

Avaluació i maneig de la lesió diafragmàtica associada a la ventilació mecànica en el pacient crític

Irene Dot Jordana

Avaluació i maneig de la lesió diafragmàtica associada a la ventilació mecànica en el pacient crític

Irene Dot Jordana

TESI DOCTORAL UPF / ANY 2021

DIRECTOR/ES DE LA TESI:

Prof. Joan Ramon Masclans

Dra. Judith Marin-Corral

Prof. Esther Barreiro

Department de Ciències Experimentals i de la Salut

A la meva família,
i especialment a l'Albert.

AGRAÏMENTS

Aquesta tesi no hauria set possible sense l'ajuda i el suport de moltes persones a qui haig de donar les gràcies.

Gràcies a les famílies dels donants, per la generositat en moments tant difícils. Gràcies als pacients per la mateixa generositat.

Gràcies Joan Ramon, per confiar en mi en aquells primers moments i haver-ho seguit fent durant aquest anys.

Gràcies Esther, gràcies per la predisposició i el suport.

Gràcies Judith per la teva capacitat de treball i organització, per la teva experiència, pels ànims i per la positivitat, sé que no ha estat fàcil fer el que has fet en aquest precís moment, i tot i així, ho has fet, moltes gràcies.

Gràcies a l'equip d'Infermeria i Urologia de Transplantament, i a l'equip d'infermeria de UCI per la seva col·laboració i predisposició. Puri, gràcies per ajudar-me quan ho he necessitat.

Gràcies Marta per no defallir i acceptar-nos com som.

Gràcies Felipe per la confiança.

Gràcies Joan per la teva experiència i fer durant molt temps el nostre dia a dia millor, et trobem a faltar.

A vosaltres noies, per animar-me sempre, facilitar-me el dia a dia, ensenyar-me i disfrutar al vostre costat dins i fora de l'hospital. Gràcies Cris per ensenyar-me a penjar d'allà dalt, va bé veure la vida de diferents punts de vista.

A tu Antònia, per ser un exemple a seguir.

Gràcies Sandra per ensenyar-me la teva valentia.

A tots/es els companys/es de l'hospital que esteu i heu estat al meu costat, gràcies per compartir amb mi aquest temps, al vostre costat és tot més fàcil.

Gràcies Sígriid i Eli per cada moment viscut i per poder seguir vivint-los després de tants anys, per ser úniques. Àgueda, gràcies per venir a viure amb mi i no deixar-me des de llavors. Anna, gràcies per ser-hi sempre tot i la distància.

I per últim però més important, a la meua família, amb molt carinyo als meus avis. Sobretot gràcies als meus pares, sense vosaltres això no hauria estat possible, gràcies per estimar-me, pel suport i la confiança que sempre m'heu donat i per l'esforç que en molts moments vàreu fer perquè jo pugui ser ara aquí. Gràcies a la meua germana i al meu germà per cada moment que hem pogut viure tots junts. Gràcies Albert, gràcies per ajudar-me i estar al meu costat sempre, per ser com ets, per fer-me millor persona...i... per voler compartir en Llevant.

RESUM

La lesió diafragmàtica associada a la ventilació mecànica (VIDD) és prevalent, infraestimada i amb implicacions pronòstiques. El seu estudi és complex i el seu diagnòstic, difícil. Aquesta Tesi inclou dos articles amb troballes innovadores en aquest camp incloent un nou model humà, els donants d'òrgans en assistència controlada (Maastricht III o MSIII), que permeten la ventilació mecànica invasiva (VMI) en modalitats assistides o espontànies i dos models ja descrits prèviament (donant mort encefàlica (ME)) i controls ((CTL) que requereixen cirurgia toràcica). El primer article, mostrà com ambdós grups de pacients (ME i MSIII) presentaren una disminució significativa de la mida de les fibres diafragmàtiques (CSA) respecte a un grup de subjectes CTL. El nou model d'estudi, per contra, mostrà com el subgrup de pacients MSIII que havien mantingut més hores l'estímul diafragmàtic presentaven menys atròfia que els MSIII que havien tingut més hores d'inactivitat diafragmàtica. El segon article va demostrar la utilitat de l'ecografia diafragmàtica en el diagnòstic d'atròfia, establint un límit de 1.7mm de Tdi, que presentava un 73% de sensibilitat, un 67% d'especificitat, i un 96% i 17% de valor predictiu positiu i negatiu respectivament per al diagnòstic d'atròfia.

ABSTRACT

Ventilation induced diaphragm damage (VIDD) is prevalent, underestimated, and with prognostic implications. Study of VIDD is complex and his diagnosis, difficult. This thesis includes two articles with innovative findings in this field and a new human model to study VIDD, a group of donors after controlled cardiac death (Maastricht III or MSIII). Both articles include MSIII, which allow invasive mechanical ventilation (VMI) in assisted or spontaneous modalities and two models already described in previous articles (brain death donors (BD) and controls ((CTLS) that require thoracic surgery). The first article showed how both donor groups (BD and MSIII) showed a significant decrease in the size of the diaphragmatic fibers (CSA) compared to a group of control subjects. The new study model, on the other hand, showed how the subgroup of MSIII patients who had maintained the diaphragmatic stimulus for more hours had less atrophy than those MSIII who had had more hours of diaphragmatic inactivity. The second article demonstrated the usefulness of diaphragmatic ultrasound in the diagnosis of atrophy, establishing a limit of 1.7 mm in diaphragmatic thickness in expiration (Tdi), which had 73% sensitivity, 67% specificity, and 96% and 17% of positive and negative predictive value respectively for the diagnosis of atrophy.

PREFACI

La VMI és una estratègia de suport ventilatori molt freqüent als Serveis de Medicina Intensiva (SMI). Aquesta s'associa a múltiples complicacions com la lesió diafragmàtica associada a la ventilació mecànica o VIDD. La presència de dany diafragmàtic en pacients ventilats va ser descrita fa anys, però no va ser fins al 2004 que va aparèixer el terme VIDD. Estudis posteriors realitzats en animals i en humans donants en ME, van demostrar la presència d'alteracions anatòmiques (atròfia) i funcionals (debilitat i pèrdua de força) en el múscul diafragma en relació a l'aplicació de modalitat controlades de VMI (amb abolició de l'estímul inspiratori i inactivitat diafragmàtica), fins i tot poques hores després del seu inici. Els mecanismes desencadenants i les mesures per prevenir-la i tractar-la, però, són encara pràcticament desconeguts. Aquesta Tesi valida un nou model de donant d'òrgans en assistència controlada (Maastricht III o MSIII) per a l'estudi d'aquesta patologia, ja que permet l'avaluació del diafragma després de períodes de ventilació en modalitats espontànies i assistides (amb activitat diafragmàtica).

Així doncs, l'any 2019 es va publicar el primer article d'aquesta Tesi a la revista de primer decil *Intensive Care Medicine* (Factor d'impacte 17.44) que descrivia aquest nou model de pacient crític ventilat per a l'estudi de la patologia diafragmàtica. Aquest treball va demostrar per primera vegada en humans el benefici de la utilització de modalitats que permeten l'estímul diafragmàtic durant la VMI per a la prevenció i tractament de la VIDD. Els grups de MSIII i ME van presentar major atròfia del diafragma i del quàdriceps que el grup control. A la vegada, els individus del grup MSIII que van passar menys hores d'inactivitat diafragmàtica, van desenvolupar menys atròfia que els individus MSIII que no, ratificant que el desús és un mecanisme desencadenant important de VIDD i que podria prevenir-se a través de l'ús de modalitats que permetin l'estímul diafragmàtic (assistides i espontànies).

Posteriorment es va utilitzar el mateix model de donants ventilats per a avaluar l'associació entre l'atrofia histològica del diafragma i la disminució del seu gruix ecogràfic (Tdi), de nou incògnita encara no resolta amb el coneixement actual. En aquest cas, els nostres resultats demostren que l'ecografia diafragmàtica és una eina no-invasiva i accessible i que és útil per al diagnòstic d'atròfia diafragmàtica tot i que ambdós conceptes no s'haurien d'utilitzar com a sinònims. A més, en el treball es descriu un punt de tall de Tdi que presenta una bona sensibilitat i valor predictiu positiu per al diagnòstic d'atròfia. Actualment aquest article ha estat enviat de nou a la revista Intensive Care Medicine (D1, IF 17.44) i està en fase de *peer review*.

El coneixement generat per la present Tesi haurà contribuït a facilitar el diagnòstic precoç de la VIDD mitjançant l'ecografia i a obrir vies de prevenció basades en prevenir el desús diafragmàtic en pacients ventilats, per a intentar disminuir els efectes deleteris associats a la VIDD.

Publicacions addicionals

Durant els anys de realització d'aquesta Tesi doctoral, he tingut la oportunitat de participar en altres estudis que tenen relació amb la mateixa. Tot i que al final no han format part del cos principal d'aquesta Tesi, tenen relació amb la lesió diafragmàtica associada a la ventilació mecànica i amb l'avaluació diafragmàtica a través de l'ecografia. Els estudis descrits van derivar en les següents publicacions:

- **Dot Irene**, Pérez-Teran Purificación, Samper Manuel-Andrés, Masclans Joan-Ramon. Disfunción diafragmática: una realidad en el paciente ventilado mecánicamente. Arch Bronconeumol. 2016;53:150-156
- Pérez-Terán Purificación, Marin-Corral Judith, **Dot Irene**, Sans Sergio, Muñoz-Bermúdez Rosana, Bosch Raquel, Vila Clara, Masclans Joan Ramon.

Aeration changes induced by high flow nasal cannula are more homogeneous than those generated by non-invasive ventilation in healthy subjects. *Journal of Critical Care*.2019;53:186–192

- Pérez-Terán Purificación, Marín-Corral Judith, **Dot Irene**, Masclans Joan Ramon. Reply to “Aeration changes induced by high flow nasal cannula are more homogeneous than those generated by non-invasive ventilation in healthy subjects: comments and observations”. *Journal of Critical Care* 2019;57:277-78.

Comunicacions relacionades amb la Tesi doctoral:

1. J Marin-Corral, **I Dot**, M Boguña, C Vilà, A Castellví, S Pascual-Guardia, MP Gracia, A Zapatero, Y Díaz, L Cecchini, JR Masclans. Abnormal diaphragm fibers in patients undergoing mechanical ventilation: a pilot study. 30th ESICM Lives (European Society of Intensive Care Medicine). Viena, Octubre 2017. *Intensive Care Medicine Experimental* 2017. 5 (Suppl 2): 005.
2. J. Marin-Corral, **I. Dot Jordana**, J. Boncompte, M. Bogunyà, L. Cecchini, A. Zapatero, M.P. Gracia-Arnillas, Y. Díaz, S. Pascual-Guardia, C. Vilà, A. Castellví, J.R. Masclans. Ventilator-induced diaphragm dysfunction in brain-dead and Maastricht III donors. 31th ESICM Lives (European Society of Intensive Care Medicine). Paris, Octubre 2018. *Intensive Care Medicine Experimental* 2018: 6(Suppl 2):0532.
3. J Marin-Corral, **I Dot**, J Boncompte, M Boguña, A Zapatero, Y Díaz, MP Gracia, S Pascual-Guardia, A Castellví, C Vilà, L Cecchini, JR Masclans. Ventilator-induced diaphragm dysfunction in brain-dead and maastricht III donors. Chest Annual Meeting 2018. San Antonio, Octubre 2018. *CHEST* 2018; 154(4): 1122A - 1123A.

4. Andrea Castellví Font; Clara Vilà Vilardell; **Irene Dot Jordana**; Marina Boguñà Planas; Judit Boncompte Torres; Thais Guri López; Anna Alabart Llinas; Sergi Pascual Guardia; Joan Ramon Masclans Enviz; Judith Marin Corral. Fibres diafragmàtiques anormals en pacients sotmesos a ventilació mecànica. Resultats preliminars. 39a Reunió de la Societat Catalana de Medicina Intensiva i Crítica (SOCMIC). Granollers, març 2018 (sense llibre de comunicacions).
5. J. Marín Corral, **I. Dot Jordana**, M. Boguñà Planas, J. Boncompte Torres, C. Vilà Vilardell, A. Castellví Font, E. Barreiro Portela, J. Gea Guiral, S. Pascual Guardia, L. Cecchini Rosell y J.R. Masclans Enviz. Fibras diafragmáticas anormales en pacientes sometidos a ventilación mecánica. Resultados preliminares. 51º Congreso nacional de la Sociedad española de neumología y cirugía torácica (SEPAR). Arch bronconeumol 2018; 54(Espec Cong): 434.
6. **Dot I**, Marin-Corral J, Vilà C, Castellví A, Boguñà M, Boncompte J, Zapatero A, Pérez-Terán P, Masclans JR. Correlation between ultrasound diaphragm thickness and histologic diaphragm cross-sectional area in mechanically ventilated patients. 32th ESICM Lives 2019. Berlin, Germany 28 septembre – 2 octubre 2019. Intensive Care Med Exp 2019. 7 (Suppl 3):001561.
7. Clara Vilà-Vilardell, Andrea Castellví-Font, Marina Boguñà-Planas, Judit Boncompte-Torres, **Irene Dot-Jordana**, Ana Zapatero-Ferrandiz, Purificación Pérez-terán, Judith Marin-Corral, Joan Ramon Masclans-Enviz. Correlació del gruix diafragmàtic mitjançant ecografia i mida fibril·lar mitjançant biòpsia en pacients crítics ventilats. 40ª Reunió de la Societat Catalana de Medicina Intensiva i Crítica (SOCMIC). Tarragona, Marzo 2019 (sin libro de comunicaciones).

8. Castellví A, Vilà C, Boguñà M, Boncompte J, Dot I, Zapatero A, Pérez-Terán P, Marin-Corral J, Masclans JR. Correlación del grosor diafragmático mediante ecografía y el tamaño fibrilar mediante biopsia en pacientes críticos ventilados. LIV Congreso nacional de la Sociedad Española de Medicina Intensiva, Crítica y Unidades Coronarias (SEMICYUC). Palma de Mallorca, Junio 2019. Med Intensiva 2019; 43(Espec Cong):156.

Finançament obtingut

- Fondo de Investigación Sanitaria- ISCIII (PI18/000025). Mecanismos moleculares de disfunción diafragmática asociada a ventilación mecánica (VIDD) tras la utilización de modalidades ventilatorias controladas y espontáneas en un modelo humano. Període:2019-2021. Quantitat: 92.202€. Funció: Investigadora col·laboradora (IP: Judith Marin-Corral i Joan Ramon Masclans).
- Fundación Española del Enfermo Crítico (FEEC). Mecanismos moleculares de disfunción muscular respiratoria tras la utilización de diferentes estrategias de ventilación mecánica. Quantitat: 10.000 euros. Període: 2017-2019. Funció: Investigadora col·laboradora (IP: Judith Marin-Corral).
- Sociedad catalana de medicina intensiva y crítica (SOCMIC). Mecanismos moleculares de disfunción muscular respiratoria después de la utilización de diferentes estrategias de ventilación mecánica. Quantitat: 1.500 € .Període: 2018-2019. Funció: Investigadora principal.

XXV	ABREVIATURES
1	1. INTRODUCCIÓ
3	1.1. Pacient crític
5	1.2. Musculatura respiratòria
6	a. Múscul diafragma
6	Anatomia
6	Histologia
8	Fisiologia
8	Funció
9	b. Musculatura de la caixa toràcica
9	1.3. Ventilació mecànica invasiva (VMI)
9	a. Definició i indicacions
10	b. Modalitats de VMI
11	c. Complicacions de la VMI
11	Lesió pulmonar associada a la VMI (VILI de l'anglès <i>ventilator-induced lung injury</i>)
13	Pneumònia associada a la VMI i altres complicacions infeccioses
13	Sobresedació
14	Debilitat adquirida a la UCI i Síndrome post-UCI
14	1.4. Efectes de la VMI sobre el diafragma
17	a. Miotrauma per VMI
18	Miotrauma per sobre-assistència respiratòria (atròfia per desús)
18	Miotrauma per infra-assistència respiratòria (dany induït per càrrega concèntrica)
19	Miotrauma induït per càrregues excèntriques (asincronies amb contraccions inefectives)
19	Miotrauma expiratori (per afectació de la longitud diafragmàtica)
19	b. Lesió diafragmàtica associada a la VMI
20	Epidemiologia i diagnòstic de la VIDD
21	Fisiopatologia de la VIDD

23	Fenòmens colaterals de lesió diafragmàtica en la VIDD
25	Prevençió i tractament de la VIDD
28	1.5. Mètodes per a l'avaluació de la funció diafragmàtica
28	a. Pressió transdiafragmàtica
29	b. Electromiografia
30	1.6. Mètodes per a l'avaluació anatòmica i funcional del diafragmàtica (ecografia diafragmàtica)
31	a. Excursió diafragmàtica
33	b. Gruix diafragmàtic en espiració (Tdi) i fracció d'enguiximent (Tfdi)
37	2. HIPÒTESI
39	2.1. Hipòtesi general
39	a. Hipòtesi concreta del treball 1
39	b. Hipòtesi concreta del treball 2
41	3. OBJECTIUS
43	3.1. Objectius generals
43	a. Objectius del treball 1
43	Objectiu principal del treball 1
43	Objectius secundaris del treball 1
44	b. Objectius del treball 2
44	Objectiu principal del treball 2
44	Objectius secundaris del treball 2
47	4. MÈTODES
49	4.1. Població d'estudi
49	a. Pacients (Donants)
50	b. Grup Control
50	4.2. Dades clíniques
51	4.3. Biòpsies
51	a. Diafragma
51	b. Quàdriceps

51	4.4. Anàlisis experimentals
51	a. Mida fibril·lar (cross-sectional area o CSA)
52	b. Anormalitats musculars
52	4.5. Gruix diafragmàtic ecogràfic (Tdi)
52	4.6. Anàlisis estadístic
55	5. RESULTATS
58	5.1. Article 1
83	5.2. Article 2
105	6. DISCUSSIÓ
115	7. CONCLUSIONS
119	8. LÍNIES DE FUTUR
125	9. BIBLIOGRAFIA
155	10. ANNEXES
157	10.1. Document aprovació dels estudis per el comitè d'ètica
158	10.2. Diligència voluntat de donació MSIII
159	10.3. Diligència voluntat de donació ME
160	10.4. Fulla d'informació i consentiment informat de biòpsia muscular als pacients control.
164	10.5. Articles publicats relacionats amb aquesta tesi

ABREVIATURES

APACHE II	Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II
BMI	Índex de massa corporal (De l'anglès: Body mass index)
CSA	Àrea fibril·lar (De l'anglès Cross-sectional area)
CTL	Controls
DP	Pressió de distensió
EMG	Electromiografia
ME	Mort encefàlica
MI	Medicina Intensiva
MHC	Cadena pesada de miosina
MPOC	Malaltia obstructiva crònica
MSIII	Donants d'òrgans en assistència controlada (Maastricht III)
NZ	Pneumònia Zero (Del castellà, Neumonía Zero)
Pdi	Pressió transdiafragmàtica
PdiTw	Pressió transdiafragmàtica obtinguda després de l'estímul del nervi frènic
PEEP	Pressió positiva al final de l'expiració (De l'anglès: Positive end expiration pressure)
Pes	Pressió esofàgica
Pgas	Pressió gàstrica
PICS	Síndrome Post-UCI (De l'anglès, Post-Intensive Care Syndrome)
P-SILI	Lesió pulmonar induïda per el propi pacient (De l'anglès Patient-Self Induced Lung Injury)
SDRA	Síndrome de Destret Respiratori agut
SMI	Servei Medicina Intensiva
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment
Tdi	Gruix diafragmàtic en expiració
Tfdi	Fracció d'engruiximent diafragmàtic
UCI	Unitat de Cures Intensives
VAP	Pneumònia associada a la ventilació mecànica (de l'Anglès, VAP)
VC	Volum Corrent
VIDD	Dany diafragmàtic associat a la ventilació mecànica (de l'anglès <i>ventilator-induced diaphragm damage</i>)
VILI	Lesió pulmonar associada a la Ventilació mecànica (De l'anglès ventilator-induced lung injury)
VMI	Ventilació mecànica invasiva

1

INTRODUCCIÓ

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Pacient crític

Els pacients crítics són aquells que requereixen ingressar a Serveis de Medicina Intensiva (SMI) per alteracions fisiològiques reversibles d'elevada gravetat i complexitat, sovint arribant a situacions de fracàs multiorgànic en el moment de l'ingrés a la Unitat de Cures Intensives (UCI). A Espanya, aproximadament el 2.5% dels llits d'un hospital es destinen a pacients crítics a les UCI, el que correspon a un 5% dels pacients ingressats a l'hospital (aproximadament uns 240.000 pacients /any)^{1,2}. Recentment, la situació de pandèmia ha modificat de manera significativa aquestes xifres de manera que no tant sols han augmentat els llits de crítics, sinó que també ho ha fet la severitat dels pacients atesos i en conseqüència el número de metges tractants. A l'inici d'aparèixer les UCI, la supervivència dels pacients ingressats era baixa, i els criteris d'ingrés eren restringits. En les últimes dècades, l'augment del coneixement científic i tecnològic en l'àmbit de la MI ha permès l'aparició de noves tècniques terapèutiques i diagnòstiques que han millorat les xifres de supervivència, la qual cosa ha flexibilitzat l'accés a l'UCI de pacients de major edat, amb més comorbiditats i/o patologies més complexes. Actualment la mortalitat intra-UCI es situa al voltant del 10%³ tot i que durant la pandèmia per SARS-CoV2 s'ha vist significativament augmentada fins al 30% segons el registre nacional ENVIN-HELICS 2020⁴.

La disfunció d'un o més òrgans pot amenaçar la vida del pacient i juntament amb la patologia prèvia, condicionar l'evolució clínica durant l'ingrés a l'UCI i a l'hospital⁵. A més nombre i severitat d'òrgans afectats, augmenta l'estada a UCI i la hospitalària, així com la mortalitat i el nombre de seqüeles que pateixen els supervivents⁶. Així doncs, la MI té com a objectiu tractar la patologia aguda que origina l'ingrés a la UCI sent necessari en tot moment donar tractament de suport als òrgans afectats fins la seva recuperació. Per a fer-ho, és freqüent la utilització de dispositius artificials i invasius que substitueixen la funció dels

òrgans de manera temporal fins a la seva recuperació. Tot i que indispensables per als pacients, cal tenir present que tots aquests dispositius poden acompanyar-se d'efectes deleteris d'importantes repercussions. De fet, la majoria d'aquests pacients, acaben desenvolupant seqüeles que poden persistir després de l'alta hospitalària i que poden derivar en l'aparició de limitacions tant a nivell físic i social, com inclús a nivell psicològic i psiquiàtric integrades en el que es coneix com a síndrome postUCI (PICS de l'anglès *post-intensive care syndrome*) amb una disminució significativa de la qualitat de vida d'aquells pacients que sobreviuen^{7,9}.

Per aquest motiu, l'atenció al pacient crític ha evolucionat d'una atenció dirigida a la cura de la malaltia en l'etapa aguda, fins a una assistència més global i integrada, dirigida no només al tractament de les patologies, sinó també a la prevenció i tractament de les conseqüències i complicacions tant físiques com psíquiques derivades del propi entorn d'UCI i dels tractaments instaurats. Els avenços tecnològics dels últims anys han portat a la creació de dispositius que permeten una monitorització més estreta i una atenció més personalitzada amb un impacte positiu sobre la supervivència i la qualitat de vida d'aquests pacients^{10,13}.

El fracàs ventilatori és una de les fallides orgàniques més habituals en els pacients crítics, ja sigui conseqüència directa d'una afectació pulmonar o com a efecte colateral de l'afectació greu a d'altres òrgans. Malgrat que en els últims anys les estratègies de suport ventilatori no invasiu s'han estès amb bons resultats en el tractament de la insuficiència respiratòria aguda, la ventilació mecànica invasiva (VMI) encara és una de les tècniques de suport ventilatori més utilitzades a les UCI^{12,14}. En aquest sentit, els efectes deleteris de la VMI han estat ben descrits a la literatura i avui en dia es coneix que afecten a l'evolució dels pacients crítics (estades a l'UCI i a l'hospital)^{7,9}.

El motiu d'aquesta Tesi és investigar i generar nou coneixement sobre una de les complicacions que s'han descrit en els últims anys en relació a l'ús de la VMI, la lesió diafragmàtica associada a la ventilació mecànica o VIDD (de l'anglès *ventilator-induced diaphragm damage*) que afecta al 60-80% dels pacients crítics ventilats¹⁵.

1.2. Musculatura respiratòria

Perquè el sistema respiratori pugui desenvolupar la seva funció correctament, és essencial un adequat funcionament de la musculatura respiratòria que és la responsable principal de la ventilació pulmonar. El sistema muscular respiratori està format per la caixa toràctica, la cavitat abdominal, els músculs respiratoris i el sistema nerviós que els innerva. La musculatura respiratòria està formada per musculatura esquelètica voluntària i involuntària que actua mobilitzant la caixa toràctica i la cavitat abdominal i dona estabilitat al tòrax. Quatre grups musculars principals formen el sistema respiratori: el diafragma (el principal múscul del sistema respiratori), els músculs accessoris i intercostals (musculatura de la caixa toràctica) i els músculs abdominals, cada un d'ells amb una funció diferenciada inspiratòria o expiratòria. La contracció activa d'aquests quatre sistemes musculars desplaçarà la cavitat toràctica i abdominal i farà que es generi un gradient de pressió transdiafragmàtic (Pdi) que provocarà l'entrada d'un volum d'aire determinat al pulmó (volum corrent o VC) que implicarà un augment significatiu del volum pulmonar. Posteriorment, amb la relaxació d'aquesta musculatura i la recuperació elàstica del pulmó, l'aire serà expulsat de manera passiva a l'exterior. En condicions normals, el diafragma i la musculatura de la caixa toràctica (intercostal i accessòria) són els músculs que participen en la ventilació.

A continuació es revisa l'anatomia, histologia, fisiologia i funció dels músculs respiratoris, principalment del diafragma que és el múscul més important implicat en la ventilació i objectiu d'estudi d'aquesta Tesi.

a. Múscul diafragma

Anatomia

El diafragma està localitzat entre la caixa toràcica i la cavitat abdominal. Està format per dues cúpules unides per un tendó central, envoltades per la pleura en la seva part toràcica i pel peritoneu en la seva part abdominal. Ambdues cúpules estan situades a diferent altura tant en relaxació com en contracció¹⁶. Aquestes dues cúpules es divideixen anatòmica i funcionalment en 2 parts, una costal i una crural. El diafragma costal s'origina anteriorment al tendó central i les seves fibres es dirigeixen cap a les costelles inferiors, on s'hi uneixen en una zona coneguda com a zona d'aposió. Aquesta zona s'estén aproximadament dos centímetres a nivell caudal i és la zona on el diafragma es pot avaluar a través de l'ecografia toràcica. El diafragma crural en canvi, té el seu inici en les fibres del tendó central però aquestes es dirigeixen dorsalment per inserir-se a la part antero-lateral de la columna lumbar i al múscul psoes¹⁷. El diafragma rep la seva innervació motora a través del nervi frènic, amb origen a nivell de C4-C5 de manera bilateral. Ambdues zones diafragmàtiques, costal i crural, i ambdós hemidiafragmes, reben innervació a través de dues branques diferents¹⁸. Aquesta innervació diferenciada implica que en diferents situacions, l'afectació diafragmàtica d'origen nerviós pot afectar només a un dels hemidiafragmes.

Histologia

El diafragma és un múscul esquelètic format per fibres musculars, que són cèl·lules multinucleades amb els nuclis col·locats de manera perifèrica. Cada fibra muscular està formada per miofibril·les que a la vegada estan formades per molècules de proteïnes, actina i miosina, conformant filaments prims i gruixuts respectivament. El sarcòmer és la unitat funcional de la miofibril·la on interactuen filaments prims i gruixuts a les bandes Z, que són les encarregades d'unir les miofibril·les entres sí i formar les fibres¹⁹. Així doncs, la

interacció de l'actina i la miosina és la responsable de generar la força i la contracció muscular.

Igual que tots els músculs esquelètics, el diafragma està conformat per diferents tipus de fibres musculars segons l'isoforma de la cadena pesada de la miosina que expressen (MHC de l'anglès *Myosin Heavy Chain*). En aquest sentit existeixen les fibres tipus I, les tipus II o les fibres híbrides segons expressin MHC-I, MHC-II, o les dues. Les fibres tipus I (o fibres lentes) presenten menys capacitat contràctil però més resistència a la fatiga, per lo que estan dissenyades per a generar la pressió necessària per mantenir la respiració de manera constant. Les fibres tipus II (o fibres ràpides) tenen una elevada força contràctil però són fatigables per la qual cosa són útils en la realització d'esforços de curta durada²⁰.

En condicions normals el múscul diafragma presenta una relació similar de fibres tipus I i II (53-55% fibres tipus I i 45-48% tipus II)^{21,22} i la mida de l'àrea d'aquestes fibres (CSA, de l'anglès *Cross-sectional area*) en la població general és de 2.200-3600 μm^2 de mediana (2320-4495 μm^2 per les fibres tipus I i entre 1960-4060 μm^2 per les fibres tipus II)²³⁻²⁶. La mida de les fibres i la seva proporció no varia entre un hemidiafragma i l'altre²⁰. En condicions de patologia, el diafragma pateix adaptacions per fer més eficient la seva funció. D'aquesta manera, en la malaltia pulmonar obstructiva crònica (MPOC) on hi ha hiperinsuflació pulmonar i un augment de la resistència al flux aeri que augmenta la demanda de treball respiratori, el diafragma presenta un augment de la proporció de fibres lentes, deleció de sarcòmers, augment de l'estrès oxidatiu i atròfia de les fibres²⁷. Alguns procediments com la VMI també poden tenir efectes sobre el diafragma tal i com es tracta en un apartat específic d'aquesta Tesi.

Fisiologia

En condicions normals durant la contracció, el diafragma s'escurça longitudinalment i s'engruixeix, provocant un aplanament de la cúpula. La seva contracció activa juntament amb la contracció de la musculatura intercostal i accessòria provoca un desplaçament caudal de l'abdomen i del propi diafragma i una elevació de la caixa toràcica juntament a un augment del diàmetre antero-posterior del tòrax¹⁶. Com ja s'ha comentat, aquest moviment fa disminuir la pressió intratoràcica i provoca una entrada d'aire significativa als pulmons. La seva relaxació juntament amb les propietats elàstiques del pulmó, fan que l'aire inspirat sigui expulsat durant l'expiració. La disposició de les fibres en cada hemidiafragma permet que la tensió aplicada en cadascun d'ells no tingui efecte sobre la mobilitat de l'altre cúpula, de manera que en situacions de paràlisi/ disfunció d'un d'ells, l'altre pot seguir realitzant la seva funció correctament¹⁶.

Funció

Mentre que el diafragma costal té un paper actiu en la ventilació, el diafragma crural funciona com un esfínter extern a l'esfínter esofàgic inferior. El diafragma costal és el principal múscul inspiratori i és el responsable del 70% de l'acció ventilatòria amb capacitat per generar el 40% del VC²⁸. La seva funció es quantifica normalment en termes de capacitat contràctil o força diafragmàtica (mesurades habitualment mitjançant pressions inspiratòries) i pel seu escurçament (mesurat per la seva capacitat de generar un canvi de volum o desplaçament de la paret toràcica). És un múscul esquelètic i la seva capacitat de contracció es pot dur a terme de manera voluntària tot i que es contrau de manera involuntària la major part del temps. La seva contracció voluntària permet inhibir la contracció involuntària i així participar en la realització de maniobres complexes com la tos, el vòmit, la defecació i la parla, o inclús en el manteniment d'una apnea perllongada mitjançant l'aturada de la seva contracció.

b. Musculatura de la caixa toràcica

Tant la musculatura intercostal com l'accessòria formen part de la musculatura de la caixa toràcica que junt amb el diafragma participen en la mobilització de l'aire als pulmons.

La musculatura intercostal està dividida en externa i interna. En situacions normals, l'externa té un paper important en la fase inspiratòria tot i que en molt menor mesura que el diafragma. En condicions de patologia com la insuficiència respiratòria o la disfunció diafragmàtica, o bé en inspiracions forçades, el paper de la musculatura intercostal externa és més rellevant i contribueix en major part en la generació de VC²⁹. En canvi, la musculatura intercostal interna participa principalment en la fase expiratòria.

La musculatura accessòria inclou els músculs escalens, el múscul pectoral major i menor, el múscul esternocleidomastoideu i el trapezi. El múscul escalè té una funció inspiratòria i ajuda en el moviment d'elevació de la caixa toràcica. A diferència dels intercostals, l'activació dels músculs accessoris, principalment l'esternocleidomastoideu, es realitza únicament en situacions d'inspiració moderada i profunda.

1.3. Ventilació mecànica invasiva (VMI)

a. Definició i indicacions

La VMI és una estratègia de suport respiratori artificial i temporal, àmpliament utilitzada en els SMI per suplir la funció dels músculs respiratoris en situacions d'insuficiència respiratòria i/o fracàs multiorgànic³⁰⁻³². Existeixen diferents patologies d'origen intra i extrapulmonar que poden requerir VMI, entre elles es contempla: la insuficiència respiratòria aguda, l'exacerbació per MPOC, la

crisi asmàtica, el coma, el fracàs multiorgànic, desordres neuromusculars i la intervenció quirúrgica entre d'altres^{33,34}.

El 40% dels pacients ingressats a l'UCI requereixen VMI, xifra que s'ha vist augmentada fins a un 50%-89% l'any 2020 en context de la pandèmia per SARS-CoV2 viscuda a nivell mundial^{4,35,36}. S'estima que el seu ús pot ascendir fins als 310 pacients per cada 100.000 pacients no quirúrgics³².

Qualsevol situació de fracàs ventilatori d'origen pulmonar suposa un augment de l'esforç inspiratori que la musculatura respiratòria no és capaç de compensar. L'augment de la demanda d'oxigen, però, no es correspon amb un augment de la seva aportació als teixits i l'intercanvi de gasos es veu severament compromès. Alguns fenòmens com la presència d'hipoxèmia prèvia, la disfunció neuromuscular, un augment de les resistències pulmonars o la hiperinsuflació, són alguns dels mecanismes que fan augmentar aquest esforç respiratori³⁷. En aquest context, és necessari disminuir l'esforç inspiratori mitjançant sedació, intubació, i la posterior connexió del pacient a la VMI per tal de millorar l'oxigenació. Per tant, en aquests casos, a l'iniciar la VMI es passa d'una ventilació activa però no suficientment efectiva realitzada pel propi pacient, a una ventilació completament passiva realitzada per un ventilador. Amb això, la correcta aportació d'oxigen als òrgans i teixits queda assegurada en la majoria dels casos.

b. Modalitats de VMI

Un cop iniciada la VMI, els esforços han d'anar dirigits a individualitzar el suport ventilatori que s'administra al pacient per ajustar-lo a les necessitats de cada moment mitjançant diferents modalitats ventilatòries i/o ajust de diferents paràmetres. Quan el motiu que porta a l'inici de la VMI és d'origen intrapulmonar o bé quan el tractament de base requereix sedació profunda i/o relaxació neuromuscular (p.e. pacients neurocrítics), és indispensable començar amb

modalitats controlades, és a dir, modalitats on el ventilador és el responsable de la freqüència respiratòria i del VC introduït en cada respiració (en modalitats controlades per volum) o bé de la pressió necessària per a introduir un VC determinat (en modalitats controlades per pressió). En aquests casos, tractaments adjuvants com els relaxants musculars permeten aconseguir una total adaptació del pacient al ventilador evitant asincronies i esforços ineficaços^{38,39}. Actualment totes les modalitats controlades dels ventiladors permeten també administrar el VC pautat rere estímuls inspiratoris que pot realitzar el pacient si no està relaxat (respiracions assistides). Quan no hi ha patologia pulmonar aguda o bé aquesta ja està resolta o en fase de resolució, és necessari portar al pacient cap a modalitats espontànies que li permetin manar la freqüència respiratòria donant-li un suport necessari per a que realitzi VC adequats. En aquesta modalitat, la generació d'un volum inspiratori dependrà doncs, de la contracció activa dels músculs respiratoris del pacient i del suport administrat pel respirador.

c. Complicacions de la VMI

Al llarg dels anys s'han anat descrivint múltiples complicacions associades a la VMI, algunes d'elles pel seu efecte directe sobre pulmó o diafragma i algunes d'elles secundàries a efectes colaterals. En aquest apartat es descriuen les complicacions no vinculades al múscul diafragma ja que aquesta entitat serà tractada en un apartat específic. L'aparició d'una sola d'aquestes complicacions pot comportar un empitjorament en el pronòstic augmentant l'estada hospitalària i la mortalitat⁴⁰.

