



**Universidad de Oviedo**

**Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias**

**Máster en Biomedicina y Oncología Molecular**

**Efecto del envejecimiento en el daño  
neurológico asociado a la lesión pulmonar  
inducida por la ventilación mecánica**

**Marina del Riego Nozal**

**Junio 2016**

**Trabajo Fin de Máster**

# ÍNDICE

<b>Resumen</b>	<b>3</b>
<b>Lista de abreviaturas empleadas</b>	<b>4</b>
<b>Introducción</b>	<b>5</b>
<i>Ventilación mecánica y lesión inducida por ventilación</i>	5
<i>Alteraciones neuropsicológicas en el paciente crítico</i>	7
<i>Daño cerebral asociado a la ventilación</i>	12
<i>Modelo de envejecimiento acelerado Zmpste24-/-</i>	16
<b>Hipótesis y Objetivos</b>	<b>21</b>
<b>Material y Métodos</b>	<b>22</b>
<i>Modelo animal</i>	22
<i>Protocolo Experimental de ventilación</i>	22
<i>Obtención de muestras</i>	23
<i>Cuantificación de Proteínas</i>	24
<i>Western blot</i>	24
<i>Análisis estadístico</i>	25
<b>Resultados</b>	<b>26</b>
<i>Estudio de la proteína GSK-3<math>\beta</math></i>	26
<i>Estudio de la proteína Caspasa-7</i>	28
<b>Discusión</b>	<b>30</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>34</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>35</b>

## RESUMEN

La ventilación mecánica es un tratamiento de soporte vital que sirve para mantener un adecuado intercambio gaseoso en aquellos pacientes que sufren una insuficiencia respiratoria y no pueden mantenerlo por sus propios medios. Sin embargo su uso está asociado al desarrollo de lesiones pulmonares, como VILI, que puede generar una respuesta inflamatoria sistémica y tener repercusión en órganos distales. Los pacientes críticos ingresados en la UCI que requieren el uso de ventilación desarrollan con mayor incidencia trastornos neuropsicológicos, que van desde el deliro hasta el deterioro cognitivo a largo plazo. La ventilación mecánica, así como la edad, se han identificado como factores de riesgo para el desarrollo de estas alteraciones. La ventilación a través de la vía vagal provoca un estado hiperdopaminérgico en el hipocampo, que mediante la inhibición de la vía de supervivencia celular Akt/GSK-3 desencadena la apoptosis en el hipocampo. La hipótesis de nuestro trabajo es que el envejecimiento empeora los efectos de la ventilación mecánica sobre el hipocampo. Para comprobar esta hipótesis se estudió la ruta de supervivencia celular Akt/GSK-3 $\beta$  en ratones *wildtype* y *knockout Zmpste24* con progeria. Se analizó la relación de GSK-3 $\beta$  fosforilada frente a la total y caspasa-7/actina en ratones sometidos a ventilación mecánica y ratones basales de ambos genotipos. Los resultados obtenidos muestran una activación de la ruta Akt/GSK-3 $\beta$  y de la apoptosis en el hipocampo de los ratones *wildtype* como consecuencia de la ventilación. Sin embargo en los ratones *knockout* no se encontraron diferencias.

# LISTA DE ABREVIATURAS EMPLEADAS

TABLA 1 ABREVIATURAS DEL TRABAJO

<b>CAM-ICU</b>	Método de Evaluación de la Confusión en la UCI
<b>DDS</b>	Puntuación para la detección de Delirio
<b>DRD2</b>	Receptor de dopamina tipo 2
<b>FiO<sub>2</sub></b>	Fracción inspirada de oxígeno
<b>HGPS</b>	Síndrome de Progeria de Hutchinson-Gilford
<b>ICDSC</b>	Lista de Verificación para la Detección del Delirio en la UCI
<b>KO</b>	<i>Knockout</i>
<b>NTS</b>	Núcleo del tracto solitario
<b>PB-KFC</b>	Complejo parabraquial/Kölliker-Fuse
<b>PEEP</b>	Presión positiva al final de la espiración
<b>PIP</b>	Presión inspiratoria máxima
<b>SDRA</b>	Síndrome de Distrés respiratorio agudo
<b>SEM</b>	Error estándar de la media
<b>UCI</b>	Unidad de cuidados intensivos
<b>VILI</b>	Lesión pulmonar inducida por la ventilación

# INTRODUCCIÓN

## Ventilación mecánica y lesión inducida por ventilación

La ventilación mecánica es un tratamiento de soporte vital que se utiliza para mantener un intercambio gaseoso adecuado cuando el paciente no puede por sus propios medios. A pesar de sus efectos beneficiosos, su aplicación puede causar graves daños estructurales al pulmón, así como otros efectos sistémicos (Herold et al. 2013). Durante la inspiración en ventilación espontánea se generan, gracias a la contracción del diafragma y otros músculos inspiratorios, presiones negativas intratorácicas que desembocan en la entrada de aire en el pulmón a favor del gradiente de presión creado. La espiración es generalmente un proceso pasivo, en el que el sistema respiratorio regresa, una vez terminada la contracción de los citados músculos, a su posición de reposo.

En ocasiones, los músculos respiratorios son incapaces de producir la presión negativa necesaria para la ventilación espontánea, por lo que es necesario recurrir a la ventilación mecánica. En ella se emplean presiones positivas para que el aire penetre en los alveolos pulmonares, superando la resistencia de las vías aéreas y las propiedades elásticas del pulmón (Slutsky & Ranieri 2013). A pesar de su papel como técnica de soporte vital, el empleo de este tipo de ventilación está asociado a una lesión específica, denominada lesión pulmonar inducida por la ventilación (***Ventilator-induced lung injury, VILI***), que puede producirse en un pulmón sano o empeorar la lesión de un pulmón ya dañado (Herold, Gabrielli et al. 2013). Dentro de los mecanismos patogénicos que puede desencadenar la ventilación mecánica, el más evidente es el **barotrauma**, causado por la aplicación de presiones demasiado elevadas que producen sobredistensión alveolar, lo que puede ocasionar la rotura de los espacios alveolares y en consecuencia fugas de aire desde el espacio alveolar (en forma de neumotórax o enfisema subcutáneo entre otros). Otros mecanismos son el **volutrauma**, debido a la utilización de un volumen excesivo de aire y a las diferencias en cuanto a la distensibilidad pulmonar, lo que origina una sobredistensión regional; el **atelectrauma**, definido como el cambio cíclico en la aireación causada por ciclos

repetitivos de apertura y cierre de las vías aéreas y los alveolos, debido a la existencia de volúmenes de aire demasiado pequeños al final de la espiración; y por último tendríamos el **biotrauma**, disrupción de las paredes celulares y cambios conformacionales en las proteínas de membrana, debido a la sobredistensión alveolar, que ocasiona la liberación de mediadores inflamatorios. Entre las consecuencias de estos mecanismos destaca la formación de un infiltrado de células inflamatorias, formación de membranas hialinas, un incremento de la permeabilidad vascular y la formación de un edema pulmonar de alto contenido proteico (Slutsky & Ranieri 2013). En pacientes sometidos a ventilación mecánica, la limitación del daño asociado a la ventilación mediante el empleo de volúmenes bajos ha disminuido la morbilidad y la mortalidad (Gonzalez-Lopez et al. 2011).

Las células pulmonares en condiciones normales son capaces de adaptarse a las deformaciones cíclicas a las que se ven sometidas, gracias al tráfico de lípidos y a la remodelación del citoesqueleto inducidas por deformaciones sobre la membrana plasmática. Durante la ventilación mecánica se pueden generar fuerzas excesivas o abruptas, como el estiramiento cíclico que sufren los alveolos pulmonares, lo que puede provocar daño directo sobre el epitelio alveolar, afectando a las interacciones celulares y alterando la barrera hematogaseosa. También se ha observado que la utilización de fracciones de oxígeno elevadas durante la ventilación mecánica afecta a las propiedades de las células epiteliales, haciéndolas más rígidas y susceptibles al daño. En general todos estos mecanismos y lesiones disminuyen los mecanismos de reparación de las barreras alveolares (Herold, Gabrielli et al. 2013).

Los mecanismos patogénicos desencadenados por las fuerzas mecánicas generadas por el ventilador conllevan alteraciones en las células, cambios en la transducción de señales y en la expresión de genes, así como una liberación local y sistémica de mediadores inflamatorios, en un proceso denominado mecanotransducción, que se podría explicar como la conversión de un estímulo mecánico en alteraciones bioquímicas y moleculares. En VILI estos mecanismos podrían ser cambios conformacionales de las moléculas de membrana, cambios en la integridad de la membrana o derivados del estiramiento cíclico. Como ya hemos comentado estos mecanismos activaría patrones de expresión génica que provocarían la liberación de mediadores inflamatorios. En los casos en los que haya un incremento de la

permeabilidad vascular, estas sustancias, así como bacterias o lipopolisacáridos pueden pasar a la circulación, provocando una respuesta sistémica, que desemboque en fallo multiorgánico y en último caso en la muerte (Slutsky & Ranieri 2013), (López-Aguilar et al. 2013).

## **Alteraciones neuropsicológicas en el paciente crítico**

Normalmente los paciente que sufren un fallo respiratorio y requieren soporte ventilatorio son ingresados en unidades de cuidados intensivo (UCIs). El número de pacientes críticos admitidos en la UCI se esta incrementando rápidamente (Brummel et al. 2014). En las últimas décadas se han desarrollado grandes avances en el manejo de los pacientes críticos, destinados principalmente a reducir la mortalidad y extender la esperanza de vida de estos pacientes, como por ejemplo el empleo de estrategias protectoras durante la ventilación mecánica (Morandi et al. 2011), (Slutsky 2015). En Estados Unidos, aproximadamente el 80% de los pacientes admitidos en la UCI sobreviven (Jackson et al. 2014). Sin embargo, a pesar de la reducción en la mortalidad de las enfermedades críticas, surgen otras complicaciones a largo plazo, asociadas a la reducción de la calidad de vida (Wergin & Modrykamien 2012). En los últimos años se han hecho multitud de estudios destinados a identificar y monitorizar estas complicaciones y sus causas, así como para introducir medidas que optimicen la recuperación de los pacientes (Morandi et al. 2011).

