar, J. Positive end-expiratory pressure modulates local and systemic inflammatory responses in a sepsis-induced lung injury model. *Intensive Care Med.* 29: 1345-1353 (2003)

- Hesketh PJ. Chemotherapy- induced nausea and vomiting. *N Engl J Med* 328 :2482-94. (2008)
- Horowitz JC, Thannickal VJ. Epithelial-mesenchymal interactions in pulmonary fibrosis. *Semin Respir Crit Care Med.* 27(6):600- 12. (2006)
- Ishida K, Shimizu H, Hida H, Urakawa S, Ida K, Nishino H : Argyroplilic dark neurons represent carios states of neuronal damage in brain insults : Some come to die and others survive. *Neuroscience* 125 :633-44. (2004)
- Kanda, S., Saito, M., Hayashi, M., Atsumi, S., Komine, S., Tanuma. N Hypoglossal hipoplasia and hiperplasia of the area postrema following perinatal hypoxic brain damage. *Brain & Development* 32:285-288. (2010)
- La Rosa S, Chiaravalli AM, Placidi C, Papanikolaou N, Cerati M, Capella C. TTF1 expression in normal lung neuroendocrine cells and related tumors: immunohistochemical study comparing two different monoclonal antibodies. *457(4):497-507.* (2010)
- Liu XX, Yu XR, Jia XH, Wang KX, Yu ZY, Lv CJ. Effect of hyperoxia on the viability and proliferation of the primary type II alveolar epithelial cells. *Cell Biochem Biophys.* 67(3) : 1539-46. (2013)
- Lorke DE, Kwong WH, Chan WY, Yew DT. Development of catecholaminergic neurons in the human medulla oblongata. *Life Sci* 73 :1315-31. (2003)
- Moldobaeva, A., van Rooijen, N., Wagner, NE. Effects of Ischemia on Lung Macrophages. *Plos ONE* 6(11):e26716.doi:10.137. (2011)
- Nollert G, Nagashima N, Buceros J, Shin óka T, Lidv HG, du Plessis A, Lonas RA : Oxygenation strategy and neurologic damage after deep hypothermic circulatory arrest :II.Hipoxic versus free radical injury. *J Thorac Cardiovasc Surg.*117 :1172-9. (1999)
- Prince CJ, Hoyda TD, Ferguson AV. The area postrema: a brain monitor and integrator of systemic autonomic state. *Neuroscientist* 14:182-94. (2008)
- Puelles López, Martínez Pérez y Martínez de la Torre. *Neuroanatomía, editorial panamericana* (2008).
- Ross y Pawlina. *Histología. 5º Edición. Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular.* Editorial médica Panamericana.(2009)
- Shuptrine JR, Auffatnt RA, Gal TJ : Cerebral and Cardiopilmonary resposes to high-frequency jet ventilation and convecional mechanical ventilation in a model of brain and lung injury. *Anesth Analg* 63 :1065-70. (1984)
- Thannickal VJ, Horowitz JC. Evolving concepts of apoptosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc Am Thorac Soc.* 3(4):350-6. (2006)
- Villar, J; Cabrera, NE; Casula, M; Flores, C; Valladares, F; Muros, M; Blanch, L; Slutsky, A; Kacmareck, RM: Mechanical ventilation modulates Toll-like receptor signaling pathway in a sepsis-induced lung injury model. *Intensive Care Med* 36:1049-1057. (2010)
- Villar, J; Herrera-Abreu, MT; Valladares, F; Muros, M; Pérez-Méndez, L; Flores, C; Kacmarek, RM: Experimental Ventilator-induced Lung Injury. *Anesthesiology* 110:1341-7. (2009)

- Villar, J; Cabrera, NE; Casula, M; Valladares, F; Flores, C; López-Aguilar, J; Blanch, L; Zhang, H; Kacmarek, RM; Slutsky, AS: WNT/ $\beta$ -Catenin signaling is modulated by mechanical ventilation in an experimental model of acute lung injury. *Intensive Care Med* 37:1201-1209. (2011a)
- Villar, J; Cabrera, NE; Casula, M; Flores, C; Valladares, F; Díaz-Flores, L; Muros, M; Slutsky, AS; Kacmarek, RM: Mechanical ventilation modulates TLR4 and IRAK-3 in a non-infectious, ventilator-induced lung injury model. Villar et al. *Respiratory Research*. *Respiratory Research*, 11 :27-38. (2010)
- Villar, J; Cabrera, NE; Valladares, F; Casula, M; Flores, C; Blanch, L; Quilez, ME; Santana-Rodríguez, N; Kacmarek, RM; Slutsky, AS: Activation of the Wnt/ $\beta$ - Catenin Signaling Pathway by Mechanical Ventilation Is Associated with Ventilator-Induced Pulmonary Fibrosis in Healthy Lungs. *Plos ONE* 6(9): e23914. (2011b)
- Villar, J; Pérez-Méndez, L; Espinosa, E; Flores, C; Blanco, J; Muriel, A; Basaldúa, S; Muros, M; Blanch, L; Artigas, A; Kacmarek, RM; Serum Lipopolysaccharide Binding Protein Levels Predict Severity of Lung Injury and Mortality in Patients with Severe Sepsis. *Plos ONE* 4(8): e6818.doi:10.1371/journal.pone0006818. (2009)
- Welsch. Elsevier 2º Edición. *Histología*. Editorial Panamericana.(2009)
- Yee M, Vitiello PF, Roper JM, Staversky RJ, Wright TW, McGrath-Morrow SA, Maniscalco WM, Finkelstein JN, O'Reilly MA. Type II epithelial cells are critical target for hyperoxia-mediated impairment of postnatal lung development. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 291(5):L1101-11. (2006)