- **Lesió pulmonar associada a la VMI (VILI de l'anglès *ventilator-induced lung injury*)**

VILI és com s'anomena a la lesió pulmonar induïda per la pròpia VMI i ha estat àmpliament estudiada en la síndrome del destret respiratori agut (SDRA),

una de les entitats que cursa amb insuficiència respiratòria aguda i que més freqüentment requereix VMI^{14,41}. La VILI és generada per l'aplicació d'estímuls nocius a nivell pulmonar de manera repetida i que és capaç de generar un dany pulmonar difús similar al de la SDRA⁴². La causa principal que provoca que un pulmó ja lesionat desenvolupi més lesió afegida, és l'increment excessiu de la pressió transpulmonar degut a l'ús de pressions i volums elevats durant la VMI (barotrauma i volutrauma) però s'han descrit altres mecanismes de VILI com el biotrauma (alliberació de productes inflamatoris del teixit pulmonar lesionat a la circulació sistèmica, que pot desenvolupar fracàs multiorgànic) i l'atelectrauma (provocat per l'aplicació de forces d'obertura i tancament alveolar de manera repetitiva, principalment en pulmons amb lesions heterogènies)⁴²⁻⁴⁴. A més a més, la persistència d'un estímul respiratori augmentat d'un pacient ventilat també, pot desencadenar una lesió pulmonar similar, i que en aquest cas s'anomena P-SILI (de l'anglès *Patient self-induced lung injury*)^{45,46}.

L'aparició de VILI en pacients amb SDRA implica un augment de la mortalitat de manera que en les últimes dècades s'han desenvolupat estratègies com la ventilació mecànica protectora que han ajudat a disminuir significativament la seva incidència i les seves conseqüències⁴⁷. La utilització de paràmetres ventilatoris segurs com la utilització de VC de 4-8ml/kg de pes predit, la optimització de la pressió positiva al final de l'expiració (PEEP de l'anglès, *positive end expiratory pressure*), la limitació de la pressió de distensió (DP, de l'anglès *driving pressure*), la limitació de la pressió meseta o *plateau* a <30cmH₂O, així com el decúbit pron, evitar la hiperòxia i l'ús de relaxants musculars en les primeres fases de la malaltia, són estratègies que han demostrat assolir els objectius de la VMI disminuint significativament la mortalitat en aquesta entitat^{38,47-54}. L'ús de la sonda nasogàstrica de doble baló per a la mesura de la pressió esofàgica (Pes), subrogat de la pressió transpulmonar, ha demostrat ser també útil per a millorar la oxigenació i la compliància del pulmons amb SDRA a través de la titulació de la PEEP, així com de la resta de paràmetres ventilatoris per tal d'evitar els efectes no desitjats de la VMI¹¹. Tot i l'evidència d'aquestes

mesures però, l'adherència a aquestes recomanacions no és completa i l'ús de VC nocius (>8ml/kg de pes predit) encara és present en la pràctica clínica i per tant també les seves conseqüències¹⁴.

- **Pneumònia associada a la VMI i altres complicacions infeccioses**

La pneumònia associada a la ventilació mecànica (VAP de l'anglès *ventilator associated pneumonia*) és una infecció intrahospitalària que apareix després de 48h de l'inici de la VMI, i pot condicionar el pronòstic i augmentar la mortalitat d'aquells pacients que la desenvolupen⁵⁵. Les taxes de VAP en el nostre medi han disminuït des de l'aparició del programa "Neumonía Zero (NZ)" promogut per la Societat Espanyola de Medicina Intensiva i Crítica (SEMICYUC) a l'any 2011⁵⁶. La VAP és una causa intrapulmonar de SDRA però la sèpsia *per se* de qualsevol origen també pot condicionar l'aparició de SDRA i l'inici del desenvolupament de disfunció i debilitat muscular perifèrica o de disfunció diafragmàtica⁵⁷⁻⁶⁰. Per aquest motiu, altres estratègies dirigides al control de la infecció dels pacients crítics també han ajudat a disminuir la incidència d'infeccions i disminuir-ne la mortalitat associada^{56,61}.

- **Sobresedació**

Els pacients sotmesos a VMI, tenen requeriments elevats de sedació. Tot i les recomanacions de les guies de pràctica clínica per utilitzar sistemes de monitorització estricta de la sedació mitjançant escales validades que permetin titular correctament les dosis a administrar, encara avui dia evitar la sobresedació en aquests pacients és un repte⁶². La inestabilitat hemodinàmica, la farmacocinètica del propi pacient, el fracàs multiorgànic o la interacció amb altres medicacions, faciliten l'acumulació i l'acció excessiva de la sedació. Aquesta situació té efectes negatius en l'evolució del pacient ja que implica un augment de la morbimortalitat, un augment dels dies d'estada, retard en el procés de retirada de la VMI (*weaning*) i més incidència de debilitat muscular del pacient crític

i disfunció diafragmàtica⁶³⁻⁶⁷. A més, sovint els pacients ventilats requereixen de l'ús de relaxants musculars des d'una fase molt inicial que pot agreujar el desús de la musculatura respiratòria i contribuir a la seva atrofia^{68,69}.

- **Debilitat adquirida a la UCI i Síndrome post-UCI**

Els supervivents d'una estada a la UCI, la majoria de vegades sotmesos a VMI, pateixen conseqüències a curt i llarg termini que queden englobades dins de la debilitat adquirida a la UCI (ICU-AW de l'anglès ICU-acquired weakness) i el síndrome PICS. Aproximadament el 50% dels pacients ventilats tenen dificultat per tornar a les seves activitats quotidianes després de l'ingrés, degut a les conseqüències tant físiques com cognitives i psicològiques que deterioren la seva qualitat de vida^{9,70,71}. L'enllitament i el desús de la musculatura perifèrica intrínseca al fet d'estar intubat i ventilat, juntament a l'ús de tractaments mèdics com la corticoteràpia i la sedació durant llargs períodes, poden contribuir al desenvolupament de l'ICU-AW i PICS durant i després de l'estada a la UCI⁶⁵. Programes de mobilització precoç i d'humanització de les cures intensives han demostrat millorar alguns factors pronòstics en aquest camp^{72,73}.

1.4. Efectes de la VMI sobre el diafragma

Com s'ha comentat prèviament la contracció diafragmàtica durant la respiració espontània fa que el diafragma s'escurci i s'engruixeixi mantenint la seva curvatura de manera constant. La curvatura del diafragma modula la relació força/volum del diafragma i el seu desplaçament. Amb una correcta contracció, la pressió transdiafragmàtica (Pdi) generada disminueix proporcionalment a la força realitzada per les fibres musculars i es genera un volum inspiratori⁷⁴.

En primer lloc, durant el període de VMI en modalitats controlades (sense esforç inspiratori espontani) el treball mecànic dels músculs respiratoris, sobretot del diafragma, es troba abolit per l'efecte de la pressió positiva administrada pel

ventilador i l'ús de la medicació sedant i/o relaxant que sovint es requereix^{38,39,54}. Així doncs hi ha un cessament complet de la contracció diafragmàtica amb una inactivació del diafragma durant la ventilació que pot conduir a atrofia⁷⁵⁻⁷⁷. En aquest context, la configuració del diafragma durant la VMI es veu alterada i la disposició i el desplaçament del mateix en el tòrax es veuen modificats. L'ús de modalitats controlades provoca que el volum inspiratori es distribueixi de manera predominant a les zones no dependents del pulmó per la presència de consolidacions i atelèctasis en zones dependents^{58,78}. Com s'ha comentat prèviament, en situacions de SDRA, la ventilació protectora és necessària per evitar que el pulmó ja lesionat evolucioni a VILI. A més de la limitació del VC i de les pressions inspiratòries, la utilització de PEEP elevada, prevé el col·lapse pulmonar i aconsegueix la obertura de zones amb atelèctasi/condensació del pulmó i a la vegada augmenta el volum pulmonar expiratori^{79,80}. La monitorització i optimització de la PEEP de manera individualitzada és necessària per evitar situacions de sobredistensió/hiperinsuflació del pulmó, ja que la sobredistensió pulmonar pot tenir també un efecte directe i deleteri sobre el diafragma. Quan el volum pulmonar en situació de repòs augmenta, la longitud del diafragma en la seva zona d'apòsició és menor a l'esperat, la curvatura diafragmàtica disminueix, i provoca una disminució de la capacitat contràctil que afecta a la seva força i capacitat per generar un volum inspiratori⁸¹⁻⁸⁴.

En segon lloc, quan dins les modalitats controlades existeixen respiracions assistides, el diafragma és capaç de disparar el *trigger* i iniciar una ventilació que s'administra per part del ventilador amb uns paràmetres prèviament determinats⁸⁵ (Taula 1). En alguns casos s'ha observat i descrit la presència d'una contracció sostinguda posterior a l'inici de la inspiració que pot tenir conseqüències negatives promovent l'aparició d'asincronies, un augment de VC i sobredistensió pulmonar amb la consegüent disminució de la longitud i força diafragmàtiques⁸⁶.

Finalment, les modalitats espontànies han demostrat una millora de la oxigenació, disminució de les atelèctasis i reclutament de zones dependents del pulmó en pacients amb esforç inspiratori i pressió transpulmonar en rangs normals^{87,88}. Estudis en animals han demostrat que la utilització de modalitats espontànies de VMI on l'estímul diafragmàtic està present, atenua la pèrdua de funció diafragmàtica i disminueix la progressió de l'atròfia⁸⁹. Tot i així, valors elevats de pressió suport poden tenir el mateix efecte d'inactivació diafragmàtica que les modalitats controlades i poden desencadenar d'igual manera atròfia i disfunció^{90,91}. Tanmateix, un suport insuficient en aquestes modalitats també pot portar a efectes indesitjables a nivell de diafragma degut a un augment de la càrrega de treball. L'efecte de l'aplicació de PEEP sobre la geometria diafragmàtica en modalitats espontànies és encara desconegut⁹².

Modalitats ventilatòries	AC/P	AC/V	APRV	PAV	PS
Criteri de ciclat	Temps	Temps	Temps/ Espontània pacient	Trigger Flux expiratori	% caiguda de pic flux inspiratori
Criteri de pauta	Pressió	Volum	Pressió/ Temps	% assistència	Pressió
Criteri dependent	Volum	Pressió	Volum	Volum	Volum
Freqüència Respiratòria	Predeterminada /Espontània pacient	Predeterminada /Espontània pacient	Predeterminada /Espontània pacient	Espontània pacient	Espontània pacient
Trigger	Si/No	Si/No	No	Si	Si
Sincronia durant inspiració	No	No	Variable	Si	Si
Activació diafragmàtica	Inactivitat diafragmàtica		Activitat diafragmàtica		

Taula 1. Comparativa entre les modalitats de ventilació mecànica invasiva més habituals. AC/P: Assistida/controlada per pressió, AC/V: Assistida/controlada per volum, APRV: Ventilació amb reducció de pressió (De l'Anglès, Airway Pressure Release Ventilation), PAV: Ventilació proporcional assistida, PS: Pressió de suport.

a. Miotrauma per VMI

La lesió iatrogènica que pateix el diafragma sotmès a VMI s'anomena miotrauma diafragmàtic i en ell conflueixen varis insults que porten a atròfia, lesió i disfunció diafragmàtica⁹³. Fins al moment s'han descrit 4 mecanismes que poden afavorir la seva aparició⁷⁵: 1) Miotrauma per sobre-assistència respiratòria (atròfia per desús); 2) Miotrauma per infra-assistència respiratòria (dany induït per càrrega concèntrica); 3) Miotrauma induït per càrregues excèntriques (asincronies amb contraccions inefectives) i 4) Miotrauma expiratori (per afectació de la longitud diafragmàtica) (Figura 1).

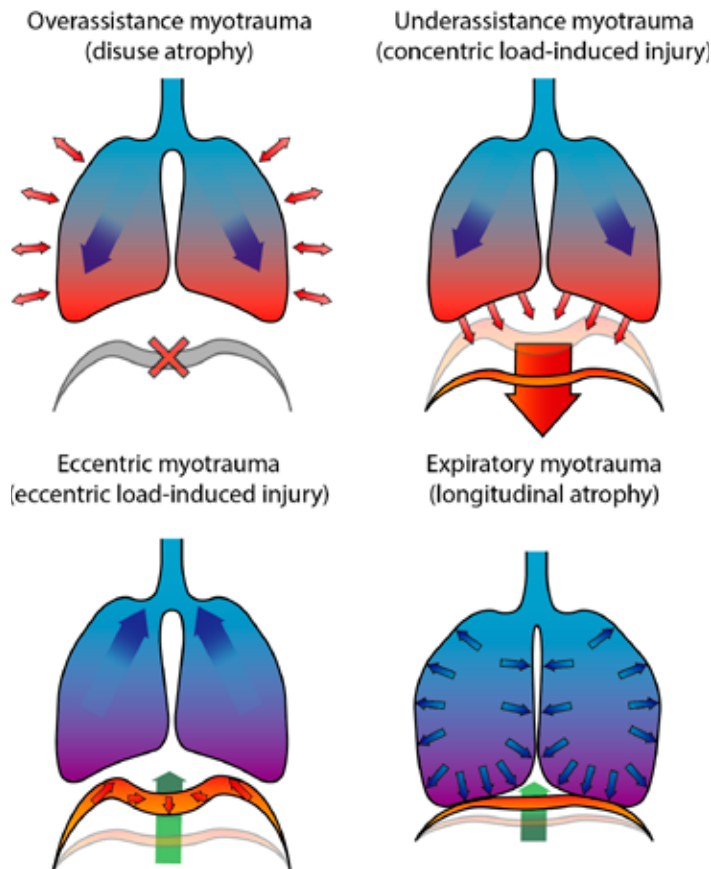


Figura 1. Mecanismes que afavoreixen l'aparició de Miotrauma Diafragmàtic secundari a la VMI.

- **Miotrauma per sobre-assistència respiratòria (atròfia per desús)**

Es tracta d'un miotrauma mediat per un suport respiratori excessiu com passa en les modalitats de VMI controlada, on l'activitat contràctil del diafragma queda abolida, la qual cosa genera l'aparició d'atròfia precoç en aquests pacients⁹⁴⁻⁹⁶. L'ús de modalitats assistides o espontànies amb suport elevat (sobre-assistència), també generen un descens de la massa muscular valorada per ecografia⁹⁰. Tot això pot implicar la necessitat de més dies de VMI, més probabilitat de complicacions i un ingrés més llarg a l'UCI^{97,98}.

- **Miotrauma per infra-assistència respiratòria (dany induït per càrrega concèntrica)**

Es tracta d'un miotrauma mediat per un suport respiratori insuficient⁹⁷. Estudis en animals evidencien la presència de lesió diafragmàtica després de l'aplicació de forces resistives que augmenten la càrrega de treball del diafragma (anormalitats fibril·lars com poden ser la ruptura dels sarcolemmes, infiltració inflamatòria de les fibres diafragmàtiques o disrupció d'elements contràctils). En aquests casos, juntament a l'alteració del teixit muscular, existeix també un descens de la força contràctil i de la capacitat de recuperació⁹⁹. Aquesta lesió que es dona sobretot a nivell del diafragma costal, pot afectar també a la musculatura intercostal. En aquest cas, la lesió està caracteritzada principalment per l'aparició de fibres necròtiques i cèl·lules inflamatòries en el teixit intersticial, que augmenten la seva mida i que s'han atribuït a una alteració en el complex de les calpaines^{99,100}. En aquest context, en pacients sotmesos a VMI s'ha observat un augment de la massa muscular diafragmàtica en espiració observada per ecografia que s'ha associat a un augment en els dies de VMI, més dies d'ingrés a l'UCI i més complicacions⁹⁷. Si aquest augment de gruix representa hipertròfia muscular o edema secundari a un excés de treball respiratori del diafragma està encara per aclarir.

- **Miotrauma induït per càrregues excèntriques (asincronies amb contraccions inefectives)**

S'han reportat diversos tipus de disincronies en els pacients ventilats. Els esforços ineficaços, el doble *triggering*, el *trigger* invers i la asincronia de flux són les més freqüents. Les contraccions excèntriques del diafragma durant l'expiració (relaxació) s'han descrit en pacients amb una coordinació pacient-ventilador alterada. Això pot ocórrer quan el suport respiratori del ventilador no és l'adequat al *drive* o demanda respiratòria del pacient¹⁰¹. El seu diagnòstic és infreqüent i fa perpetuar els efectes secundaris que se'n poden derivar. Diferents treballs han descrit un augment de la producció de citocines i una reducció de la mida dels sarcòmers i de les fibres musculars amb una alteració contràctil secundària en pacients ventilats amb una falta d'interacció coordinada diafragma-ventilador^{102,103}.

- **Miotrauma espiratori (per afectació de la longitud diafragmàtica)**

La hiperinsuflació pulmonar s'ha descrit en els pacients amb MPOC com a causant de la delecio de sarcòmers i remodelació de les fibres a nivell diafragmàtic²⁷. Recentment Lindqvist i col·laboradors han descrit l'afectació de la longitud de les fibres diafragmàtiques en el pacient ventilat degut a un augment de la pressió expiratòria secundària a l'aplicació de PEEP elevada. Així doncs, aquest fenomen pot afavorir també la pèrdua de sarcòmers a nivell de la fibra muscular i reduir-ne la longitud, provocant el que es coneix com a "atròfia longitudinal" que pot alterar la relació força-longitud i provocar que la contracció no sigui òptima¹⁰⁴.

b. Lesió diafragmàtica associada a la VMI

En els últims anys les alteracions que pateix el múscul diafragma sotmès a VMI, s'han englobat dins d'una entitat diferent a la miopatia del pacient crític, que

pot existir en paral·lel o no amb l'afectació de la resta de la musculatura. Així doncs, la lesió diafragmàtica associada a la VMI (VIDD de l'anglès *ventilator-induced diaphragm damage*) és una complicació molt freqüent dels pacients ventilats i ja des de les poques hores de l'inici de la VMI^{15,98,105}. Donat que el dany que pateix el diafragma amb la VMI (miotrauma) es pot acabar traduït en una afectació de la funció diafragmàtica, sovint el terme VIDD s'utilitza també com a abreviatura de disfunció diafragmàtica associada a la VMI (de l'anglès *ventilator-induced diaphragm dysfunction*). En aquesta Tesi es fa èmfasi en les alteracions estructurals que pateix el diafragma com a conseqüència del miotrauma diafragmàtic generat per la VMI sense valorar l'impacte que aquest genera en la funció diafragmàtica. Aquesta és una línia de treball futura que s'obre arrel de les troballes dels estudis inclosos en la Tesi.

- **Epidemiologia i diagnòstic de la VIDD**

La VIDD és una entitat encara poc sospitada en l'àmbit de la patologia crítica i en conseqüència poc diagnosticada i estudiada a nivell clínic. Tot i així, les dades que provenen dels diferents estudis clínics, indiquen que és una entitat prevalent, amb una incidència superior al 60-84% en pacients sotmesos a VMI¹⁰⁶. Fins i tot algunes publicacions suggereixen que és més freqüent que la debilitat adquirida a l'UCI¹⁵. Apareix precoçment després de l'inici de la VMI i augmenta a mesura que s'allarga la durada de la mateixa¹⁰⁷. Així doncs, els canvis generats per la VIDD són temps-dependents i la durada de la VMI es correlaciona amb la gravetat i la velocitat de l'afectació diafragmàtica^{94,96,108,109}. Actualment ja hi ha estudis que relacionen la VIDD amb un pitjor pronòstic a la UCI, a l'hospital i fins i tot un cop superada la fase aguda. L'aparició de VIDD pot allargar la dependència de la VMI d'aquests pacients amb majors possibilitats d'aparició de complicacions derivades com les descrites prèviament^{15,108,109}. En conseqüència, també pot augmentar l'estada a l'UCI i a l'hospital, així com la mortalitat i les importants limitacions funcionals a llarg termini rere l'alta hospitalària^{97,106,110,111}. El diagnòstic de VIDD és per exclusió, havent-se descar-

tat altres causes de disfunció del diafragma¹¹². Tanmateix, aquesta situació és complicada en el pacient crític, ja que, com s'ha descrit, el diafragma d'aquests pacients es pot veure afectat per molts factors deleteris intrínsecs a la situació de gravetat i a l'entorn d'UCI.

- **Fisiopatologia de la VIDD**

Malgrat que les conseqüències derivades de la VIDD s'han pogut descriure en múltiples publicacions durant els últims anys, les vies que promouen la seva aparició son encara desconegudes. El diafragma és un múscul actiu, caracteritzat per un alt cicle de treball, una forta capacitat oxidativa i un contingut elevat en mitocondries. A continuació es detallen els mecanismes moleculars que s'han descrit fins al moment i que estan presents en les diferents formes de presentació de la VIDD. Aquestes troballes s'han descrit en models animals de VMI i en estudis en humans malgrat la dificultat d'obtenir mostres biològiques per al seu estudi.

Atròfia fibril·lar

S'entén per atrofia diafragmàtica a la disminució del CSA de les fibres diafragmàtiques. Aquesta s'ha descrit en models de VMI ja des de fases inicials de la ventilació⁹⁸. Així, un descens significatiu del CSA es pot observar després de 12-18 hores de VMI en modalitats controlades en animals i després de 18-69 hores en pacients crítics^{66,76,98}. Aquest descens pot ser de fins a un 53% respecta a voluntaris sans⁹⁸. La immobilització i el desús són els factors que més s'han associat a atròfia, sent per tant l'ús de modalitats controlades el principal factor de risc per desenvolupar-la⁹⁸. La utilització de PEEP pot precipitar també la seva aparició¹⁰⁴.

Els mecanismes moleculars més importants que poden portar a l'atròfia en la VIDD són la disminució de la síntesi proteica, l'augment de la proteòlisi, i l'augment de l'estrès oxidatiu.

Alteracions en el recanvi proteic i apoptosi

L'atròfia que es produeix en relació a l'ús de la VMI ocorre de forma primària degut a un descens de la síntesi proteica i a un augment de la proteòlisi¹¹³⁻¹¹⁵. La síntesi proteica del diafragma pot disminuir fins a un 30% després de només 6h de VMI⁷⁷. Per altra banda, l'augment de la proteòlisi es troba en relació a l'activació de les vies de les proteases (calpaína, caspasa-3), del sistema ubiquitina-proteasoma, vies d'apoptosi i d'activació d'autofàgia^{95,115}. Estudis en humans conclouen que pacients ventilats en els que existeix una augment de l'activitat del sistema ubiquitina-proteasoma, presenten un descens del 25% del CSA, tant de les fibres lentes com de les ràpides i un descens de la seva força contràctil⁹⁵. La disfunció mitocondrial, l'oxidació de fosfolípids, d'àcids nucleics i de proteïnes pot activar també la proteòlisi i l'apoptosi en models animals^{116,117}. Malgrat l'evidència dels estudis animals, en biòpsies diafragmàtiques de pacients s'ha observat una menor relació entre la presència de proteòlisis i l'aparició d'estrès oxidatiu i disfunció mitocondrial, suggerint la presència d'altres mecanismes desencadenants d'atròfia i disfunció contràctil en humans²⁶.

Augment de l'estrès oxidatiu

Durant la VMI en modalitats controlades es produeixen alteracions en la morfologia mitocondrial que provoquen alteracions de la seva funció i excés de creació d'espècies reactives d'oxigen (ROS). Aquest augment de l'estrès oxidatiu a nivell diafragmàtic, actua com a desencadenant de l'activació de les vies de la calpaína i caspasa-3 a aquest nivell^{94,98,118}. En aquest sentit, en pacients donants en mort encefàlica (ME) s'ha confirmat l'aparició molt precoç (18h) d'una

reducció del diàmetre de les fibres musculars diafragmàtiques junt a fenòmens d'estrès oxidatiu i d'activació de proteases a nivell diafragmàtic⁹⁶. D'altra banda, la VMI perllongada dóna lloc a una disminució de la capacitat antioxidant en el diafragma, que s'objectiva en el descens dels nivells de glutatión, CuZn superòxid dismutasa (SOD) i de l'activitat de la glutatión peroxidasa¹¹⁹.

Disfunció contràctil

Models animals han permès demostrar l'aparició de disfunció contràctil diafragmàtica després de 48h de l'inici de la VMI mitjançant l'avaluació de la disminució de la força diafragmàtica, que en el cas de la VIDD és progressiva i temps-dependent. De manera paral·lela a l'atròfia, 12h de VMI en modalitats controlades són suficients per evidenciar una reducció de la força¹²⁰. L'origen de la disfunció contràctil en la VIDD ve mediada per la pròpia atròfia i per canvis a nivell de la ultraestructura fibril·lar que conté l'aparell contràctil en el diafragma.

Canvis ultraestructurals

La VMI, sobretot en modalitats controlades, dóna lloc a alteracions temps-dependents de la ultraestructura fibril·lar. Estudis en animals descriuen l'aparició inicial d'àrees amb miofibril·les anormals per desorganització miofibril·lar i alteracions en les línies Z¹²⁰. Posteriorment es descriuen àrees de regeneració sense signes d'inflamació¹²¹. I finalment, si la VMI es perllonga més de 3 dies es produeix un augment de les vacuoles lipídiques probablement en relació a un procés d'autofàgia¹²².

- **Fenòmens colaterals de lesió diafragmàtica en la VIDD**

Tot i que la VMI és responsable directe de l'aparició de VIDD, existeixen altres insults presents molt freqüentment en els pacients crítics que poden afavorir

també l'aparició de debilitat i/o empitjorar l'atròfia i la disfunció diafragmàtica secundària. La severitat a l'ingrés, el fracàs multiorgànic i la sèpsia són els tres factors que s'han associat de manera més robusta a la debilitat diafragmàtica des dels primers moments d'ingrés a l'UCI¹⁰⁶. La situació proinflamàtoria inherent a la sèpsia pot donar lloc a una reducció de la síntesi proteica i un augment de la proteòlisi, que pot desencadenar també en una pèrdua de massa muscular aguda que es pot observar en la VIDD¹²³⁻¹²⁵. A més a més, aquests factors poden existir ja prèviament a l'inici de la VMI, pel que un cop s'instaura la mateixa, poden precipitar i augmentar la gravetat de la VIDD^{57,106,108,126,127}. Altres factors com la hiperglucèmia que s'ha relacionat amb un augment dels processos oxidatius al diafragma, o l'ús de fàrmacs com els relaxants musculars, podrien condicionar l'aparició d'atròfia i disfunció diafragmàtica o intensificar-ne la gravetat^{68,128}. L'impacte de la corticoteràpia sobre el diafragma està més discutit actualment ja que existeixen estudis amb resultats contradictoris sobre el seu efecte sobre la musculatura respiratòria, protector en alguns i perjudicial en d'altres^{129,130} (Fig.2).

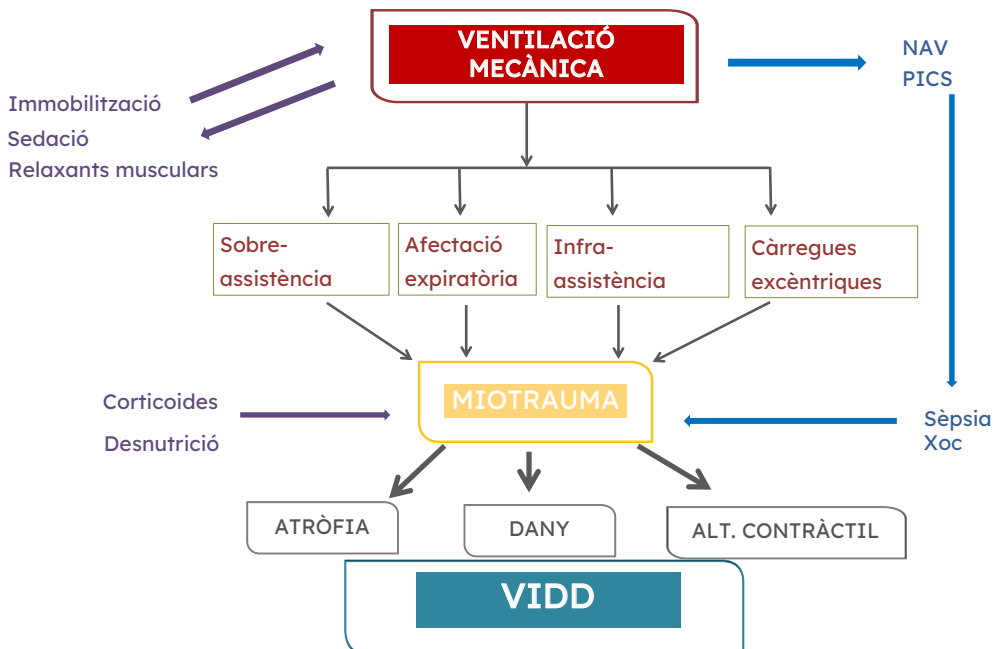


Fig.2 Mecanismes associats al desenvolupament de VIDD. NAV: Pneumònia associada a la Ventilació mecànica, PICS: Síndrome Post-UCI (De l'Anglès, *Post-Intensive Care Syndrome*), VIDD: Dany Diafragmàtic secundaria a Ventilació i mecànica (De l'anglès, *Ventilatory Induced Diaphragm Damage*).

- **Prevenió i tractament de la VIDD**

La VMI és una interacció dinàmica entre pacient i màquina, per tant la monitorització d'aquests dos elements és essencial per poder obtenir beneficis i evitar complicacions¹³¹. En les últimes dècades els esforços dels intensivistes en relació al maneig de la VMI s'han centrat en minimitzar la VILI. En els últims anys però, l'atenció sobre el diafragma i com evitar la VIDD ha despertat cada vegada més interès a la llum de la repercussió que aquesta entitat té en el pronòstic dels pacients¹³². En aquest sentit, les guies de maneig clínic dels pacients sota VMI inclouen ja recomanacions per a prevenir, monitoritzar i tractar la VIDD, mostrant com a pilar fonamental l'ús d'estratègies de VMI protectora del diafragma¹³³. Per prevenir i tractar la VIDD, la majoria d'autors

recomanen un abordatge multidisciplinari i tot i que no existeix encara un tractament dirigit, algunes de les següents estratègies podrien tenir resultats esperançadors. La monitorització de la VIDD es tractarà en un apartat específic d'aquesta Tesi.

Ventilació mecànica protectora del diafragma

La VMI protectora del diafragma pretén prevenir la VIDD, i en aquells casos on ja s'ha establert, intenta minimitzar-la sense deixar de banda en cap moment la protecció al pulmó¹³⁴. Així doncs, després dels fenòmens descrits en els apartats previs, sembla lògic que aquestes estratègies han de buscar: 1) la sincronització-pacient-ventilador, 2) assegurar un esforç inspiratori adequat al *drive* respiratori del pacient, 3) evitar esforços innecessaris i 4) evitar càrregues de treball respiratori inapropiades. Malgrat tot, donada la falta d'evidència actual sobre l'aplicació d'aquestes estratègies en la prevenció de la VIDD, totes aquestes recomanacions es basen en opinions d'experts basades moltes vegades en estudis animals¹³³. És conegut a la literatura que el pas a modalitats espontànies i la minimització de la pressió de suport tant precoçment com la condició del pacient ho permeti, permet millorar l'oxigenació dels pacients i pot disminuir l'efecte deleteri i d'inactivació sobre el diafragma^{91,98,135}. L'ús de modalitat espontànies en models animals i humans, disminueix l'atròfia i la disfunció contràctil del diafragma^{94,136}. Per tant, l'ús preferent de modalitats espontànies també podria prevenir i minimitzar l'aparició de VIDD enfront d'altres modalitats⁸⁹, però sempre ajustant l'esforç inspiratori del pacient per a que no sigui ni excessiu ni insuficient⁷⁵. Monitoritzar paràmetres que ajudin a ajustar el nivell de pressió suport que s'ofereix al pacient en cada moment per a mantenir l'activitat contràctil del diafragma dins uns valors fisiològics ha de ser un dels primers objectius a l'hora de protegir el diafragma¹³⁷.

Així doncs, l'aplicació de la VMI s'ha tornat cada cop més individualitzada buscant un equilibri entre dues ventilacions protectores, la pulmonar i la

diafragmàtica, amb l'objectiu de minimitzar el temps necessari de ventilació, la mortalitat i les complicacions que se'n poden derivar^{11,138-140}. En el següent apartat es detallen els mètodes de que disposem a la actualitat per avaluar i monitoritzar l'estat i la funció diafragmàtica en la pràctica habitual i que poden ser útils per a guiar la ventilació protectora del diafragma.

Altres estratègies de prevenció de la VIDD

La profilaxis de la VIDD en la fase aguda passa per l'optimització de la VMI però també per controlar aquells factors que poden contribuir a la seva aparició. Així doncs, el maneig mèdic òptim de les situacions intercurrents és una estratègia inicial indispensable. Aquest maneig hauria d'estar dirigit a controlar la sèpsia, assegurar un adequat suport nutricional i restringir els fàrmacs amb efectes deleteris sobre el múscul administrats durant l'ingrés^{10,141}. La utilització d'una sedació protocol·litzada, regular l'ús de corticoides i de relaxants musculars i evitar la hiperglucèmia serien estratègies modificables que podrien contribuir en la profilaxis de la VIDD^{62,68,128}.

Altres estratègies de tractament de la VIDD

Molts dels estudis actuals estan dirigits al diagnòstic i a la descripció de les vies fisiopatològiques que desencadenen la VIDD per tal d'identificar fàrmacs o intervencions terapèutiques que puguin ajudar en el seu maneig. D'una banda, l'ús de fàrmacs com la N-acetilcisteïna que té capacitat antioxidant, el bortezomib, la teofil·lina, el levosimendan i la rapamicina entre d'altres han demostrat en estudis aïllats, la capacitat de millorar la síntesi proteica, la contractilitat, o evitar els mecanismes de la VIDD¹⁴²⁻¹⁴⁶. Tot i així, manquen estudis randomitzats controlats en humans que avaluin el seu efecte real sobre la musculatura respiratòria. D'altra banda, estratègies no farmacològiques dirigides a incrementar l'activitat diafragmàtica podrien tenir un paper en l'atròfia per desús. La rehabilitació respiratòria amb la utilització de tècniques

d'entrenament del diafragma ha demostrat millorar la força de la musculatura diafragmàtica, però en el moment actual, encara no hi ha estudis que avaluïn millores en factors pronòstics¹⁴⁷. L'ús de programes de mobilització precoç han demostrat ser segurs en els pacients d'UCI però el seu efecte directe sobre el diafragma no s'ha avaluat encara¹⁴⁸. Estratègies de rescat com l'estimulació elèctrica diafragmàtica o la utilització d'un marcapàs diafragmàtic presenten resultats prometedors en models animals, on aconsegueix evitar l'atròfia i la pèrdua de força però no hi ha estudis en humans¹⁴⁹. Actualment s'està duent a terme un assaig clínic que avalua els beneficis d'un marcapàs diafragmàtic que estimula el nervi frènic via transvenosa i que podria tenir resultats prometedors en els propers mesos¹⁵⁰.

1.5. Mètodes per a l'avaluació de la funció diafragmàtica

a. Pressió transdiafragmàtica

La mesura de la pressió transdiafragmàtica (Pdi) és la tècnica *gold standard* per a l'avaluació de la funció diafragmàtica^{96,151-153}. La Pdi és la diferència neta entre la pressió gàstrica (Pgas) que estima la pressió abdominal i la pressió Pes que estima la pressió pleural, mesurades de manera simultània en una contracció màxima del diafragma^{152,154,155}. Aquesta diferència de pressions o Pdi doncs, és la pressió negativa generada pel diafragma en la seva contracció màxima i representa la força realitzada pel mateix^{152,154}. La manera més fàcil per a la mesura d'ambdues pressions (Pgas i Pes) és mitjançant la utilització d'una sonda de doble baló, un a nivell gàstric i un a nivell esofàgic, connectats a un sensor de pressió. Donat que per a fer la mesura es necessita una contracció màxima del múscul, el procediment per a realitzar la maniobra de mesura és diferent en funció de la possibilitat del pacient de col·laborar¹⁵⁶.

En pacients sedats sense capacitat de col·laborar, la determinació s'ha de realitzar rere un estímul màxim cervical del nervi frènic en situació de relaxació

completa del diafragma. La seva principal limitació resideix en que és una tècnica invasiva i no disponible a la majoria de SMI. Valors de Pdi rere estimulació del nervi frènic (Pdi Twich o PdiTw) inferiors a 11cm H₂O s'han relacionat amb una dificultat en l'extubació, generant un impacte negatiu en l'evolució del pacients ingressats a UCI^{106,109}.

En pacients amb capacitat de col·laborar, la mesura de la Pdi es realitza durant una inspiració màxima voluntària des d'una situació de repòs. En aquest cas, la mesura pot estar influenciada per la musculatura de la caixa toràcica, i sovint el pacient no és capaç d'activar completament la musculatura diafragmàtica, pel que els resultats poden no ser del tot estrictes en quant a avaluació diafragmàtica¹⁵⁷.

b. Electromiografia

L'electromiografia (EMG) de la musculatura diafragmàtica permet enregistrar l'activitat elèctrica muscular en temps real per valorar la funció contràctil del diafragma i el *drive* respiratori^{158,159}. L'ús de l'EMG s'ha estès a la clínica i a la investigació, sobretot en pacients amb desordres del son i patologia neuromuscular. El seu ús als SMI continua essent poc freqüent^{160,161}.