Además de las complicaciones físicas, las alteraciones neuropsicológicas son bastante frecuentes, llegando a afectar al 50% de los pacientes de la UCI, a la vez que difíciles de determinar y reconocer. Estas afecciones son diferentes del deterioro asociado a la edad, tanto en progresión y evolución como en epidemiología y factores de riesgo, por lo que se pueden clasificar como un subgrupo específico de alteraciones neuropsicológicas del paciente crítico (Wergin & Modrykamien 2012). Incluyen deterioro cognitivo, depresión, discapacidad funcional y disminución de la calidad de vida entre otras y se pueden desarrollar en pacientes sin alteraciones cognitivas previas(Jackson et al. 2014). Las disfunciones cerebrales agudas que sufren los pacientes de la UCI más comúnmente durante la fase activa de la enfermedad crítica

son el coma y el delirio, mientras que a largo plazo es más común el deterioro cognitivo (Torgersen et al. 2011)(Wergin & Modrykamien 2012).

El **delirio**, también denominado psicosis de la UCI, es una forma de síndrome confusional agudo definido como una alteración de la conciencia y de la cognición. Se desarrolla normalmente en la fase aguda de la enfermedad crítica y su curso durante la estancia del paciente en la UCI es fluctuante (Zaal & Slooter 2012). Incluye modificaciones en la habilidad de focalizar y mantener la atención, alteraciones perceptivas y otros cambios cognitivos (López-Aguilar et al. 2013), (Zaal & Slooter 2012).

Podemos distinguir dos subtipos de delirio, según su afectación psicomotora: hiperactivo, con agitación e inquietud, normalmente se presenta con baja frecuencia, en torno al 1%; e hipoactivo, mucho más frecuente (en torno al 56%), que se caracteriza por falta de movimiento, apatía y disminución de la capacidad de respuesta. También pueden observarse subtipos con características mixtas (Zaal & Slooter 2012).

La frecuencia de delirio en estudios de pacientes de UCI muestra una tasa que varía del 16 al 89% (Zaal & Slooter 2012). Esta variación tan grande podría explicarse por las dificultades existentes a la hora de realizar el diagnóstico de esta alteración, debido a la existencia de diferentes protocolos de diagnóstico temprano, así como los de sedación y analgesia. Otra de las dificultades reside en la falta de comunicación verbal que existe normalmente con estos pacientes, dado que suelen requerir ventilación mecánica, por lo que es necesario recurrir a herramientas de diagnóstico no verbales (Lin et al. 2008). Algunas de las herramientas de detección temprana más utilizadas son el Método de Evaluación de la Confusión en la UCI (CAM-ICU), Lista de Verificación para la Detección del Delirio en la UCI (ICDSC), y Puntuación para la detección de Delirio (DDS) (Morandi et al. 2011), (Torgersen et al. 2011). La carencia de un protocolo de diagnóstico estandarizado dificulta el manejo de estos pacientes, así como la comparación de datos entre diferentes estudios. Se cree que hasta un 70% de los casos pueden pasar desapercibidos (Hsieh et al. 2013).



Existe mucha controversia a la hora de definir los factores de riesgo para el desarrollo de delirio en la UCI. En un estudio reciente Zaal y colaboradores realizaron una exhaustiva revisión acerca de los factores de riesgo para determinar sobre cuales de ellos existía mayor evidencia y llegaron a determinar 11. Entre los factores de riesgo con evidencia suficiente estarían la edad del paciente, patologías crónicas como demencia o hipertensión, así como diversas variables precipitantes como enfermedades agudas graves (identificadas como aquellas con puntuaciones elevadas en las diferentes escalas de gravedad empleadas), coma, cirugía de emergencia, traumatismos severos, ventilación mecánica, acidosis metabólica y desarrollo de delirio en los días previos. La mayoría de estos factores no son modificables, sino que son características propias de los pacientes a su entrada en la UCI (Zaal et al. 2015). Estudios más antiguos relacionaban la sepsis y la hipoalbuminemia con el desarrollo de delirio. La relación de la sepsis con el desarrollo de delirio puede estar asociada con la liberación de endotoxinas bacterianas y citoquinas o con la disminución del flujo sanguíneo cerebral regional, entre otras hipótesis (Lin et al. 2008), (Jackson & Hopkins 2009).

Los pacientes ventilados suelen recibir analgésicos y sedantes, para prevenir el dolor y la ansiedad. Sin embargo el uso de estos medicamentos ha sido asociado con el desarrollo de delirio. No todos los sedantes provocan los mismos efectos a corto o medio plazo, por ejemplo las benzodiazepinas se relacionan con peores pronósticos, mientras que la dexmedetomidina, un nuevo agente, esta proporcionando muy buenos resultados, disminuyendo la duración de la disfunción cerebral, con una menor probabilidad de desarrollo de delirio en los días siguientes a su uso. En general la reducción del uso de benzodiazepinas frente a otros medicamentos puede mejorar el pronóstico de los pacientes (Wergin & Modrykamien 2012), (Hughes et al. 2012), (Morandi et al. 2011).

Las consecuencias del desarrollo de delirio en la UCI se relacionan con un peor pronóstico, aumento de la mortalidad hospitalaria y del coste médico por paciente, y mayor duración de la ventilación mecánica (Lin et al. 2008), incluso después de ajustar por las comorbilidades, la severidad de la enfermedad crítica o la sedación (López-Aguilar et al. 2013), (Granja et al. 2012). El delirio es el mayor predictor de estancia en

la UCI, y cada día de delirio empeora el pronóstico (Hsieh et al. 2013). Las estrategias más utilizadas para reducir la duración del delirio son reducir la sedación y retirar la ventilación mecánica lo antes posible, así como el tratamiento con dexmedetomidina que ha demostrado que reduce la prevalencia de delirio (Zaal et al. 2015), (Morandi et al. 2011).

En un estudio de cohortes prospectivo realizado por Brummel y colaboradores se relacionó la duración del delirio en la UCI con una discapacidad a la hora de realizar actividades de la vida diaria: a mayor tiempo sufriendo delirio aumentaba la probabilidad de sufrir deterioro en la función motora-sensorial. Esto demostró que los efectos del delirio en la UCI se extendían más allá de problemas en la cognición, afectando al pronóstico funcional del paciente. La hipótesis subyacente relacionaba el delirio hipoactivo, en el que se reduce la actividad física, con el desarrollo de atrofia muscular y debilidad durante la estancia en la UCI, lo que hacía más propenso al paciente a sufrir incapacidad funcional de algún grado en el tiempo posterior a la estancia en la UCI (Brummel et al. 2014).

El delirio también se ha determinado como un factor predictor para la aparición de **deterioro cognitivo a largo plazo**. El deterioro cognitivo se puede definir como una serie de anomalías clínicas significativas en funciones cerebrales como la memoria, la atención, la velocidad de procesamiento mental, la función ejecutiva o las habilidades espaciales, visuales e intelectuales (López-Aguilar et al. 2013), (Zaal & Slooter 2012), (Jackson & Hopkins 2009). Puede variar en cuanto a su gravedad, de leve a grave, llegando a limitar el desarrollo de las actividades diarias así como empeorar la calidad de vida del paciente a largo plazo (Gordon et al. 2004). Se cree que entre un 30-80% de los pacientes de la UCI desarrollaran deterioro cognitivo a largo plazo (Jackson et al. 2004).

Respecto a la prevalencia de esta afección, estudios de cohortes realizados por Hopkins et al mostraron que la incidencia del deterioro cognitivo a largo plazo disminuía, pasando de un 78% de los pacientes de UCI en el momento del alta hospitalaria a 46% en el año siguiente y bajaba hasta un 26% en los 6 años posteriores al alta (Wergin & Modrykamien 2012), (Jackson et al. 2004).

Los pacientes parecen susceptibles a sufrir deterioro cognitivo independientemente de la edad o del nivel educativo (Jackson & Hopkins 2009). Sobre los factores de riesgo que pueden predisponer al desarrollo del deterioro cognitivo a largo plazo se ha hipotetizado acerca de la presencia de complicaciones médicas como sepsis, SDRA, hipoxemia o el uso de determinados medicamentos como narcóticos y sedantes. Además como ya se ha comentado anteriormente, se ha relacionado la aparición de delirio en la UCI con el desarrollo de deterioro cognitivo a largo plazo (Gordon et al. 2004), (Pandharipande et al. 2013), (Sakuramoto et al. 2015). Girard et al realizaron en el año 2010 el primer estudio de cohorte prospectivo en pacientes de UCI sometidos a ventilación mecánica y determinaron que la duración del delirio era un factor predictor independiente para el desarrollo de deterioro cognitivo a largo plazo (Girard et al. 2010). Por lo tanto es importante prevenir, diagnosticar y tratar el delirio de la UCI para evitar el desarrollo de secuelas a largo plazo (Wergin & Modrykamien 2012), (Fonsmark & Rosendahl-Nielsen 2015).

También resulta muy importante la detección temprana del deterioro cognitivo, pues tiene serias implicaciones en la vida de los pacientes y permitiría poner en marcha terapias de rehabilitación cognitiva. Sin embargo, el deterioro cognitivo pasa desapercibido en uno de cada dos casos debido a la dificultad de realizar una evaluación del estado cognitivo (Gordon et al. 2004). Esta se puede hacer mediante observación de datos objetivos, como los test cognitivos, o mediante datos más subjetivos, como la observación clínica del paciente. La detección de delirio resulta muy importante pues como ya se ha comentado se relaciona directamente con el riesgo de padecer deterioro cognitivo a largo plazo (Gordon et al. 2004),(Lin et al. 2008).

También es bastante frecuente en los pacientes después de su estancia en la UCI, el desarrollo de problemas psicológicos, como **depresión y ansiedad**. La prevalencia y severidad de estos síntomas varía entre un 10-58%. Se cree que estos desordenes afectivos pueden estar relacionados con el deterioro cognitivo que sufren los pacientes, pues pueden empeorar la velocidad psicomotora, la atención e incrementar la distracción en los test neuropsicológicos. Además la depresión severa puede

mimetizar los síntomas del deterioro cognitivo (Gordon et al. 2004), (Jackson et al. 2014).

## **Daño cerebral asociado a la ventilación**

Aunque la **ventilación mecánica** es una herramienta de soporte vital, existe bastante evidencia acerca de su relación con el desarrollo de alteraciones neuropsicológicas en el paciente crítico. Esto se puede ver por ejemplo en la frecuencia del delirio de la UCI, que en pacientes no ventilados se sitúa entre un 20-40%, mientras que en los pacientes sometidos a ventilación mecánica asciende hasta un 60-80% (Wergin & Modrykamien 2012).

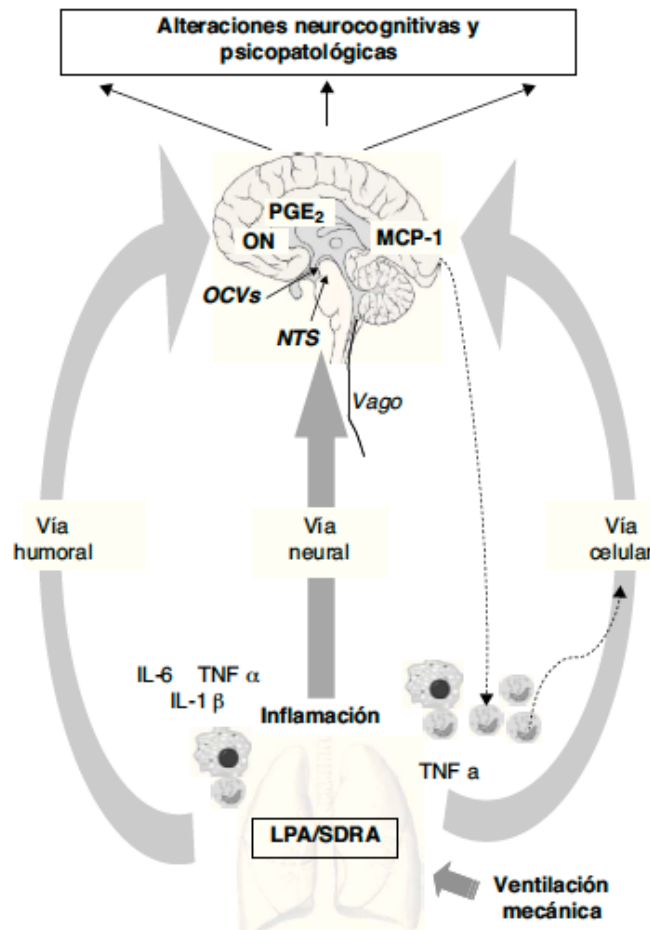
Esto ha llevado al desarrollo de protocolos y estrategias de ventilación destinadas tanto a proteger el pulmón, como a evitar el desarrollo de lesiones inducidas del uso del ventilador en otros órganos, ajustando los parámetros ventilatorios y los patrones de ventilación para mejorar la interacción del paciente con el ventilador. Así se consigue garantizar el intercambio gaseoso y evitar en la mayor parte de lo posible el desarrollo de asincronías y disconfort respiratorio (disnea), pues se han identificado como marcadores negativos de pronóstico del paciente, incrementando la duración de la ventilación y la estancia en la UCI y se han relacionado con la aparición de alteraciones neurocognitivas. Las alteraciones respiratorias pueden provocar hipoxia cerebral y disminución del flujo sanguíneo cerebral, pudiendo provocar secuelas neuropsicológicas (Jackson et al. 2004). El hipocampo, la región cerebral asociada al aprendizaje y la memoria, es una zona muy sensible a la hipoxia. También puede verse afectada por alteraciones estructurales inducidas por el SDRA, y todo ello podría provocar las afecciones neuropsicológicas post-UCI (López-Aguilar et al. 2013).

Acerca de las vías de comunicación pulmón-cerebro, no están totalmente elucidadas, pero se han propuesto tres posibles vías de señalización. (Véase *Figura 1*).

- Mediante la vía humoral, los mediadores inflamatorios liberados a la circulación sistémica a consecuencia de la ventilación, pueden llegar al cerebro, a través de órganos carentes de barrera hemato-encefálica, como los órganos

circunventriculares o el plexo coroideo. También se produce la liberación de prostaglandina E<sub>2</sub> y óxido nítrico por la activación del endotelio cerebral y procesos de transporte activo.

- Mediante la vía celular se produce una retroalimentación entre la liberación periférica de TNF- $\alpha$  y la secreción cerebral de proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1), que a su vez estimula la activación de monocitos en ambos niveles.
- Por la vía neural, los mediadores inflamatorios estimulan el nervio vago, que a través del núcleo del tracto solitario alcanzan el cerebro. (López-Aguilar et al. 2013)

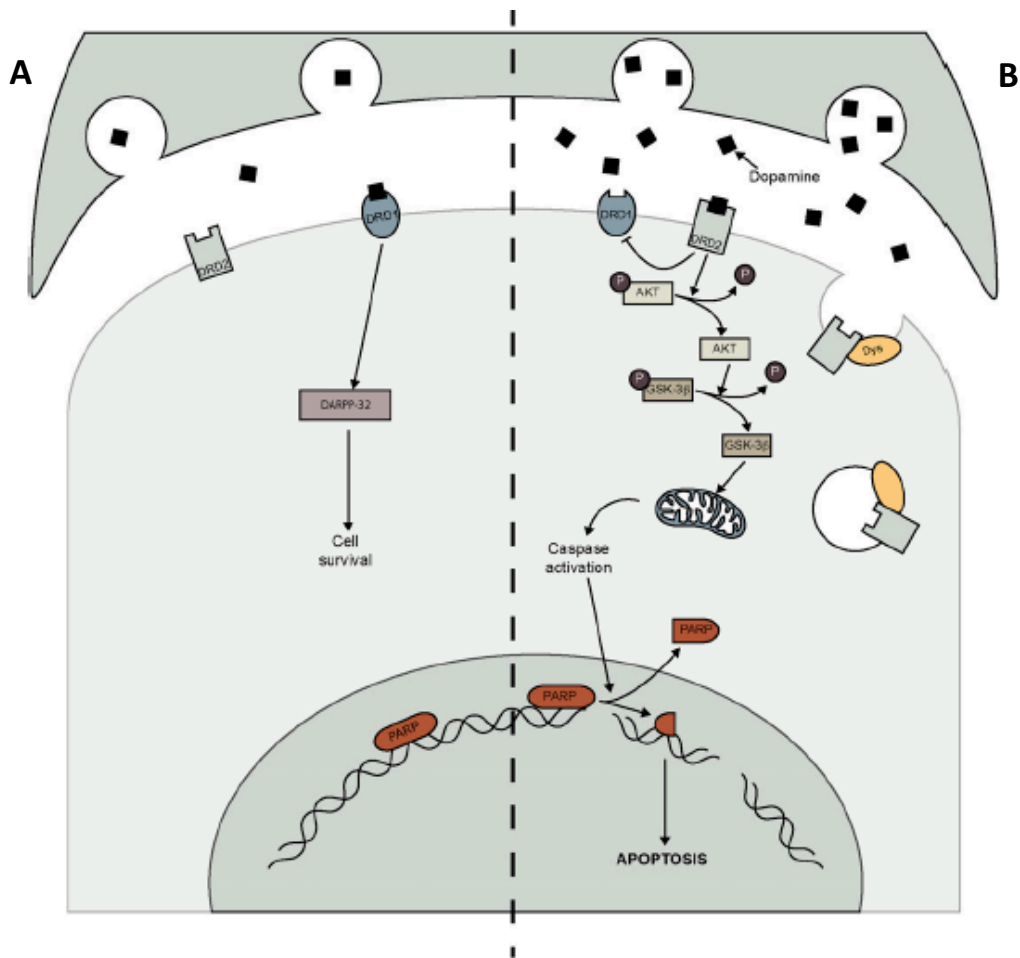


**Figura 1.** Esquema representativo de las vías de comunicación pulmón-sistema nervioso central durante la ventilación mecánica. Vía humoral a la izquierda, neural en el centro y celular a la derecha. J. López-Aguilar. Medicina intensiva / Sociedad Española de Medicina Intensiva y Unidades Coronarias, 2012.

Se cree que la ventilación mecánica causa daños directos sobre ciertas zonas cerebrales, como el hipocampo, a través de una vía neural aferente. Un estudio de 2013 probó que la ventilación mecánica provoca un estado hiperdopaminérgico en el hipocampo, inhibiendo la vía de supervivencia celular mediada por Akt/GSK3 $\beta$ , provocando la muerte neuronal por apoptosis en el hipocampo (González-López et al. 2013).

La ventilación mecánica provoca el estiramiento pasivo de los pulmones, lo que activa a neuronas sensoriales pulmonares, cuyos axones conectan a través del nervio vago con las células P del núcleo del tracto solitario (NTS) en el tronco cerebral. Los axones de las células P conectan con el diversas áreas, como la médula ventrolateral caudal, el núcleo retrotrapezoide y el complejo parabraquial/Kölliker-Fuse (PB-KFC). A través del PB-KFC o del locus ceruleus inervan el área ventral tegumental (VTA). El VTA es la fuente de dopamina del hipocampo. Debido a la ventilación mecánica se produce una estimulación vagal incorrecta que converge a través de diversas rutas en el VTA y termina provocando un estado hiperdopaminérgico en el hipocampo (González-López et al. 2014).