Actualment es disposa de 3 mètodes per realitzar un EMG del diafragma: 1) transcutani; 2) intramuscular i 3) transesofàgic. En el primer cas es necessiten elèctrodes de superfície sobre la pell (mètode transcutani) esdevenint una prova no invasiva i indolora¹⁶² tot i que més difícil de realitzar en els pacients crítics per problemes de posicionament dels elèctrodes i detecció de senyal. L'EMG intramuscular es realitza a través de la col·locació d'agulles o sensors en el teixit muscular. En aquest cas és una prova invasiva i pot causar dolor i no està exempta de complicacions com el pneumotòrax. Recentment s'ha utilitzat l'ecografia per a guiar la punció i així disminuir el risc, tot i que continua sent no menyspreable¹⁶³. Finalment en l'EMG transesofàgic, el sensor està integrat

en un catèter que es posiciona a l'esòfag. També és un mètode invasiu, pot generar molèsties al pacient derivades de la col·locació del catèter a l'esòfag i la peristalsi esofàgica pot artefactar els resultats¹⁶⁰. L'ús de l'EMG diafragmàtica transesofàgica (EAdi) s'ha estès en els últims anys amb l'aparició d'un dispositiu que permet determinar l'activitat diafragmàtica a través d'un catèter acoblat a un ventilador, estratègia que s'ha anomenat NAVA (de l'anglès *neurally adjusted ventilatory assist*). Aquesta modalitat permet analitzar el *drive* respiratori i la funció diafragmàtica en pacients amb diferents patologies i en el SMI podria ser útil per a valorar l'esforç respiratori¹⁶⁴. La seva aplicabilitat en la detecció precoç del fracàs de l'extubació és discutida ja que no ha aportat més beneficis que altres tècniques habituals de caràcter menys invasiu¹⁶⁵.

1.6. Mètodes per a l'avaluació anatòmica i funcional del diafragmàtica (ecografia diafragmàtica)

L'ecografia diafragmàtica és una tècnica relativament recent, l'única que permet valorar l'anatomia diafragmàtica de manera dinàmica i en temps real i de la que se'n deriven paràmetres que s'han relacionat amb la funció diafragmàtica. És una tècnica no invasiva, innòcua, indolora i lliure de radiacions i que permet la repetició de les exploracions sense implicar molèstia pels pacients^{166,167}. La limitació principal resideix en la variabilitat inter i intraobservador, tot i que varis estudis han demostrat una bona precisió i reproductibilitat tant en voluntaris sans com en pacients crítics (ventilats i no ventilats)¹⁶⁸. L'ecografia diafragmàtica pot aportar informació rellevant en la prevenció i detecció de la VIDD. La seva accessibilitat permet monitoritzar la resposta diafragmàtica als canvis realitzats en el ventilador de manera dinàmica i observar en temps real la presència d'asincronies que permeti fer els canvis necessaris per a evitar-les¹⁶⁹.

A continuació es detallen els paràmetres específics que es poden mesurar mitjançant ecografia i que poden aportar informació rellevant en el camp de la VIDD.

a. Excursió diafragmàtica

L'excursió del diafragma valorada a través de la finestra subcostal permet visualitzar en temps real el desplaçament crani caudal de la cúpula diafragmàtica durant la respiració¹⁷⁰. Aquest desplaçament (mobilitat) i la velocitat en la que es realitza es pot mesurar i informa de l'activitat de la musculatura diafragmàtica, permetent distingir entre un diafragma normal, dèbil o amb paràlisi completa^{167,171}. La valoració de l'excursió diafragmàtica presenta algunes limitacions que són fàcilment identificables. L'augment de la pressió abdominal (p.e. ascites) o l'augment de la pressió intratoràctica (p.e. vessament pleural, emfisema, fibrosi, condensacions, empiema, etc) poden restringir la mobilitat diafragmàtica i ser un fals positiu per a disfunció diafragmàtica^{172,173}.

Per a la valoració de la excursió diafragmàtica es posiciona la sonda de 3.5-5 MHz per sota la vora costal a la nivell de la línia mitja-clavicular dirigint el feix d'ultrasons perpendicularment al terç posterior de l'hemidiafragma a estudi¹⁷⁴. En el pla bidimensional (2D), durant la inspiració el diafragma normal apareix com una línia hiperecogènica corba que es desplaça en direcció caudal, en direcció a la sonda. El mode-M s'utilitza per mesurar l'excursió diafragmàtica, que correspon a la distància recorreguda entre l'expiració i la inspiració (Fig.3).

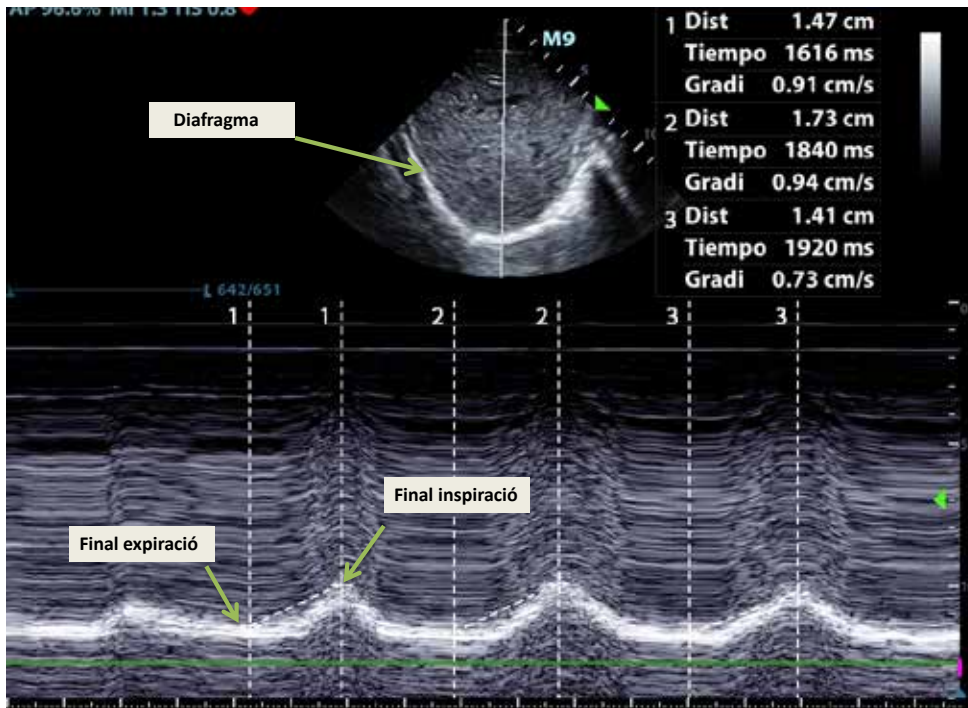


Fig.3. Mesura en mode-M de l'excursió diafragmàtica durant una inspiració no forçada. El diafragma es pot observar com una línia hiperecogènica (marcada amb una fletxa). L'excursió es mesura com la diferència de distància entre el final de la inspiració i el final de l'expiració.

Els valors de normalitat en pacients no ventilats, en repòs i en posició supina, són en homes i dones de 18 ± 3 y 16 ± 3 mm respectivament¹⁷¹. Es defineix com a debilitat diafragmàtica una excursió menor a 10mm. La nul·la mobilitat del diafragma durant la inspiració o la presència d'una excursió negativa (o moviment paradoxal) indica una paràlisi completa del diafragma^{167,175}. Tot i que existeix una lleu asimetria de l'excursió entre ambdós hemidiafragmes (més marcada a l'esquerra), la relació entre els dos mai ha de ser superior al 50%. En pacients ventilats en modalitats controlades l'excursió diafragmàtica es veu artefactada per l'entrada d'aire a pressió positiva, per la qual cosa no és un paràmetre adequat per a pacients crítics amb respiració passiva.

b. Gruix diafragmàtic en expiració (Tdi) i fracció d'engruiximent (Tfdi)

El Tdi valorat per ecografia diafragmàtica s'ha correlacionat amb el gruix del diafragma mesurat amb una regla en cadàvers¹⁷⁶ i en conseqüència amb la massa muscular del diafragma¹⁷⁷. El Tdi a l'hemidiafragma dret és més accessible que l'esquerra degut a una millor finestra ecogràfica i presenta una bona reproduïbilitat inter i intra-observadors. A diferència de l'excursió diafragmàtica, la força derivada de l'aplicació de la ventilació mecànica no modificarà el gruix expiratori, pel que aquesta mesura serà útil en pacients ventilats¹⁷⁸. Tampoc la mesura es veurà afectada per gènere o índex de massa corporal (BMI de l'anglès body mass index)^{177,179,180}.

Per a mesurar el Tdi s'utilitza una sonda de 10–12 MHz que es col·loca en el 9-10è espai intercostal de manera transversal, a l'altura de la línia axil·lar anterior que correspon a la zona d'inserció del diafragma a les costelles, la zona d'apòsició¹⁷⁴. En aquesta posició i en el pla 2D, el diafragma es visualitza com una estructura formada per tres capes, dues hiperecogèniques (pleura i peritoneu) i una hipoecogènica (diafragma), que engruixeix en la inspiració i s'aprima en l'expiració. Per mesurar el Tdi s'utilitza el Mode-M mesurant des de la part interior de la capa pleural a la part interior de la capa peritoneal en la zona corresponent al final de l'expiració (Fig. 4).

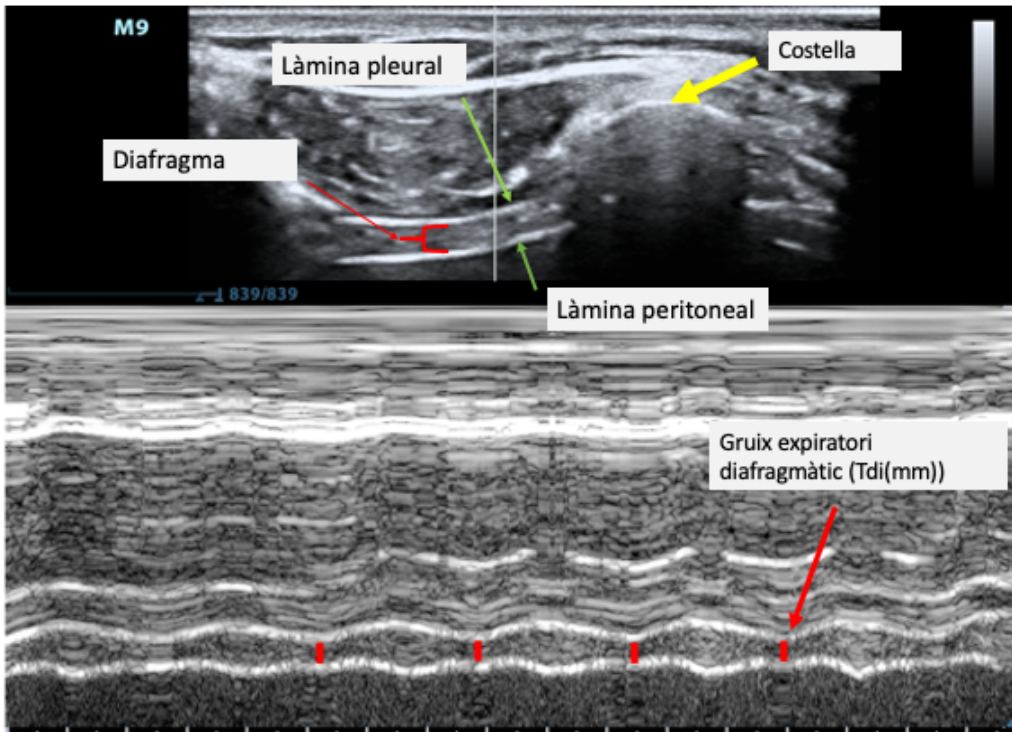


Figura 4. Mesura del gruix diafragmàtic en espiració no forçada. El diafragma es visualitza com tres línies paral·leles (part superior de la imatge): dues hiperecògeniques amb una línia central hipocògena i de més gruix. La marca vermella (part inferior de la imatge) representa el gruix espiratori diafragmàtic (Tdi).

No s'han establert valors de normalitat per al Tdi i aquests varien en els diferents grups control utilitzats en els diferents estudis (pacients sans o ventilats). Els límits inferiors descrits varien entre 1.6 i 2.3mm. Valors per sota de 1.5mm s'han considerat fins al moment compatibles amb un gruix espiratori disminuït^{97,166,181-183}. El Tdi s'ha utilitzat en molts estudis com a sinònim d'atròfia diafragmàtica tot i que no hi ha estudis que demostrin que siguin equivalents. Per això, el valor de Tdi s'ha usat com a mesura per valorar i monitoritzar la VIDD¹⁸⁴. Grosu et al. van ser els primers en detectar un descens diari de Tdi del 6% després de les primeres 48h de ventilació mecànica en modalitats assistides¹⁸⁴ amb un augment d'aquest percentatge fins al 10% en pacients

ventilats en modalitats controlades¹⁸⁵. La presència d'un Tdi disminuït, tot i que no s'ha associat a força contràctil ni a fracàs a l'extubació¹⁷⁷ si que s'ha associat a la presència de disfunció diafragmàtica, amb un augment dels dies de VMI, augment de l'estada hospitalària i de complicacions^{97,185}.

De la mateixa manera que s'obté el Tdi (que per definició és expiratori) també es pot obtenir el Tdi en inspiració (Tdi_{insp}). Amb aquests dos valors es pot calcular la Tfdi seguint la següent fórmula: $Tfdi = (Tdi_{insp}) - (Tdi) / (Tdi) \times 100$. El Tfdi sí que s'ha correlacionat amb els volums inspiratoris, la força diafragmàtica i la Pdi, i tradueix, per tant, la intensitat de la contracció voluntària del diafragma^{97,186,187}. Els valors de normalitat s'estimen superiors al 30% però una Tfdi inferior al 20% es considera com a VIDD^{97,109,186,187}.



HIPÒTESI

2. HIPÒTESI

2.1. Hipòtesi general

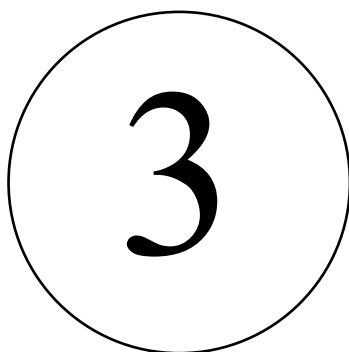
La lesió diafragmàtica associada a la ventilació mecànica (VIDD) és una entitat descrita en els últims anys en els pacients crítics amb importants repercussions en el seu pronòstic. El seu estudi presenta limitacions per la complexitat i riscos en la obtenció de mostres biològiques i per la dificultat d'utilitzar mètodes per a avaluar-la en aquests pacients. Un nou model humà no utilitzat fins al moment, els donants MSIII, podria ser útil per estudiar els canvis que pateix el diafragma sotmès a ventilació mecànica en diferents modalitats ventilatòries així com per validar la utilitat de proves d'imatge no invasives com l'ecografia a l'hora de diagnosticar atròfia.

a. Hipòtesi concreta del treball 1

Els donants d'òrgans MSIII, els quals són capaços d'estimular el seu diafragma sota ventilació mecànica tolerant modalitats assistides o espontànies, podrien presentar menys VIDD (atròfia) que els donants en ME els quals tenen abolida la contracció diafragmàtica tolerant només modalitats controlades.

b. Hipòtesi concreta del treball 2

L'avaluació ecogràfica del diafragma a través de la mesura del gruix diafragmàtic en expiració (Tdi) és una bona eina per diagnosticar l'atròfia diafragmàtica (definida per una disminució de la mida de les fibres musculars) en pacients sotmesos a ventilació mecànica.



OBJECTIUS

3. OBJECTIUS

3.1. Objectius generals

L'objectiu comú que va portar a dissenyar aquesta Tesi va ser el d'investigar i conèixer la utilitat d'un nou model humà per a l'estudi de la VIDD que permetés avaluar la importància de la utilització de diferents estratègies de ventilació mecànica en el seu desenvolupament així com validar la utilitat d'una tècnica d'imatge no invasiva com l'ecografia com a mètode per a diagnosticar l'atròfia diafragmàtica.

a. Objectius del treball 1

- **Objectiu principal del treball 1**

Comparar les característiques histològiques de la musculatura respiratòria i perifèrica d'un grup de donants MSIII i un grup de donants en ME ventilats amb diferents modalitats de ventilació mecànica.

- **Objectius secundaris del treball 1**

Descriure un nou model fisiopatològic en humans (donants MSIII) útil per a l'estudi de la VIDD.

Comparar les característiques histològiques de la musculatura respiratòria i perifèrica entre ambdós grups de donants i entre dos subgrups de donants MSIII (segons si presenten major o menor activitat diafragmàtica) i un grup de subjectes control sotmesos a cirurgia toràcica programada.

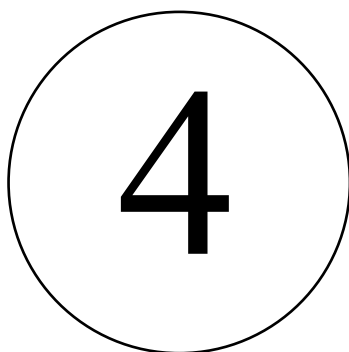
b. Objectius del treball 2**• Objectiu principal del treball 2**

Avaluar la capacitat de la mesura de descens del gruix diafragmàtic mesurat per ecografia (Tdi) per a detectar atròfia diafragmàtica (definida pel descens de l'àrea de les fibres musculars) en pacients sotmesos a ventilació mecànica.

• Objectius secundaris del treball 2

Analitzar l'impacte de la ventilació mecànica sobre la mida fibril·lar (cross-sectional area o CSA) i el Tdi.

Aportar una base científica i experimental per l'ús del descens del Tdi mesurat per ecografia com a signe d'atròfia.



MÈTODES

4. MÈTODES

4.1. Població d'estudi

En els dos estudis es van incloure pacients donants d'òrgans de dos tipus diferents: en assistència controlada (MSIII) i en ME, tots ells ingressats a la UCI de l'Hospital del Mar durant el període 2017-2020. El disseny dels estudis va fer que en el primer treball ambdós grups de donants conformessin grups diferents per ser comparats entre ells, mentre que en el segon treball, els dos grups de donants es van incloure en el mateix grup. Els pacients inclosos en els grups control eren pacients sotmesos a resecció de nòduls pulmonars localitzats. Els criteris d'exclusió van ser els següents: edat menor de 18 anys, insuficiència respiratòria crònica, tractament amb esteroides orals, sospita de síndromes paraneoplàstiques o miopaties i/o tractament amb fàrmacs coneguts que poguessin alterar l'estructura i/o la funció muscular.

a. Pacients (Donants)

Donants en assistència controlada (MSIII). Els donants en assistència controlada, són donants amb el diagnòstic de mort per cessament irreversible de les funcions cardiorespiratòries (després d'una aturada cardíaca). Són pacients que presenten lesions irreversibles que condicionen un pronòstic vital infaust, on es consensua limitar el tractament de suport vital (LTSV) i no iniciar la reanimació després de l'aturada cardíaca al quiròfan. Els donants potencials sovint són capaços de generar activitat respiratòria espontània durant la ventilació mecànica i com a resultat, és habitual que es trobin en modalitats espontànies abans de la donació.

Donants d'òrgans en mort encefàlica (ME). Els donants en ME presenten una lesió cerebral irreversible amb la pèrdua de tots els reflexes de tronc i abolició del centre respiratori, que implica el cessament complet de l'activitat respiratò-

ria espontània. El diafragma d'aquests donants es manté completament inactiu durant el període de ventilació mecànica posterior al diagnòstic, i en la majoria dels casos, també en el període anterior a aquest.

b. Grup Control

Subjectes CTL. Pacients sense comorbiditats significatives que van ser sotmesos a una toracotomia per a la resecció d'una neoplàstica pulmonar localitzada i que van necessitar poques hores de MV.

4.2. Dades clíniques

En el moment de la inclusió es van recollir dades demogràfiques, edat, gènere, BMI, hàbits tòxics, comorbiditats, medicació crònica i el tipus d'ingrés. En el grup de donants es va recollir la gravetat en les primeres 24h d'ingrés (*Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II* o APACHE II i *Sequential Organ Failure Assessment* or SOFA). Es va recollir també el tipus de donació, els tractaments rebuts durant l'estada a l'UCI (corticoides sistèmics, tipus i dies de sedació, ús i dies d'ús de relaxants neuromusculars, insulina, nutrició enteral i drogues vasoactives) i resultats analítics del dia de l'ingrés. Es van recollir les complicacions i l'evolució durant l'ingrés a UCI i també el tipus i dies de ventilació mecànica i els dies d'estada a UCI. En el grup MSIII es va recollir el tipus de preservació (oxigenació per membrana extracorpòria o ECMO, perfusió freda o extracció ràpida).

4.3. Biòpsies

a. Diafragma

Les biòpsies diafragmàtiques es van obtenir a quiròfan en tots els casos del diafragma costal lateral a la inserció del nervi frènic. En primer lloc, en els MSIII, després de la retirada del tractament de suport vital (VMI) i un cop certificada la mort. En els ME, en el mateix moment de l'extracció d'òrgans, abans de l'aturada circulatòria i tan aviat com va ser possible durant l'extirpació dels òrgans; per tal d'assegurar un temps mínim d'isquèmia a causa d'hipoperfusió. Finalment en els CTL, al principi de la cirurgia. En aquest cas, el DF dels pacients CTL va estar inactiu durant un curt període de temps abans de la biòpsia.

b. Quàdriceps

En el primer estudi es van obtenir també biòpsies del vast lateral del quàdriceps. En el cas dels donants, aquestes es van extreure a la UCI, en condicions asèptiques, sota anestèsia local i en les 4 hores prèvies a la cirurgia de donació d'òrgans. En el cas dels CTL, es van recollir al final de la cirurgia i abans de la reversió del bloqueig neuromuscular.

4.4. Anàlisis experimentals

Totes les mostres (diafragma i quàdriceps) es van processar de la mateixa manera. Immediatament després a l'extracció es van submergir en formol i es van posar immerses en parafina per al posterior anàlisi.

a. Mida fibril·lar (cross-sectional area o CSA)

L'anàlisi histològic es va realitzar mitjançant tècniques d'immunohistoquímica (tincions per a miosina tipus I i II) com està especificat en ambdós estudis.

L'anàlisi morfomètric es va realitzar a través de la presa d'imatges mitjançant una càmera adaptada a un microscopi òptic i posteriorment amb l'ajuda d'un programa específic com s'indica en les dues publicacions.

b. Anormalitats musculars

Les anormalitats musculars van ser avaluades a través de tincions histològiques amb hematoxilina-eosina segons mètodes descrits prèviament a la literatura (188). L'estructura histològica de les fibres musculars es va classificar en: estructura normal, presència de nuclis interns, cèl·lules inflamatòries, dipòsits de lipofucsina, fibres anormals, inflamades i necròtiques.

4.5. Gruix diafragmàtic ecogràfic (Tdi)

En el segon estudi, la mesura del Tdi es va realitzar en les 6 hores prèvies a la donació d'òrgans (en el grup de donants) o abans de la cirurgia (en el grup control), mentre els subjectes estaven sotmesos a VMI i en posició a 45°. La mesura ecogràfica de Tdi es va realitzar amb la metodologia detallada en el segon article, segons procediment validat a la literatura. Les mesures obtingudes es van analitzar independentment per dos intensivistes amb experiència en ecografia diafragmàtica, i es va analitzar la variabilitat intra/interobservador.

4.6. Anàlisi estadístic

Donades les característiques específiques del disseny de cada estudi, aquests mètodes es detallen en cadascun d'ells.



RESULTATS

5. RESULTATS

Els resultats dels treballs d'investigació d'aquesta Tesi es presenten en forma de dues publicacions científiques. La primera va ser publicada a la revista *Intensive Care Medicine* al 2019, revista de primer decil amb impact factor de 17.44. La segona està actualment en procés de *peer review* a la mateixa revista des del 29 d'octubre de 2021.

- Marin-Corral J, Dot I, Boguña M, Cecchini L, Zapatero A, Gracia MP, Pascual-Guardia S, Vilà C, Castellví A, Pérez-Terán P, Gea J, Masclans JR. Structural differences in the diaphragm of patients following controlled vs assisted and spontaneous mechanical ventilation. *Intensive Care Med* 2019; 45:488–500.
- Dot I, Pérez-Terán P, Francés A, Díaz Y, Vilà-Vilardell C, Salazar-Degracia A, Chalela R, Barreiro E, Rodríguez-Fuster A, Masclans JR, Marin-Corral J. Association between histological diaphragm atrophy and ultrasound thickness in ventilated patients. *Intensive Care Med* en *peer review*.

5.1. Article 1

ORIGINAL



Structural differences in the diaphragm of patients following controlled vs assisted and spontaneous mechanical ventilation

J. Marin-Corral^{1,2*}, I. Dot^{1,2}, M. Bogaña^{2,3}, L. Cecchini⁴, A. Zapatero^{1,2}, M. P. Gracia^{1,2}, S. Pascual-Guardia^{5,6}, C. Vilà^{1,2}, A. Castellví^{1,2}, P. Pérez-Terán^{1,2}, J. Gea^{5,6,7} and J. R. Masclans^{1,2,8}

© 2019 Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature

Abstract

Purpose: Ventilator-induced diaphragm dysfunction or damage (VIDD) is highly prevalent in patients under mechanical ventilation (MV), but its analysis is limited by the difficulty of obtaining histological samples. In this study we compared diaphragm histological characteristics in Maastricht III (MSIII) and brain-dead (BD) organ donors and in control subjects undergoing thoracic surgery (CTL) after a period of either controlled or spontaneous MV (CMV or SMV).

Methods: In this prospective study, biopsies were obtained from diaphragm and quadriceps. Demographic variables, comorbidities, severity on admission, treatment, and ventilatory variables were evaluated. Immunohistochemical analysis (fiber size and type percentages) and quantification of abnormal fibers (a surrogate of muscle damage) were performed.

Results: Muscle samples were obtained from 35 patients. MSIII ($n = 16$) had more hours on MV (either CMV or SMV) than BD ($n = 14$) and also spent more hours and a greater percentage of time with diaphragm stimuli (time in assisted and spontaneous modalities). Cross-sectional area (CSA) was significantly reduced in the diaphragm and quadriceps in both groups in comparison with CTL ($n = 5$). Quadriceps CSA was significantly decreased in MSIII compared to BD but there were no differences in the diaphragm CSA between the two groups. Those MSIII who spent 100 h or more without diaphragm stimuli presented reduced diaphragm CSA without changes in their quadriceps CSA. The proportion of internal nuclei in MSIII diaphragms tended to be higher than in BD diaphragms, and their proportion of lipofuscin deposits tended to be lower, though there were no differences in the quadriceps fiber evaluation.

Conclusions: This study provides the first evidence in humans regarding the effects of different modes of MV (controlled, assisted, and spontaneous) on diaphragm myofiber damage, and shows that diaphragm inactivity during mechanical ventilation is associated with the development of VIDD.

Keywords: Ventilator-induced diaphragm dysfunction or damage (VIDD), Atrophy, Mechanical ventilation, Brain death, Maastricht III, Muscle dysfunction

*Correspondence: jmarincorral@gmail.com

¹ Critical Care Department, Hospital del Mar, Passeig Marítim 25-29, 08003 Barcelona, Spain

Full author information is available at the end of the article

J. Marin-Corral and I. Dot contributed equally to the study.

Presented at the 30th ESICM Lives (European Society of Intensive Care Medicine) Vienna, October 2017, at the 31st ESICM Paris, October 2018 and at the CHEST Annual Meeting 2018, San Antonio, October 2018 as an oral presentation.

Introduction

Most critically ill patients admitted to the intensive care unit (ICU) require mechanical ventilation (MV) because of respiratory failure. MV may be associated with adverse effects on respiratory muscles, and disuse atrophy may be the most important mechanism in patients under controlled mechanical ventilation (CMV) [1]. During CMV,

the electromyographic activity of the respiratory muscle fibers is diminished or may even stop [2], resulting in the rapid development of respiratory muscle dysfunction, especially diaphragm weakness. Ventilator-induced diaphragm dysfunction (VIDD) is defined as the loss of the diaphragm's capacity to generate force, together with muscle injury and fiber atrophy, and the same acronym has been used previously to describe ventilator-induced diaphragm damage [3]. Both types of VIDD are associated particularly with the use of MV, typically after periods of CMV [4–6].

VIDD may play a key role in the pathophysiological mechanisms that make it difficult to wean critically ill patients off MV. It causes direct systemic and pulmonary complications and may exacerbate the patient's comorbidities, thus extending hospital stay. It is also associated with important functional limitations after hospital discharge, reduced quality of life, significantly increased mortality [7], and an increase in costs for the national health systems [8].

Multiple studies with animal [9–15] and human [16–20] models have examined the pathophysiology of VIDD and the molecular pathways involved. The inactivity of the diaphragm caused by MV triggers a state of mitochondrial vulnerability that produces an enzymatic deficiency [10, 19], generating excessive reactive oxygen species production and reducing antioxidant activity [14]. It activates apoptotic [12, 16] and proteolytic pathways [9–11, 14, 17, 20] and promotes the accumulation of lipids in diaphragm due to an excess of energy substrate [18]. It also leads to atrophy of the respiratory muscles and reduces their force-generation capacity.

The loss of muscle strength occurs quickly in some animal models under CMV (6 h), with muscle atrophy appearing later (12–18 h) [13]. However, other animal studies show fast and complete diaphragmatic recovery from VIDD within 24 h after returning to spontaneous breathing when CMV is removed before 12 h [21, 22]. As in animal models, the establishment of VIDD in humans occurs very quickly (<24 h), and it increases in severity over time [5].

VIDD severity may be related to several factors that are important for the development of new therapeutic strategies to decrease diaphragm damage. Animal studies [23–28] have shown that spontaneous mechanical ventilation (SMV) may provide more protection than CMV. To date, however, these data have not been confirmed in humans because of the difficulty of obtaining diaphragm biopsies in ventilated critically ill patients; the human data available come from mechanically ventilated brain-dead (BD) organ donors undergoing CMV but they are not representative of ICU patients as a result of multiple limitations. Recently, in some European countries,

Take-home message

Maastricht III donors present less ventilator-induced diaphragm damage (VIDD) than brain-dead donors, probably owing to their ability to stimulate their diaphragm. In this regard, we recommend that the period of controlled mechanical ventilation in critically ill ventilated patients should be kept short and that ventilation modes with sustained patient effort should be introduced promptly.

donors after circulatory death (DCD) have been accepted for donation and transplantation activity. Maastricht category III donors (MSIII) are DCD in whom cardiac arrest follows planned, controlled withdrawal of life-sustaining treatments. These donors can undergo SMV, but the histological characteristics of their diaphragm have not been evaluated to date.

This is the first study to assess the histological characteristics of the diaphragm in a new human physiopathological model in critical care—MSIII donors—and to compare them with the same data from BD donors. Our hypothesis was that MSIII donors who are able to stimulate their diaphragm may present less VIDD than BD who cannot. The main objective was to compare the histological characteristics of MSIII and BD donors ventilated with different forms of MV in respiratory and peripheral muscles.

Methods

See also the additional information in the online supplement.

Subjects

MSIII donors, BD donors, and control subjects (CTL) undergoing resection of located pulmonary nodules were included. All patients included were clinically stable at the time of the study; CTL subjects had no episodes of exacerbation or oral steroid treatment in the previous 4 months. Exclusion criteria included age younger than 18 years, chronic respiratory failure, treatment with oral steroids, chronic metabolic diseases, suspected paraneoplastic or myopathic syndromes and/or treatment with drugs known to alter muscle structure and/or function. Protocols were approved by the Ethics Committees of Hospital del Mar. All biopsies were performed after written informed consent was obtained.

Biopsies

All diaphragm biopsy specimens were obtained from the anterior costal diaphragm, lateral to the insertion of the phrenic nerve. All quadriceps biopsies were obtained from the vastus lateralis. All muscle samples were immediately immersed in an alcohol-formol bath and then

embedded in paraffin. These tissues were used for the histological analysis.

Clinical data

Age, sex, and body mass index were recorded for all subjects. In both donor groups, reason for donation, severity scores on admission (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II or APACHE II and Sequential Organ Failure Assessment or SOFA), comorbidities, previous treatments, treatments received in the ICU, complications during ICU stay, and vital signs prior to surgery were registered. In MSIII donors, the type of preservation [extracorporeal membrane oxygenation (ECMO), cold perfusion, or rapid extraction] was also recorded.

The following data on the MV received were recorded: period of time on MV, time on CMV, time on SMV, time with diaphragm stimuli [hours on CMV with real respiratory rate (RRR) above the predetermined respiratory rate (PRR) + hours in SMV] and without diaphragm stimuli (hours on CMV with same RRR and PRR) in hours, and percentage of time with diaphragm stimuli [(period of time with diaphragm stimuli/hours on MV) × 100]. Definitions for these variables are shown in online supplement Table 1.

Experimental analyses

The analysis was carried out in the two muscles of both donor groups and CTL. Fiber cross-sectional area (CSA), mean least diameter, and proportions of myofibers expressing myosin heavy chain (MHC) I (type I) or MHCII (type II) were assessed by immunohistochemical analysis under light microscopy (Olympus, Series BX50F3, Olympus Optical Co., Hamburg, Germany). Muscle structure abnormalities (a surrogate of muscle damage) were evaluated by previously published methodologies [29, 30]. The proportion of abnormal muscle (online supplement Table 2) in paraffined samples stained with hematoxylin–eosin was determined by means of the same optic microscopy.

Statistics

Following the Kolmogorov–Smirnov test results, continuous variables were expressed as means and standard deviation (SD) when the data were normally distributed or as medians and interquartile range (IQR 25–75%) otherwise, and categorical variables as frequencies and percentages. Chi-square, Fisher's test, Student's *t* test, and Mann–Whitney *U* test were used. Comparisons between groups were performed through one-way ANOVA with post hoc Bonferroni test for intragroup comparisons. Relationships between MV duration and CSA were assessed with the Spearman's Rho correlation coefficient. Statistical significance was established at $p < 0.05$. The

data were analyzed using the statistical package for social sciences 15.0 BM[®] SPSS Statistics[®], Chicago, IL, USA) for Windows.

Results

See also the additional information in the online supplement.

Characteristics of patients

Thirty-five mechanically ventilated patients (16 MSIII, 14 BD, and 5 CTL) were prospectively included in the study. MSIII were older than BD but not older than CTL (though this may have been due to the small sample size), and there were no significant differences in sex and body mass index among the three groups (Table 1). Clinical characteristics of both donor groups are shown in Table 2. Briefly, the groups did not present differences regarding the severity scores at admission (APACHE II and SOFA), the percentage of comorbidities, or treatment prior to admission. During the ICU stay, BD donors received more neuromuscular blockers (NMB, cisatracurium in all cases) and fewer benzodiazepines, opioids, and enteral feeding (and for a shorter time) than MSIII donors.

Ventilatory characteristics of donor groups are shown in Table 1. MSIII donors had longer ICU stay with more hours on MV, CMV, and SMV than BD. MSIII donors also spent more hours (and a higher percentage of time) with diaphragm stimuli than BD donors.

Immunohistochemical data

The size of type I and type II fibers was significantly reduced in the diaphragm and quadriceps of both donor groups in comparison with CTL. There were no differences in the MHCI and MHCII CSA of diaphragm between MSIII and BD donors but quadriceps MHCI and MHCII were significantly smaller in MSIII than in BD. These results are shown in Fig. 1. The proportions of isoforms did not differ between the three groups (online supplement Table 3).

CSA of diaphragm MHCI and MHCII was lower in MSIII donors who spent 100 h or more on CMV without diaphragm stimuli than in MSIII donors who spent less than 100 h without it. These differences did not appear in quadriceps CSA of the same patients (Fig. 2). This threshold was used because 100 h was the median of hours in CMV without diaphragm stimuli in the MSIII group (Table 1). Representative cases of diaphragm and quadriceps biopsy specimens are shown in Figs. 1 and 2 of the online supplement.