La **hiperdopaminergia** resultante en el hipocampo, a través del receptor DRD2, provoca la asociación de Akt con  $\beta$ -arrestina 2, que causa la defosforilación de Akt en la posición Thr308. Akt inactivo no puede seguir manteniendo su función antiapoptótica, por lo que se produce la defosforilación y activación de GSK3 $\beta$ . La activación de GSK3 $\beta$  activa la vía intrínseca **apoptótica**, activando la cascada de las caspasas. La activación de las caspasas provoca la escisión de la proteína PARP-1 y su inactivación. Esta proteína se encarga de la reparación de los daños del DNA y su inactivación conduce por tanto a la muerte celular por apoptosis. (Véase **Figura 2**). (González-López et al. 2013).



**Figura 2.** Modelo explicativo del mecanismo propuesto de apoptosis inducida por dopamina. (A) Estado normal en el que la dopamina activa a los receptores tipo 1 (DRD1). (B) Estado hiperdopaminérgico, la dopamina activa los receptores tipo 2 (DRD2), disminuyendo la fosforilación y activación de Akt, provocando un incremento de la activación de GSK-3b, que finalmente desencadena la activación de la vía intrínseca de la apoptosis. **Adrián González-López.** *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2013.

Por lo tanto la muerte neuronal se produciría por la activación de la ruta intrínseca apoptótica debido a la disminución de las señales de supervivencia. La apoptosis neural en el hipocampo provocada por la ventilación positiva se comprobó mediante diversos marcadores de apoptosis, como la proteína PARP-1 “escindida” y diversas caspasas (como la caspasa 7 y la 9), que indicaban la activación de la vía intrínseca apoptótica post-ventilación (González-López et al. 2013).

Se comprobó mediante un pretratamiento con haloperidol (bloqueante del receptor DRD2) y vagotomía cervical bilateral la activación de la **vía vagal-dopaminérgica**. Mediante ambos mecanismos se mantenía activada la vía de supervivencia de PTEN/Akt/GSK3 $\beta$ , probando que las señales aferentes del nervio vago intervienen en la lesión apoptótica del hipocampo provocada por la ventilación mecánica (González-López et al. 2013).

La proteína disbindina-1 participa inhibiendo el reciclaje de DRD2 (disminuye los niveles del receptor en la superficie celular), actuando por tanto como un mecanismo compensador destinado a minimizar los efectos de la hiperdopaminergia. La ventilación mecánica y la consiguiente hiperdopaminergia provocan una sobreexpresión de la variante específica 1C del gen de la disbindina en el hipocampo (González-López et al. 2013), (González-López et al. 2014).

## **Modelo de envejecimiento acelerado *Zmpste24*<sup>-/-</sup>**

El **envejecimiento**, entendido como una pérdida progresiva de la integridad fisiológica que conduce a una función deletérea, es un proceso que acontece a todos los seres vivos. Supone un factor de riesgo para el desarrollo de las principales patologías humanas, como el cáncer, la diabetes, los trastornos cardiovasculares o las enfermedades degenerativa. El estudio del envejecimiento se centra en determinar las vías genéticas y los procesos bioquímicos que controlan la tasa de envejecimiento, así como en identificar posibles dianas terapéuticas (López-Otín et al. 2013). Los modelos animales con enfermedades progeroides son utilizados para este fin. Los síndromes progeroides se caracterizan por el desarrollo temprano de alteraciones que normalmente están asociadas al envejecimiento (Osorio et al. 2009).

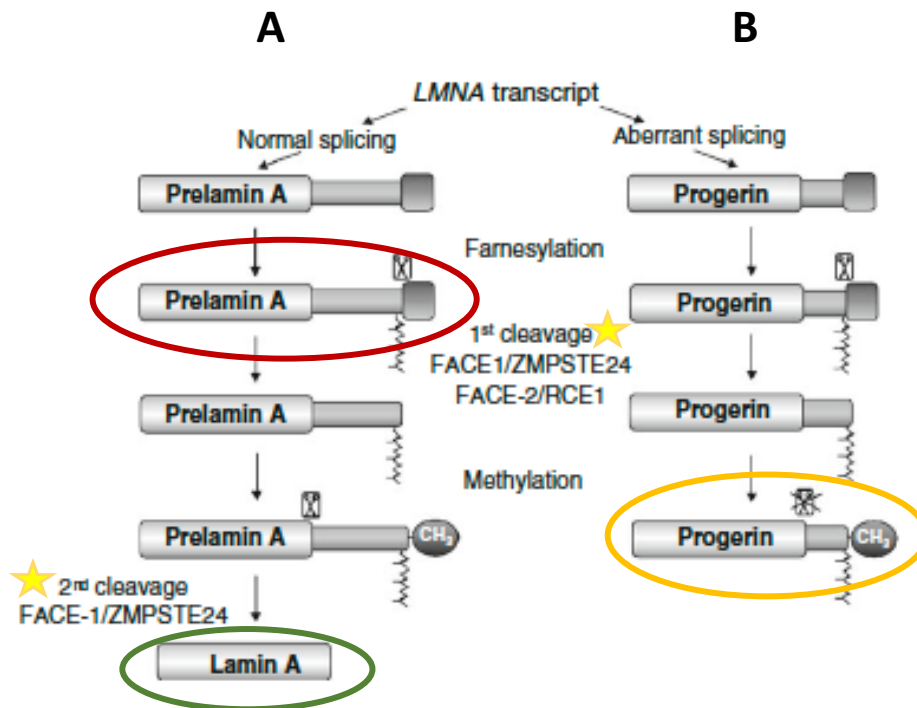
Las progerias, o enfermedades del envejecimiento acelerado, pueden estar causadas principalmente por dos defectos: daños en los sistemas de reparación del DNA o alteraciones de la lámina nuclear. El Síndrome de Progeria de Hutchinson-Gilford (HGPS), que pertenece al segundo grupo, se caracteriza por una reducción de la esperanza de vida, retraso del crecimiento, alteraciones en la integridad del tejido



conectivo, pérdida de pelo, aterosclerosis y problemas cardiovasculares (Osorio et al. 2009), (González Morán 2014).

El HGPS pertenece a un grupo de enfermedades muy heterogéneas denominadas laminopatías, pues esta causado por una mutación puntual del gen LMNA que provoca alteraciones en la lámina nuclear (Quigley et al. 2013), (González Morán 2014). El gen LMNA codifica las laminas A y C, componentes de la lámina nuclear. La lamina A se sintetiza a partir de un precursor, la prelamina A y es sometida a una serie de modificaciones posttraduccionales, como farnesilación, metilación o proteólisis. Para la maduración final a lamina A es necesario la escisión de los últimos 15 aminoácidos, donde se encuentra el grupo farnesilado. Los pacientes con HGPS poseen una mutación que activa un sitio crítico de splicing que provoca la síntesis de una isoforma de prelamina A conocida como progerina. Esta molécula carece de 50 residuos en el extremo carboxilo, región donde se encuentra la secuencia diana para la última modificación, la escisión de los 15 residuos finales con el grupo farnesilado. Al carecer del sitio de corte de la enzima, la proteína se mantiene constitutivamente farnesilada y se acumula en el núcleo (Pollex & Hegele 2004), (Osorio et al. 2009) (Osorio et al. 2010), (Barrowman et al. 2012), (Quigley et al. 2013).

La metaloproteasa de zinc FACE-1 o ZMPSTE-24 es la enzima responsable de este último paso en el procesamiento y maduración de la prelamina A. Es una proteína integral de membrana, altamente conservada a lo largo de la evolución y de expresión generalizada en los mamíferos (Osorio et al. 2009). Los ratones mutantes deficientes en *Zmpste24* acumulan prelamina A farnesilada en la envuelta nuclear, proporcionando un modelo animal acerca del HGPS (Véase **Figura 3**). Al nacer los ratones son iguales a los *wildtype*, normales fenotípicamente. Entre las 4 y las 6 semanas disminuye su tasa de crecimiento y comienzan a manifestarse diversas afecciones hasta que fallecen prematuramente en torno a los 4 meses. En general presentan retraso del crecimiento, disminución de la esperanza de vida, lipidistrofia, distrofia muscular y cardiomiopatía (Bergo et al. 2002), (Pendas et al. 2002).



**Figura 3.** Procesamiento de la lamina. A: La lamina A se sintetiza a partir de un precursor, la prelamin A, que es procesada mediante farnesilación, metilación y proteólisis de 15 residuos terminales farnesilados, hasta resultar en la lamina A (señalada en verde en el esquema). Los ratones *Face-1/Zmpste-24* carece de la metaloproteasa encargada de este procesamiento, por lo que acumulan prelamin A farnesilada (señalada en rojo en el esquema). B: En el caso de HGPS existe una mutación que provoca, mediante splicing alternativo, la síntesis de progerina (señalada en amarillo en el esquema), una forma de prelamin-A truncada que carece de la secuencia diana de la enzima, por lo que permanece farnesilada de forma constitutiva. **Fernando G. Osorio. Transgenic Research, 2009.**

La acumulación de prelámina A farnesilada conduce a las anomalías a nivel nuclear y celular, ocasionando a nivel sistémico alteraciones como la pérdida de grasa subcutánea, alopecia, alteraciones metabólicas, defectos musculares y esqueléticos como cifosis, osteolisis, deficiencias dentales, debilidad muscular y artritis, que provocan una movilidad reducida. Presentan una disfunción cardíaca crónica, con degeneración del músculo cardíaco, adelgazamiento de las paredes ventriculares y fibrosis intersticial. Esto provoca un fallo cardíaco que causa la muerte (Pendas et al. 2002).

Estos ratones desarrollan fracturas óseas espontáneas, principalmente de las costillas, aunque también de otros huesos como escápula, clavícula, esternón, maxilar inferior o

húmero. La densidad ósea es menor que en ratones *wildtype*, lo que unido a la debilidad muscular, provoca anomalías en la marcha de los ratones, por ejemplo el arrastre de las extremidades posteriores (Bergo et al. 2002). (Véase **Figura 4**).