MHCI and MHCII diaphragm and quadriceps CSA in all ventilated subjects presented a significant moderate positive correlation with the time spent in CMV without

Table 1 Characteristics of organ donors

Subject	Cause of donation	Type of donation	Age (years)	Sex (male)	BMI (kg/m ²)	MV (h)	A	B	Total CMV (h)	CMV with RRR= PRR (DF with-out stimuli, h)	B2	CMV with RRR> PRR (h)	C	Total SMV (h)	DF stimuli (h)	DF stimuli (B2+C)	DF stimuli (%) ((B2+C)/A) × 100
Control																	
1			61	F	25	5	5	5	5	5	0	0	0	0	0	0	0
2			61	M	23	4	4	4	4	4	0	0	0	0	0	0	0
3			74	M	23	4	4	4	4	4	0	0	0	0	0	0	0
4			63	M	27	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0	0	0
5			58	M	30	4	4	4	4	4	0	0	0	0	0	0	0
63 (6)			4 (80)		26 (3)	3 (3-4) ^{ad}	3 (3-4) ^{ad}	3 (3-4) ^{ad}	3 (3-4) ^{ad}	3 (3-4) ^{ad}	0 (0-0) ^{bc}	0 (0-0) ^{bc}	0 (0-0) ^c	0 (0-0) ^d	0 (0-0) ^d	0 (0-0) ^d	0 (0-0) ^d
Brain dead																	
1	Cardiac arrest		66	M	36	63	63	63	63	63	0	0	0	0	0	0	0
2	Cardiac arrest		59	M	28	117	92	92	92	92	0	0	25	25	25	25	21.37
3	Cardiac arrest		33	F	21	46	46	46	46	43	3	3	0	3	3	3	6.52
4	Cerebro-vascular accident		81	M	26	29	26	26	26	26	0	0	3	3	3	3	10.34
5	Cardiac arrest		30	M	24	97	74	74	67	67	7	7	23	30	30	30.93	
6	Cerebro-vascular accident		59	M	21	7	7	7	7	7	0	0	0	0	0	0	0
7	Cerebro-vascular accident		75	M	21	13	13	13	13	13	0	0	0	0	0	0	0
8	Cardiac arrest		40	M	25	54	54	54	53	53	1	1	0	1	1	1.85	
9	Cerebro-vascular accident		75	F	29	54	54	54	54	54	0	0	0	0	0	0	0
10	Cerebro-vascular accident		44	M	28	120	83	83	66	66	17	17	37	54	54	45	

Table 1 (continued)

Subject	Cause of donation	Type of donation	Age (years)	Sex (male)	BMI (kg/m ²)	MV (h)	Total CMV (h)	CMV with RRB = PRR (DF with-out stimuli, h)	CMV with RRR > PRR (h)	Total SMV (h)	DF stimuli (h)	DF stimuli ((B2 + C)/A) × 100
			A	B	B1	B2	C	B2 + C				
11	Cerebro-vascular accident		65	M	28	79	79	0	0	0	0	0
12	Meningitis		32	M	24	138	138	0	0	0	0	0
13	Cardiac arrest		73	M	29	147	108	105	3	39	42	28.57
14	Severe head trauma		51	F	31	238	238	238	0	0	0	0
Maastricht III												
1	Cardiac arrest	RE	47	M	22	126	29	25	4	97	101	80.16
2	Cardiac arrest	CP	49	F	21	196	134	134	0	62	62	31.63
3	Cerebro-vascular accident	RE	77	F	38	22	22	22	0	0	0	0
4	Meningitis	RE	72	M	25	208	75	59	16	133	149	71.63
5	Cerebro-vascular accident	RE	78	F	22	382	51	49	2	331	333	87.17
6	Cerebro-vascular accident	RE	67	M	24	381	108	58	50	273	323	84.78
7	Cardiac arrest	RE	57	F	31	352	352	213	139	0	139	39.49
8	Cerebro-vascular accident	CP	63	M	22	110	110	110	0	0	0	0
9	Severe head trauma	ECMO	73	M	30	97	97	73	24	0	24	24.74
10	Cardiac arrest	CP	73	F	28	560	194	159	35	366	401	71.61
11	Severe head trauma	RE	87	M	24	236	152	128	24	84	108	45.76

Table 1 (continued)

Subject	Cause of donation	Type of donation	Age (years)	Sex (male)	BMI (kg/m ²)	MV (h)	Total CMV (h)	CMV with RRR = PRR (DF without stimuli, h)	CMV with RRR > PRR (h)	Total SMV (h)	DF stimuli (h)	DF stimuli (%)
						A	B	B1	B2	C	B2 + C	(B2 + C)/A × 100
12	Cerebrovascular accident	RE	77	M	27	156	156	93	63	0	63	40.38
13	Severe head trauma	CP	84	F	24	177	177	177	0	0	0	0
14	Cardiac arrest	RE	73	M	30	316	182	182	0	134	134	42.41
15	Cardiac arrest	ECMO	57	F	27	159	65	35	30	94	124	77.99
16	Cerebrovascular accident	CP	66	F	29	213	201	197	4	12	16	7.51
			69 (12) ^e	8 (50)	27 (4)	202 (133–343) ^g	122 (67–181) ^e	101 (51–172)	10 (0–34) ^f	73 (0–34) ^e	104 (18–146) ^f	41 (12–76) ^f

Note that hours with DF stimuli (B2 + C) are the hours of SMV (C) plus the hours in CMV with RRR higher than PRR (B2). Data expressed as mean (SD), median (IQR), or n (%). BMI body mass index, MV mechanical ventilation, CMV controlled mechanical ventilation, SMV spontaneous mechanical ventilation, RRR real respiratory rate, PRR predetermined respiratory rate, DF diaphragm, F female, M male, RE rapid extraction, CP cold perfusion, ECMO extracorporeal membrane oxygenation

^a Between control and brain dead, $p < 0.001$

^b Between control and Maastricht III, $p < 0.05$

^c Between control and Maastricht III, $p < 0.01$

^d Between control and Maastricht III, $p < 0.001$

^e Between brain dead and Maastricht III, $p < 0.05$

^f Between brain dead and Maastricht III, $p < 0.01$

^g Between brain dead and Maastricht III, $p < 0.001$

Table 2 Clinical characteristics of included subjects

	Brain-dead <i>n</i> = 14	Maastricht III <i>n</i> = 16	<i>p</i> value
Severity scores, mean (SD)			
APACHE II score at admission	29 (8)	24 (6)	NS
SOFA score at admission	9 (3)	7 (3)	NS
Days of ICU stay, median (IQR)	4 (2–6)	8 (5–12)	0.002
Toxic habits, <i>n</i> (%)			
Smoking	7 (50)	3 (18.8)	NS
Alcoholism	3 (21.4)	2 (12.5)	NS
Comorbidities, <i>n</i> (%)			
Asthma	1 (7.1)	0 (0)	NS
COPD	2 (14.3)	3 (18.8)	NS
Diabetes mellitus	2 (14.3)	5 (31.3)	NS
Heart failure	0 (0)	1 (6.3)	NS
Chronic Kidney disease	2 (14.3)	0 (0)	NS
Hematologic disease	0 (0)	0 (0)	NS
Obesity	4 (28.6)	2 (12.5)	NS
Previous treatment, <i>n</i> (%)			
Corticosteroids	0 (0)	0 (0)	NS
Statins	4 (28.6)	4 (25)	NS
Insulin	2 (14.3)	0 (0)	NS
ICU treatment, <i>n</i> (%)			
Corticosteroids	10 (71.4)	6 (37.5)	NS
NMB	10 (71.4)	4 (25)	0.014
Days with NMB, mean (SD)	1 (1–2)	1 (0–2)	NS
Insulin	12 (85.7)	15 (93.8)	NS
Rehabilitation	0 (0)	1 (6.3)	NS
Benzodiazepines	7 (50)	14 (87.5)	0.032
Days with benzodiazepines, mean (SD)	0.5 (0–2)	2.5 (2–6.5)	0.013
Opioids	9 (64.3)	16 (100)	0.014
Days with opioids, mean (SD)	1.5 (0–3)	4.5 (2–6.75)	0.007
Vasoactive drugs	13 (92.9)	12 (75)	NS
Maximum dose, µg/kg/min, mean (SD)	1.3 (0.8)	0.67 (1.35)	NS
Enteral nutrition	5 (35.7)	13 (81.3)	0.014
Days with enteral nutrition, mean (SD)	0 (0–2)	7 (3.35–11.5)	< 0.001
Total parenteral nutrition	0 (0)	0 (0)	NS
Infectious complications, <i>n</i> (%)	2 (14.3)	11 (68.8)	0.004
Non-infectious complications, <i>n</i> (%)	2 (14.3)	5 (31.3)	NS

SD standard deviation, IQR interquartile range, APACHE II Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II, SOFA Sequential Organ Failure Assessment, COPD chronic obstructive pulmonary disease, ICU intensive care unit, NMB neuromuscular blockers, NS not significant

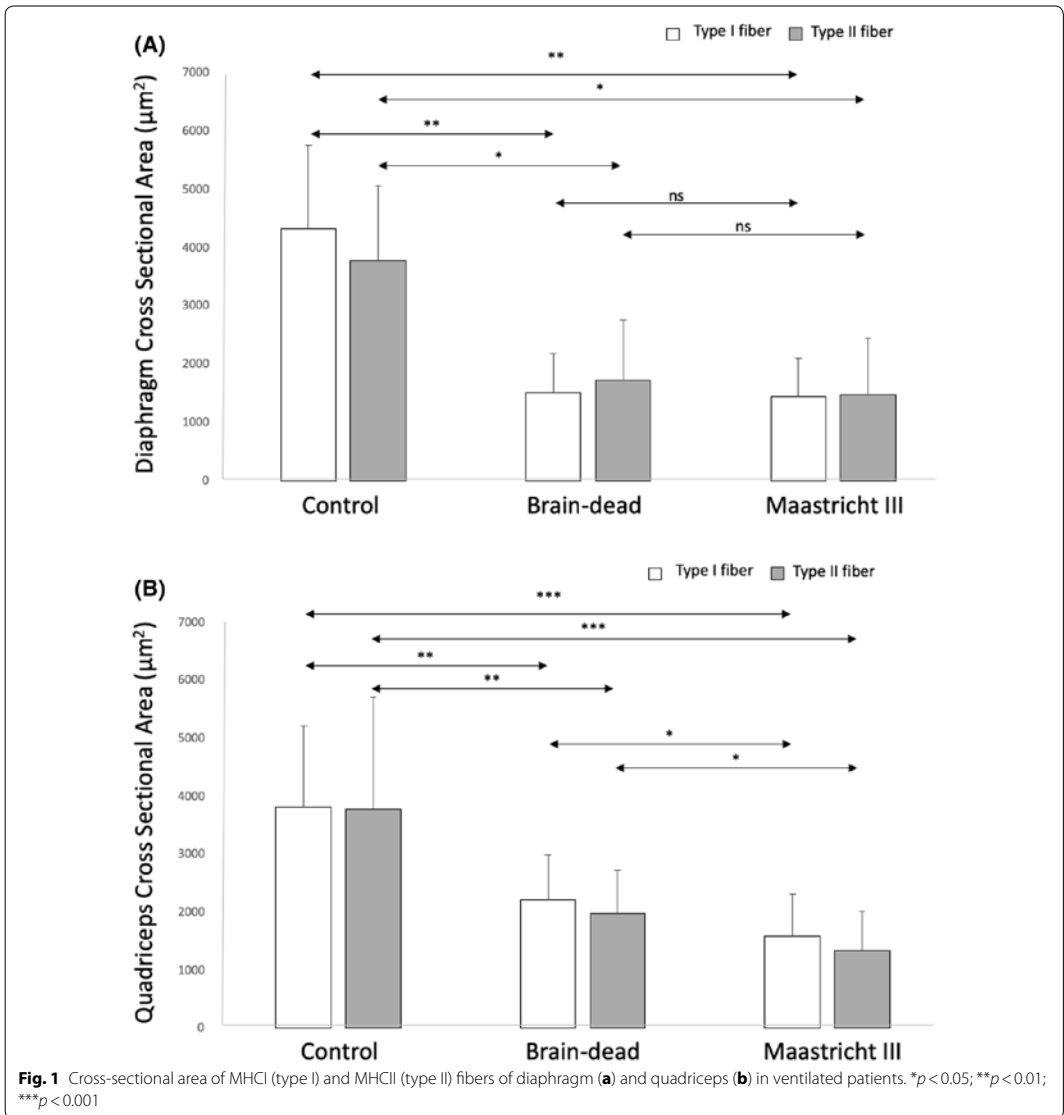
diaphragm stimulation (online supplement Fig. 3). Diaphragm atrophy seemed to appear sooner under CMV without diaphragm stimulation than quadriceps atrophy (100 h vs 150 h), but no significant differences were found (online supplement Fig. 4).

Differences between MSIII with cold perfusion and rapid extraction are shown in the online supplement (Table 4). There were no differences in the time under MV, but donors with cold perfusion preservation spent

more hours under CMV and without diaphragm stimuli than donors with rapid extraction. Cold perfusion presented smaller fibers in diaphragm MHCII than rapid extraction, without differences in any other clinical variables.

Muscle structure abnormalities

The histological evaluation of muscle structure abnormalities showed an increase in abnormal fibers in



diaphragms of MSIII and BD compared with CTL, although the difference was not statistically significant (possibly due to the small sample size). Diaphragms of BD had a higher proportion of lipofuscin deposits than CTL; this proportion tended to be higher in MSIII, though the difference did not reach statistical significance. Both donor groups presented decreased internal nuclei compared to CTL. The proportion of internal nuclei in MSIII

diaphragms tended to be higher than in BD diaphragms and their proportion of lipofuscin deposits tended to be lower. There were no significant differences in the fiber evaluation in quadriceps between the three groups (Table 3); nor were there significant differences in other categories assessed in diaphragms. Several representative images are shown in the online supplement (Figs. 5 and 6).

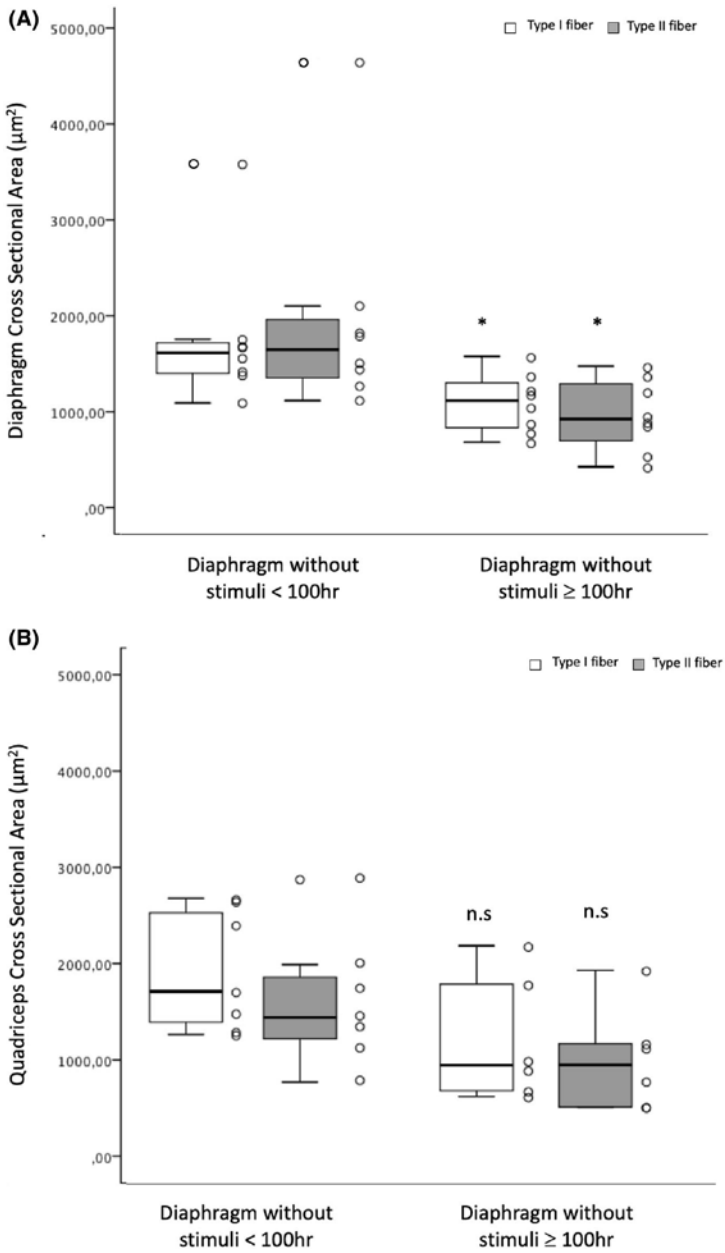


Fig. 2 Cross-sectional area of MHC I (type I) and MHC II (type II) fibers of diaphragm (a) and quadriceps (b) in ventilated patients without DIA-PHRAGM stimuli. * $p < 0.05$

Discussion

This is the first study with human samples to analyze the histological characteristics of respiratory (diaphragm) and peripheral (quadriceps) muscles in two types of organ donor (MSIII and BD) undergoing different forms of MV (SMV and CMV). The results show that MSIII who have the capacity to stimulate their diaphragm present less VIDD than BD.

Until now, human data related to VIDD have basically been available from two groups of patients. The bulk of the evidence derives from mechanically ventilated BD donors; only very recently have studies expanded to include mixed ICU populations with underlying diseases. Levine et al. [31] were the first to demonstrate that complete diaphragmatic inactivity and MV result in atrophy of human diaphragm myofibers in BD. But studies with BD donors present a clear limitation, given that brain death itself can generate multiple systemic changes, and is thus an important confounder [32–35]. BD donors do not exhibit the clinical features of critically ill patients; they are distinguished by the complete absence of neural activation of the diaphragm, metabolic stress, and brain ischemia [32–35]. Recent studies in mixed ICU populations present an important limitation due to the difficulty of obtaining diaphragmatic samples that allow the performance of histological studies [20]. A relevant advance in the present study is our use of a novel pathophysiological model, MSIII organ donors, and our assessment of their diaphragmatic structure. This recently described donor

profile [36] could present multiple advantages over the groups used in previous models.

First, MSIII are critically ill patients with irreversible severe disease in whom the decision is taken to withdraw life support measures in a controlled manner. This means that they are a highly representative population of critically ventilated patients. MSIII presented a longer ICU stay with a lower need for NMB and a higher need for sedation and opioids than BD and also had more infectious complications. With regard to these differences, anesthetics can be ruled out as a cause of VIDD, since studies using appropriate controls concluded that the decreased contractility was due to the effects of MV per se [37]. The decreased contractility secondary to CMV cannot be attributed solely to NMB, since it was also observed in studies that did not use these drugs. However, the effects of 24 h of CMV and aminosteroidal NMB (rocuronium) are synergistic in depressing diaphragm contractility, in inducing atrophy, and in upregulating proteolysis, a synergism not observed with different doses of benzylisoquinoline NMB (cisatracurium) [37].

Second, among other differences with respect to BD, in most cases MSIII were able to spontaneously stimulate their diaphragm and tolerated SMV well, since they spent more hours under SMV and with diaphragm stimuli.

Another strength of this study is the analysis of two muscles, one respiratory (diaphragm) and the other non-respiratory (quadriceps). As we expected, both presented significant CSA reductions in MSIII and in BD compared

Table 3 Histological evaluation of muscle structure abnormalities in the three groups

	Control <i>n</i> = 5	Brain-dead <i>n</i> = 14	Maastricht III <i>n</i> = 16	<i>p</i>
Diaphragm, %, mean (SD)				
Total abnormal muscle fibers	3.5 (1.1)	9.4 (10.7)	6.5 (14.2)	0.709
Internal nuclei	2.4 (1.0)	0.3 (0.3) ^a	1.1 (1.5) ^f	0.003
Inflammatory cells	0.5 (0.3)	0.5 (0.1)	0.5 (0.1)	0.392
Lipofuscin deposits	0.4 (0.1)	7.9 (10.5) ^b	4.2 (12.2)	0.000
Abnormal viable	0.2 (0.1)	0.1 (0.2)	0.1 (0.2)	0.748
Inflamed/necrotic	0 (0)	0.6 (0.4)	0.6 (0.5)	0.485
Quadriceps, %, mean (SD)				
Total abnormal muscle fibers	2.4 (0.6)	2.3 (5.0)	1.8 (2.4)	0.730
Internal nuclei	1.0 (0.5)	0.2 (0.4)	0.5 (0.8)	0.247
Inflammatory cells	0.1 (0.1)	0 (0)	0.1 (0.1)	0.343
Lipofuscin deposits	1.3 (0.5)	2.0 (5.0)	1.0 (2.2)	0.487
Abnormal viable	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.223
Inflamed/necrotic	0 (0)	0.1 (0.4)	0.2 (0.3)	0.787

See the categories and definitions for point counting in online supplement Table 1

^a Between brain-dead and control, *p* < 0.01

^b Between brain-dead and control, *p* < 0.001

^c Between Maastricht III and control, *p* < 0.05

to CTL. It is known that in limb muscles, contractile activity regulates protein turnover and muscle mass, and muscle disuse accelerates protein degradation [38]. MV may impose bed rest and may indirectly prolong immobility as a result of the use of sedatives or NMB, which may promote neuropathy, muscle wasting, and loss of muscle function in non-respiratory muscles. Indeed, our results showed that quadriceps of MSIII patients, who spent more days intubated and immobilized in the ICU with greater need for these drugs, presented a decreased fiber size than BD. Similarly, Powers and colleagues [39] recently speculated that the sudden creation of a state of diaphragm disuse during “full support” MV is the key initiator of the cascading changes that lead to VIDD. But while the diaphragm is characterized by a permanent cyclic activity, normal limb muscles are not constantly active. Furthermore, although both are striated muscles, their fiber type composition differs, as shown both by our results and by previous reports [40, 41].

Animal experiments in recent years have demonstrated that increasing diaphragm muscle contraction by use of assisted modes during MV may slow the evolution of VIDD [23–28]. On the one hand, in rats, rabbits, and piglets, partial support MV has been shown to prevent protease activation in the diaphragm [23], the increased expression of ubiquitin–proteasome system components and diaphragm atrophy, and maintains contractile function [24–26]. On the other, reducing the level of support also protects rat diaphragm against oxidative stress and atrophy [27]. Finally, intermittent spontaneous breathing in ventilated rats minimizes the reduction in diaphragm force and fiber size during MV [28].

As we expected, our results regarding muscle atrophy and diaphragm abnormalities in humans are in accordance with these data observed in animal models. First of all, our results showed that BD and MSIII donors presented major diaphragmatic atrophy in both types of muscle fibers, slow-twitch (type I or expressing MHCI) and fast-twitch (type II or expressing MHCII) after a variable long-term period of ventilation compared to CTL. Second, there were no differences between diaphragm CSA in MHC I or MHC II in MSIII compared to BD, although MSIII donors spent significantly longer under MV and CMV. In addition, MSIII donors spent more hours under SMV and a higher proportion of time with diaphragm stimuli. Moreover, when MSIII donors were divided into two groups according to the number of hours without diaphragm stimuli, it was found that diaphragm CSA of MSIII donors with more hours of ventilation without diaphragm stimuli were smaller than those with fewer hours without diaphragm stimuli. So it seems that MSIII donors present a protective factor against the development of respiratory muscle atrophy which could

be attributed to the higher rate of SMV used and the diaphragm stimulation maintained during MV.

At present there are no data regarding other morphological muscle abnormalities existing in the respiratory muscles of ventilated patients. Our results showed that diaphragm of MSIII had a lower percentage of lipofuscin and a higher percentage of internal nuclei than diaphragm of BD, and there were no differences in peripheral muscles in any of the groups analyzed. The accumulation of lipofuscin indicates more remains of lipid destruction, which is an indirect marker of oxidative stress and may indicate a more advanced stage of muscle protein degradation in BD. These findings are in accordance with previous reports indicating that CMV induces the production of reactive oxygen species in the diaphragm, which is required for the activation of several key proteolytic systems involved in MV-induced diaphragmatic atrophy [2]. The lesser appearance of internal nuclei indicates a lower capacity of muscle repair in the diaphragm of the same patients. These results suggest that respiratory muscles of MSIII donors are less damaged than those from BD, and once again this may be due to a protective factor induced by diaphragmatic stimulation. Although increases in the proportion of necrotic fibers in the diaphragm of some ventilated patients have been reported in the literature [42, 43], these studies analyzed septic patients in whom VIDD and sepsis-induced diaphragm dysfunction (SIDD) may have coexisted. This combination of sepsis and ventilation could have an additive (if not synergic) deleterious impact on diaphragm function, but was not present in our series or in the BD series described by Levine [31].

A variety of interventions may be useful in preventing VIDD. Muscle-protective ventilation strategies (proportional assist ventilation and neurally adjusted ventilatory assist) aim to titrate ventilation in order to maintain appropriate levels of inspiratory muscle effort and optimize synchrony between patient and ventilator [44]. Moreover, interventions involving the molecular pathways studied and the reversal of muscle disuse through electrostimulation are under investigation. The time is indeed ripe for clinical trials in this important area, but new tools are also needed that allow us to evaluate respiratory muscle function at the bedside. The current literature suggests that diaphragm ultrasound could be a useful and accurate tool for detecting diaphragmatic dysfunction in critically ill patients, predicting extubation success or failure, monitoring respiratory workload, and assessing atrophy in patients who are mechanically ventilated [45].

Study limitations

First of all, the groups compared contained different kinds of patients (BD and MSIII). However, the aim of this study was to present the first assessment of the histological characteristics of MSIII patients, and to compare them with those of BD, the only previously studied population. Neither group was pure in terms of the ventilatory methods used, so it is difficult to attribute the changes described to the type of ventilation received. To minimize this heterogeneity, in this study the hours under CMV and SMV were carefully counted as well as the difference between the PRR and RRR in order to calculate the time under MV in which patients stimulated or did not stimulate their diaphragm. These data are detailed in Table 2. Moreover, inside the MSIII group we also compared those who spent more hours on CMV with those under fewer hours of CMV, and cold perfusion versus rapid extraction. Further studies will be necessary to compare pure groups. Another limitation is that we cannot exclude the possibility that factors other than MV per se were involved in the histological alterations found in both donor groups. We eliminated patients suffering from other conditions known to alter respiratory muscle function in our study, and we recorded the treatments known to be deleterious. We also included a limb muscle as internal control, subjected to the same systemic factors as the diaphragm (except for MV) in order to assess whether the changes were due to the different forms of ventilation used. Likewise—and this is a major limitation—since our data are histological we can only speculate about their functional significance and we can only refer to ventilator-induced diaphragm damage. Further studies will be necessary to elucidate why diaphragmatic rest reduces diaphragm CSA, and how preserving a certain degree of spontaneous diaphragm contractile activity protects against diaphragm atrophy.

Conclusions

This study provides the first evidence in humans regarding the effects of different modes of MV (controlled, assisted, and spontaneous) on diaphragm myofiber damage, and shows that diaphragm inactivity during mechanical ventilation is associated with the development of VIDD. The results suggest that the deleterious effects of diaphragm unloading generated by CMV in humans can be attenuated by maintaining a certain level of respiratory muscle stimulation during MV. Future studies using MSIII donor models should include more decisive measures of protein turnover and redox balance along with diaphragmatic contractile measurements in these patients.

Electronic supplementary material

The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00134-019-05566-5>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Author details

¹ Critical Care Department, Hospital del Mar, Passeig Marítim 25-29, 08003 Barcelona, Spain. ² Research Group in Critical Disorders (GREPAC), Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques (IMIM), Barcelona, Spain. ³ Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain. ⁴ Urology Department, Hospital del Mar, Barcelona, Spain. ⁵ Respiratory Department, Hospital del Mar, IMIM, Barcelona, Spain. ⁶ CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Madrid, Spain. ⁷ DCEXS Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain. ⁸ Medicine Department, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

Acknowledgements

We thank Marta Gas for her administrative and technical support, the transplant coordination nursing team of the Hospital del Mar for their help with obtaining the sample, and Judit Boncompte for her help with the experimental analyses.

Author contributions

JMC, ID, JRM conceived and designed the study. JMC, ID, MB, LC, AZ, MPG, SPG, CV, PPT and AC contributed to data acquisition and analysis. JMC, ID, SPG, JG, JRM made important intellectual contributions and actively participated in the interpretation of the data and wrote the paper. All authors contributed to critical examination of the paper for important intellectual content and approval of the final manuscript.

Funding and role of the sponsors

This study has been supported by a grant from Instituto de Salud Carlos III-Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) (PI18/00025), Spanish Critical Patient Foundation (FECC 2017) and Catalan Society of Critical Care (SOCMIC 2018). The study sponsors had no role in the study design, data collection, data analysis, data interpretation, or writing of the report. The corresponding author (JMC) had full access to all the data in the study and final responsibility for the decision to submit for publication.

Compliance with ethical standards

Conflicts of interest

All named authors declare that they have no conflicts of interests.

Ethics committee approval

The institutional review board of PSMAR approved the original study (IRB Ref 2017/7183/I).

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Received: 21 October 2018 Accepted: 7 February 2019

Published online: 21 February 2019

References

- Dres M, Goligher EC, Heunks LMA, Brochard LJ (2017) Critical illness-associated diaphragm weakness. *Intensive Care Med* 43(10):1441–1452
- Tang H, Shrager JB (2018) Translational review: the signaling network resulting in ventilator-induced diaphragm dysfunction. *Am J Respir Cell Mol Biol*. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2018-0022tr>
- Li LF, Tien ML, Leung SY, Lin MC (2011) High tidal volume mechanical ventilation elicits increased activity in protein kinase B and c-Jun NH₂-terminal kinase pathways in mouse diaphragm. *Intensive Care Med* 37:2015–2022
- Vassilakopoulos T, Petrof BJ (2004) Ventilator-induced diaphragmatic dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med* 169:336–341

5. Jaber S, Petrof BJ, Jung B, Chanques G, Berthet JP, Rabuel C et al (2011) Rapidly progressive diaphragmatic weakness and injury during mechanical ventilation in humans. *Am J Respir Crit Care Med* 183(3):364–371
6. Petrof B, Hussain S (2016) Ventilator-induced diaphragmatic dysfunction: what have we learned? *Curr Opin Crit Care* 22(1):67–72
7. Supinski GS, Ann Callahan L (2013) Diaphragm weakness in mechanically ventilated critically ill patients. *Crit Care* 17(3):R120
8. Herridge MS, Tansey C, Matté A, Tomlinson G, Diaz-Granados N, Cooper A et al (2009) Functional disability 5 years after acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 364(14):123–134
9. Smuder AJ, Nelson WB, Hudson MB, Kavazis AN, Powers SK (2010) Inhibition of the ubiquitin-proteasome pathway does not protect against ventilator-induced accelerated proteolysis or atrophy in the diaphragm. *Surg Clin North Am* 90(5):955–968
10. Smuder AJ, Hudson MB, Nelson WB, Kavazis AN, Powers SK (2012) Nuclear factor- κ B signaling contributes to mechanical ventilation-induced diaphragm weakness. *Crit Care Med* 40(3):927–934
11. Smuder AJ, Sollanek KJ, Min K, Nelson WB, Powers SK (2015) Inhibition of forkhead boxO-specific transcription prevents mechanical ventilation-induced diaphragm dysfunction. *Crit Care Med* 43(5):e133–e142
12. Azuelos I, Jung B, Picard M, Liang F, Li T, Lemaire C et al (2015) Relationship between autophagy and ventilator-induced diaphragmatic dysfunction. *Anesthesiology* 122(6):1349–1361
13. Matecki S, Diridi H, Jung B, Saint N, Reiken SR, Scheuermann V et al (2016) Leaky ryanodine receptors contribute to diaphragmatic weakness during mechanical ventilation. *Proc Natl Acad Sci* 113(32):9069–9074
14. Matecki S, Jung B, Saint N, Scheuermann V, Jaber S, Lacampagne A (2017) Respiratory muscle contractile inactivity induced by mechanical ventilation in piglets leads to leaky ryanodine receptors and diaphragm weakness. *J Muscle Res Cell Motil* 38:17–24
15. Jaber S, Sebbane M, Koechlin C, Hayot M, Capdevila X, EledJam J et al (2005) Effects of short vs prolonged mechanical ventilation on antioxidant systems in piglet diaphragm. *Intensive Care Med* 31:1427–1433
16. Hussain SNA, Mofarrahi M, Sigala I, Kim HC, Vassilakopoulos T, Maltais F et al (2010) Mechanical ventilation-induced diaphragm disuse in humans triggers autophagy. *Am J Respir Crit Care Med* 182(11):1377–1386
17. Levine S, Biswas C, Dierov J, Barsotti R, Shragar JB, Nguyen T et al (2011) Increased proteolysis, myosin depletion, and atrophic AKT-FOXO signaling in human diaphragm disuse. *Am J Respir Crit Care Med* 183(4):483–490
18. Picard M, Jung B, Liang F, Azuelos I, Hussain S, Goldberg P et al (2012) Mitochondrial dysfunction and lipid accumulation in the human diaphragm during mechanical ventilation. *Am J Respir Crit Care Med* 186(11):1140–1149
19. Tang H, Smith IJ, Hussain SN, Goldberg P, Lee M, Sugiarto S et al (2014) The JAK-STAT pathway is critical in ventilator-induced diaphragm dysfunction. *Mol Med* 20(36):579–589
20. Hooijman PE, Beishuizen A, Witt CC, de Waard MC, Girbes ARJ, Spoelstra-de Man AME et al (2015) Diaphragm muscle fiber weakness and ubiquitin-proteasome activation in critically ill patients. *Am J Respir Crit Care Med* 191(10):1126–1138
21. Bruells CS, Bergs I, Rossaint R, Du J, Bleilevens C, Goetzenich A et al (2014) Recovery of diaphragm function following mechanical ventilation in a rodent model. *PLoS One* 9(1):3–10
22. Callahan LA, Supinski GS (2013) Rapid and complete recovery in ventilator-induced diaphragm weakness—problem solved? *J Appl Physiol* 115(6):773–774
23. Futier E, Constantin JM, Combaret L, Mosoni L, Roszyk L, Sapin V et al (2008) Pressure support ventilation attenuates ventilator-induced protein modifications in the diaphragm. *Crit Care* 12(5):R116
24. Sassoon CS, Zhu E, Caiozzo VJ (2004) Assist-control mechanical ventilation attenuates ventilator-induced diaphragmatic dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med* 170(6):626–632
25. Hudson MB, Smuder AJ, Nelson WB, Wiggs MP, Shimkus KL, Fluckey JD et al (2015) Partial support ventilation and mitochondrial targeted antioxidants protect against ventilator-induced decreases in diaphragm muscle protein synthesis. *PLoS One* 10(9):e0137693
26. Jung B, Constantin JM, Rossel N, Le Goff C, Sebbane M, Coisel Y et al (2010) Adaptive support ventilation prevents ventilator-induced diaphragmatic dysfunction in piglet: an in vivo and in vitro study. *Anesthesiology* 112(6):1435–1443
27. Hudson MB, Smuder AJ, Nelson WB, Bruells CS, Levine S, Powers SK (2012) Both high level pressure support ventilation and controlled mechanical ventilation induce diaphragm dysfunction and atrophy. *Crit Care Med* 40(4):1254–1260
28. Gayan-Ramirez G, Testelmans D, Maes K, Rácz GZ, Cadot P, Zádor E et al (2005) Intermittent spontaneous breathing protects the rat diaphragm from mechanical ventilation effects. *Crit Care Med* 33(12):2804–2809
29. Macgowan NA, Evans KG, Road JD, Reid WD (2001) Diaphragm injury in individuals with airflow obstruction. *Am J Respir Crit Care Med* 163(7):1654–1659
30. Pascual-Guardia S, Wodja E, Gorostiza A, López de Santamaría E, Gea J, Gáldiz JB et al (2013) Improvement in quality of life and exercise capacity without muscular biology changes after general training in patients with severe chronic obstructive pulmonary disease. *Med Clin* 140(5):200–206
31. Levine S, Nguyen T, Taylor N, Friscia M, Budak MT, Rothenberg P et al (2007) Rapid disuse atrophy of diaphragm fibers in mechanically ventilated humans. *N Engl J Med* 358(13):1327–1335
32. Belperio JA, Keane MP, Lynch JP, Strieter RM (2006) The role of cytokines during the pathogenesis of ventilator-associated and ventilator-induced lung injury. *Semin Respir Crit Care Med* 27:350–364
33. Amado JA, López-Espadas F, Vázquez-Barquero A, Salas E, Riancho JA, López-Cordovilla JJ et al (1995) Blood levels of cytokines in brain-dead patients: relationship with circulating hormones and acute-phase reactants. *Metabolism* 44:812–816
34. Auraen H, Molines TE, Bjortuft O, Bakkan PA, Geiran O, Kongerud J et al (2013) Multiorgan procurement increases systemic inflammation in brain dead donors. *Clin Transplant* 27(4):613–618
35. Barklin A (2009) Systemic inflammation in the brain-dead organ donor. *Acta Anaesthesiol Scand* 53:425–435
36. Rubio JJ, Palacios D (2016) Reflections upon donation after controlled cardiac death (Maastricht type III donors). *Med Intensiva* 40(7):431–433
37. Vassilakopoulos T (2008) Ventilator-induced diaphragm dysfunction: the clinical relevance of animal models. *Intensive Care Med* 34:7–16
38. Latronico N, Herridge M, Hopkins R, Angus D, Hart N, Hermans G et al (2017) The ICM research agenda on intensive care unit-acquired weakness. *Intensive Care Med* 43(9):1270–1281
39. Powers SK, Smuder AJ, Fuller D, Levine S (2013) Crosstalk proposal: mechanical ventilation-induced diaphragm atrophy is primarily due to inactivity. *J Physiol* 591(21):5255–5257
40. Polla B, D'Antona G, Bottinelli R, Reggiani C (2004) Respiratory muscle fibres: specialisation and plasticity. *Thorax* 59:808–817
41. Barreiro E, Ferrer D, Sanchez F, Minguella J, Marin-Corral J, Martinez-Llorens J et al (2011) Inflammatory cells and apoptosis in respiratory and limb muscles of patients with COPD. *J Appl Physiol* 111(3):808–817
42. Latronico N, Fenzi F, Recupero D, Guarneri B, Tomelleri G, Tonin P et al (1996) Critical illness myopathy and neuropathy. *Lancet* 347(9015):1579–1582
43. Puthuchery ZA, Rawal J, McPhail M, Connolly B, Ratnayake G, Chan P et al (2013) Acute skeletal muscle wasting in critically ill patient with ultrasound: a systematic review. *Intensive Care Med* 43(1):29–38

Online Supplement

Structural differences in the diaphragm of patients following controlled vs assisted and spontaneous mechanical ventilation

Marin-Corral J, Dot I, Bogaña M, Cecchini L, Zapatero A, Gracia MP, Pascual-Guardia S, Vilà C, Castellví A, Pérez-Terán P, Gea J, Masclans JR

Methods

This original single-center prospective interventionist cohort study was conducted at the Critical Care Department of the Hospital del Mar in Barcelona and by the Critical illness research group (GREPAC) at the Hospital del Mar's Institute of Medical Investigations (IMIM). It was designed in accordance with our institution's ethical standards on human experimentation established in accordance with the 1964 Helsinki Declaration and its subsequent amendments. The study was approved by our Local Ethics and Clinical Research Committee (IRB PSMAR, 2017/7183/I) and by the Catalan Transplant Organization (OCATT). Written informed consent was obtained from all relatives prior to the study. Any details that might disclose the subject's identity in the study were omitted.