**Figura 4.** Fotografía de un ratón *Zmpste24<sup>-/-</sup>*, donde se puede observar el arrastre de las extremidades posteriores así como inicio de alopecia. **Martin O. Bergo. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002.**

Estos ratones muestran una activación de estrategias adaptativas prosupervivencia, en respuesta a los efectos deletéreos del envejecimiento acelerado. Entre ellas se incluiría una intensa autofagia, asociada a la activación de la vía de señalización de AMPK y a una inhibición de mTOR, alteraciones transcripcionales en los genes implicados en el metabolismo de lípidos y de glucosa, así como alteraciones en factores séricos como la glucosa, insulina o adiponectina (tienen hipoglucemia e hipoinsulinemia). La activación crónica de estas rutas metabólicas protectoras termina siendo perjudicial y provoca la muerte celular, contribuyendo al fenotipo con distrofia muscular y lipidistrofia que presentan estos animales (Mariño et al. 2008),(Osorio et al. 2009).

La lámina nuclear participa en la replicación del DNA y en la organización de la cromatina, regulando la transcripción y la división celular (Pendas et al. 2002). La acumulación de prelamina A prenilada en el núcleo provoca alteraciones en su estructura, como *blebbing*, deformaciones y fragmentación. Estos procesos inducen cambios en la estructura de la cromatina y alteraciones en la regulación de la expresión génica, provocando interacciones anormales con los factores de transcripción. También puede tener efectos reguladores *downstream*. La hiperactivación de la vía de señalización de p53, que reduce la capacidad proliferativa de los fibroblastos, participa en la generación del fenotipo envejecido mediante la

activación de la senescencia (Pendas et al. 2002), (Pollex & Hegele 2004), (Varela et al. 2005). Respecto a las anomalías óseas, una hipótesis propone que la acumulación de lámina A afecta a la secreción de procolágeno I; otra posibilidad sería que la enzima ZMPSTE tiene otros sustratos adicionales y que provocan la anomalía en los huesos (Bergo et al. 2002).

No se han estudiado con detalle las alteraciones cerebrales asociadas a estos modelos experimentales con envejecimiento acelerado. Del mismo modo, y dado que la edad es uno de los factores asociados a la incidencia de alteraciones neurocognitivas tras la ventilación mecánica, estos modelos podrían suponer una alternativa válida para el estudio de los mecanismos responsables de su aparición ligada al envejecimiento.

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La hipótesis subyacente a este trabajo es que el envejecimiento empeora los efectos de la ventilación mecánica sobre el hipocampo induciendo apoptosis neuronal.

Para probar la hipótesis se plantearon los siguientes objetivos:

- Estudiar la ruta de supervivencia celular AKT/GSK-3 $\beta$ , determinando los niveles de la proteína GSK-3 $\beta$  total y fosforilada así como de caspasa-7 total y activada en ratones ventilados y basales.
  - Analizar la relación GSK-3 $\beta$  fosforilado/ GSK-3 $\beta$  total. Estudiar si existen diferencias en la cantidad de proteína entre los ratones ventilados y basales de genotipo *wildtype* y KO *Zmpste24*.
  - Analizar la relación caspasa-7 activada/actina. Estudiar si existen diferencias en la cantidad de proteína entre los ratones ventilados y basales de genotipo *wildtype* y KO *Zmpste24*.

# MATERIAL Y MÉTODOS

## Modelo animal

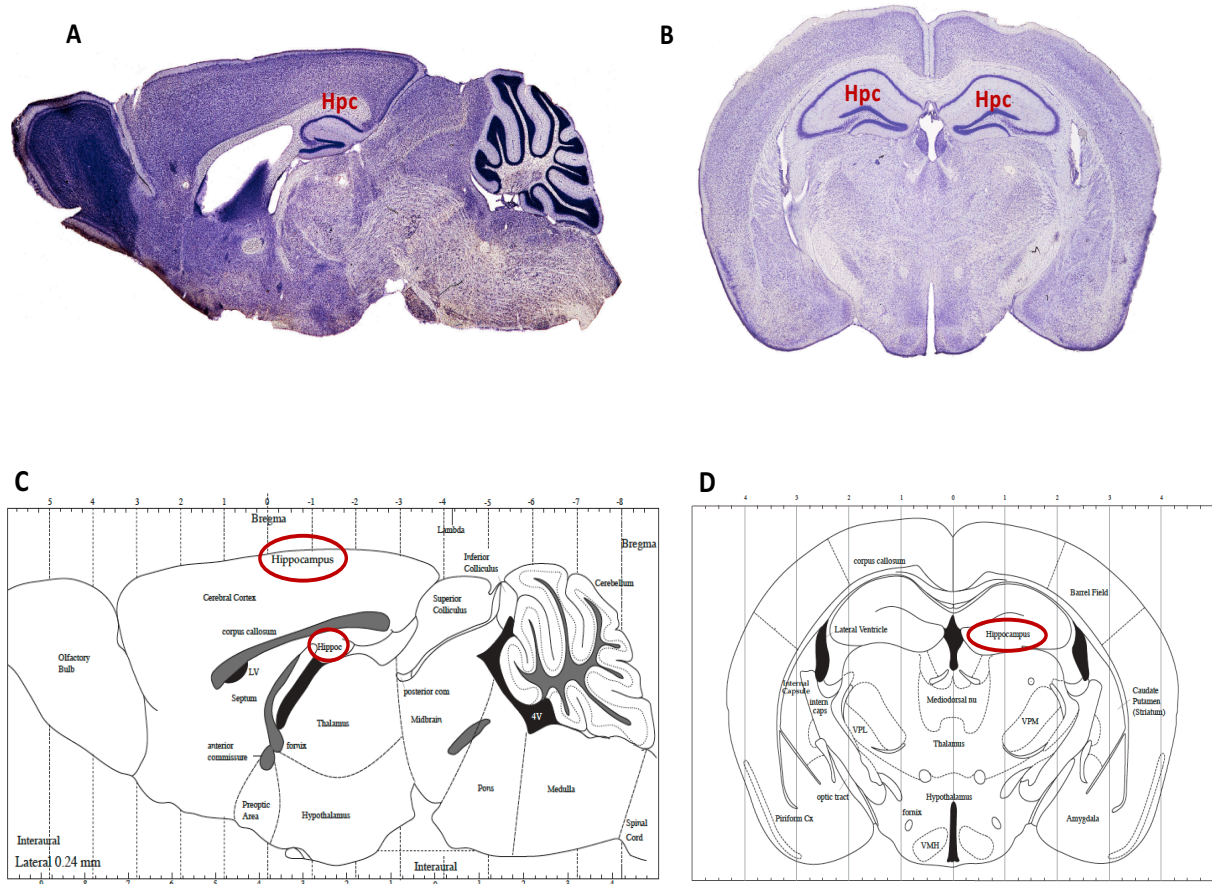
Para los experimentos se utilizaron 23 animales de entre ocho y doce semanas *wildtype* y ratones *knockout Zmpste-24* deficientes en la enzima ZMPSTE-24, ambos de fondo mixto Sv129/C57BL6. Los ratones *knockout zmpste-24* (Pendas et al. 2002) fueron proporcionados por el laboratorio del Dr. López Otín. Los animales se mantuvieron en el bioterio de la Universidad de Oviedo bajo condiciones reguladas, libres de patógenos y expuestos a ciclos de luz/oscuridad de doce horas, así como con acceso constante a comida y agua. Así mismo todos los protocolos experimentales fueron revisados y aprobados por el Comité de Ética en la Investigación de la Universidad de Oviedo.

## Protocolo Experimental de ventilación

Los ratones fueron asignados al azar a los diferentes grupos experimentales, ventilación mecánica o basales. Los ratones fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de ketamina (80 mg/kg) y xylacina (25 mg/kg). Después se les realizó una traqueotomía y la tráquea se canuló con un catéter 20G. La ventilación mecánica se realizó utilizando un ventilador Evita 2 Dura (Dräger, Alemania). Se realizó una estrategia de ventilación de baja presión con los siguientes parámetros: presión inspiratoria máxima (PIP) 12 cmH<sub>2</sub>O, presión positiva al final de la espiración (PEEP) 2 cmH<sub>2</sub>O, frecuencia respiratoria 100 respiraciones por minuto. La fracción inspirada de oxígeno (FiO<sub>2</sub>) fue del 50% y la relación inspiración-espiración fue 1:1. Los ratones se mantuvieron sobre una manta eléctrica a 37°C.

## Obtención de muestras

Al finalizar la ventilación, los ratones fueron sacrificados por decapitación. El hipocampo se diseccionó y fue rápidamente almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . (Véase *Figura 5*). A continuación, las muestras fueron homogenizadas en un buffer de RIPA con 100 mM TRIS pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% ácido desoxicólico, 1% Triton X-100, 0.25% SDS, cóctel inhibidor de proteasas (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania) e inhibidores de fosfatasas (1 mM ortovanadato, 5 mM  $\beta$ -glicerofosfato, 50 mM NaF). Una vez homogenizados, los extractos de tejido fueron centrifugados a 13000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  y recogidos los sobrenadantes.



**Figura 5.** Cortes histológicos de cerebro de ratón, teñido con acetilcolinesterasa. (A) corte sagital, (B) corte coronal. En color violeta oscuro el hipocampo (Hpc). Esquema representativo de cerebro de ratón (C) corte sagital y (D) corte coronal. En rojo se señala la localización del hipocampo *George Paxinos & Keith B. J. Franklin. Academic Press, 2009.*

## Cuantificación de Proteínas

La concentración de proteína en los homogeneizados se cuantificó mediante un kit comercial (Kit BCA protein assay, Pierce, EEUU) basado en la reacción entre el ácido bicinconínico y cationes de cobre reducidos al quelarse en medio alcalino con las proteínas de la muestra. Se añadieron 2  $\mu$ l de muestra + 18  $\mu$ l de agua + 80  $\mu$ l de solución. Como patrón de estándares se utilizó la albúmina sérica bovina. Tras incubación a 37°C durante 40 minutos, se midió la absorbancia a 562nm y se calculó la concentración de la proteína correspondiente a cada muestra.

## Western blot

Las muestras a analizar (25 $\mu$ g) se mezclaron con tampón de disociación (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, SDS 2%, glicerol 10%, 2- $\beta$ mercaptoetanol 0,62% y azul de bromofenol 0,0005%) y se calentaron a 100°C durante 10 minutos antes de cargarlas en un gel de poliacrilamida-SDS al 8%. Se sometieron a electroforesis con un voltaje constante de 120 V en tampón Tris-HCl 24,8 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1%, pH 8,8. A continuación se procedió a la transferencia de las proteínas a membranas de membranas de PVDF (Millipore) preincubadas en metanol, en el tampón de transferencia (Tris 24,8mM, Glicina 192 mM, metanol 20%) durante 75 minutos a voltaje constante de 50 V en un soporte Miniprotean (Bio-Rad). Posteriormente la membrana se bloqueó e incubó con un anticuerpo primario (la tabla 1 especifica las soluciones de bloqueo y los anticuerpos empleados) toda la noche a 4°C. Luego se lavó durante 30 minutos con TBS-T, y por último, se incubó 1 hora con el anticuerpo secundario. Tras lavar de nuevo con TBS-T otros 30 minutos, se llevó a cabo la detección de los complejos antígeno-anticuerpo mediante generación de quimio-luminiscencia con un sustrato comercial (Luminata Forte, Millipore-Merck, Francia). Las imágenes fueron adquiridas con el sistema *Chemidoc Imaging* (UVP, USA) y la intensidad de cada banda se cuantificó usando el software *ImageJ* (NIH, USA). También se midió la cantidad de actina para confirmar cantidades iguales de proteína cargada.



Antígeno	Bloqueo	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
Caspasa 7	5% leche desnatada	5% BSA + Rabbit polyclonal anti-caspase-7 (Cell Signaling) (1:1000)	3% leche desnatada + Goat anti-rabbit Anti-Rabbit (AbCam) 1:2000
Fosfo-GSK-3 $\beta$	5% leche desnatada	5% BSA + Rabbit polyclonal anti phospho-GSK (Cell Signaling) (1:1000)	5% leche desnatada + Goat anti-Rabbit Anti-Rabbit (AbCam) 1:2000
GSK-3 $\beta$ total	5% leche desnatada	5% BSA + Rabbit monoclonal anti-GSK-3 $\beta$ (Cell Signaling) (1:1000)	2,5% leche + Goat anti-Rabbit Anti-Rabbit (AbCam) 1:2000
Actina	5% leche desnatada	3% leche desnatada + Goat polyclonal anti-Actin (Santa Cruz, sc-1616) (1:10000)	-

**Tabla 2.** Anticuerpos utilizados

## Análisis estadístico

Todos los resultados están expresados como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Mediante una prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra se comprobó que las variables cuantitativas (la cuantificación de determinadas proteínas) se ajustasen a una distribución normal, y se aceptó la hipótesis de normalidad. La diferencia entre las medias de los distintos grupos se comprobó mediante una prueba T para muestras independientes. Las diferencias se consideraron significativas cuando el p-valor fue inferior a 0,05.

## RESULTADOS

### Estudio de la proteína GSK-3 $\beta$

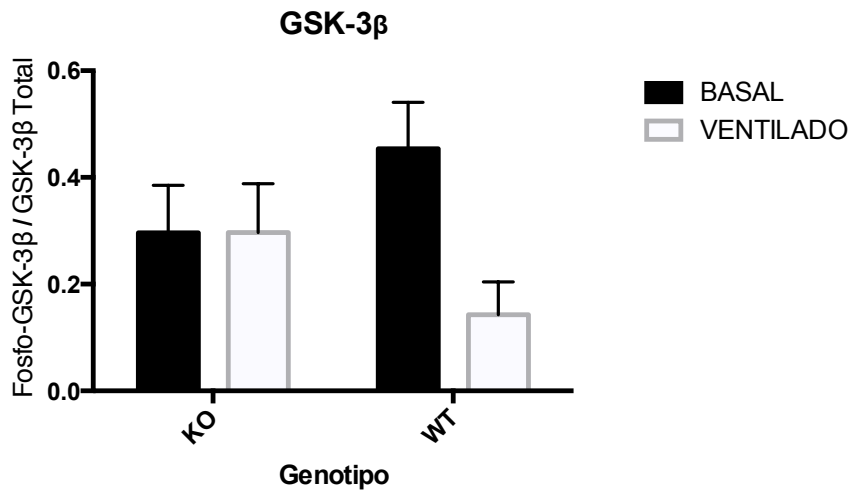
A partir de las muestras de proteínas obtenidas de los homogenizados de hipocampo de los animales del experimento, se cuantificó la proteína GSK-3 $\beta$  total y la forma inactiva de esta enzima glicógeno-sintasa-kinasa-3 $\beta$  (que resulta en su forma fosforilada) mediante Western blot.

En nuestro ensayo se determinó la cantidad de proteína fosforilada respecto de la total en muestras de ratones sometidos a ventilación mecánica y en ratones sin ventilar, pertenecientes a dos grupos de ratones de diferente genotipo, *wildtype* y KO con envejecimiento acelerado. Se analizó si existían diferencias entre los grupos.

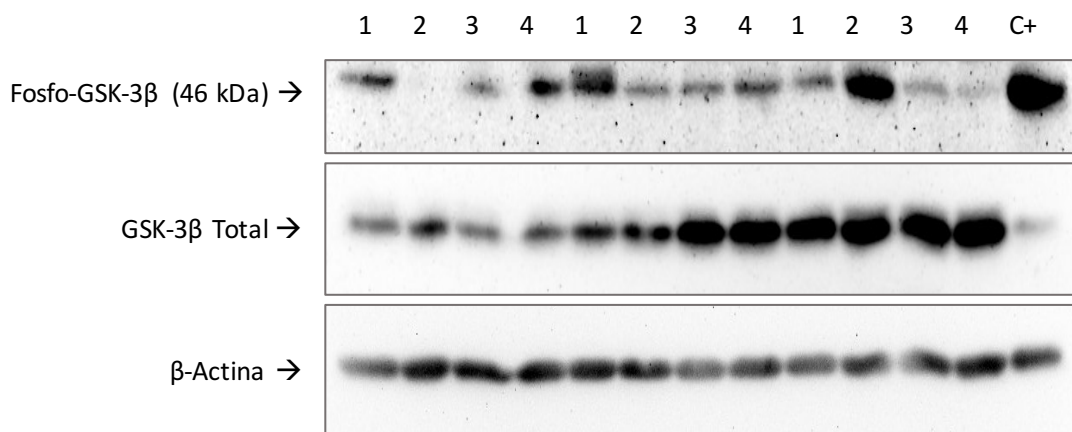
En los ratones *wildtype* existe un descenso significativo de los niveles de GSK-3 $\beta$  fosforilado en los ratones ventilados frente a los basales.

Sin embargo en los ratones KO no se encontraron diferencias en los niveles de la proteína entre los ratones ventilados y los basales. (Véase *Figura 6* y

*Figura 7*).



**Figura 6.** Relación entre la proteína GSK-3 $\beta$  fosforilada respecto a la total en los ratones knockout *zmpste-24* (KO) y wildtype (WT). En negro se pueden ver los ratones que no fueron ventilados y en blanco los ratones sometidos a ventilación mecánica. La ventilación, en los ratones WT provoca una disminución significativa de la proteína GSK-3 $\beta$  fosforilada. No hay diferencias significativas en la cantidad de GSK con la ventilación en el grupo KO.



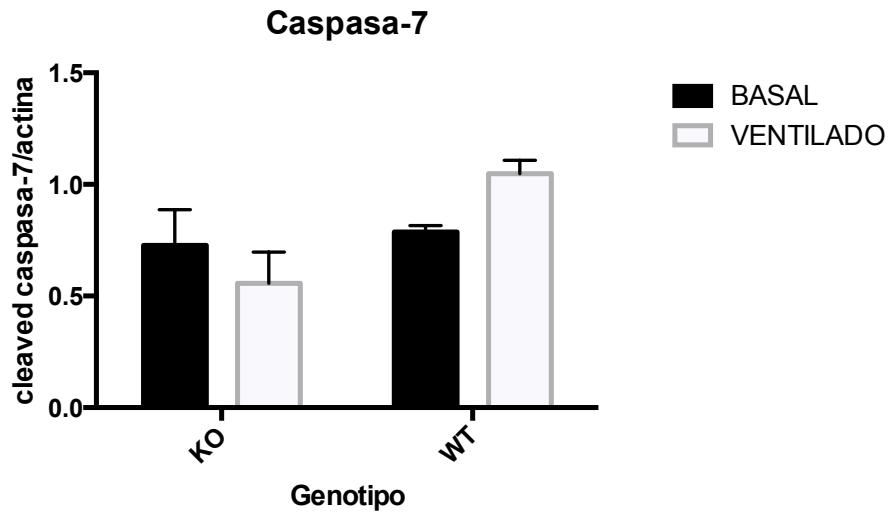
**Figura 7.** Western Blot donde se detectó la proteína GSK-3 $\beta$  fosforilada, GSK-3 $\beta$  total y  $\beta$ -Actina en los diferentes grupos: 1, muestras de hipocampo de ratones wildtype sin ventilar (basales); 2, muestras de hipocampo de ratones KO sin ventilar (basal); 3, muestras de ratones wildtype ventilados; 4, muestras de hipocampo de ratones KO ventilados; C+ control positivo de pulmón con VILI.