The sample size was based on previous data regarding organ donation and was calculated in order to find significant differences between two independent means in terms of muscle atrophy. Accepting an alpha risk of 0.05 and a beta risk of less than 0.2 in a bilateral contrast, 11 subjects in the MS group and 11 subjects in the BD group were required in order to detect a difference equal to or greater than 600 units (μm^2). It was assumed that the common standard deviation was 400, and a follow-up loss rate of 5% was estimated.

Subjects

MS donors. Non heart-beating donors were donors diagnosed as dead due to irreversible cessation of cardiorespiratory functions (after cardiac arrest). MS donors included patients with non-survivable injuries in whom the treating clinicians decided to withdraw treatment and not commence resuscitation (limiting life support or LLS) after cardiac arrest, in the ICU or in the operating room. The predictability or control of cardiorespiratory arrest allowed procedures that avoided organic hypoperfusion by administering cold perfusions or the initiation of extracorporeal circulation after cardiac arrest, which kept the tissues in a suitable condition. The potential MS donors presented few important comorbidities, which predicted a good viability of the organs and they usually were able to generate spontaneous respiratory activity during MV. As a result, SMV ventilation was possible.

BD organ donors. Donors with a BD diagnosis. One of criteria for BD diagnosis was the lack of spontaneous respiratory muscle activity during normocapnia as well as normoxic hypercapnia. These data reveal that DF of BD organ donors were completely inactive during the period of MV following the diagnosis, and in most cases previous to it.

CTL subjects. Patients without significant comorbidities who underwent thoracotomy of a suspected early localized lung malignancy and who needed several hours of MV. All subjects were on bronchodilators and inhaled corticosteroids.

Biopsies

MS donors. DF biopsies in MS donors were obtained in the operating room, after withdrawing life support treatment (MV) and certification of death. At that time, in order to avoid ischemia due to hypoperfusion, the extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) or cold in situ perfusion were started. In a few cases where only kidneys were suitable for retrieval, a rapid extraction was performed without reperfusion measures. Specimens were taken after a variable period of MV. The QD biopsy was extracted in the ICU, under aseptic conditions and during the four hours before the organ donation surgery.

BD organ donors. DF biopsies in BD organ donors were obtained in the operating room at the time of organ extraction, prior to circulatory arrest and as soon as was possible during organ removal, ensuring minimal ischemia time due to hypoperfusion. Specimens were taken after a variable period of MV. The QD biopsy was extracted in the ICU, under aseptic conditions and in the four-hour period prior to the organ donation surgery.

CTL subjects. DF biopsies in CTL subjects were obtained at the end of the surgery and before reversal of the neuromuscular blockade. In this case, DF of CTL patients was inactive for a short period of time prior to biopsy. QD biopsy was obtained at the same time as DF biopsy, at the end of the surgery, before reversal of the neuromuscular blockade.

Immunohistochemical data

Morphometric analyses were carried out in the DF and QD samples. Muscle samples were immersed in subsequent baths of different degrees of alcohol, formol, and xylol, to be finally embedded in paraffin. Three-micrometer muscle paraffin-embedded sections were obtained using a microtome and fixed on a glass slide which was then dried by heat (60°C). All sections were deparaffinized and incubated with citric acid solution in a pressure cooker (antigen retrieval protocol). Slides were then incubated in a humid chamber with monoclonal anti-myosin heavy chain-I (clone MHC, Biogenesis Inc., Poole, UK) and monoclonal anti-myosin heavy chain-II antibodies (clone MY-32, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). After several washes in phosphate-buffered saline, slides were incubated with biotinylated secondary antibodies followed by HRP-conjugated streptavidin and diaminobenzidine (LSAB + HRP kit, DakoCytomation Inc, CA, USA) as a substrate. Negative control slides were exposed only to secondary antibodies. Slides were counterstained with hematoxylin, dehydrated, and mounted for conventional microscopy. The cross-sectional area (CSA), mean least diameter, and proportions of type I (expressing MHCI) and type II (expressing MHCII) fibers were assessed by using a light microscope (Olympus, Series BX50F3, Olympus Optical Co., Hamburg, Germany) coupled with an image-digitizing camera (Pixera Studio, version 1.0.4; Pixera Corporation, Los Gatos, CA) and evaluated using specific morphometry program (Image J, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). At least 150 fibers were measured and counted in each muscle specimen.

Muscle structure abnormalities

The area fraction of normal and abnormal muscle (abnormal cellular events taking place in the muscle fibers) was evaluated on 3µm paraffin-embedded sections of DF and QD fixed on a glass slide. They were stained with hematoxylin and eosin. Following the method of point counting used by Macgowan *et al* and other authors [29, 30], each image of muscle cross section was quantified by projecting 63 point-intercepts on each image sample. Two independent observers classified each point-intercept in one of the following categories: normal structure muscle, presence of internal nucleus, inflammatory cells, lipofuscin deposits, abnormal viable fibers or inflamed or necrotic fibers (Table 1 Online Supplement). At a magnification of x40, each point-intercept was assigned to a specific category. The fraction areas of normal and abnormal muscle were determined by calculating the proportion of points in each assigned category. The sum of the percentages of the non-normal categories was termed “total abnormal muscle fibers”. Photographs were used for reference when assigning point-intercepts to categories. For each muscle cross section, all possible non-overlapping fields were counted in a standardized manner. The observer was blinded to the identity of the slide.

Discussion

In this study, there were no differences in the atrophy or in the fiber percentages presented in any ventilated donor group between the two fiber types; however, when we compared MSIII donors according to the type of preservation, we found that those who had been administered cold perfusion spent more hours in CMV and without diaphragm stimuli than rapid extraction although they spent the same number hours under MV. In accordance with previous data, only MHCII CSA were significantly decreased compared with rapid extraction, and there were no differences in the other clinical characteristics. In this regard, both short-term and long-term CMV result in modifications of the MHC phenotype in rats. Within 12 and 18 h of CMV both type I and II fibers are reduced in size, but type II fibers exhibit a much greater reduction; within 24 h of MV the transcript levels of the MHCII isoforms fall by ~20%, consistent with the preferential atrophy observed in the above-mentioned studies. This modification of the MHC phenotype could contribute to the force decline of the diaphragm reported in some articles, since slow fibers produce less force than fast fibers [37].

A	Time on MV	Total time on MV	With and without diaphragm stimuli
B	Time on CMV	Time on controlled mode	With and without diaphragm stimuli
B1	CMV with RRR = PRR	Time on CMV with ventilations totally controlled by the ventilator	Without diaphragm stimuli
B2	CMV with RRR > PRR	Time on CMV with ventilations assisted by the ventilator	With diaphragm stimuli
C	Time on SMV	Time on spontaneous mode	With diaphragm stimuli

B1 = Time without diaphragm stimuli

B2 + C = Time with diaphragm stimuli

MV: mechanical ventilation; CMV: controlled mechanical ventilation; RRR: real respiratory rate; PRR: predetermined respiratory rate; SMV: spontaneous mechanical ventilation.

Table 1. Definitions for the ventilatory variables.

CATEGORIES AND DEFINITIONS FOR POINT COUNTING*

Category	Name	Definition
1	Normal muscle	Polygonal fiber, acidophilic cytoplasm, plasma membrane, peripheral muscle nuclei
2	Internal nuclei	Fiber with at least one muscle nucleus located internally
3	Inflammatory cell	Round-shaped nucleus in interstitial space
4	Lipofuscin	Fiber containing deposits of yellow-brown pigmentation at least size of a muscle nucleus
5	Abnormal viable	Small fiber with two or more oblique angles or with basophilic peripheral sarcoplasm
6	Inflamed/necrotic	Fiber containing inflammatory cell(s); necrotic mass of inflammatory cells and muscle debris

*Total count = Σ Categories 1 to 6; area fraction normal muscle = Σ Category 1/Total count X 100; total abnormal muscle fibers = Σ Category 2 to 6/Total count X 100. Modified from Macgowan et al, Am J Respir Crit Care Med 2001.

Table 2. Categories and definitions for point counting.

	Control n=5	Brain-dead n=14	Maastricht III n=16
Diaphragm, %, mean (SD)			
Type I fiber	52.60 (3.25)	49.07 (10.25)	51.83 (9.09)
Type II fiber	47.40 (3.25)	50.93 (10.25)	48.17 (9.09)
Quadriceps, %, mean (SD)			
Type I fiber	41.66 (14.10)	39.86 (10.16)	45.36 (6.71)
Type II fiber	58.33 (14.10)	60.14 (10.17)	54.63 (6.71)

Table 3. Proportion of type I and II muscle fibers in the three cohort groups.

	Cold perfusion n=5	Rapid extraction n=9	p
Total MV, h, median (IQR)	196 (143 - 386)	208 (141 - 348)	ns
Total CMV, h, median (IQR)	177 (122 - 197.5)	75 (40 - 154)	0.022
Diaphragm without stimuli, h, median (IQR)	159 (122 - 187)	58 (30 - 110)	0.004
Diaphragm, μm^2 , mean (SD)			
Type I fiber	1145.6 (383.4)	1631.1 (789.7)	ns
Type II fiber	933.5 (442.8)	1869.4 (1108.7)	0.047

Table 4. Characteristics of MS donors in two types of organ preservation, cold perfusion or rapid extraction.

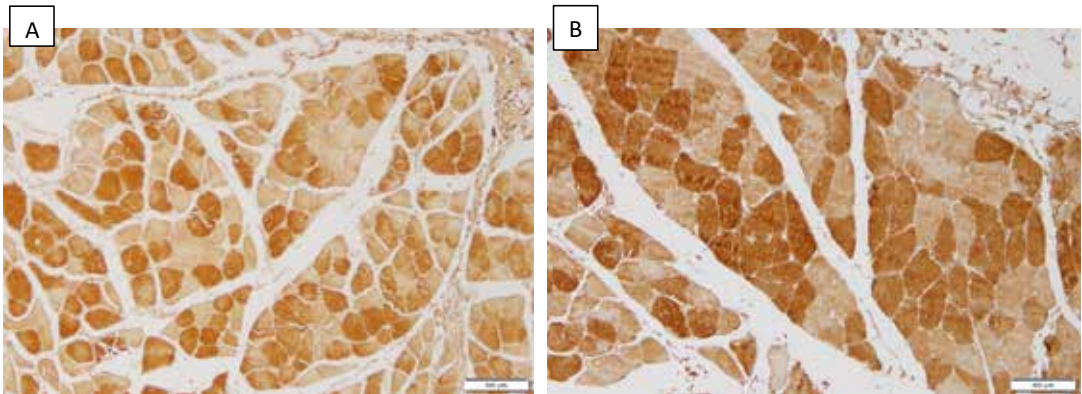


Figure 1. Comparison of representative MSIII donor diaphragm-biopsy specimens with respect to fiber size and MHCII/MHCII proportions. A: MHCII immunohistochemical staining of a MSIII donor who spent 100 or more hours without diaphragm stimuli (10X). B: MHCII immunohistochemical staining of a MSIII donor who spent less than 100 hours without diaphragm stimuli (10X).

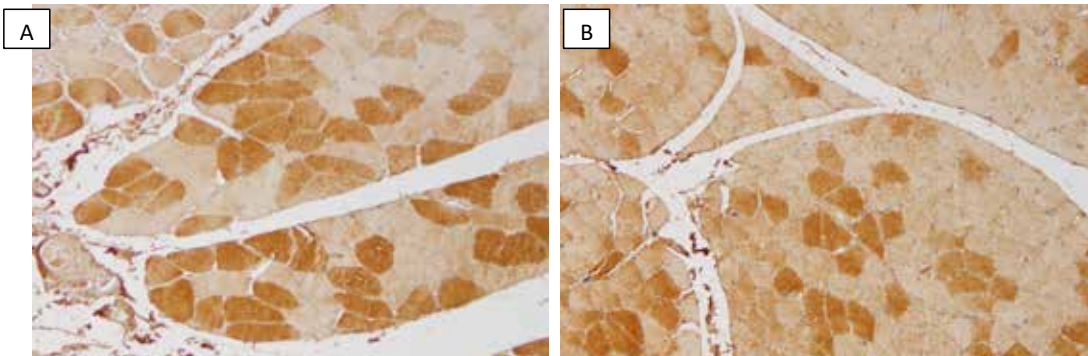


Figure 2. Comparison of representative BD and MSIII donor quadriceps-biopsy specimens with respect to fiber size and MHCII/MHCII proportions. A: MHCII immunohistochemical staining of a BD donor (10X). B: MHCII immunohistochemical staining of a MSIII donor (10X).

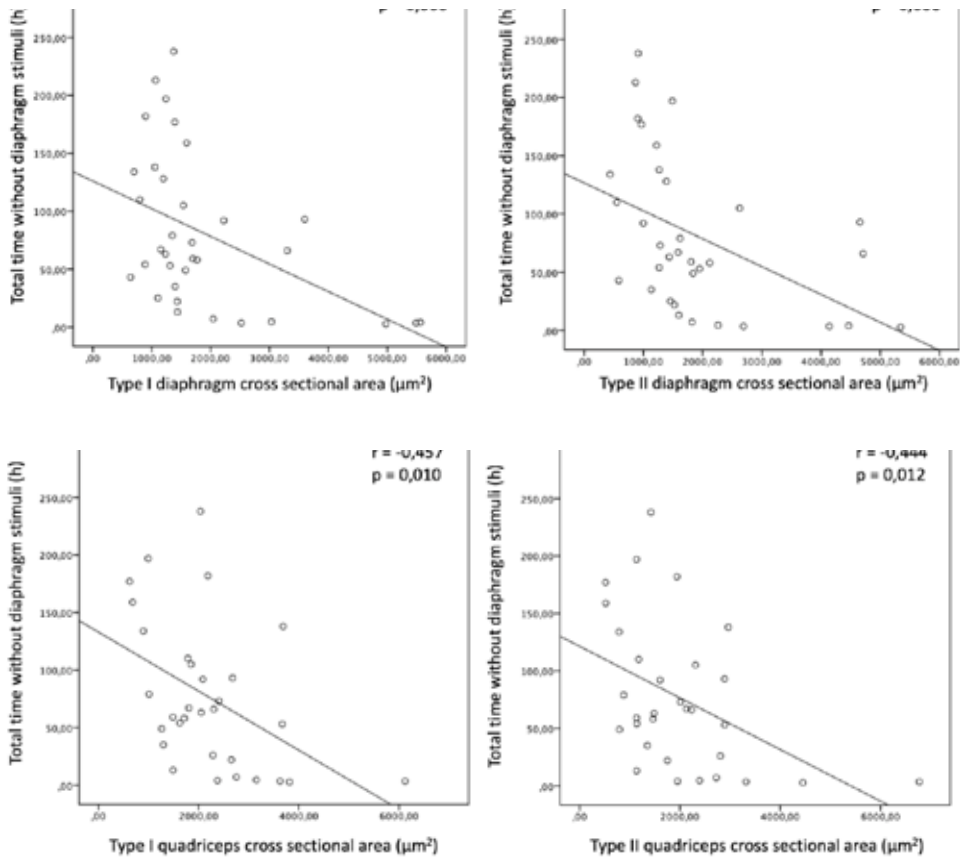


Figure 3. Correlations between type I and type II diaphragm and quadriceps cross-sectional areas and time spent without diaphragm stimulation.

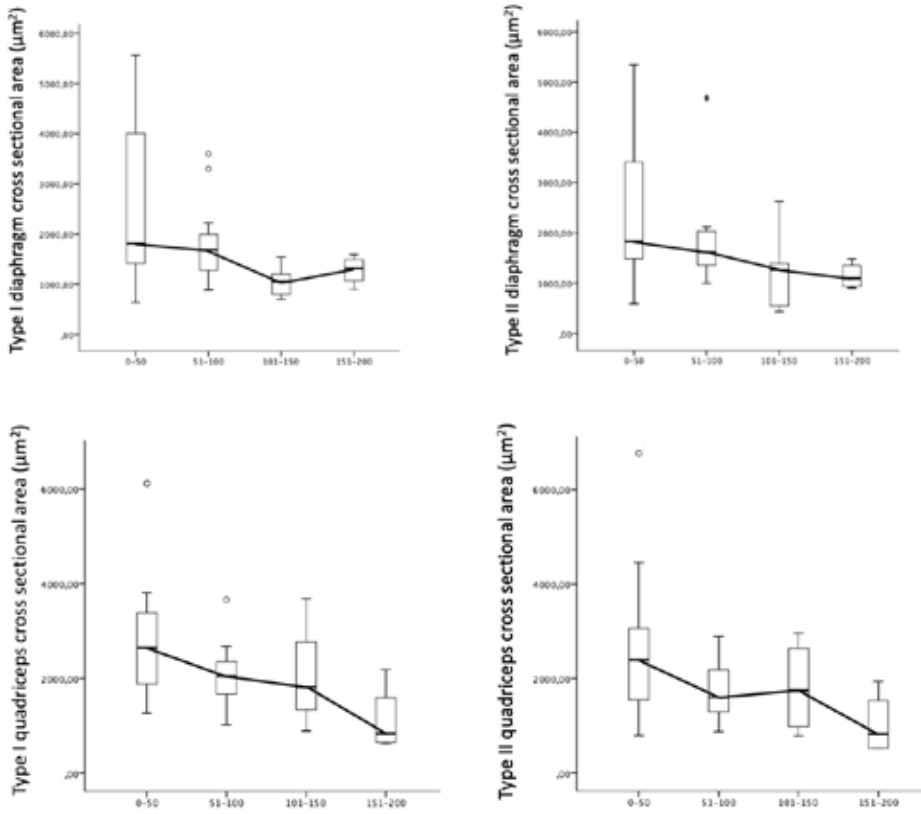


Figure 4. Diaphragm and quadriceps cross sectional areas according to total time in controlled mechanical ventilation without diaphragm stimuli.

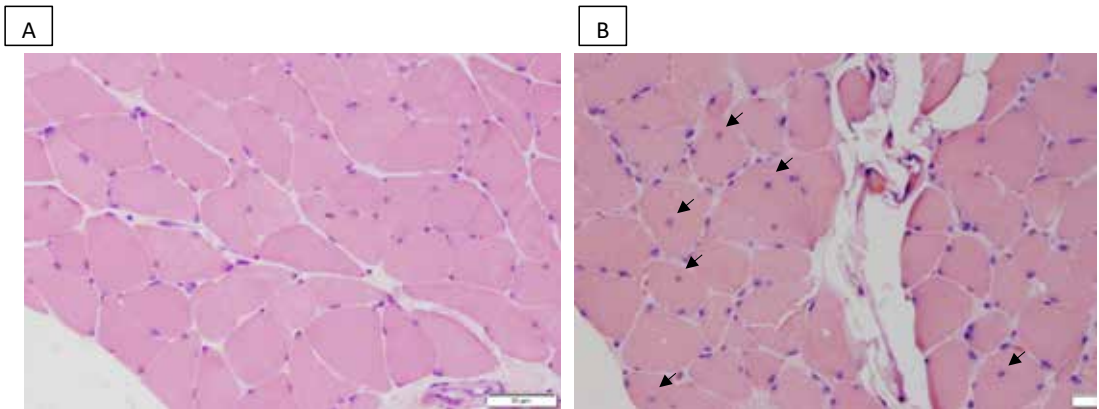


Figure 5. Comparison of representative BD and MSIII donor diaphragm-biopsy specimens with respect to muscle abnormalities (black arrows indicate internal nuclei) A: Hematoxylin-eosin staining of a BD donor (20X). B: Hematoxylin-eosin staining of a MSIII donor (20X).

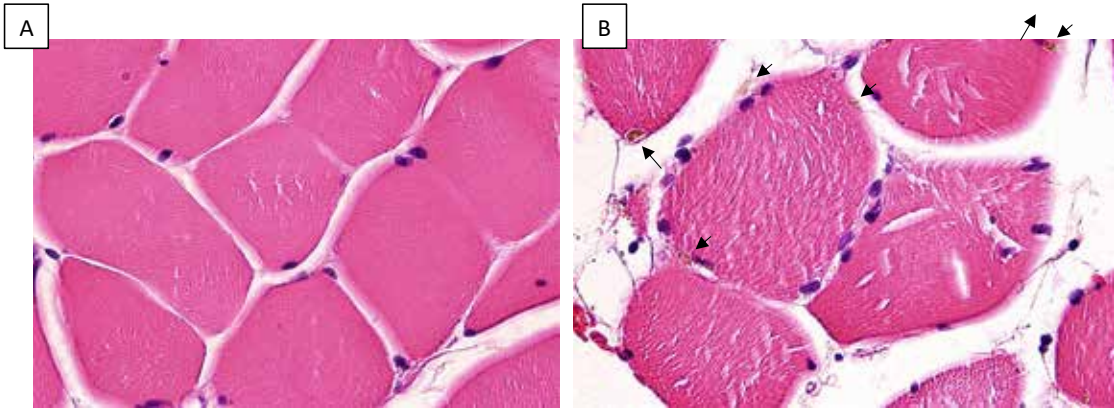


Figure 6. Comparison of representative CTL and BD donor diaphragm-biopsy specimens with respect to muscle abnormalities (black arrows indicate lipofuscin deposits) A: Hematoxylin-eosin staining of a CTL subject (X40). B: Hematoxylin-eosin staining of a BD donor (X40).

5.2. Article 2

Intensive Care Medicine

Association between histological diaphragm atrophy and ultrasound diaphragm thickness in ventilated patients

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Association between histological diaphragm atrophy and ultrasound diaphragm thickness in ventilated patients
Article Type:	Original
Funding Information:	ISCIII (P118/00025) Dr. Judith Marin Corral
Abstract:	<p>Purpose</p> <p>To evaluate the ability of decreased diaphragm thickness (Tdi) measured by ultrasound to predict muscle atrophy, defined by the decrease in the diaphragm fiber cross-sectional area (CSA) obtained through diaphragm biopsy (the gold standard technique) in ventilated patients.</p> <p>Methods</p> <p>Diaphragm biopsies and diaphragm ultrasound were performed in ventilated donors and in control subjects. Demographic variables, comorbidities, severity on admission, treatment, laboratory test results and evolution variables were evaluated. Immunohistochemical analysis (CSA) and ultrasound measurements of diaphragm thickness (Tdi) were performed, and median values of the control group were used as thresholds for further analysis. Sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values of an ultrasound Tdi cutoff for detecting histologic atrophy were calculated. Agreement between two ultrasound observers was also assessed.</p> <p>Results</p> <p>Thirty-five ventilated organ donors and 5 ventilated controls were included, without differences in basic characteristics. CSA and Tdi were lower in donors than in controls. All donors presented decreased CSA, but only 74% decreased Tdi. The cutoff value for decreased diaphragm thickness (Tdi<1.7mm) presented a sensitivity of 73%, a specificity of 67%, a positive predictive value of 96% and a negative predictive value of 17% for determining the presence of diaphragm atrophy (CSA<2851 μm^2).</p> <p>Conclusions</p> <p>Mechanical ventilation generates both diaphragm atrophy and decreased thickness. Diaphragm ultrasound is a good tool for diagnosing atrophy, but decreased Tdi should not be regarded as synonymous to atrophy. In our population, Tdi<1.7mm indicated diaphragm atrophy with a high probability of success. However, a Tdi > 1.7mm could not rule out diaphragm atrophy.</p>
Corresponding Author:	Judith Marin Corral, MD, PhD Hospital del Mar - IMIM Barcelona, Barcelona SPAIN
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Hospital del Mar - IMIM
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	I Dot
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	I Dot

	P Pérez-Terán
	A Francés
	Y Díaz
	C Vilà-Vilardell
	A Salazar-Degracia
	R Chalela
	E Barreiro
	A Rodríguez-Fuster
	JR Masclans
	Judith Marin Corral, MD, PhD
Order of Authors Secondary Information:	
Author Comments:	<p>Barcelona, October 27th 2021</p> <p>Dr. Giuseppe Citerio, Editor-in-Chief Intensive Care Medicine</p> <p>Dear Dr. Citerio, Please find attached our original article "Association between histological diaphragm atrophy and ultrasound diaphragm thickness in ventilated patients", authored by Dot et al., to be considered for publication as an original article in the Intensive Care Medicine.</p> <p>Our manuscript attempts to fill some of the gaps in our current understanding of the usefulness of diaphragm ultrasound for the diagnosis of diaphragm atrophy. Our study explores the concern expressed by certain authors regarding the significance of decreased diaphragm thickness or Tdi related to atrophy. At present, little is known about the relationship between Tdi and atrophy, defined by a decrease in the fiber cross-sectional area evaluated in diaphragm biopsies (the gold standard technique). Therefore, our aim was to assess the ability of decreased Tdi measured by ultrasound to predict muscle atrophy (decrease in CSA) in ventilated patients. We determined that mechanical ventilation generates both diaphragm atrophy and decreased thickness. We also confirmed that diaphragm ultrasound is a good tool for diagnosing atrophy, although decreased Tdi should not be regarded as synonymous to atrophy. Therefore, we strongly believe that our novel approach offers a potential scientific and experimental basis for the use of Tdi decrease measured by ultrasound to express atrophy, while taking the underlying limitations into consideration at all times. We think that this original article may be attractive to Intensive Care Medicine readers because in recent years your journal has been interested in respiratory muscle dysfunction in ventilated patients and in the tools available for its diagnosis and management. Our group already had the honor of publishing a novel manuscript on this topic using the same human model for sampling. In addition, the preliminary results of the study were presented at the 32th ESICM Lives, arousing considerable interest. The study was supported by a grant from Instituto de Salud Carlos III-Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) (PI18/00025).</p> <p>This manuscript contains original research and has not been published or submitted for publication elsewhere. All authors have read and approved the manuscript and have made significant contributions to the paper. The research meets all applicable standards with regard to the ethics of experimentation and research and was approved by the local research ethics committee. None of the authors have any disclosures to make related to this manuscript. I will be responsible for all pre-publication correspondence.</p> <p>Thank you for considering our manuscript for publication in the Intensive Care Medicine.</p> <p>Yours faithfully,</p> <p>Judith Marin-Corral, MD, PhD Critical Care Department, Hospital del Mar</p>

	Coordinator of Critical Illness Research Group (GREPAC), IMIM Passeig Maritim 25-29, 08003 Barcelona, Spain
Suggested Reviewers:	Nilam J. Soni SoniN@uthscsa.edu ICU ultrasound expert

Association between histological diaphragm atrophy and ultrasound diaphragm thickness in ventilated patients

Short Running Title: Diaphragm atrophy vs thickness in ICU

Dot I^{*1,2}, Pérez-Terán P^{*1,2}, Francés A³, Díaz Y^{1,2,6}, Vilà-Vilardell C^{1,2}, Salazar-Degracia A^{1,2}, Chalela R^{4,6}, Barreiro E^{4,5,6}, Rodríguez-Fuster A^{4,5,7}, Masclans JR^{**1,2,6}, Marin-Corral J^{**1,2}

1 Critical Care Department, Hospital del Mar, Barcelona, Spain

2 Critical illness research group (GREPAC), Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques (IMIM), Barcelona, Spain

3 Urology Department, Hospital del Mar, Barcelona, Spain

4 Respiratory Medicine Department-Muscle Wasting and Cachexia in Chronic Respiratory Diseases and Lung Cancer Research Group, Hospital del Mar, IMIM, Barcelona, Spain,

5 Centro de Investigación en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Barcelona, Spain

6 Health and Experimental Sciences Department (CEXS), Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain

7 Thoracic Surgery Department, Hospital del Mar, Barcelona, Spain

* and ** contributed equally to the work

Corresponding Author: Judith Marin Corral, MD, PhD, Critical Care Department, Hospital del Mar, Passeig Marítim 25-29, E-08003 Barcelona, Spain

Tel.: +34-93-2483014; e-mail: jmarincorral@gmail.com (0000-0003-1320-4427)

Presented at the

- 32nd ESICM Lives (European Society of Intensive Care Medicine) Berlin, October 2019 as an oral presentation.
- LIV Congreso Nacional de la SEMICYUC. Palma de Mallorca June 2019 as a poster.
- 40th Reunió de la SOCMIC. Tarragona, March 2019 as an oral communication.

MANUSCRIPT WORD COUNT: 2804

ABSTRACT WORD COUNT: 250

Abstract

Purpose

To evaluate the ability of decreased diaphragm thickness (Tdi) measured by ultrasound to predict muscle atrophy, defined by the decrease in the diaphragm fiber cross-sectional area (CSA) obtained through diaphragm biopsy (the gold standard technique) in ventilated patients.

Methods

Diaphragm biopsies and diaphragm ultrasound were performed in ventilated donors and in control subjects. Demographic variables, comorbidities, severity on admission, treatment, laboratory test results and evolution variables were evaluated. Immunohistochemical analysis (CSA) and ultrasound measurements of diaphragm thickness (Tdi) were performed, and median values of the control group were used as thresholds for further analysis. Sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values of an ultrasound Tdi cutoff for detecting histologic atrophy were calculated. Agreement between two ultrasound observers was also assessed.

Results

Thirty-five ventilated organ donors and 5 ventilated controls were included, without differences in basic characteristics. CSA and Tdi were lower in donors than in controls. All donors presented decreased CSA, but only 74% decreased Tdi. The cutoff value for decreased diaphragm thickness (Tdi<1.7mm) presented a sensitivity of 73%, a specificity of 67%, a positive predictive value of 96% and a negative predictive value of 17% for determining the presence of diaphragm atrophy (CSA<2851 μm^2).

Conclusions

Mechanical ventilation generates both diaphragm atrophy and decreased thickness. Diaphragm ultrasound is a good tool for diagnosing atrophy, but decreased Tdi should not be regarded as synonymous to atrophy. In our population, Tdi<1.7mm indicated diaphragm atrophy with a high probability of success. However, a Tdi \geq 1.7mm could not rule out diaphragm atrophy.

Keywords

Diaphragm thickness, Ventilator-induced Diaphragm Dysfunction or damage (VIDD), Atrophy, Muscle dysfunction, diaphragm ultrasound

Introduction

Diaphragm fiber atrophy after the use of mechanical ventilation (MV) has been described as an important factor contributing to the development of ventilator-induced diaphragmatic dysfunction (VIDD) [1]. The prevalence of VIDD in the intensive care unit (ICU) in ventilated patients is 40-80% according to previous studies and has been associated with a high rate of weaning failure, increased length of stay, and increased ICU and hospital mortality [2-7]. For these reasons, its detection, diagnosis, evaluation and treatment are crucial to improve outcomes in critically ill patients.

Animal and human studies have revealed the presence of histological atrophy (i.e., decrease in muscle fiber size) after a few hours of controlled MV or inappropriate ventilator settings with a decreased force-generating capacity [8-12]. MV itself seems to affect the diaphragm, but many other factors such as inflammation, malnutrition and the use of certain pharmacological agents contribute to this problem in the ICU. Although muscle biopsy and histological evaluation through fiber cross-sectional area (CSA) is still the best methodology to evaluate muscle structure, it is an invasive procedure that may cause severe complications in routine use and is rarely performed in clinical practice [13].

In recent years, ultrasound has become increasingly popular in the day-to-day management of ICU patients given its simplicity, its non-invasive nature and its high safety profile. It can be used to assess distinctive diaphragmatic characteristics such as the expiratory diaphragm thickness or Tdi and offers high reproducibility [14,15]. Rapid early changes in Tdi have been described after MV [16,17] and its decrease in ultrasound studies has been accepted as an indicator of a loss of diaphragm muscle mass. In this context, it has been widely used to describe the atrophy found in the diaphragm of critically ill patients who have undergone MV. However, no previous studies have compared histological diaphragm atrophy (CSA) and ultrasound Tdi in ventilated patients. We hypothesized that Tdi would be a good tool for diagnosing diaphragm atrophy in ventilated patients. The aims of this study were: 1) to assess the ability of Tdi decrease measured by ultrasound to evaluate diaphragm atrophy (normally assessed by diaphragm CSA) in ventilated patients; and 2) to analyse the impact of MV on diaphragm CSA and Tdi. We also aimed to give a scientific and experimental basis for the use of muscle thickness decrease measured by ultrasound to define atrophy.

Methods

Study subjects

Critically ill organ donor patients admitted in a University hospital ICU during a period of 3 years and who required mechanical ventilation for a period longer than 24h, were eligible for the study. The donor group comprised two types of donors, those included in the Maastricht III classification, in whom circulatory death occurred after a controlled and planned withdrawal of life-sustaining therapies, and brain-dead donors, diagnosed as such in view of the evidence of a lack of cortical and brainstem reflexes secondary to irreversible brain damage. We also included a control group

comprising patients who had undergone elective thoracic surgery for localized lung nodule. Exclusion criteria were as follows: age younger than 18, previous diaphragmatic surgery and difficulty obtaining diaphragm ultrasound images. Protocols were approved by the Ethics Committees of Hospital del Mar (2017/7183/I) and informed consent was obtained from all subjects or their next of kin prior to inclusion. The procedures used in this study adhered to the tenets of the Declaration of Helsinki. Further details regarding study donors are detailed in a previous study by Marin-Corral et al [10].

Clinical data

At inclusion, demographic variables such as age, gender, body mass index (BMI), toxic habits, chronic medical comorbidities, chronic medications and type of admission were recorded for all subjects. In the donor group the severity scores in the first 24h after admission (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II or APACHE II and Sequential Organ Failure Assessment or SOFA) were also recorded, as were the type of donation, treatments received during ICU stay (systemic corticosteroids, type and days of sedation, use and number of days with neuromuscular blockers, insulin, enteral nutrition, and vasoactive drugs) and laboratory test results on the day of inclusion. Finally, ICU complications and evolution (days on MV, ICU length of stay) were also described.

Biopsies and fiber cross-sectional area (CSA)

In all patients included, diaphragm biopsy samples were obtained early during surgery, from the anterior right costal diaphragm, lateral to the insertion of the phrenic nerve (Figure 1). Specifically, in the case of donors, the biopsy was obtained as soon as possible during organ removal, ensuring minimal ischemia time due to hypoperfusion. Muscle samples were immediately immersed in an alcohol-formol bath and then embedded in paraffin. These tissues were used for the histological analysis. Morphometric analyses were carried out in the diaphragm samples. CSA and proportions of myofibers expressing myosin heavy chain I (MHC I or type I, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) or II (MHC II or type II, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) were assessed by immunohistochemical analysis under light microscopy (Olympus, Series BX61, Olympus Optical Co., Hamburg, Germany) coupled with an image-digitizing camera (Olympus, Series DP71, Olympus Optical Co., Hamburg, Germany) and evaluated using a specific morphometry program (Image J, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). At least 150 fibers were measured and counted in each muscle specimen and the CSA evaluation included the size of all fibers type (I and II). Further details on biopsy procedures are detailed elsewhere [10].