## Estudio de la proteína Caspasa-7

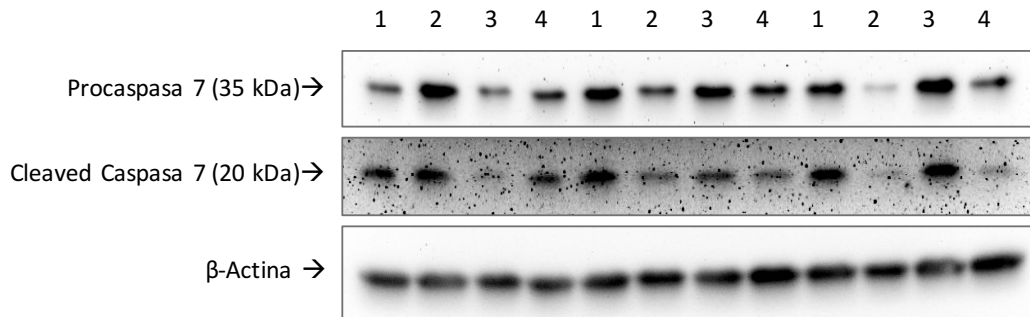
A partir de las muestras de proteínas obtenidas de los homogenizados de hipocampo de los animales del experimento, se cuantificó la caspasa-7, una caspasa ejecutora, mediante Western blot. Se determinaron los niveles de procaspasa-7 inactiva y de la subunidad mayor de la caspasa-7 procesada por otras caspasas.

En el experimento se determinó la cantidad de proteína procesada (*cleaved caspasa-7*) respecto a la actina, que se utilizó como control de carga en muestras de hipocampo de ratones sometidos a ventilación mecánica y en ratones sin ventilar, pertenecientes a dos grupos de ratones de diferente genotipo, *wildtype* y KO con envejecimiento acelerado. Se analizó si existían diferencias entre los grupos.

En los ratones *wildtype* se encontró un aumento significativo de los niveles de caspasa-7 *cleaved* en los ratones ventilados frente a los basales. Sin embargo en los ratones KO no se encontraron diferencias significativas en los niveles de la proteína entre los ratones ventilados y los basales, aunque hubo una disminución moderada de la proteína. (Véase **Figura 8** y **Figura 9**).



**Figura 8.** Relación entre la proteína caspasa-7 “cleaved” respecto a los niveles de actina en los ratones knockout *zmpste-24* (KO) y wildtype (WT). En negro se pueden ver los ratones que no fueron ventilados y en blanco los ratones sometidos a ventilación mecánica. La ventilación, en los ratones WT provoca un aumento significativo de caspasa-7 activa. En los ratones KO la proteína desciende con la ventilación pero el descenso no es significativo.



**Figura 9.** Imagen del Western Blot donde se cuantificaron los niveles de procaspasa-7, caspasa-7 “cleaved” y  $\beta$ -Actina en los diferentes grupos: 1, muestras de hipocampo de ratones wildtype sin ventilar (basales); 2, muestras de hipocampo de ratones KO sin ventilar (basal); 3, muestras de ratones wildtype ventilados; 4, muestras de hipocampo de ratones KO ventilados; C+ control positivo de pulmón con VILI.

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en los experimentos demuestran que se produce un descenso en la proteína GSK-3 $\beta$  fosforilada así como un incremento en los niveles de caspasa-7 procesada en las muestras de hipocampo de ratones *wildtype* sometidos a ventilación mecánica frente a los no ventilados. Estos resultados parecen demostrar que la ventilación mecánica activa en el hipocampo la ruta intrínseca de muerte celular e inactiva la ruta de supervivencia celular Akt/GSK-3 $\beta$ . Sin embargo, en los ratones *Face-1/Zmpste-24* no se observan cambios significativos en los niveles de estas dos proteínas en los ratones sometidos a ventilación mecánica frente a los no ventilados. Esto parece indicar que en los ratones *knockout* la ventilación mecánica no provoca daño neurológico.

Como ya se comentó en la introducción del trabajo, el número de pacientes ingresados en la UCI que sufren algún grado de disfunción neuropsicológica es bastante alto, llegando hasta el 50% de los casos (Wergin & Modrykamien 2012), (Jackson et al. 2014). Parece que no solo la propia enfermedad del paciente que le condujo a la UCI, sino que el tratamiento y el propio entorno de la UCI intervienen en el desarrollo de estas alteraciones, entre las que se incluye el delirio, la depresión o el deterioro cognitivo a largo plazo (González-López et al. 2014).

La ventilación mecánica, a pesar de ser un instrumento de soporte vital que requieren la mayoría de los pacientes de la UCI, se ha identificado como un posible factor de riesgo para el desarrollo de delirio. Su uso incrementa la frecuencia de esta patología hasta un 80% de los pacientes, aunque las causas de estos síndromes siguen siendo desconocidas (Lin et al. 2008), (Zaal et al. 2015). El empleo de estas técnicas de ventilación artificial puede provocar o agravar la lesión pulmonar, promoviendo la aparición de VILI (lesión pulmonar inducida por la ventilación mecánica). La mecanotransducción, o transducción de señales celulares en respuesta a estímulos mecánicos, a la que se ven sometidas las células pulmonares debido al uso de la ventilación mecánica, provoca la liberación de mediadores inflamatorios. (Slutsky & Ranieri 2013). Esto conlleva una respuesta celular que se extiende más allá del órgano

de origen, el pulmón, a distintos órganos distales, como es el cerebro en el caso de este trabajo (López-Aguilar et al. 2013).

Las vías de comunicación pulmón-cerebro no han sido elucidadas, aunque hay varias hipótesis propuestas, como puede ser a través de la señalización neural aferente (López-Aguilar et al. 2013), (González-López et al. 2013). La ventilación mecánica parece activar las vías aferentes vagales provocando, a través del área ventral tegumental (VTA), un aumento de los niveles de dopamina. De este modo se ha hallado que los niveles de expresión de la enzima tirosina hidroxilasa, responsable de la síntesis del precursor de la dopamina, se encuentran aumentados en el hipocampo de ratones sometidos a ventilación mecánica. Este estado hiperdopaminérgico activa los receptores de dopamina tipo 2 (DRD2) que a su vez provocan la activación de PTEN, que inhibe a la fosfatidil-inositol-kinasa-3, bloqueando la fosforilación de Akt, inactivándola. La enzima GSK-3 $\beta$ , liberada de la acción inhibitoria de Akt mediante fosforilación de la Serina 9, se activa, desencadenando la ruta intrínseca apoptótica mitocondrial, con la consiguiente activación de las caspasas. Estas provocan la rotura de la enzima poli-ADP-ribosa-polimerasa (PARP-1) que no puede mantener su capacidad de reparación del DNA, provocando en último término la apoptosis de la célula (González-López et al. 2013), (González-López et al. 2014).

La ventilación mecánica provoca la defosforilación de GSK y su consiguiente activación. Por lo tanto, el descenso en los niveles de GSK-3 $\beta$  fosforilado en los ratones *wildtype* ventilados encontrados en nuestros experimentos estaría en consonancia con estos datos. Además también hemos podido demostrar un aumento en los niveles de caspasa-7 activa en los ratones *wildtype* ventilados. Esta caspasa efectora inicia una cascada de activación de procaspasas que conduce a la muerte celular.

Durante el envejecimiento se producen cambios sobre el sistema inmune: mientras que la capacidad de respuesta de la inmunidad adquirida va disminuyendo, las respuestas del sistema inmune innato se ven aumentadas (Pop-Vicas & Opal 2013). Las moléculas proinflamatorias causan una respuesta mayor en los individuos de mayor edad (Setzer et al. 2013). La utilización de la ventilación mecánica provoca en los pacientes de mayor edad una respuesta inflamatoria exacerbada, unido a una disminución en la capacidad de resolver un proceso inflamatorio. La respuesta inflamatoria consecuente a la ventilación provoca efectos sistémicos sobre otros

órganos, como riñones, intestino o el sistema cardiovascular. El envejecimiento hace más susceptibles a los pacientes a los efectos dañinos de la ventilación mecánica en el pulmón además de relacionarse con el desarrollo de respuestas inflamatorias más intensas y exacerbadas, así como una mayor susceptibilidad a sufrir deterioro funcional de los órganos afectados. Así, la edad avanzada parece estar relacionada con un aumento de la susceptibilidad a los efectos dañinos de la ventilación mecánica, tanto en los pulmones como en otros órganos, como el sistema cardiovascular, donde provoca hipotensión (Nin et al. 2008),(Setzer et al. 2013).

Por otro lado, la edad supone el principal factor de riesgo para el desarrollo de diversas alteraciones neurocognitivas, así como del delirio en la UCI (Zaal et al. 2015). La neuroinflamación se ha asociado con diversos trastornos neurodegenerativos y psiquiátricos, así como deterioro cognitivo y disminución de la memoria (Barrientos et al. 2015), (Estes & McAllister 2015), (Webster et al. 2015).

Por todo lo anterior, cabría esperar que el daño neurológico asociado a la lesión pulmonar inducida por la ventilación mecánica fuese mayor en los individuos más envejecidos. Sin embargo nuestros experimentos no han encontrado señales de daño neurológico en los ratones *knockout* de *Face-1/Zmpste-24*. Esto nos lleva a plantearnos nuevas hipótesis que puedan aportar luz sobre las causas de este efecto. En este sentido, es posible que sí se produzca el daño neurológico, pero sean otros factores o vías, no la ruta de Akt/GSK-3 $\beta$  y la ruta de las caspasas, los implicados en los procesos de generación del daño. Podría ser por ejemplo que éste daño se debiera al proceso de neuroinflamación (Barrientos et al. 2015), (Dela Peña et al. 2011),(Webster et al. 2015).

Las lesiones periféricas, como puede ser VILI, provocan un proceso inflamatorio local que desencadena una cascada de activación que termina produciendo efectos sistémicos. Como consecuencia de este proceso inmunológico y a través del torrente sanguíneo o de rutas neurales, se producen cambios en la actividad neural. Estos incluyen un aumento de la producción de citoquinas en el parénquima cerebral mediado por células microgliales activadas. Barrientos et al. determinaron tras una serie de experimentos con animales, que con la edad las células de la microglia se “sensibilizan” provocando una respuesta inflamatoria exacerbada en el hipocampo. Encontraron un aumento en los niveles de citoquinas proinflamatorias, como IL-1 $\beta$ .