Ultrasound diaphragm thickness (Tdi)

Diaphragm ultrasound (Vivid I® ultrasound device, General Electric, Fairfield, CT, USA) was performed in the six hours before organ donation (donor group) or prior to surgery (control group) with subjects connected to MV in a semi-recumbent position (45°). Tdi (mm) was measured in the zone of apposition of the right hemidiaphragm to the rib cage with the linear probe (10–12 MHz) located in the 9th-10th intercostal space, at the level of the anterior axillary line in a transversal position as previously described. In this position, the diaphragm is visualized as a three-layered

structure which thickens with inspiration. The two external echogenic layers correspond to the pleura and the peritoneum. Between the two layers, diaphragm muscle is clearly visualized (Figure 1). To measure Tdi at end-expiration, M-mode was used to obtain three uninterrupted and well-defined respiratory cycles. Images were stored in digital format and Tdi was measured from the inner-to-inner layer with an electronic caliper. The average of the three individual values were used. Measurements were analysed independently by two intensivists experienced in ultrasound, and intraobserver/interobserver agreement was evaluated.

Statistics

Continuous variables were described as means and standard deviation (SD) or medians and interquartile range [IQR (25-75)] according to whether the Kolmogorov-Smirnov test showed the distribution to be normal or non-normal. Categorical variables were described as number of cases and percentages [n (%)]. Chi-square, Fisher's test, Student's t-test, and Mann-Whitney U test were used to evaluate variables at baseline. Agreement between the two ultrasound observers was performed with Spearman's Rho correlation coefficient, and intraindividual variability was assessed by the variation coefficient.

We established cutoff values for histologic atrophy and ultrasound Tdi decrease in our population, based on the characteristics of our control group (i.e., the median values of CSA and Tdi). Standard formulas were used to calculate the sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of the ultrasound Tdi cutoff to detect histologic atrophy through CSA. Data were analysed using the statistical package for social sciences 15.0 BM® SPSS Statistics®, Chicago, IL, USA). Statistical significance was established at $p \leq 0.05$.

Results

Characteristics of patients

Forty mechanically ventilated patients were included in the analysis, 35 organ donors and 5 controls. Table 1 shows the characteristics of the patients included. Briefly, no significant differences in age, gender and BMI were found between the groups. The control group had a higher prevalence of smoking (60% vs 34%, $p > 0.05$) and of chronic comorbidities (80% vs 43%, $p > 0.05$) without reaching statistical significance. There were no differences between groups in terms of chronic treatment such as oral corticosteroids, statins or insulin. Most of the donors (91%) were admitted to the ICU for medical causes (neurological illnesses), and as described above all the controls were admitted for elective surgery.

Clinical characteristics of donors during their ICU stay before inclusion are shown in Table 2. Summarizing, donors had a median APACHE score at admission of 29 (23-33) and a median SOFA score of 7 (5-9). Half were brain dead donors (54%) and the other half were Maastricht III (45%). A total of 18 (51%) patients presented some complication during the ICU stay, most frequently of infectious nature (34%) without any diagnoses of septic shock. ICU length of stay and duration of MV were identical because all patients were admitted intubated and connected to invasive MV for a median of 5 (2-9) days.

Diaphragm Cross sectional area

The size of diaphragmatic fibers was significantly lower in donors than in controls [1513 (1150-1807) μm^2 vs 2851 (1743-3587) μm^2 , $p \leq 0.001$] (Figure 2A, 2B and 2E). The median CSA value in the control group (2851 μm^2) was used as a threshold to define diaphragm atrophy.

Diaphragm thickness

Ultrasound Tdi intra-observer coefficient of variation was 0.93 (CI 0.8-0.96) and 0.96 (CI 0.94-0.98) according to sonographer. Measurements of Tdi showed a good inter-observer agreement between the two observers (Rho 0.89, $p \leq 0.001$) as shown in Figure 3. Tdi was lower in donors than in controls although the difference did not reach statistical significance [1.4 (1.3-1.7) mm vs 1.7 (1.3-1.8) mm, $p > 0.05$; (Figure 2C, 2D and 2E). The median Tdi value in the control group (1.7 mm) was used as a threshold to define decreased Tdi at end expiration.

Association between histological atrophy and ultrasound thickness

All ventilated donors included presented histological diaphragm atrophy, while only 74% presented decreased Tdi at end expiration according to ultrasound (Figure 4A). In all the population, the cutoff value for decreased diaphragm thickness (Tdi < 1.7mm) presented a sensitivity of 73%, a specificity of 67%, a positive predictive value of 96% and a negative predictive value of 17% for determining the presence of diaphragm atrophy (Figure 4B).

Discussion

The key findings of this study are that 1) MV generates diaphragm atrophy and reduces its thickness; 2) diaphragm thickness measured by ultrasound (Tdi) is able to detect diaphragm atrophy but does not have the capacity to rule it out completely; 3) most ventilated patients with decreased Tdi have diaphragm atrophy, while only a few with Tdi in normal ranges do not have atrophy; and 4) diaphragm ultrasound is a good tool for diagnosing diaphragm atrophy in ventilated patients; it presents good reproducibility and is easy to perform at the bedside.

Our results for diaphragm atrophy in ventilated patients and controls are in agreement with previous studies. A reduction of diaphragm myofiber CSA has been shown after the use of short periods of controlled MV [12,18]. In 2008, Levine et al. were the first to demonstrate this phenomenon in brain-dead adult donors compared with control patients [8]. Since then, the results have been replicated in other groups of ventilated patients with different pathologies [10,19]. Because each of these studies used its own control group, there are no generalized normality values for diaphragm CSA. In our cohort, as threshold for determining diaphragm atrophy, we considered the median CSA value of the control group, which is similar to the thresholds previously used in the literature [18,19]. Our results show that all our ventilated donors had histological atrophy after a median of 5 days under MV, probably related to the time-dependent relationship between atrophy and time of ventilation observed in previous studies [12]. Given the difficulties involved in obtaining diaphragm biopsies, recent studies have used diaphragm ultrasound as an accessible tool for exploring diaphragm structure in critical patients. Tdi in expiration has been used as a surrogate of muscle mass and has been accepted in

ultrasound studies as a noninvasive assessment of diaphragm atrophy in ventilated patients [17,20]. Changes in Tdi have been detected in mechanically ventilated patients after the first hours on MV [16,21,22]. Again, the lower limit values of Tdi range widely (between 1.6 and 2.3 mm) in healthy and ventilated patients in the different studies [16,23-27]. The cut off value obtained from our control group and used as a threshold to define a decrease in Tdi agrees with previous data (1.7 mm).

At present it is unclear whether a Tdi decrease measured by ultrasound should be accepted as an indicator of histological diaphragm atrophy. In our study, although 100% of the donors had diaphragm atrophy, only 74% presented decreased Tdi. This suggests an association between the two variables, but also that they probably do not represent the same phenomenon. Reynolds et al, studied the diaphragm of ventilated pigs through histology and diaphragm ultrasound, assessing diaphragm CSA and Tdi in both ventilated non-paced and ventilated animals after the use of phrenic nerve pacing. Although the aim of the study was not to correlate the two measures, ventilated pigs in the non-paced group showed a decrease in both CSA and Tdi in comparison with treated animals, suggesting a possible association between the two. Unfortunately, this issue has not been thoroughly examined in later animal or human studies [28]. Based on our results, the fact that the two variables do not reflect exactly the same thing should not come as a surprise: the CSA measures only the size of the muscle fibers while the Tdi measures the entire thickness of the muscle, taking into account the interfibrillar tissue which may also be altered by the conditions that frequently affect critically ill patients [10,18,29-31].

In this study we used histological CSA as a gold standard for evaluating atrophy. Our results suggest that $Tdi < 1.7\text{mm}$ is able to detect atrophy in 73% of cases (sensitivity) and $Tdi \geq 1.7\text{mm}$ to rule it out in 67% (specificity). We also found that when Tdi detects a decrease in thickness, it is well correlated with histological atrophy in 96% of cases (positive predictive value). Notably, when Tdi is within normal ranges, there is no atrophy in only 17% of cases. Interestingly, DiNino et al. described a minimum Tdi value for extubating success of 1.7mm [32]. In the light of our results, we can speculate that although our Tdi cut off value may underdiagnose diaphragm atrophy, it will probably be able to detect patients whose atrophy implies diaphragm dysfunction and worse outcomes.

In this study, two independent observers performed the diaphragm ultrasound measurements, with intra and interobserver agreements on Tdi close to the values previously described in the literature. This confirms that diaphragm ultrasound in ventilated patients is an easy-to-perform and reproducible tool at the bedside [14].

Study limitations

The current study has important limitations. First, as the reference or normal threshold we decided to use the median CSA and Tdi of a control group that included only five patients. The sample size of the control group is small, given the difficulties in obtaining diaphragmatic biopsies in healthy subjects. Nevertheless, our data on both fibrillar size (CSA) and diaphragm thickness (Tdi) are similar to those previously described in the literature for similar sized control groups. It

is necessary to carry out studies with a sufficient sample size to establish normal ranges in these variables, which would probably have to be stratified according to age or gender or BMI. Second, our study did not include data on diaphragmatic function, and it was limited to evaluating the structure; it was unable to relate atrophy or decrease in thickness with diaphragm dysfunction. It is difficult to assess diaphragmatic function in organ donors undergoing MV, many of whom are highly controlled, but it can be done by measuring transdiaphragmatic pressure (Pdi) after phrenic nerve stimulation. Future studies should focus on evaluating the three variables together (CSA, Tdi and Pdi) to decide on the best cut off values for clinicians to use in their day-to-day practice. Third, we only measured the right hemidiaphragm thickness because, as described elsewhere, the left side tends to be poorly visualized [2]. However, in cases in which the left side can be seen clearly, no differences have been reported between the hemidiaphragms and so the evaluation of just one of them should not introduce a bias [15].

Conclusions

MV generates decreases in diaphragm CSA and Tdi measured by diaphragm ultrasound. Diaphragm ultrasound seems to be a good tool for diagnosing atrophy, but the terms CSA and Tdi should not be used synonymously. We propose a threshold for Tdi of 1.7mm, below which we can be sure that patients will suffer diaphragmatic atrophy. Consequently, protective diaphragm MV strategies should be prioritized in these patients. However, a Tdi equal or greater than 1.7mm cannot rule out atrophy. Future studies should seek to clarify the association between these structural and functional variables in order to find the best cutoff Tdi for diaphragm dysfunction and thus improve outcomes.

References

1. Vassilakopoulos T, Petrof BJ (2004) Ventilator-induced Diaphragmatic Dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med* 169:336–341. doi: 10.1164/rccm.200304-489CP
2. Dubé B-P, Dres M, Mayaux J, et al (2017) Ultrasound evaluation of diaphragm function in mechanically ventilated patients: comparison to phrenic stimulation and prognostic implications. *Thorax* 1–8. doi: 10.1136/thoraxjnl-2016-209459
3. Jung B, Moury PH, Mahul M, et al (2016) Diaphragmatic dysfunction in patients with ICU-acquired weakness and its impact on extubation failure. *Intensive Care Med* 42:853–861. doi: 10.1007/s00134-015-4125-2
4. De Jonghe B, Bastuji-Garin S, Durand M-C, et al (2007) Respiratory weakness is associated with limb weakness and delayed weaning in critical illness. *Crit Care Med* 35:2007–2015. doi: 10.1097/01.ccm.0000281450.01881.d8
5. Hermans G, Agten A, Testelmans D, et al (2010) Increased duration of mechanical ventilation is associated with decreased diaphragmatic force: a prospective observational study. *Crit Care*. doi: 10.1186/cc9094
6. Demoule A, Jung B, Prodanovic H, et al (2013) Diaphragm dysfunction on admission to

- the intensive care unit. Prevalence, risk factors, and prognostic impact—a prospective study. *Am J Respir Crit Care Med* 188:213–9. doi: 10.1164/rccm.201209-1668OC
7. Supinski GS, Ann Callahan L (2013) Diaphragm weakness in mechanically ventilated critically ill patients. *Crit Care*. doi: 10.1186/cc12792
 8. Levine S, Nguyen T, Taylor N, et al (2008) Rapid Disuse Atrophy of Diaphragm Fibers in Mechanically Ventilated Humans. *N Engl J Med* 358:1327. doi: 10.1056/NEJMoa1005372
 9. Jaber S, Jung B, Matecki S, Petrof BJ (2011) Clinical review: Ventilator-induced diaphragmatic dysfunction - human studies confirm animal model findings! *Crit Care* 15:206. doi: 10.1186/cc10023
 10. Marin-Corral J, Dot I, Boguña M, et al (2019) Structural differences in the diaphragm of patients following controlled vs assisted and spontaneous mechanical ventilation. *Intensive Care Med* 45:488–500. doi: 10.1007/s00134-019-05566-5
 11. Goligher EC, Brochard LJ, Reid WD, et al (2018) Diaphragmatic myotrauma: a mediator of prolonged ventilation and poor patient outcomes in acute respiratory failure. *Lancet Respir Med* 7:90–98. doi: 10.1016/s2213-2600(18)30366-7
 12. Jaber S, Petrof BJ, Jung B, et al (2011) Rapidly progressive diaphragmatic weakness and injury during mechanical ventilation in humans. *Am J Respir Crit Care Med* 183:364–371. doi: 10.1164/rccm.201004-0670OC
 13. Noullet S, Romero N, Menegaux F, et al (2015) A novel technique for diaphragm biopsies in human patients. *J Surg Res* 196:395–398. doi: 10.1016/j.jss.2015.02.057
 14. Matamis D, Soilemezi E, Tsagourias M, et al (2013) Sonographic evaluation of the diaphragm in critically ill patients. Technique and clinical applications. *Intensive Care Med* 39:801–10. doi: 10.1007/s00134-013-2823-1
 15. Goligher EC, Laghi F, Detsky ME, et al (2015) Measuring diaphragm thickness with ultrasound in mechanically ventilated patients: feasibility, reproducibility and validity. *Intensive Care Med* 41:642–9. doi: 10.1007/s00134-015-3687-3
 16. Goligher EC, Dres M, Fan E, et al (2018) Mechanical ventilation-induced diaphragm atrophy strongly impacts clinical outcomes. *Am J Respir Crit Care Med* 197:204–213. doi: 10.1164/rccm.201703-0536OC
 17. Grosu HB, Lee YI, Lee J, et al (2012) Diaphragm muscle thinning in patients who are mechanically ventilated. *Chest* 142:1455–1460. doi: 10.1378/chest.11-1638
 18. Hooijman PE, Beishuizen A, Witt CC, et al (2015) Diaphragm Muscle Fiber Weakness and Ubiquitin-Proteasome Activation in Critically Ill Patients. *Am J Respir Crit Care Med* 191:1126–1138. doi: 10.1164/rccm.201412-2214OC
 19. Van den Berg M, Hooijman PE, Beishuizen A, et al (2017) Diaphragm atrophy and weakness in the absence of mitochondrial dysfunction in the critically ill. *Am J Respir Crit Care Med* 196:1544–1558. doi: 10.1164/rccm.201703-0501OC
 20. Gottesman E, McCool FD (1997) Ultrasound evaluation of the paralyzed diaphragm. *Am J Respir Crit Care Med* 155:1570–1574. doi: 10.1164/ajrccm.155.5.9154859
 21. Goligher EC, Fan E, Herridge MS, et al (2015) Evolution of Diaphragm Thickness During

- Mechanical Ventilation: Impact of Inspiratory Effort. *Am J Respir Crit Care Med* 192:1–56. doi: 10.1164/rccm.201503-0620OC
22. Grosu HB, Ost DE, Lee YI, et al (2017) Diaphragm Muscle Thinning in Subjects Receiving Mechanical Ventilation and Its Effect on Extubation. *Respir Care* 62:904–11. doi: 10.4187/respcare.05370
 23. Carrillo-Esper R, Pérez-Calatayud AA, Arch-Tirado E, et al (2016) Standardization of sonographic diaphragm thickness evaluations in healthy volunteers. *Respir Care* 61:920–924. doi: 10.4187/respcare.03999
 24. Baldwin CE, Paratz JD, Bersten AD (2011) Diaphragm and peripheral muscle thickness on ultrasound: Intra-rater reliability and variability of a methodology using non-standard recumbent positions. *Respirology* 16:1136–1143. doi: 10.1111/j.1440-1843.2011.02005.x
 25. Boon AJ, Harper CJ, Ghahfarokhi LS, et al (2013) Two-dimensional ultrasound imaging of the diaphragm: Quantitative values in normal subjects. *Muscle and Nerve* 47:884–889. doi: 10.1002/mus.23702
 26. Schepens T, Verbrugge W, Dams K, et al (2015) The course of diaphragm atrophy in ventilated patients assessed with ultrasound: a longitudinal cohort study. *Crit Care* 19:422. doi: 10.1186/s13054-015-1141-0
 27. Zambon M, Beccaria P, Matsuno J, et al (2016) Mechanical Ventilation and Diaphragmatic Atrophy in Critically Ill Patients. *Crit Care Med* 44:1347–1352. doi: 10.1097/CCM.0000000000001657
 28. Reynolds SC, Meyyappan R, Thakkar V, et al (2017) Mitigation of Ventilator-Induced Diaphragm Atrophy by Transvenous Phrenic Nerve Stimulation. *Am J Respir Crit Care Med* 195:339–348. doi: 10.1165/rcmb.2011-0115OC
 29. Scott A, Wang X, Road J., Reid WD (2006) Increased injury and intramuscular collagen of the diaphragm in COPD: autopsy observations. *Eur Respir J* 27:51–59. doi: 10.1183/09031936.06.00143004
 30. Nucci RAB, De Souza RR, Suemoto CK, et al (2019) Cigarette smoking impairs the diaphragm muscle structure of patients without respiratory pathologies: An autopsy study. *Cell Physiol Biochem* 53:648–655. doi: 10.33594/000000163
 31. Lindqvist J, Van Den Berg M, Van Der Pijl R, et al (2018) Positive end-expiratory pressure ventilation induces longitudinal atrophy in diaphragm fibers. *Am J Respir Crit Care Med* 198:472–485. doi: 10.1164/rccm.201709-1917OC
 32. Dinino E, Gartman EJ, Sethi JM, McCool FD (2014) Diaphragm ultrasound as a predictor of successful extubation from mechanical ventilation. *Thorax* 69:423–427. doi: 10.1136/thoraxjnl-2013-204111

Acknowledgments

We thank Marta Gas for her administrative and technical support and the transplant coordination nursing team of the Hospital del Mar for their help obtaining the samples. We also thank Judit Bigas for her experimental support and Victor Boutonnet for his help in figure design. Finally, we thank all the families and patients who consented to our use of biological samples for research purposes in very difficult emotional situations.

Author contributions

ID, JMC, PPT and JRM conceived and designed the study.

ID, AF, RC, ARF and YD contributed to patient recruitment and biopsy obtention.

ASD and JMC contributed to biopsy experimental analysis.

ID and PPT performed diaphragm ultrasounds.

ID, CVV and PPT contributed to data acquisition and analysis.

ID, JMC, PPT, EB, JRM made important intellectual contributions and actively participated in the interpretation of the data

ID and JMC wrote the paper.

All authors contributed to critical examination of the paper for important intellectual content and approval of the final manuscript.

Funding and Role of the sponsors

This study has been supported by a grant from Instituto de Salud Carlos III-Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) (PI18/00025) and Catalan Society of Critical Care (SOCMIC 2018).

The study sponsors had no role in the study design, data collection, data analysis, data interpretation, or writing of the report. The corresponding author (JMC) had full access to all the data in the study and final responsibility for the decision to submit for publication.

Ethics Committee Approval

The institutional review board of PSMAR approved the original study (IRB Ref 2017/7183/I).

Figure legends

Figure 1. Representative image of the methodology followed for the study: location of the sample collection, performance of the diaphragmatic ultrasound and measurements of the CSA and Tdi.

Figure 2. Diaphragm cross-sectional area (CSA) and diaphragm thickness (Tdi) related data in donor and control groups. 2A and 2B: Representative examples of histological samples. 2C and 2D: Representative examples of ultrasound measurements. White arrow: pleural layer; Red arrow: peritoneal layer. 2E: Principal study variables (histological and ultrasound) in control and donor groups. Data are shown as median and interquartile ranges (IQR or 25th-75th percentile).

Figure 3. Correlation of diaphragm thickness (Tdi) measured by diaphragm ultrasound between two observers.

Figure 4. Association between histological atrophy and ultrasound diaphragm thickness. 4A: Donor's flow chart with diaphragm thickness measured by diaphragm ultrasound regarding the presence of diaphragm atrophy. 4B: Distribution of diaphragm thickness (Tdi) related to diaphragm cross-sectional area (CSA) in all study population.

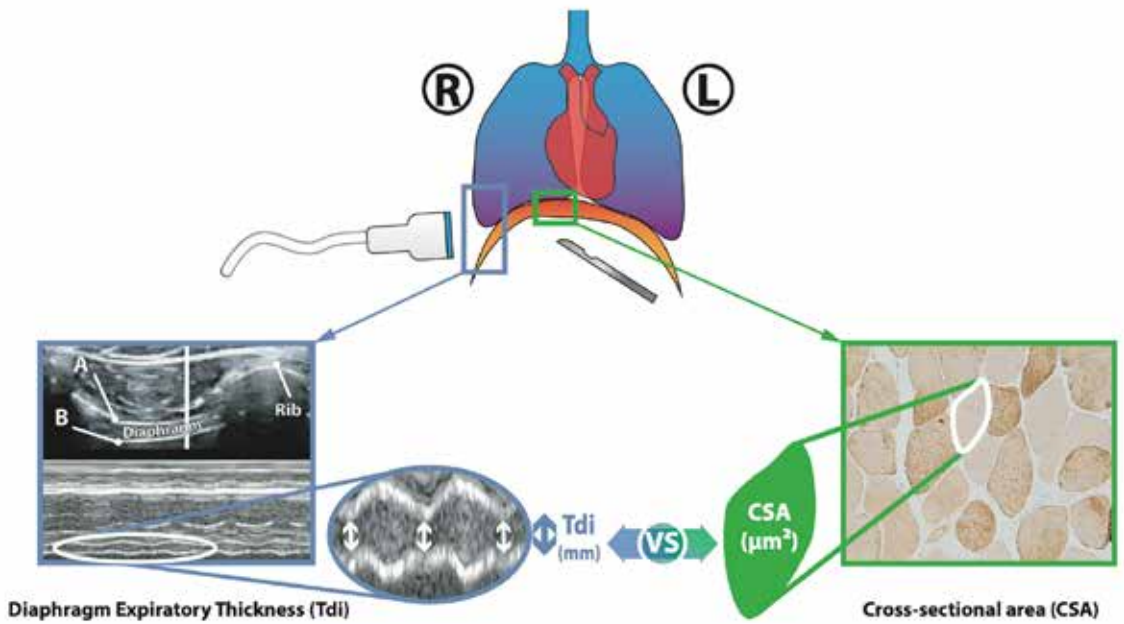
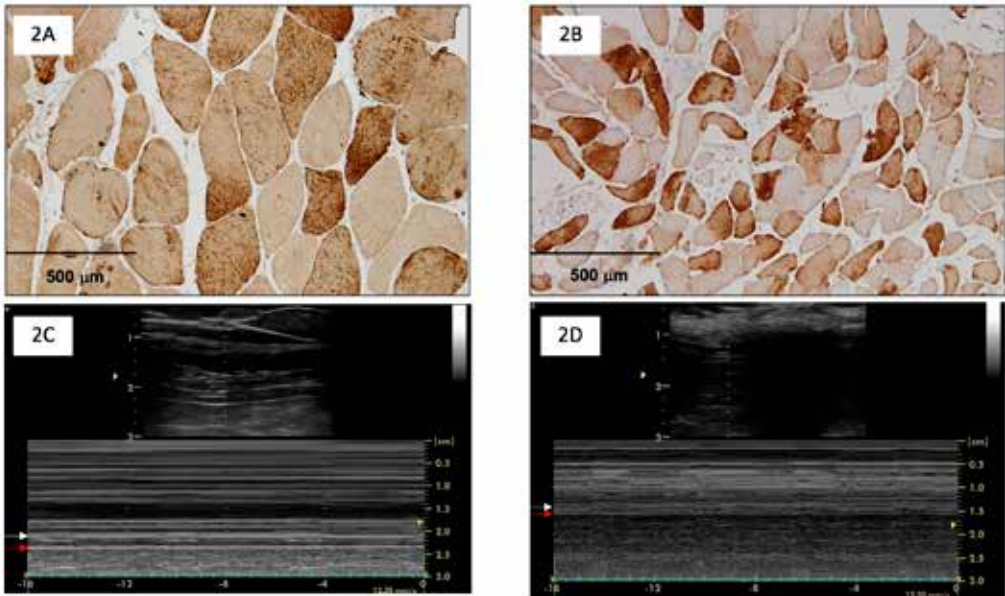


Figure 1. Representative image of the methodology followed for the study: location of the sample collection, performance of the diaphragmatic ultrasound and measurements of the CSA and Tdi.



2E	Controls n=5	Donors n=35	p value
Histological results			
Diaphragm Cross Sectional Area (CSA), μm^2	2851 (1743 - 3587)	1513 (1150 - 1807)	≤ 0.001
Ultrasound results			
Diaphragm expiration thickness (Tdi), mm	1.7 (1.3 - 1.8)	1.4 (1.3 - 1.7)	ns

Figure 2. Diaphragm cross-sectional (CSA) area and diaphragm thickness (Tdi) related data in donor and control groups. 2A and 2B: Representative examples of histological samples. 2C and 2D: Representative examples of ultrasound measurements. White arrow: pleural layer; Red arrow: peritoneal layer. 2E: Principal study variables (histological and ultrasound) in control and donor groups. Data are shown as median and interquartile ranges (IQR or 25th-75th percentile).

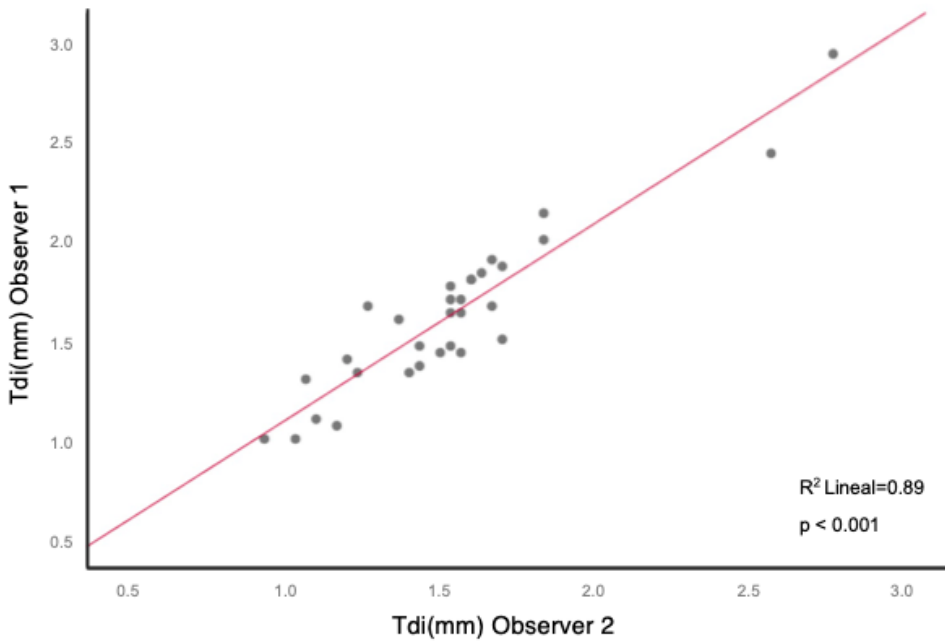


Figure 3. Correlation of diaphragm thickness (Tdi) measured by diaphragm ultrasound between two observers.

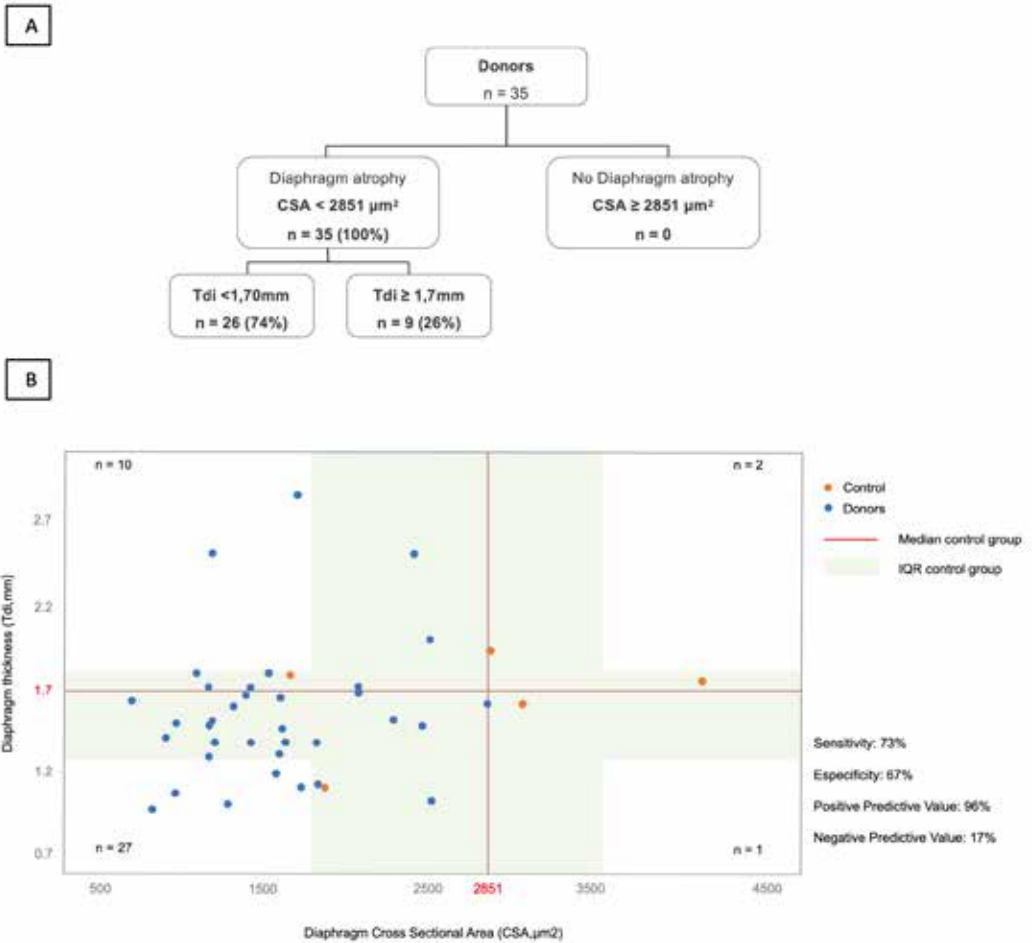


Figure 4. Association between histological atrophy and ultrasound diaphragm thickness. 4A: Donor’s flow chart with diaphragm thickness measured by diaphragm ultrasound regarding the presence of diaphragm atrophy. 4B: Distribution of diaphragm thickness (Tdi) related to diaphragm Cross Sectional Area (CSA) in all study population.

Table 1. Basic characteristics of controls and donors.

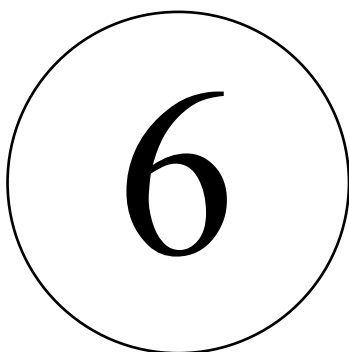
	Controls n=5	Donors n=35	p-value
Demographics			
Age, years	61 (56-77)	69 (55-76)	ns
Gender, female	2 (40)	14 (40)	ns
Body Mass Index, Kg/m ²	25 (3)	26 (5)	ns
Toxic habits			
Smoking	3 (60)	12 (34)	ns
Alcoholism	2 (40)	5 (14)	ns
Comorbidities			
COPD	1 (20)	3 (9)	ns
Diabetes Mellitus	0 (0)	7 (20)	ns
Heart failure	0 (0)	3 (9)	ns
Chronic kidney disease	1 (20)	2 (6)	ns
Hematologic disease	1 (20)	0 (0)	ns
Previous treatment			
Oral corticosteroids	0 (0)	0 (0)	ns
Statins	2 (40)	14 (40)	ns
Insulin	0 (0)	2 (3)	ns
Type of ICU admission			<0.001
Elective surgery	5 (100)	1 (3)	
Medical cause	0 (0)	32 (91)	
Traumatic cause	0 (0)	2 (6)	

Data expressed as frequencies and percentages [n (%)] or medians and interquartile ranges (IQR or 25th-75th percentile). COPD: Chronic Obstructive Pulmonary Disease; ICU: Intensive Care Unit.

Table 2. Clinical characteristics of organ donors

	Donors n=35
Severity scores at admission	
APACHE II	29 (23-33)
SOFA	7 (5-9)
Donation type	
Brain-death	19 (54)
Maastricht III	16 (45)
Pharmacological treatments during ICU	
Systemic corticosteroids	12 (34)
Neuromuscular blockers	12 (34)
Days on neuromuscular blockers	1 (1-2)
Benzodiazepines	24 (68)
Days on benzodiazepines	1 (0-3)
Opioids	26 (74)
Days on opioids	2 (0-3)
Insulin	12 (34)
Subcutaneous	31 (88)
Intravenous	3 (8)
Norepinephrine	27 (77)
Maximal dose, µg/kg/min	0.3 (0.2-0.6)
Dobutamine	4 (11)
Maximum dose, µg/kg/min	7.0 (1.0-16.0)
Enteral nutrition	18 (51)
Days on enteral nutrition	2 (0-6)
Enrolled on a physical therapy program	4 (11)
Complications during ICU stay	
Hyperglycemias >200mg/dl	17 (48)
Infectious	12 (34)
Non-infectious	6 (17)
Analytical variables on day of inclusion	
C-reactive protein, mg/dl	2 (0-17)
Troponin, ng/l	41 (8-485)
Creatine kinase, U/L	179 (54-581)
Albumin g/dl	3 (0.5)
ICU evolution data	
Days on mechanical ventilation	5 (2-9)
ICU length of stay	5 (2-9)

Data expressed as frequencies and percentages [n (%)] or medians and interquartile ranges (IQR or 25th-75th percentile). APACHE II: Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II; SOFA: Sequential Organ Failure Assessment; ICU: Intensive Care Unit.



DISCUSSIÓ

6. DISCUSSIÓ

La investigació portada a terme en aquesta Tesi doctoral, ha permès evidenciar les característiques histològiques que presenta el diafragma de pacients ventilats amb diferents modalitats ventilatòries, a la vegada que valida una tècnica senzilla i còmode com l'ecografia per a la monitorització de l'estructura diafragmàtica en aquests pacients. Per a fer-ho es va utilitzar per primera vegada un grup de pacients crítics ventilats, els donants MSIII que sovint estan subjectes a diferents modalitats ventilatòries. En primer lloc es va demostrar que la presència d'un estímul diafragmàtic durant la ventilació pot disminuir l'aparició d'atròfia a nivell diafragmàtic. Concretament, un subgrup de donants MSIII amb més temps sense estímul diafragmàtic (superior a 100 hores) presentaren més atròfia a nivell del múscul diafragma que el subgrup de donants MSIII amb menys temps d'estímul (inferior a 100 hores), sense canvis a nivell de la musculatura perifèrica. En segon lloc, aquesta Tesi també aporta dades que confirmen la utilitat de la ecografia diafragmàtica com a eina per a diagnosticar atròfia. Concretament es va trobar que la presència d'un Tdi valorat per ecografia inferior a 1.7mm permetia fer el diagnòstic d'atròfia amb una sensibilitat del 73%, una especificitat del 67%, i uns valors predictius positius i negatius del 96% i 17% respectivament, confirmant la seva validesa per al diagnòstic d'atròfia.

L'estudi de la VIDD en pacients crítics presenta algunes limitacions derivades de la dificultat d'obtenir mostres de biòpsies diafragmàtiques en el pacient crític i de la dificultat de poder executar les exploracions complementaries necessàries. Això ha condicionat que fins ara, la majoria d'estudis s'hagin realitzat a partir de dos models concrets de pacient crític sotmesos a VMI. El model de pacient crític donant d'òrgans en ME, va ser el pioner en evidenciar l'aparició d'una atròfia diafragmàtica significativa des de fases molt precoces de la VMI, amb un descens de més del 50% de l'àrea de les fibres musculars diafragmàtiques. Aquests pacients, però, sovint tenen abolit el reflex respiratori

previ a la confirmació de la ME i per tant passen la major part del temps en modalitats controlades^{98,189}, la qual cosa no permet estudiar la influència de les diferents modalitats ventilatòries en el desenvolupament de la VIDD. La presència d'atròfia del diafragma, s'ha pogut demostrar també en un altre model de pacients crítics ventilats sotmesos a cirurgia. En aquests estudis, s'ha descrit la presència d'atròfia i de disfunció contràctil del diafragma, compatibles amb alteracions histològiques i funcionals secundaries a VIDD^{26,96,98}. El pacient quirúrgic, però, presenta algunes limitacions com a model d'estudi de VIDD. En l'estudi dut a terme per Van Den Berg et al, la majoria dels pacients que requerien cirurgia ho feien per un episodi de sèpsia i xoc, molts d'ells després de varis dies d'intubació orotraqueal²⁶. En aquesta situació, les alteracions histològiques diafragmàtiques poden estar influenciades per la sèpsia, el xoc i la gravetat de la malaltia, i no permeten discriminar l'efecte que té la VMI *per se*¹⁰⁶. El model de pacient crític donant d'òrgans en assistència controlada (Maastricht III) avaluat en aquesta Tesi, en canvi, permet l'estudi fisiopatològic, histològic i ecogràfic del diafragma sense la influència d'aquests factors previs. A més, aquests donants sovint tenen preservada la funció del centre respiratori i són pacients que es poden ventilar en modalitats assistides o fins i tot espontànies amb diferent grau d'estimulació diafragmàtica. Per tant, l'estudi d'aquest model, a diferència dels previs, permet també avaluar l'impacte de la VMI sobre el diafragma després de l'ús de diferents modalitats ventilatòries.