Estos procesos neuroinflamatorios que se producen en el hipocampo se asocian con déficits de memoria y deterioro cognitivo a largo plazo (Barrientos et al. 2015). Webster y colaboradores mediante el uso de una “pequeña molécula” terapéutica experimental, el MW151 y MW189, han conseguido atenuar la sobreexpresión de citoquinas proinflamatorias en el cerebro (Webster et al. 2015).

Para algunos autores estos datos deben de ser tomados con precaución, porque los mediadores inflamatorios que pueden ser patológicos en una enfermedad, pueden tener efectos terapéuticos en otros casos (Estes & McAllister 2015).

Otra hipótesis reside en que los animales utilizados para este estudio, ratones *knockout* de *Face-1/Zmpste-24* con envejecimiento acelerado, no sean un modelo representativo del envejecimiento fisiológico normal. Se ha encontrado que estos ratones son más resistentes a desarrollar lesión pulmonar inducida por la ventilación. Por lo tanto es posible que tengan disminuidas o inhibidas diversas rutas de señalización que participan normalmente en la generación de la lesión a distancia (López-Alonso, datos sin publicar).

Por último, también se podría hipotetizar que estos ratones muestren a nivel cerebral, algún mecanismo de resistencia a la apoptosis.

Nuestra metodología está sometida a algunas limitaciones. En primer lugar, los hallazgos encontrados en un modelo animal no son directamente extrapolables a humanos. En segundo lugar, y como se ha comentado anteriormente, puede ser que los animales con envejecimiento acelerado *knockout* de *Face-1/Zmpste-24* utilizados en estos experimentos, posean alteraciones desconocidas que afecten a las rutas estudiadas, afectando por tanto a los resultados obtenidos. Los ratones con envejecimiento fisiológico podrían constituir un modelo más realista. Otra de las limitaciones encontradas sería que el tamaño de la muestra con la que se realizó el ensayo fue reducida. En este tipo de estudios se intentan identificar respuestas biológicas frente a diferentes factores y estímulos, por lo que no se vería influenciado por un tamaño de muestra pequeño puesto que solamente se pretende identificar los mecanismos celulares implicados.

## CONCLUSIONES

Las conclusiones que hemos obtenido tras la realización de este trabajo son las siguientes:

- La ventilación mecánica desencadena apoptosis en el hipocampo de ratones *wildtype*.
- En los ratones con envejecimiento acelerado no se han obtenido los mismos resultados, lo que parece indicar la existencia de otros mecanismos responsables del daño neural que no hemos podido identificar.

## BIBLIOGRAFÍA

- Barrientos, R.M. et al., 2015. Neuroinflammation in the normal aging hippocampus. *Neuroscience*, 309, pp.84–99.
- Barrowman, J. et al., 2012. Requirements for efficient proteolytic cleavage of prelamin A by ZMPSTE24. *PLoS ONE*, 7(2), pp.1–8.
- Bergo, M.O. et al., 2002. Zmpste24 deficiency in mice causes spontaneous bone fractures, muscle weakness, and a prelamin A processing defect. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(20), pp.13049–13054.
- Brummel, N.E. et al., 2014. Delirium in the ICU and subsequent long-term disability among survivors of mechanical ventilation. *Critical care medicine*, 42(2), pp.369–77.
- Estes, M.L. & McAllister, A.K., 2015. Alterations in immune cells and mediators in the brain: it's not always neuroinflammation! *Brain Pathology*, 24(6), pp.37–54.
- Fonsmark, L. & Rosendahl-Nielsen, M., 2015. Experience from multidisciplinary follow-up on critically ill patients treated in an intensive care unit. *Danish Medical Journal*, 62(5).
- González Morán, M.G., 2014. Síndrome de progeria de hutchinson-gilford. causas, investigación y tratamientos farmacológicos. *Educacion Quimica*, 25(4), pp.1–6.
- Gonzalez-Lopez, A. et al., 2011. Inflammation and matrix remodeling during repair of ventilator-induced lung injury. *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology*, 301(4), pp.L500–L509.
- González-López, A. et al., 2013. Mechanical ventilation triggers hippocampal apoptosis by vagal and dopaminergic pathways. *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology*, 188(6), pp.693–702.

- González-López, A., Albaiceta, G.M. & Talbot, K., 2014. Newly identified precipitating factors in mechanical ventilation-induced brain damage: implications for treating ICU delirium. *Expert review of neurotherapeutics*, 14(6), pp.583–8.
- Gordon, S.M. et al., 2004. Clinical identification of cognitive impairment in ICU survivors: Insights for intensivists. *Intensive Care Medicine*, 30(11), pp.1997–2008.
- Granja, C. et al., 2012. Outcome of ICU survivors: A comprehensive review. the role of patient-reported outcome studies. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, 56(9), pp.1092–1103.
- Herold, S., Gabrielli, N.M. & Vadasz, I., 2013. Novel concepts of acute lung injury and alveolar-capillary barrier dysfunction. *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology*, 305(10), pp.L665–81.
- Hsieh, S.J., Ely, E.W. & Gong, M.N., 2013. Can intensive care unit delirium be prevented and reduced? lessons learned and future directions. *Annals of the American Thoracic Society*, 10(6), pp.648–656.
- Hughes, C.G., Patel, M.B. & Pandharipande, P.P., 2012. Pathophysiology of acute brain dysfunction: what's the cause of all this confusion? *Current opinion in critical care*, 18(5), pp.518–26.
- Jackson, J. & Hopkins, R., 2009. Acute respiratory distress syndrome, sepsis, and cognitive decline: a review and case study. *Southern Medical Journal*, 102(11), pp.1150–1157.
- Jackson, J.C. et al., 2014. Depression, post-traumatic stress disorder, and functional disability in survivors of critical illness in the BRAIN-ICU study: A longitudinal cohort study. *The Lancet Respiratory Medicine*, 2(5), pp.369–379.
- Jackson, J.C. et al., 2004. Research issues in the evaluation of cognitive impairment in intensive care unit survivors. *Intensive Care Medicine*, 30(11),

pp.2009–2016.

Lin, S.M. et al., 2008. Risk factors for the development of early-onset delirium and the subsequent clinical outcome in mechanically ventilated patients. *Journal of Critical Care*, 23(3), pp.372–379.

López-Aguilar, J. et al., 2013. [Lung-brain interaction in the mechanically ventilated patient]. *Medicina intensiva / Sociedad Española de Medicina Intensiva y Unidades Coronarias*, 37(7), pp.485–92.

López-Otín, C. et al., 2013. The Hallmarks of Aging. *Cell*, 153(6), pp.1194–1217.

Mariño, G. et al., 2008. Premature aging in mice activates a systemic metabolic response involving autophagy induction. *Human Molecular Genetics*, 17(14), pp.2196–2211.

Morandi, A., Brummel, N.E. & Ely, E.W., 2011. Sedation, delirium and mechanical ventilation: the “ABCDE” approach. *Current opinion in critical care*, 17(1), pp.43–49.

Nin, N. et al., 2008. Aging increases the susceptibility to injurious mechanical ventilation. *Intensive Care Medicine*, 34(5), pp.923–931.

Osorio, F.G. et al., 2009. Accelerated ageing: From mechanism to therapy through animal models. *Transgenic Research*, 18(1), pp.7–15.

Osorio, F.G. et al., 2010. Nuclear envelope alterations generate an aging-like epigenetic pattern in mice deficient in Zmpste24 metalloprotease. *Aging Cell*, 9(6), pp.947–957.

Pandharipande, P.P. et al., 2013. Long-Term Cognitive Impairment after Critical Illness. *New England Journal of Medicine*, 369(14), pp.1306–1316.

Pendas, A.M. et al., 2002. Defective prelamin A processing and muscular and adipocyte alterations in Zmpste24 metalloproteinase-deficient mice. *Nature Genetics*, 31(1), pp.94–99.

- Dela Peña, I. et al., 2014. Stem cells and G-CSF for treating neuroinflammation in traumatic brain injury: Aging as a comorbidity factor. *Journal of Neurosurgical Sciences*, 58(3), pp.145–149.
- Pollex, R.L. & Hegele, R.A., 2004. Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Clinical Genetics*, 66(5), pp.375–381.
- Pop-Vicas, A. & Opal, S.M., 2013. Over-distension of the airways by mechanical ventilation in the elderly: adding insult to injury. *Critical care (London, England)*, 17(4), p.165.
- Quigley, A. et al., 2013. The Structural Basis of ZMPSTE24-Dependent Laminopathies. *SCIENCE*, 339, pp.403–406.
- Sakuramoto, H. et al., 2015. Severity of delirium in the ICU is associated with short term cognitive impairment. A prospective cohort study. *Intensive and Critical Care Nursing*, 31(4), pp.250–257.
- Setzer, F. et al., 2013. Susceptibility to ventilator induced lung injury is increased in senescent rats. *Critical Care*, 17(3), p.R99.
- Slutsky, A.S., 2015. History of Mechanical Ventilation. From Vesalius to Ventilator-induced Lung Injury. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 191(10), pp.1106–15.
- Slutsky, A.S. & Ranieri, V.M., 2013. Ventilator-Induced Lung Injury. *New England Journal of Medicine*, 369(22), pp.2126–2136.
- Torgersen, J. et al., 2011. Cognitive impairments after critical illness. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, 55(9), pp.1044–1051.
- Varela, I. et al., 2005. Accelerated ageing in mice deficient in Zmpste24 protease is linked to p53 signalling activation. *Nature*, 437(7058), pp.564–568.
- Webster, S.J. et al., 2015. Closed head injury in an age-related Alzheimer mouse model leads to an altered neuroinflammatory response and persistent

cognitive impairment. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 35(16), pp.6554–69.

Wergin, R. & Modrykamien, A., 2012. Cognitive impairment in ICU survivors: Assessment and therapy. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 79(10), pp.705–712.

Zaal, I.J. et al., 2015. A Systematic Review of Risk Factors for Delirium in the ICU. *Critical Care Medicine*, 43(1), pp.40–47.

Zaal, I.J. & Slooter, A.J.C., 2012. Delirium in critically ill patients. *Critical Care Medicine*, 40(1), pp.112–118.