Per als estudis que conformen aquesta Tesi s'han utilitzat doncs, ambdós tipus de donants d'òrgans (MSIII i ME) i subjectes control. El disseny específic de cadascun d'ells ha fet que els dos tipus de donants formessin part de grups d'estudi diferents: en el primer estudi per a comparar-se entre ells, mentre que compartiren grup en el segon estudi donats els objectius del mateix. Ambdós treballs van comparar les troballes respecte a un grup de controls (CTLS) ventilats la qual cosa els dona robustesa i permet asseverar les troballes. En el segon treball a més, al grup control va ser indispensable per a poder establir els punts de tall utilitzats tant de Tdi mesurat per ecografia com de la mida fibril·lar

histològica per a les poblacions incloses. Malgrat que els dos estudis inclouen subjectes diferents en cada grup, els resultats són coherents sense evidenciar-se diferències significatives en les variables principals entre els grups donants i control dels dos estudis. Els grups CTLS d'ambdós estudis són també de característiques similars als utilitzats per altres autors^{26,96}.

Actualment els intensivistes tenim molt present que un nombre significatiu de pacients crítics pot desenvolupar debilitat muscular (ICU-AW). Aquesta, implica una debilitat significativa a nivell de la musculatura perifèrica, i pot acompanyar o no a l'afectació de la musculatura a nivell respiratori. L'ICU-AW igual que la VIDD té també unes característiques histològiques específiques i pot condicionar de manera significativa el pronòstic¹⁹⁰. S'ha de tenir en compte que només el 50% de pacients crítics que requereixen VMI desenvolupen ICU-AW després de 7 dies de VMI. La VIDD per contra, pot afectar fins al 70% dels pacients, i apareix de manera molt precoç, després de poques hores de l'inici de VMI^{15,98,191}. Els nostres resultats estan alineats amb aquest fenomen ja que en les nostres cohorts, tots els grups de donants ventilats (en ambdós estudis) presentaven una mediana de més de 5 dies de VMI, amb un CSA diafragmàtic disminuït respecte a ambdós grups control. Tot i que no s'ha avaluat en els nostres estudis, aquest fet podria estar en relació a l'associació temporal entre atrofia i temps de VMI que s'ha observat en estudis previs⁹⁶.

Tot i que la VIDD i la ICU-AW poden coexistir, l'afectació diafragmàtica que es troba a les poques hores de la VMI, no es troba en la musculatura perifèrica. De fet, menys de la meitat dels pacients amb VIDD presenta ICU-AW i si aquesta apareix, ho fa més enllà de 7 dies, com és en el cas dels pacients MSIII inclosos en aquesta Tesi, que presentaren una atrofia important a nivell del múscul quàdriceps respecte al grup control¹⁵. En aquest sentit, el grup de pacients MSIII del primer estudi, va requerir més hores de VMI, més hores de sedació i per tant més hores d'immobilització que el grup control i que el grup de donants en ME. En conseqüència, es va veure una major afectació de

la musculatura perifèrica amb una disminució de CSA respecte als dos grups. Tanmateix, no va haver-hi diferències en quant a CSA del diafragma entre els dos grups de donants.

La diferent afectació d'ambdues musculatures (respiratòria i perifèrica) porta als investigadors a atribuir les troballes estructurals i funcionals del diafragma, a l'ús de la VMI i les seves modalitats com a VIDD. El primer treball d'aquesta Tesi a més de comparar ambdós grups de donants analitzà també en el grup de donants Maastricht, aquells amb més hores d'inactivitat diafragmàtica en comparació amb aquells amb menys hores d'inactivitat diafragmàtica. El fet de no trobar canvis a nivell del quàdriceps però sí a nivell de diafragma entre aquests dos subgrups en quant a atrofia (més atrofia en el grup amb més inactivitat), de nou permet atribuir aquests canvis a la VMI, l'únic factor que afecta a una musculatura i no a l'altra. Concretament els resultats suggereixen que l'estímul diafragmàtic, pot ser un factor protector contra l'aparició de miotrauma per desús i per tant de VIDD. Aquest fet ja havia estat estudiat en animals, on s'havia objectivat que l'ús de modalitats espontànies disminueix la degradació proteica i regula l'estrès oxidatiu i per tant podria disminuir o prevenir l'aparició d'atrofia diafragmàtica^{89,192,193}. Fins al moment, però, aquest fenomen no havia estat corroborat en humans. Els resultats d'aquesta Tesi doctoral són coherents amb la literatura publicada fins al moment. La inactivitat muscular pot promoure tant a nivell diafragmàtic com a nivell de musculatura perifèrica la pèrdua de massa muscular a través d'un desequilibri en el sistema de proteòlisi i de proteosintesi que provoca un descens del CSA, és a dir a una atrofia muscular⁹⁵⁻¹⁹⁴. La VMI de fet, és un dels factors més importants que pot contribuir a l'aparició d'immobilitat i afavorir l'aparició d'atrofia tant a nivell diafragmàtic en context de VIDD com a nivell dels músculs no respiratoris¹⁹⁵. Tot i la presència dels canvis en atrofia diafragmàtica dels pacients ventilats en ambdós treballs, no es van objectivar en cap d'ells, canvis a nivell dels percentatges fibril·lars, suggerint que la noxa de la VMI podria no ser prou mantinguda en el temps com per a generar canvis adaptatius del diafragma

o que la situació de gravetat a la que es veuen sotmesos aquests pacients no deixen actuar als mecanismes de compensació. Aquests resultats estan també en la línia del que s'ha reportat per d'altres autors⁹⁶⁻⁹⁸.

Malgrat el coneixement actual de la VIDD, existeixen limitacions importants per al seu estudi. En primer lloc ja s'han tractat prèviament les limitacions que suposa l'estudi del diafragma en pacients ventilats per la dificultat d'obtenir biòpsies i els beneficis que el nou model humà presentat en aquesta Tesi aporta. En segon lloc, no existeixen paràmetres de normalitat estandarditzats a la literatura en quant al CSA diafragmàtic per a pacients sota VMI, així com tampoc en quant a Tdi. És per això que habitualment cada estudi aporta dades d'un grup control a partir del qual comparen les dades dels grups de pacients ventilats. Sovint però, els grups control inclouen pacients de diferent edat, gènere i BMI, factors que podrien influenciar en el CSA i que podrien contribuir a la dispersió que sovint presenten les dades en els diferents grups reportats. Aquest fet i donat que els dos grups control utilitzats en ambdós estudis contenien subjectes diferents, és coherent amb les diferències observades en paràmetres mesurats en les dues cohorts com la CSA. Degut a aquesta limitació, en el segon treball de la Tesi es van utilitzar les dades del grup control per a establir els llindars d'atròfia i de disminució de Tdi que després va permetre valorar la capacitat del paràmetre ecogràfic per al diagnòstic d'atròfia. Malgrat tot, els nostres valors són similars als reportats prèviament a la literatura^{26,96}.

Donada la dificultat per a l'obtenció de mostres histològiques diafragmàtiques, cada cop més, l'ecografia s'ha posicionat en el diagnòstic de l'afectació diafragmàtica per la seva capacitat de visualitzar a temps real l'estructura del diafragma. Així, els canvis estructurals precoços observats a nivell de les fibres diafragmàtiques després de poques hores de VMI també s'han observat en el Tdi valorat per ecografia^{177,178}. Tot i que diversos estudis han utilitzat la disminució del Tdi per a expressar atròfia, fins ara cap estudi havia valorat la relació entre la disminució de la mida de les fibres diafragmàtiques (CSA), que és *gold*

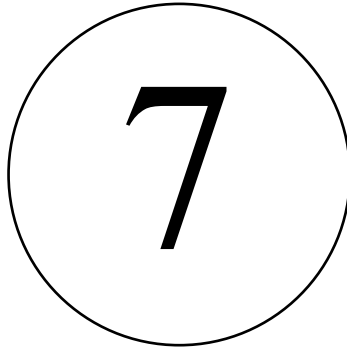
standard per a la valoració d'atròfia, amb el Tdi. Com s'ha comentat, els límits ecogràfics de Tdi tampoc estan establerts i poden variar en els diferents estudis en pacients sans i ventilats (entre 1.6 i 2.3mm)^{90,97,181-183}. En el segon estudi d'aquesta Tesi es va utilitzar la mediana del grup control per a les variables CSA i Tdi com a punt de tall per a definir disminució de la mida o atròfia i disminució de gruix. El punt de tall obtingut per al Tdi va ser de 1.7mm, de nou dins dels rangs descrits a la literatura. Els nostres resultats van demostrar que tots els donants ventilats presentaven atròfia histològica (100%) tot i que només el 74% d'ells tenia un Tdi disminuït. Això suggereix que existeix una associació entre les dues variables (CSA i Tdi), però que no representen el mateix fenomen exactament. Això no és estrany, ja que el Tdi és la mesura de la massa total del múscul, incloent l'espai interfibril·lar i pot estar alterat per altres factors¹⁰⁴⁻¹⁹⁶.

En relació amb els resultats dels nostres dos estudis, Zambon et al. l'any 2016 van publicar el primer estudi ecogràfic del diafragma on es valorava l'impacte de la VMI en el descens de la massa muscular diafragmàtica després del l'ús de varies modalitats ventilatòries⁹⁰. En aquest estudi, l'ús de modalitats controlades va significar un descens diari del Tdi del 7.5%. En canvi, després de l'ús de modalitats espontànies es va objectivar un augment del 2.3% diari. El valor mitjà de Tdi mostrat a l'estudi de Zambon et al. en pacients ventilats va ser de 1.7mm, el mateix valor reportat en el segon treball d'aquesta Tesi com a punt de tall per a definir disminució de gruix diafragmàtic. Per tant, amb les dades obtingudes podríem especular que el descens de Tdi després de l'ús de modalitats controlades objectivat per Zambón et al, podria ser secundari a atròfia diafragmàtica en un 96% dels casos. Tot i així, en aquest cas, seria arriscat extrapolat que l'augment de Tdi podria ser secundari a l'efecte beneficiós de les modalitats espontànies. De fet, el descens o augment significatiu del Tdi durant la VMI, s'ha associat a pitjor pronòstic⁹⁷. Per tant, si l'augment de Tdi és secundari a edema, hipertròfia o altres alteracions intersticials s'haurà d'investigar en altres estudis posteriors.

Ambdós estudis d'aquesta Tesi doctoral tenen limitacions importants. Primer de tot, els grups contenen diferents tipus de pacients (BD i MSIII) i les modalitats ventilatòries no van ser exclusives durant tot el període de ventilació. Tot i així, es tracta de grups de pacients amb poca comorbiditat i poca repercussió de la patologia a nivell sistèmic que permeten ser comparats entre ells. A més, com s'ha comentat, la inclusió del grup MSIII va ser adequada per a l'estudi de la VIDD. Estudis futurs seran necessaris per comparar grups més purs i l'ús de modalitats ventilatòries de manera exclusiva. Aquests permetrien detectar perquè apareix l'atròfia, valorar el nivell de contractilitat diafragmàtica necessària per protegir el diafragma i a la vegada mantenir un escenari segur per evitar la lesió pulmonar¹⁹⁷.

En segon lloc, les dades recollides en els dos estudis inclouen dades histològiques (CSA) i de massa muscular estàtica (Tdi), de manera que només podem evidenciar la repercussió estructural de la VMI però no podem relacionar l'atròfia amb l'alteració funcional associada a la VIDD. De totes maneres, la repercussió histològica en forma d'atròfia per desús és de les primeres alteracions descrites en el miotrauma que provoca la VIDD i aquesta s'ha associat en varis estudis a disfunció contràctil^{95,96}.

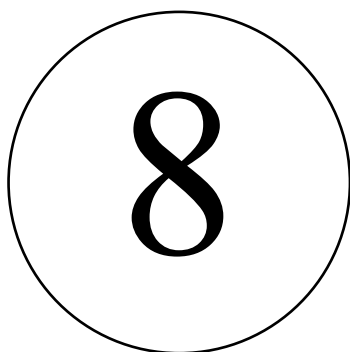
En tercer lloc, el valor de Tdi i CSA utilitzats en ambdós estudis per a la valoració de l'associació entre elles, es basen en el valor de la mediana d'ambdues variables en el grup control. Es tracta d'una mostra petita i la mida de la mostra pot influir en el resultat. De tota manera, donat que existeix un risc associat a l'obtenció de les biòpsies diafragmàtiques en subjectes sans que dificulta la seva recollida¹⁹⁸ i que els valors obtinguts són similars als publicats en la literatura aquesta podria ser la millor aproximació^{26,90,96,181-183}. Són necessaris estudis amb més individus que permetin establir els valors de normalitat d'aquests paràmetres i els llinars a tenir en compte en pacients crítics sotmesos a VMI de cara al maneig de la VIDD.



CONCLUSIONS

7. CONCLUSIONS

1. El model de donants en asistòlia controlada Maastricht III permet l'estudi en humans del dany estructural diafragmàtic rere l'ús de diferents modalitats ventilatòries (controlades, assistides, espontànies).
2. La inactivitat del diafragma durant la ventilació mecànica s'associa a l'aparició de lesió diafragmàtica associada a la ventilació mecànica (VIDD).
3. Mantenir l'estímul diafragmàtic durant la ventilació mecànica a través de modalitats assistides i espontànies, permet atenuar els efectes deleteris que té a nivell del múscul diafragma l'ús de modalitats controlades que aboleixen l'estímul diafragmàtic.
4. L'ecografia és una bona eina per diagnosticar atròfia a través del gruix diafragmàtic en espiració (Tdi), però els conceptes d'àrea fibril·lar i Tdi no s'haurien d'utilitzar com a sinònims.
5. El valor de Tdi inferior a 1.7mm és útil per diagnosticar atròfia però un valor superior a 1.7mm no s'ha d'utilitzar per descartar-la.

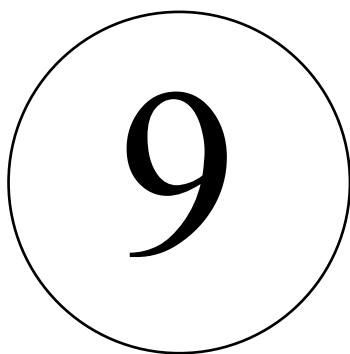


LÍNIES DE FUTUR

8. LÍNIES DE FUTUR

Aquesta Tesi doctoral descriu treballs innovadors i importants en l'àmbit de la VIDD des d'un punt de vista de l'estructura diafragmàtica, concretament mitjançant l'avaluació de l'atròfia. A la vista dels resultats inclosos en els dos articles presentats queda palès que: 1) El model de donants MSIII és de molta utilitat en l'estudi de la VIDD; 2) les modalitats ventilatòries tenen un impacte sobre el desenvolupament d'atròfia diafragmàtica en pacients ventilats i 3) l'ecografia diafragmàtica mitjançant la mesura del Tdi, és una bona eina per diagnosticar atròfia tot i que ambdós conceptes no s'haurien d'utilitzar com a sinònims. Aquests resultats són molt valuosos en aquest camp d'estudi ja que assenten unes bases experimentals que donen sentit als fenòmens clínics. Així doncs, la primera línia de futur que s'obre arrel d'aquesta Tesi és la d'avaluar l'impacte clínic que té la major atròfia observada amb l'ús de modalitats ventilatòries controlades en comparació amb la menor atròfia observada en modalitats assistides o espontànies a nivell de funció diafragmàtica. Per tant, caldrà generar estudis que utilitzin els mateixos models en humans (donants MSIII i en ME) i que permetin avaluar si hi ha diferències a nivell de paràmetres de funció com la Pdi rere l'estimulació del nervi frènic, entre els individus ventilats amb diferents modalitats i a la vegada veure si aquesta variable es correlaciona amb la mida de les fibres musculars (si a més atròfia, més disfunció). En segon lloc, caldrà també aprofundir en els mecanismes moleculars que condueixen a atròfia en la VIDD per a continuar buscant dianes terapèutiques que ajudin a prevenir o revertir els efectes deleteris de la ventilació mecànica. Fins al moment, la principal limitació a l'hora de realitzar aquests estudis derivava de la dificultat per a la recollida de mostres (biòpsies diafragmàtiques), sobretot d'un grup de pacients ventilats en modalitats espontànies. De nou, la utilització del model de pacients MSIII serà molt útil donada la major facilitat per a la recollida de mostres en els pacients donants d'òrgans. Finalment, la validació de l'ecografia diafragmàtica com a eina per a diagnosticar atròfia

i el punt de tall proposat de Tdi 1.7mm (discrimina entre atròfia histològica o normalitat en la mida fibril·lar), obren també una línia de treball dirigida a valorar la importància clínica d'aquells valors de Tdi falsos negatius d'atròfia. En aquest sentit, pacients amb atròfia histològica però Tdi dins dels rangs de normalitat podrien no tenir compromís en la funció diafragmàtica i per tant traduir una menor rellevància clínica d'aquesta troballa. Totes aquestes línies de futur podrien tenir un impacte directe en els pacients crítics ventilats, ja sigui en l'avaluació o maneig de la VIDD, la qual cosa redunda en la importància de les nostres troballes.



BIBLIOGRAFIA

9. BIBLIOGRAFIA

1. Junta Directiva de la Sociedad Española de Medicina Intensiva C y UC (SEMICYUC). Medicina intensiva en España. *Med Intensiva* 2011;35:92–101.
2. Bittner MI, Donnelly M, van Zanten ARH, Andersen JS, Guidet B, Cabello JTT, et al. How is intensive care reimbursed? A review of eight European countries. *Ann Intensive Care* 2013;3:1–9.
3. Palomar M, Álvarez Lerma F, Olaechea P, Gimeno Costa RR, Gracia Arnillas MP, Seijas Betolaza I, et al. Estudio Nacional De Vigilancia De Infección Nosocomial (Envin-Helics). 2019.
4. Catalán-González M, Nuvials X, Gimeno Costa R, Gracia Arnillas MP, Bilbao NM, Palanco JL, et al. Estudio Nacional De Vigilancia De Infección Nosocomial (Envin-Helics). 2020.
5. Vincent JL, Marshall JC, Namendys-Silva SA, François B, Martin-Loeches I, Lipman J, et al. Assessment of the worldwide burden of critical illness: The Intensive Care Over Nations (ICON) audit. *Lancet Respir Med* 2014;2:380–6.
6. Soo A, Zuege DJ, Fick GH, Niven DJ, Berthiaume LR, Stelfox HT, et al. Describing organ dysfunction in the intensive care unit: A cohort study of 20,000 patients. *Crit Care* 2019;23:1–15.
7. Masclans JR, Roca O, Muñoz X, Pallisa E, Torres F, Rello J, et al. Quality of Life, Pulmonary Function, and Tomographic Scan Abnormalities After ARDS. *CHEST J* 2011;139:1340–6.

8. Sivanathan L, Wunsch H, Vigod S, Hill A, Pinto R, Scales DC. Mental illness after admission to an intensive care unit. *Intensive Care Med* 2019;45:1550–8.
9. Herridge MS, Tansey CM, Matté A, Tomlinson G, Diaz-Granados N, Cooper A et al. Functional disability 5 years after acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2011;364:1757–65.
10. Evans L, Rhodes A, Alhazzani W, Antonelli M, Coopersmith CM, French C, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021. *Intensive Care Med* 2021;47:1181–247.
11. Talmor D, Sarge T, Malhotra A, O'Donnell CR, Ritz R, Lisbon A, et al. Mechanical Ventilation Guided by Esophageal Pressure in Acute Lung Injury. *N Engl J Med* 2008;359:2095–104.
12. Marshall JC, Bosco L, Adhikari NK, Connolly B, Diaz J V., Dorman T, et al. What is an intensive care unit? A report of the task force of the World Federation of Societies of Intensive and Critical Care Medicine. *J Crit Care* 2017;37:270–6.
13. Amato MBP, Meade MO, Slutsky AS, Brochard L, Costa ELV, Schoenfeld DA, et al. Driving Pressure and Survival in the Acute Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med* 2015;372:747–55.
14. Bellani G, Laffey JG, Pham T, Fan E, Brochard L, Esteban A, et al. Epidemiology, patterns of care, and mortality for patients with acute respiratory distress syndrome in intensive care units in 50 countries. *JAMA* 2016;315:788–800.

15. Dres M, Dube B, Mayaux J, Delemazure J, Reuter DA, Brochard, Laurent J. et al. Coexistence and Impact of Limb Muscle and Diaphragm Weakness at Time of Liberation from Mechanical Ventilation in Medical Intensive. *Am J Respir Crit Care Med* 2017;195:57–66.
16. Whitelaw WA. Shape and size of the human diaphragm in vivo. *J Appl Physiol* 1987;62:180–6.
17. Shin MS, Berland LL. Computed tomography of retrocrural spaces: Normal, anatomic variants, and pathologic conditions. *Am J Roentgenol* 1985;145:81–6.
18. Verin E, Marie JP, Similowski T. Cartography of human diaphragmatic innervation: Preliminary data. *Respir Physiol Neurobiol* 2011;176:68–71.
19. Sieck GC, Gransee HM. Respiratory muscles. Structure, Function and regulation. 2012.
20. Meznaric M, Cvetko E. Size and Proportions of Slow-Twitch and Fast-Twitch Muscle Fibers in Human Costal Diaphragm. *Biomed Res Int* 2016;2016:1–6.
21. Polla B, D'Antona G, Bottinelli R, Reggiani C. Respiratory muscle fibres: Specialisation and plasticity. *Thorax* 2004;59:808–17.
22. Barreiro E, de la Puente B, Minguella J, Corominas JM, Serrano S, Hussain SNA, et al. Oxidative stress and respiratory muscle dysfunction in severe chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:1116–24.

23. Mizuno M, Secher NH. Histochemical characteristics of human expiratory and inspiratory intercostal muscles. *J Appl Physiol* 1989;67:592–8.
24. Mizuno M. Human respiratory muscles: Fibre morphology and capillary supply. *Eur Respir J* 1991;4:587–601.
25. Levine S, Nguyen T, Kaiser LR, Rubinstein NA, Maislin G, Gregory C, et al. Human diaphragm remodeling associated with chronic obstructive pulmonary disease: Clinical implications. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:706–13.
26. Van Den Berg M, Hooijman PE, Beishuizen A, de Waard MC, Paul MA, Hartemink KJ, et al. Diaphragm atrophy and weakness in the absence of mitochondrial dysfunction in the critically ill. *Am J Respir Crit Care Med* 2017;196:1544–58.
27. Levine S, Bashir MH, Clanton TL, Powers SK, Singhal S. COPD elicits remodeling of the diaphragm and vastus lateralis muscles in humans. *J Appl Physiol* 2013;114:1235–45.
28. Fogarty MJ, Sieck GC. Evolution and functional differentiation of the diaphragm muscle of mammals. *Compr Physiol* 2019;9:715–66.
29. Parthasarathy S, Jubran A, Laghi F, Tobin MJ. Sternomastoid, rib cage, and expiratory muscle activity during weaning failure. *J Appl Physiol* 2007;103:140–7.
30. Tobin MJ. Advances in mechanical ventilation. *N Engl J Med* 2001;344:1986–96.

31. De Backer D, Creteur J, Preiser JC, Dubois MJ, Vincent JL. Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:98–104.
32. Mehta AB, Syeda SN, Wiener RS, Walkey AJ. Epidemiological Trends in Invasive Mechanical Ventilation in the United States: A Population-Based Study. *J Crit Care* 2015;30:1217–21.
33. Esteban A, Anzueto A, Alía I, Gordo F, Apezteguía C, Palizas F, et al. How is mechanical ventilation employed in a pediatric intensive care unit in Brazil? *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1450–8.
34. de Montmollin E, Aboab J, Ferrer R, Azoulay E, Annane D. Criteria for initiation of invasive ventilation in septic shock: An international survey. *J Crit Care* 2016;31:54–7.
35. Richardson S, Hirsch JS, Narasimhan M, Crawford JM, McGinn T, Davidson KW, et al. Presenting Characteristics, Comorbidities, and Outcomes among 5700 Patients Hospitalized with COVID-19 in the New York City Area. *JAMA - J Am Med Assoc* 2020;323:2052–9.
36. Wang Y, Lu X, Li Y, Chen H, Chen T, Su N, et al. Clinical course and outcomes of 344 intensive care patients with COVID-19. *Am J Respir Crit Care Med* 2020;201:1430–4.
37. Blanch L, Bernabé F, Lucangelo U. Measurement of air trapping, intrinsic positive end-expiratory pressure, and dynamic hyperinflation in mechanically ventilated patients. *Respir Care* 2005;50:110–23; discussion 123-124.

38. Guervilly C, Bisbal M, Forel JM, Mechat M, Lehingue S, Bourenne J, et al. Effects of neuromuscular blockers on transpulmonary pressures in moderate to severe acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med* 2017;43:408–18.
39. Rodriguez PO, Tiribelli N, Fredes S, Gogniat E, Plotnikow G, Fernandez Ceballos I, et al. Prevalence of Reverse Triggering in Early ARDS: Results From a Multicenter Observational Study. *Chest* 2021;159:186–95.
40. De Montmollin E, Ruckly S, Schwebel C, Philippart F, Adrie C, Mariotte E, et al. Pneumonia in acute ischemic stroke patients requiring invasive ventilation: Impact on short and long-term outcomes. *J Infect* 2019;79:220–7.
41. Sklar MC, Patel BK, Beitler JR, Piraino T, Goligher EC. Optimal Ventilator Strategies in Acute Respiratory Distress Syndrome. *Semin Respir Crit Care Med* 2019;40:81–93.
42. Slutsky AS, Ranieri VM. Ventilator-Induced Lung Injury. *N Engl J Med* 2013;369:2126–36.
43. Cressoni M, Chiumello D, Algieri I, Brioni M, Chiurazzi C, Colombo A, et al. Opening pressures and atelectrauma in acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med* 2017.
44. Plötz FB, Slutsky AS, Van Vught AJ, Heijnen CJ. Ventilator-induced lung injury and multiple system organ failure: A critical review of facts and hypotheses. *Intensive Care Med* 2004;30:1865–72.
45. Brochard L, Slutsky A, Pesenti A. Mechanical ventilation to minimize progression of lung injury in acute respiratory failure. *Am J Respir Crit Care Med* 2017;195:438–42.

46. Grieco DL, Menga LS, Eleuteri D, Antonelli M. Patient self-inflicted lung injury: Implications for acute hypoxemic respiratory failure and ARDS patients on non-invasive support. *Minerva Anestesiol* 2019;85:1014–23.
47. ARDS Network. Ventilation With Lower Tidal Volumes As Compared With Traditional Tidal Volumes for ALI and the ARDS. *N Engl J Med* 2000;342:1301–8.
48. Network T acute respiratory DS. Ventilation With Lower Tidal Volumes As Compared With Traditional Tidal Volumes for Acute Lung Injury and the Acute Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med* 2000;342:1301–8.
49. Amato MB, Meade MO, Slutsky AS, Brochard L, Costa EL, Schoenfeld DA, et al. Driving pressure and survival in the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2015;372:747–55.
50. Hraiech S, Yoshida T, Annane D, Duggal A, Fanelli V, Gacouin A, et al. Myorelaxants in ARDS patients. *Intensive Care Med* 2020;46:2357–72.
51. Howell MD, Davis AM. Management of ARDS in Adults. *Jama* 2018;319:711–2.
52. Barrot L, Asfar P, Mauny F, Winiszewski H, Montini F, Badie J, et al. Liberal or Conservative Oxygen Therapy for Acute Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med* 2020;382:999–1008.
53. William R Henderson, Lu Chen MBPA and LJB. Fifty Years of Research in ARDS Setting Positive End-expiratory Pressure in the Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2017:1–30.

54. Papazian I, Forel JM GA. Neuromuscular blockers in early acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2008;359:1543–54.
55. Zaragoza R, Vidal-cortés P, Aguilar G, Borges M, Diaz E, Ferrer R, et al. Update of the treatment of nosocomial pneumonia in the ICU. *Crit Care* 2020;24:1–13.
56. Álvarez-Lerma F, Palomar-Martínez M, Sánchez-García M, Martínez-Alonso M, Álvarez-Rodríguez J, Lorente L, et al. Prevention of ventilator-Associated pneumonia: The multimodal approach of the Spanish ICU “pneumonia zero” program. *Crit Care Med* 2018;46:181–8.
57. Lanone S, Taillé C, Boczkowski J, Aubier M. Diaphragmatic fatigue during sepsis and septic shock. *Appl Physiol Intensive Care Med (Second Ed)* 2009:395–401.
58. Thompson BT, Chambers RC, Liu KD. Acute Respiratory Distress Syndrome. Review Article. *N Engl J Med* 2017;6:562–72.
59. Langhans C, Weber-Carstens S, Schmidt F, Hamati J, Kny M, Zhu X, et al. Inflammation-induced acute phase response in skeletal muscle and critical illness myopathy. *PLoS One* 2014;9:e92048.
60. Bednarik J, Vondracek P, Dusek L, Moravcova E, Cundrle I. Risk factors for critical illness polyneuromyopathy. *J Neurol* 2005;252:343–51.
61. Papazian L, Klompas M, Luyt CE. Ventilator-associated pneumonia in adults: a narrative review. *Intensive Care Med* 2020;46:888–906.

62. Devlin JW, Skrobik Y, Gélinas C, Needham DM, Slooter AJC, Pandharipande PP, et al. Clinical Practice Guidelines for the Prevention and Management of Pain, Agitation/Sedation, Delirium, Immobility, and Sleep Disruption in Adult Patients in the ICU. vol. 46. 2018.
63. Shehabi Y, Bellomo R, Kadiman S, Ti LK, Howe B, Reade MC, et al. Sedation intensity in the first 48 hours of mechanical ventilation and 180-day mortality: A multinational prospective longitudinal cohort study. *Crit Care Med* 2018;46:850–9.
64. Stephens RJ, Dettmer MR, Roberts BW, Ablordeppey E, Fowler SA, Kollef MH, et al. Practice patterns and outcomes associated with early sedation depth in mechanically ventilated patients: A systematic review and meta-analysis. *Crit Care Med* 2018;46:471–9.
65. Hermans G, Van den Berghe G. Clinical review: intensive care unit acquired weakness. *Crit Care* 2015;19:274.
66. Scott K, Powers M, Andreas N, Kavazis S, and SL. Prolonged mechanical ventilation alters diaphragmatic structure and function. *Crit Care Med* 2009;37(10 Supp):S347–S353.
67. Urner M, Mitsakakis N, Vorona S, Chen L, Sklar MC, Dres M, et al. Identifying Subjects at Risk for Diaphragm Atrophy During Mechanical Ventilation Using Routinely Available Clinical Data. *Respir Care* 2021;66:551–8.
68. Testelmans D, Maes K, Wouters P, Gosselin N, Deruisseau K, Powers S, et al. Rocuronium exacerbates mechanical ventilation-induced diaphragm dysfunction in rats. *Crit Care Med* 2006;34:3018–23.

69. Moss M, Huang DT, Brower RG, Ferguson ND, Ginde AA, Gong MN, et al. Early neuromuscular blockade in the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2019;380:1997–2008.
70. Hermans G, Van Mechelen H, Clerckx B, Vanhullebusch T, Mesotten D, Wilmer A, et al. Acute outcomes and 1-year mortality of intensive care unit-acquired weakness: A cohort study and propensity-matched analysis. *Am J Respir Crit Care Med* 2014;190:410–20.
71. Cuthbertson BH, Roughton S, Jenkinson D, Maclennan G, Vale L. Quality of life in the five years after intensive care: a cohort study. EQ-5D. *Crit Care* 2010;14:R6.
72. Mendez-Tellez P a, Needham DM. Early Physical Rehabilitation in the ICU and Ventilator Liberation. *Respir Care* 2012;57:1663–9.
73. Pun BT, Balas MC, Barnes-Daly MA, Thompson JL, Aldrich JM, Barr J, et al. Caring for Critically Ill Patients with the ABCDEF Bundle. *Crit Care Med* 2018;47:3–14.
74. Greybeck BJ, Wettergreen M, Hubmayr RD, Boriak AM. Diaphragm curvature modulates the relationship between muscle shortening and volume displacement. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol* 2011;301:76–83.
75. Goligher EC, Brochard LJ, Reid WD, Fan E, Olli S, Slutsky AS, et al. Diaphragmatic myotrauma: a mediator of prolonged ventilation and poor patient outcomes in acute respiratory failure. *Lancet Respir Med* 2018;7:90–8.

76. Capdevila X, Lopez S, Bernard N, Rabischong E, Ramonatxo M, Martinazzo G, et al. Effects of controlled mechanical ventilation on respiratory muscle contractile properties in rabbits. *Intensive Care Med* 2003;29:103–10.
77. Shanely RA, Van Gammeren D, Deruisseau KC, Zergeroglu a M, McKenzie MJ, Yarasheski KE, et al. Mechanical ventilation depresses protein synthesis in the rat diaphragm. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:994–9.
78. Yoshida T, Amato MBP, Kavanagh BP. Understanding spontaneous vs. ventilator breaths: impact and monitoring. *Intensive Care Med* 2018:18–21.
79. Dellamonica J, Lerolle N, Sargentini C, Beduneau G, Di Marco F, Mercat A, et al. PEEP-induced changes in lung volume in acute respiratory distress syndrome. Two methods to estimate alveolar recruitment. *Intensive Care Med* 2011;37:1595–604.
80. Mergoni M, Martelli A, Volpi A, Primavera S, Zuccoli P, Rossi A. Impact of positive end-expiratory pressure on chest wall and lung pressure-volume curve in acute respiratory failure. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:846–54.
81. Laghi FA, Saad M, Shaikh H. Ultrasound and non-ultrasound imaging techniques in the assessment of diaphragmatic dysfunction. *BMC Pulm Med* 2021;21:1–29.
82. Cassart M, Pettiaux N, Gevenois PA, Paiva M, Estenne M. Effect of chronic hyperinflation on diaphragm length and surface area. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:504–8.

83. Jansen D, Jonkman AH, De Vries HJ, Marcus JT, Ottenheijm CAC, Heunks LMA. Positive end-expiratory pressure affects geometry and function of the human diaphragm. *J Appl Physiol* 2021;1328–39.
84. Wilson TA, De Troyer A. Diagrammatic analysis of the respiratory action of the diaphragm. *J Appl Physiol* 2010;108:251–5.
85. Chatburn RL, El-Khatib M, Mireles-Cabodevila E. A taxonomy for mechanical ventilation: 10 fundamental maxims. *Respir Care* 2014;59:1747–63.
86. Flick GR, Bellamy PE, Simmons DH. Diaphragmatic contraction during assisted mechanical ventilation. *Chest* 1989;96:130–5.
87. Putensen C, Zech S, Wrigge H, Zinserling J, Stüber F, Von Spiegel T, et al. Long-term effects of spontaneous breathing during ventilatory support in patients with acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:43–9.
88. Yoshida T, Amato MBP, Kavanagh BP, Fujino Y. Impact of spontaneous breathing during mechanical ventilation in acute respiratory distress syndrome. *Curr Opin Crit Care* 2019;25:192–8.
89. Futier E, Constantin J-M, Combaret L, Mosoni L, Roszyk L, Sapin V, et al. Pressure support ventilation attenuates ventilator-induced protein modifications in the diaphragm. *Crit Care* 2008;12:191.
90. Zambon M, Beccaria P, Matsuno J, Gemma M, Frati E, Colombo S, et al. Mechanical Ventilation and Diaphragmatic Atrophy in Critically Ill Patients. *Crit Care Med* 2016;44:1347–52.

91. Hudson MB, Smuder AJ, Nelson WB, Bruells CS, Levine S, Powers SK. Both High Level Pressure Support Ventilation and Controlled Mechanical Ventilation Induce Diaphragm Dysfunction and Atrophy. *Crit Care Med* 2013;40:1254–60.
92. Gauthier AP, Verbanck S, Estenne M, Segebarth C, Macklem PT, Paiva M. Three-dimensional reconstruction of the in vivo human diaphragm shape at different lung volumes. *J Appl Physiol* 1994;76:495–506.
93. Goligher EC. Myotrauma in mechanically ventilated patients. *Intensive Care Med* 2019;45:881–4.
94. Powers SK, Shanely RA, Coombes JS, Koesterer TJ, McKenzie M, Van Gammeren D, et al. Mechanical ventilation results in progressive contractile dysfunction in the diaphragm. *J Appl Physiol* 2002;92:1851–8.
95. Hooijman PE, Beishuizen A, Witt CC, de Waard MC, Girbes ARJ, Spoelstra-de Man AME, et al. Diaphragm Muscle Fiber Weakness and Ubiquitin-Proteasome Activation in Critically Ill Patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2015;191:1126–38.
96. Jaber S, Petrof BJ, Jung B, Chanques G, Berthet JP, Rabuel C, et al. Rapidly progressive diaphragmatic weakness and injury during mechanical ventilation in humans. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;183:364–71.
97. Goligher EC, Dres M, Fan E, Rubenfeld GD, Scales DC, Herridge MS, et al. Mechanical ventilation-induced diaphragm atrophy strongly impacts clinical outcomes. *Am J Respir Crit Care Med* 2018;197:204–13.

98. Levine S, Nguyen T, Taylor N, Friscia ME, Budak MT, Rothenberg P, et al. Rapid Disuse Atrophy of Diaphragm Fibers in Mechanically Ventilated Humans. *N Engl J Med* 2008;358:1327.
99. Jiang T-X, Reid WD, Road JD. Delayed Diaphragm Injury and Diaphragm Force Production. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:736–42.
100. Reid WD, Huang J, Bryson S, Walker DC, Belcastro AN. Diaphragm injury and myofibrillar structure induced by resistive loading. *J Appl Physiol* 1994;76:176–84.
101. Murias G, Lucangelo U, Blanch L. Patient-ventilator asynchrony. *Curr Opin Crit Care* 2016;22:53–9.
102. Mirabella L, Cinnella G, Costa R, Cortegiani A, Tullo L, Rauseo M, et al. Patient-ventilator asynchronies: Clinical implications and practical solutions. *Respir Care* 2020;65:1751–66.
103. Gea J, Zhu E, Gáldiz JB, Comtois N, Salazkin I, Antonio Fiz J, et al. Functional Consequences of Eccentric Contractions of the Diaphragm. *Arch Bronconeumol* 2009;45:68–74.
104. Lindqvist J, Van Den Berg M, Van Der Pijl R, Hooijman PE, Beishuizen A, Elshof J, et al. Positive end-expiratory pressure ventilation induces longitudinal atrophy in diaphragm fibers. *Am J Respir Crit Care Med* 2018;198:472–85.
105. Dres M, Demoule A. Diaphragm dysfunction during weaning from mechanical ventilation: an underestimated phenomenon with clinical implications. *Crit Care* 2018;22.

106. Demoule A, Jung B, Prodanovic H, Molinari N, Chanques G, Coirault C, et al. Diaphragm dysfunction on admission to the intensive care unit. Prevalence, risk factors, and prognostic impact—a prospective study. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;188:213–9.
107. Jaber S, Petrof BJ, Jung B, Chanques G, Berthet JP, Rabuel C, et al. Rapidly progressive diaphragmatic weakness and injury during mechanical ventilation in humans. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;183:364–71.
108. Hermans G, Agten A, Testelmans D, Decramer M, Gayan-Ramirez G. Increased duration of mechanical ventilation is associated with decreased diaphragmatic force: a prospective observational study. *Crit Care* 2010;14.
109. Dubé B-P, Dres M, Mayaux J, Demiri S, Similowski T, Demoule A. Ultrasound evaluation of diaphragm function in mechanically ventilated patients: comparison to phrenic stimulation and prognostic implications. *Thorax* 2017:1–8.
110. Supinski GS, Ann Callahan L. Diaphragm weakness in mechanically ventilated critically ill patients. *Crit Care* 2013;17.
111. Medrinal C, Prieur G, Frenoy É, Quesada AR, Poncet A, Bonnevie T, et al. Respiratory weakness after mechanical ventilation is associated with one-year mortality —a prospective study. *Crit Care* 2016;20:1–7.
112. Vassilakopoulos T, Petrof BJ. Ventilator-induced Diaphragmatic Dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169:336–41.
113. Le Bourdelles G, Viires N, Boczkowski J, Seta N, Pavlovic D, Aubier M. Effects of mechanical ventilation on diaphragmatic contractile properties in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149:1539–44.

114. Shanely AR, Zergeroglu MA, Lennon SL, Sugiura T, Yimlamai T, Enns D, et al. Mechanical ventilation-induced diaphragmatic atrophy is associated with oxidative injury and increased proteolytic activity. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:1369–74.
115. Hussain SNA, Cornachione AS, Guichon C, Al Khunaizi A, De Souza Leite F, Petrof BJ, et al. Prolonged controlled mechanical ventilation in humans triggers myofibrillar contractile dysfunction and myofilament protein loss in the diaphragm. *Thorax* 2016;71:436–45.
116. Picard M, Jung B, Liang F, Azuelos I, Hussain S, Goldberg P, et al. Mitochondrial dysfunction and lipid accumulation in the human diaphragm during mechanical ventilation. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;186:1140–9.
117. Picard M, Azuelos I, Jung B, Giordano C, Matecki S, Hussain S, et al. Mechanical ventilation triggers abnormal mitochondrial dynamics and morphology in the diaphragm. *J Appl Physiol* 2015;118:1161–71.
118. Smuder AJ, Kavazis AN, Hudson MB, Nelson WB, Powers SK. Oxidation enhances myofibrillar protein degradation via calpain and caspase-3. *Free Radic Biol Med* 2010;49:1152–60.
119. Falk DJ, DeRuisseau KC, Van Gammeren DL, Deering MA, Kavazis AN, Powers SK. Mechanical ventilation promotes redox status alterations in the diaphragm. *J Appl Physiol* 2006;101:1017–24.
120. Sassoon CSH, Caiozzo VJ, Manka A, Sieck GC. Altered diaphragm contractile properties with controlled mechanical ventilation. *J Appl Physiol* 2002;92:2585–95.

121. Radell P, Edström L, Stibler H, Eriksson LI, Ansved T. Changes in diaphragm structure following prolonged mechanical ventilation in piglets. *Acta Anaesthesiol Scand* 2004;48:430–7.
122. Bernard N, Matecki S, Py G, Lopez S, Mercier J, Capdevila X. Effects of prolonged mechanical ventilation on respiratory muscle ultrastructure and mitochondrial respiration in rabbits. *Intensive Care Med* 2003;29:111–8.
123. Supinski GS, Callahan LA. Calpain activation contributes to endotoxin-induced diaphragmatic dysfunction. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2010;42:80–7.
124. Supinski GS, Wang W, Callahan LA. Caspase and calpain activation both contribute to sepsis-induced diaphragmatic weakness. *J Appl Physiol* 2009;107:1389–96.
125. Eikermann M, Koch G, Gerwig M, Ochterbeck C, Beiderlinden M, Koeppen S, et al. Muscle force and fatigue in patients with sepsis and multiorgan failure. *Intensive Care Med* 2006;32:251–9.
126. Dres M, Goligher EC, Heunks LMA, Brochard LJ. Critical illness-associated diaphragm weakness. *Intensive Care Med* 2017;43:1441–52.
127. Puthucheary ZA, Rawal J, McPhail M, Connolly B, Ratnayake G, Chan P, et al. Acute skeletal muscle wasting in critical illness. *JAMA* 2013;310:1591–600.
128. Callahan L a, Supinski GS. Hyperglycemia-induced diaphragm weakness is mediated by oxidative stress. *Crit Care* 2014;18:R88.

129. Sassoan CSH, Zhu E, Pham HT, Nelson RS, Fang L, Baker MJ, et al. Acute effects of high-dose methylprednisolone on diaphragm muscle function. *Muscle Nerve* 2008;38:1161–72.
130. Maes K, Agten A, Smuder A, Powers SK, Decramer M, Gayan-Ramirez G. Corticosteroid effects on ventilator-induced diaphragm dysfunction in anesthetized rats depend on the dose administered. *Respir Res* 2010;11:178.
131. Sarge T, Talmor D. Targeting transpulmonary pressure to prevent ventilator induced lung injury. *Minerva Anesthesiol* 2009;75:293–9.
132. Goligher EC, Fan E. Editorial: Lung and diaphragm-protective ventilation: setting new concepts in historical context. *Curr Opin Crit Care* 2020;26:1–2.
133. Goligher EC, Ferguson ND, Brochard LJ. Clinical challenges in mechanical ventilation. *Lancet* 2016;387:1856–66.
134. Goligher EC, Jonkman AH, Dianti J, Vaporidi K, Beitler JR, Patel BK, et al. Clinical strategies for implementing lung and diaphragm-protective ventilation: avoiding insufficient and excessive effort. *Intensive Care Med* 2020;46:2314–26.
135. Yoshida T, Uchiyama A, Matsuura N, Mashimo T, Fujino Y. The comparison of spontaneous breathing and muscle paralysis in two different severities of experimental lung injury. *Crit Care Med* 2013;41:536–45.
136. Powers SK, DeCramer M, Gayan-Ramirez G, Levine S. Pressure support ventilation attenuates ventilator-induced protein modifications in the diaphragm. commentary. *Crit Care* 2008;12:191.

137. Goligher EC, Dres M, Patel BK, Sahetya SK, Beitler JR, Telias I, et al. Lung- And diaphragm-protective ventilation. *Am J Respir Crit Care Med* 2020;202:950–61.
138. Talmor D, Sarge T, O'Donnell CR, Ritz R, Malhotra A, Lisbon A, et al. Esophageal and transpulmonary pressures in acute respiratory failure. *Crit Care Med* 2006;34:1389–94.
139. Amato MB, Valente CS, Medeiros DM, Borges R, Schettino GPP, Lorenzi-Filho G, et al. Effect of a Protective-Ventilation Strategy on Mortality in the Acute Respiratory Distress Syndrome Effect of a Protective-Ventilation Strategy on Mortality in the Acute Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med* 1998;338:347–54.
140. Mauri T, Cambiagli B, Spinelli E, Langer T, Grasselli G. Spontaneous breathing: A double-edged sword to handle with care. *Ann Transl Med* 2017;5:1–11.
141. Lambell KJ, Tatuco-Babet OA, Chapple L, Gantner D, Ridley EJ. Nutrition therapy in critical illness: a review of the literature for clinicians. *Crit Care* 2020;24:35.
142. Powers SK, Hudson MB, Nelson WB, Talbert EE, Min K, Szeto HH, et al. Mitochondria-targeted antioxidants protect against mechanical ventilation-induced diaphragm weakness. *Crit Care Med* 2011;39:1749–59.
143. Yu TJ, Liu YC, Chu CM, Hu HC, Kao KC. Effects of theophylline therapy on respiratory muscle strength in patients with prolonged mechanical ventilation: A retrospective cohort study. *Medicine (Baltimore)* 2019;98:e13982.

144. Agten A, Maes K, Thomas D, Cielen N, Van Hees HWH, Dekhuijzen RPN, et al. Bortezomib partially protects the rat diaphragm from ventilator-induced diaphragm dysfunction. *Crit Care Med* 2012;40:2449–55.
145. Hooijman Pleuni E. BA. Diaphragm Fiber Strength Is Reduced in Critically Ill Patients and Restored by a Troponin Activator. *Am J Respir Crit Care Med* 2014;189.
146. Doorduyn J, Sinderby CA, Beck J, Stegeman DF, van Hees HWH, van der Hoeven JG, et al. The calcium sensitizer levosimendan improves human diaphragm function. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;185:90–5.
147. Schellekens W-JM, van Hees HWH, Doorduyn J, Roesthuis LH, Scheffer GJ, van der Hoeven JG, et al. Strategies to optimize respiratory muscle function in ICU patients. *Crit Care* 2016;20:103.
148. Menges D, Seiler B, Tomonaga Y, Schwenkglens M, Puhan MA, Yeboyo HG. Systematic early versus late mobilization or standard early mobilization in mechanically ventilated adult ICU patients: systematic review and meta-analysis. *Crit Care* 2021;25:1–24.
149. Reynolds SC, Meyyappan R, Thakkar V, Tran BD, Nolette MA, Sadrangani G, et al. Mitigation of ventilator-induced diaphragm atrophy by transvenous phrenic nerve stimulation. *Am J Respir Crit Care Med* 2017;195:339–48.
150. NCT03783884. A Protocol Comparing Temporary Transvenous Diaphragm Pacing to Standard of Care for Weaning From Mechanical Ventilation. <https://ClinicalTrialsGov/Show/NCT03783884> 2018:1–7.

151. Akoumianaki E, Maggiore SM, Valenza F, Bellani G, Jubran A, Loring SH, et al. The application of esophageal pressure measurement in patients with respiratory failure. *Am J Respir Crit Care Med* 2014;189:520–31.
152. Mier A, Brophy C, Moxham J, Green M. Twitch pressures in the assessment of diaphragm weakness. *Thorax* 1989;44:990–6.
153. Laveneziana P, Albuquerque A, Aliverti A, Babb T, Barreiro E, Dres M, et al. ERS statement on respiratory muscle testing at rest and during exercise. *Eur Respir J* 2019;53.
154. Cattapan SE, Laghi F, Tobin MJ. Can diaphragmatic contractility be assessed by airway twitch pressure in mechanically ventilated patients? *Thorax* 2003;58:58–62.
155. Benditt JO. Esophageal and gastric pressure measurements. *Respir Care* 2005;50:68–75; discussion 75-77.
156. Yoshida T, Brochard L. Esophageal pressure monitoring: Why, when and how? *Curr Opin Crit Care* 2018;24:216–22.
157. Podnar S, Doorduyn J. Safety of needle electromyography of the diaphragm: Anterior lung margins in quietly breathing healthy subjects. *Muscle and Nerve* 2016;54:54–7.
158. Hutten GJ, van Thuijl HF, van Bellegem ACM, van Eykern LA, van Aalderen WMC. A literature review of the methodology of EMG recordings of the diaphragm. *J Electromyogr Kinesiol* 2010;20:185–90.

159. Jolley CJ, Luo YM, Steier J, Reilly C, Seymour J, Lunt A, et al. Neural respiratory drive in healthy subjects and in COPD. *Eur Respir J* 2009;33:289–97.
160. Barwing J, Pedroni C, Olgemöller U, Quintel M, Moerer O. Electrical activity of the diaphragm (EAdi) as a monitoring parameter in difficult weaning from respirator: a pilot study. *Crit Care* 2013;17:R182.
161. Moss M, Yang M, Macht M, Sottile P, Gray L, McNulty M, et al. Screening for critical illness polyneuromyopathy with single nerve conduction studies. *Intensive Care Med* 2014;40:683–90.
162. Stegeman DF, Blok JH, Hermens HJ, Roeleveld K. Surface EMG models: Properties and applications. *J Electromyogr Kinesiol* 2000;10:313–26.
163. Laporta D, Grassino A. Assessment of transdiaphragmatic pressure in humans. *J Appl Physiol* 1985;58:1469–76.
164. Jansen D, Jonkman AH, Roesthuis L, Gadgil S, Van Der Hoeven JG, Scheffer G-JJ, et al. Estimation of the diaphragm neuromuscular efficiency index in mechanically ventilated critically ill patients. *Crit Care* 2018;22:1–8.
165. Dres M, Schmidt M, Ferre A, Mayaux J, Similowski T, Demoule A. Diaphragm electromyographic activity as a predictor of weaning failure. *Intensive Care Med* 2012;38:2017–25.
166. Dass C, Dako F, Simpson S, Marchetti N, Steiner R, Criner G. Sonographic evaluation of diaphragmatic dysfunction: Technique, interpretation, and clinical applications. *J Thorac Imaging* 2019;34:W131–40.

167. Lloyd T, Tang YM, Benson MD, King S. Diaphragmatic paralysis: The use of M mode ultrasound for diagnosis in adults. *Spinal Cord* 2006;44:505–8.
168. Goligher EC, Laghi F, Detsky ME, Farias P, Murray A, Brace D, et al. Measuring diaphragm thickness with ultrasound in mechanically ventilated patients: feasibility, reproducibility and validity. *Intensive Care Med* 2015;41:642–9.
169. Dres M, Rittayamai N, Brochard L. Monitoring patient-ventilator asynchrony. *Curr Opin Crit Care* 2016;22:246–53.
170. Pasero D, Koeltz A, Placido R, Fontes Lima M, Haun O, Rienzo M, et al. Improving ultrasonic measurement of diaphragmatic excursion after cardiac surgery using the anatomical M-mode: a randomized crossover study. *Intensive Care Med* 2015;41:650–6.
171. Boussuges A, Gole Y, Blanc P. Diaphragmatic motion studied by M-mode ultrasonography. Methods, Reproducibility, and Normal Values. *Chest* 2009;135:391–400.
172. Nason LK, Walker CM, Mcneeley MF, Burivong W, Fligner CL, David Godwin J. Imaging of the diaphragm: Anatomy and function. *Radiographics* 2012;32:51–71.
173. Kim K, Jang DM, Park JY, Yoo H, Kim HS, Choi WJ. Changes of diaphragmatic excursion and lung compliance during major laparoscopic pelvic surgery: A prospective observational study. *PLoS One* 2018;13:1–9.

174. Matamis D, Soilemezi E, Tsagourias M, Akoumianaki E, Dimassi S, Boroli F, et al. Sonographic evaluation of the diaphragm in critically ill patients. Technique and clinical applications. *Intensive Care Med* 2013;39:801–10.
175. Boussuges A, Brégeon F, Blanc P, Gil JM, Poirette L. Characteristics of the paralysed diaphragm studied by M-mode ultrasonography. *Clin Physiol Funct Imaging* 2019;39:143–9.
176. Wait JL, Nahormek PA, Yost WT, Rochester DP. Diaphragmatic thickness-lung volume relationship in vivo. *J Appl Physiol* 1989;67:1560–8.
177. Grosu HB, Ost DE, Lee YI, Song J, Li L, Eden E, et al. Diaphragm Muscle Thinning in Subjects Receiving Mechanical Ventilation and Its Effect on Extubation. *Respir Care* 2017;62:904–11.
178. Goligher EC, Fan E, Herridge MS, Murray A, Vorona S, Brace D, et al. Evolution of Diaphragm Thickness During Mechanical Ventilation: Impact of Inspiratory Effort. *Am J Respir Crit Care Med* 2015;192:1–56.
179. Boon AJ, Harper CJ, Ghahfarokhi LS, Strommen JA, Watson JC, Sorenson EJ. Two-dimensional ultrasound imaging of the diaphragm: Quantitative values in normal subjects. *Muscle and Nerve* 2013;47:884–9.
180. Sklar MC, Dres M, Fan E, Rubenfeld GD, Scales DC, Herridge MS, et al. Association of Low Baseline Diaphragm Muscle Mass with Prolonged Mechanical Ventilation and Mortality among Critically Ill Adults. *JAMA Netw Open* 2020;3:1–14.

181. Carrillo-Esper R, Pérez-Calatayud ÁA, Arch-Tirado E, Díaz-Carrillo MA, Garrido-Aguirre E, Tapia-Velazco R, et al. Standardization of sonographic diaphragm thickness evaluations in healthy volunteers. *Respir Care* 2016;61:920–4.
182. Baldwin CE, Paratz JD, Bersten AD. Diaphragm and peripheral muscle thickness on ultrasound: Intra-rater reliability and variability of a methodology using non-standard recumbent positions. *Respirology* 2011;16:1136–43.
183. Boon AJ, Harper CJ, Ghahfarokhi LS, Strommen J a., Watson JC, Sorenson EJ. Two-dimensional ultrasound imaging of the diaphragm: Quantitative values in normal subjects. *Muscle and Nerve* 2013;47:884–9.
184. Grosu HB, Lee YI, Lee J, Eden E, Eikermann M, Rose KM. Diaphragm muscle thinning in patients who are mechanically ventilated. *Chest* 2012;142:1455–60.
185. Schepens T, Verbrugge W, Dams K, Corthouts B, Parizel PM, Jorens PG. The course of diaphragm atrophy in ventilated patients assessed with ultrasound: a longitudinal cohort study. *Crit Care* 2015;19:422.
186. Vivier E, Dessap AM, Dimassi S, Vargas F, Lyazidi A, Thille AW, et al. Diaphragm ultrasonography to estimate the work of breathing during non-invasive ventilation. *Intensive Care Med* 2012;38:796–803.
187. Umbrello M, Formenti P, Longhi D, Galimberti A, Piva I, Pezzi A, et al. Diaphragm ultrasound as indicator of respiratory effort in critically ill patients undergoing assisted mechanical ventilation: a pilot clinical study. *Crit Care* 2015;19:1–10.

188. Macgowan NA, Evans KG, Road JD, Reid WD. Diaphragm injury in individuals with airflow obstruction. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:1654–9.
189. Greer DM, Shemie SD, Lewis A, Torrance S, Varelas P, Goldenberg FD, et al. Determination of Brain Death/Death by Neurologic Criteria: The World Brain Death Project. *J Am Med Assoc* 2020;324:1078–97.
190. De Jonghe B, Bastuji-Garin S, Sharshar T, Outin H, Brochard L. Does ICU-acquired paresis lengthen weaning from mechanical ventilation? *Intensive Care Med* 2004;30:1117–21.
191. Garnacho-Montero J, Amaya-Villar R, García-Garmendía JL, Madrazo-Osuna J, Ortiz-Leyba C. Effect of critical illness polyneuropathy on the withdrawal from mechanical ventilation and the length of stay in septic patients. *Crit Care Med* 2005;33:349–54.
192. Sassoon CSH, Zhu E, Caiozzo VJ. Assist-control mechanical ventilation attenuates ventilator-induced diaphragmatic dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:626–32.
193. Hudson MB, Smuder AJ, Nelson WB, Wiggs MP, Shimkus KL, Fluckey JD, et al. Partial Support Ventilation and Mitochondrial-Targeted Antioxidants Protect against Ventilator-Induced Decreases in Diaphragm Muscle Protein Synthesis. *PLoS One* 2015;10:e0137693.
194. Latronico N, Herridge M, Hopkins RO, Angus D, Hart N, Hermans G, et al. The ICM research agenda on intensive care unit-acquired weakness. *Intensive Care Med* 2017;43:1270–81.

- 195.** Jolley SE, Bunnell AE, Hough CL. ICU-Acquired Weakness. *Chest* 2016;150:1129–40.
- 196.** Scott A, Wang X, Road J., Reid WD. Increased injury and intramuscular collagen of the diaphragm in COPD: autopsy observations. *Eur Respir J* 2006;27:51–9.
- 197.** Bertoni M, Spadaro S, Goligher EC. Monitoring Patient Respiratory Effort during Mechanical Ventilation: Lung and Diaphragm-Protective Ventilation. *Crit Care* 2020;24.
- 198.** Noullet S, Romero N, Menegaux F, Chapart M, Demoule A, Morelot-Panzini C, et al. A novel technique for diaphragm biopsies in human patients. *J Surg Res* 2015;196:395–8.

10

ANNEXES

10. ANNEXES

10.1. Document aprovació dels estudis per el comitè d'ètica



Informe del Comitè Ètico de Investigación Clínica

Doña M^a Teresa Navarra Alcrudo Secretaria del Comitè Ètico de Investigación Clínica
Parc de Salut MAR

CERTIFICA

Que este Comitè ha evaluado el proyecto de investigación clínica nº 2017/7183/I titulado *"Impacto de las diferentes modalidades ventilatorias en la disfunción muscular diafragmática asociada a la ventilación mecánica."* propuesto por la Dra. JUDITH MARIN CORRAL del servicio de Medicina Intensiva del Hospital del Mar.

Que adjunta documento de consentimiento informado.

Y que considera que:

Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.

La capacidad del investigador y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

El alcance de las compensaciones económicas que se solicitan está plenamente justificado.

Y que este Comitè acepta que dicho proyecto de investigación sea realizado en el Hospital del Mar por la Dra. MARIN como investigadora principal tal como recoge el ACTA de la reunión del día 14 de Febrero de 2017.

Lo que firmo en Barcelona, a 10 de Abril de 2017

COMITÈ ÈTIC DE INVESTIGACIÓ CLÍNICA
CEIC - PARC DE SALUT MAR

Firmado:
Doña M^a Teresa Navarra Alcrudo

10.2. Diligència voluntat de donació MSIII



Unitat de Coordinació Trasplantaments i Donació d'Òrgans

Trasplantament. Diligència de voluntat de donació

DADES DEL DONANT

Cognoms i nom

DADES DEL/S DECLARANT/S (majors d'edat)

Cognoms i nom	Relació amb difunt	Adreça

DECLAREM:

L'absència de coneixement d'oposició expressa del difunt perquè després de la seva mort es faci l'extracció dels seus òrgans i teixits amb finalitats terapèutiques i científiques.

Que hem rebut la informació del procés de donació d'òrgans i teixits, donant el consentiment de la possibilitat de canul·lació arterial i venosa prèvia a la defunció i administració de medicació, en condicions òptimes de sedoanalgesia per a la posterior preservació dels òrgans a trasplantar després de la mort.

Signatures

Data

10.4. Fulla d'informació i consentiment informat de biòpsia muscular als pacients control.

INFORMACIÓN PARA EL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA UN ESTUDIO CON MUESTRAS BIOLÓGICAS QUE SE CONSERVAN CODIFICADAS

Proyecto de investigación titulado : *Impacto de las diferentes modalidades ventilatorias en la disfunción muscular diafragmática asociada a la ventilación mecánica.*

Investigador principal Dra. Judith Marin Corral/Irene Dot Jordana.

Servicio Medicina Intensiva

Objetivos:

Se trata de un estudio en el Hospital del Mar de Barcelona, dirigido a los pacientes que ingresan en el Servicio de Medicina Intensiva que precisan ventilación mecánica durante unos días por cualquier motivo y a los que se puede acceder a tomarles una muestra de musculatura respiratoria (diafragma) y periférica (cuádriceps). Los pacientes críticos que precisan una máquina que les suple la ventilación (ventilador) durante más de 24 horas sufren una afectación importante en la musculatura respiratoria (músculo diafragma) que tiene importantes repercusiones a la hora de retirarles dicho soporte ventilatorio (necesidad de mayor tiempo de destete de la ventilación mecánica) con las importantes consecuencias que esto puede suponer. Esta disfunción muscular diafragmática asociada al ventilador se conoce como VIDD y creemos que puede desarrollarse en mayor o menor grado según la modalidad que utilicemos a la hora de ventilar. Nuestra hipótesis es que la utilización de modalidades espontáneas podría comportar menor disfunción de la musculatura respiratoria que modalidades controladas.

Para confirmar el efecto de la ventilación mecánica en la musculatura respiratoria necesitamos compararlo con una musculatura periférica (en este caso músculo cuádriceps) y además con una cohorte de pacientes sanos que sean sometidos a ventilación mecánica por un periodo corto de tiempo, como en su caso, durante una cirugía. Dado que en la cirugía a la que se va a someter se realiza un abordaje torácico con exposición de la musculatura respiratoria, le pedimos su consentimiento para incluirle en este estudio y que le podamos tomar una muestra (biopsia) del músculo diafragma y del músculo cuádriceps, así como una muestra de sangre.

Participación voluntaria

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria y que puede decidir no participar o cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio alguno en su tratamiento.

Beneficios:

Es posible que de su participación en este estudio no obtenga un beneficio directo. Sin embargo, un mejor conocimiento de las bases moleculares de este fenómeno de disfunción muscular podría beneficiar en un futuro a otros pacientes que la sufren y contribuir para el desarrollo de nuevas terapias.

Procedimientos del estudio:

Si decide participar, se recopilarán algunos datos referentes a usted que su facultativo de referencia haya escrito en su historia clínica. Una vez usted ya esté anestesiado e intubado se procederá a la realización de la biopsia de cuádriceps (en el muslo de una de las dos piernas) por parte de un médico intensivista. En cuanto el cirujano torácico lo considere oportuno, él mismo tomará una muestra del músculo diafragma durante la cirugía. También durante la cirugía se tomará la muestra de sangre de una de las vías venosas que ya llevará colocadas.

Molestias y posibles riesgos:

Las biopsias de los músculos diafragma y cuádriceps aportarán una valiosa información de la que se podría beneficiar usted y futuros pacientes. Ambas se realizarán para obtener pequeñas muestras musculares, aunque de gran importancia ya que permitirán conocer la estructura de los músculos. Dichas muestras musculares permitirán analizar la posible relación existente entre la estructura muscular y su estado de salud.

Las muestras de musculatura respiratoria (diafragma) se obtendrán siempre en el acto quirúrgico (toracotomía) médicamente indicado como tratamiento de su enfermedad. Por tanto, la obtención de las muestras musculares no supondrá ninguna pérdida de tiempo para usted. Tras la intervención quirúrgica, que tendrá la duración necesaria derivada del propio proceso, usted solo notará los síntomas directamente relacionados con el propio acto quirúrgico. La toma de la biopsia de cuádriceps es un procedimiento rutinario practicado por los médicos y científicos responsables del presente proyecto. Se trata de obtener una pequeña muestra (5mm) superficial de un músculo de la pierna. La toma se realizará estando usted sedado de manera que no sentirá molestias. Tras la toma biopsia del músculo usted notará un leve escozor en la zona de punción durante un par de días. La extracción de muestras de sangre no le comportará un nuevo pinchazo ya que usted tendrá colocada una vía en la vena para la extracción de muestras de sangre.

Protección de datos personales:

De acuerdo con la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre de Protección de Datos de Carácter Personal, los datos personales que se obtengan serán los necesarios para cubrir los fines del estudio. En ninguno de los informes del estudio aparecerá su nombre, y su identidad no será revelada a persona alguna salvo para cumplir con los fines del estudio, y en el caso de urgencia médica o requerimiento legal.

Cualquier información de carácter personal que pueda ser identificable será conservada por métodos informáticos en condiciones de seguridad por la Dra Judith Marin, o por una institución designada por ella. El acceso a dicha información quedará restringido al personal de Medicina Intensiva, designado al efecto o a otro personal autorizado que estará obligado a mantener la confidencialidad de la información.

De acuerdo con la ley vigente, tiene usted derecho al acceso de sus datos personales; asimismo, y si está justificado, tiene derecho a su rectificación y cancelación. Si así lo desea, deberá solicitarlo al médico que le atiende en este estudio.

Sólo se transmitirán a terceros y a otros países los datos recogidos para el estudio que en ningún caso contendrán información que le pueda identificar directamente, como nombre y apellidos, iniciales, dirección, número de la seguridad social, etc. En el caso de que se produzca esta cesión, será para los mismos fines del estudio descrito y garantizando la confidencialidad como mínimo con el nivel de protección de la legislación vigente en nuestro país.

El acceso a su información personal quedará restringido al médico del estudio / colaboradores, autoridades sanitarias, al Comité Ético de Investigación Clínica y personal autorizado por el Promotor, cuando lo precisen para comprobar los datos y procedimientos del estudio, pero siempre manteniendo la confidencialidad de estos de acuerdo a la legislación vigente.

Uso futuro de las muestras:

Además, le pedimos su consentimiento para que autorice al investigador a almacenar su muestra para realizar otros estudios relacionados con su enfermedad. Si autoriza que el material biológico obtenido se utilice en estas investigaciones, sus datos se mantendrán codificados a fin de garantizar la confidencialidad en su utilización, tal como prevé la legislación vigente. Por razones de seguridad, las muestras se guardarán centralizadas en el IMIM de Barcelona.

Su muestra sólo se utilizará en proyectos de investigación aprobados por el Comité de Ética de la Investigación del Hospital.

Si necesita más información sobre este estudio puede contactar con el investigador responsable, el/la **Dra. Judith Marin Corral y la Dra. Irene Dot del Servicio de Medicina Intensiva Tel. 932 483 014.**

Derecho de revocación del consentimiento:

Su participación en el estudio es totalmente voluntaria, y si decide no participar recibirá todos los cuidados médicos que necesite y la relación con el equipo médico que le atiende no se verá afectada.

Si cambia de opinión después de dar muestras para el estudio, puede pedir que se destruya su muestra; para ello puede contactar con el/la Dra Judith Marin o la Dra. Irene Dot del Servicio de Medicina Intensiva.

Título del estudio: *Impacto de las diferentes modalidades ventilatorias en la disfunción muscular diafragmática asociada a la ventilación mecánica*

Yo (nombre y apellidos) _____, he leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He hablado con: _____ (nombre del investigador).

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- 1 Cuando quiera
- 2 Sin tener que dar explicaciones
- 3 Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Punto 1: DOY NO DOY mi consentimiento voluntariamente para que pueda realizarse el estudio.

Punto 2: DOY NO DOY mi consentimiento voluntariamente para que mis muestras biológicas se almacenen para utilizarlas en otros estudios sobre otros factores relacionados con el mismo tema. Todas las muestras se identificarán con un número codificado, y mi identidad se mantendrá en secreto.

Fecha y firma del participante

Fecha y firma del investigador

10.5. Articles publicats relacionats amb aquesta tesi

Arch Bronconeumol. 2017;53(3):150-156



ARCHIVOS DE
Bronconeumología

www.archbronconeumol.org



Revisión

Disfunción diafragmática: una realidad en el paciente ventilado mecánicamente



Irene Dot^{a,b}, Purificación Pérez-Teran^{a,b}, Manuel-Andrés Samper^{a,b} y Joan-Ramon Masclans^{a,b,c,d,*}

^a Servicio de Medicina Intensiva, Hospital del Mar-Parc de Salut Mar de Barcelona, Barcelona, España

^b Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques (IMIM)-GREPAC, Barcelona, España

^c Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, España

^d CIBERES, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 17 de diciembre de 2015

Aceptado el 17 de julio de 2016

On-line el 21 de agosto de 2016

Palabras clave:

Diafragma

Disfunción diafragmática

Ventilación mecánica

Ecografía

R E S U M E N

La afectación muscular del paciente crítico está presente en la mayoría de pacientes que ingresan en el servicio de medicina intensiva (SMI). La alteración, en particular, del músculo diafragmático, inicialmente englobada en esta categoría, se ha diferenciado en los últimos años y se ha demostrado la existencia de una disfunción muscular propia de los pacientes sometidos a ventilación mecánica. En este subgrupo de pacientes encontramos una disfunción muscular que aparece de manera precoz después del inicio de la ventilación mecánica y que se relaciona principalmente con el uso de modalidades control, la presencia de sepsis y/o de fracaso multiorgánico. Aunque se desconoce la etiología concreta que desencadena el proceso, el músculo presenta procesos de estrés oxidativo y alteración mitocondrial que provocan un desequilibrio en la síntesis proteica, con el resultado de atrofia y alteración de la contractilidad y, como consecuencia, una menor funcionalidad. No fue, de hecho, hasta 2004 cuando Vassilakopoulos et al. describieron el término «disfunción diafragmática asociada a ventilación mecánica», que, junto a la lesión por sobredistensión pulmonar y por barotrauma, representan un reto en el día a día de los pacientes ventilados.

La disfunción diafragmática tiene influencia en el pronóstico, retardando la extubación, aumentando la estancia hospitalaria y afectando la calidad de vida de estos pacientes en los años siguientes al alta hospitalaria. La ecografía, como técnica no invasiva y accesible en la mayoría de unidades, podría ser de utilidad en el diagnóstico precoz para iniciar, de forma avanzada, la rehabilitación e influir positivamente en el pronóstico de estos enfermos.

© 2016 SEPAR. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Diaphragm Dysfunction in Mechanically Ventilated Patients

A B S T R A C T

Muscle involvement is found in most critical patients admitted to the intensive care unit (ICU). Diaphragmatic muscle alteration, initially included in this category, has been differentiated in recent years, and a specific type of muscular dysfunction has been shown to occur in patients undergoing mechanical ventilation. We found this muscle dysfunction to appear in this subgroup of patients shortly after the start of mechanical ventilation, observing it to be mainly associated with certain control modes, and also with sepsis and/or multi-organ failure. Although the specific etiology of process is unknown, the muscle presents oxidative stress and mitochondrial changes. These cause changes in protein turnover, resulting in atrophy and impaired contractility, and leading to impaired functionality. The term 'ventilator-induced diaphragm dysfunction' was first coined by Vassilakopoulos et al. in 2004, and this phenomenon, along with injury cause by over-distention of the lung and barotrauma, represents a challenge in the daily life of ventilated patients.

Keywords:

Diaphragm

Diaphragmatic dysfunction

Mechanical ventilation

Ultrasound

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: jrmascians@parcdesalutmar.cat (J.-R. Masclans).

Diaphragmatic dysfunction affects prognosis by delaying extubation, prolonging hospital stay, and impairing the quality of life of these patients in the years following hospital discharge. Ultrasound, a non-invasive technique that is readily available in most ICUs, could be used to diagnose this condition promptly, thus preventing delays in starting rehabilitation and positively influencing prognosis in these patients.

© 2016 SEPAR. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

La ventilación mecánica (VM) ha sido utilizada a lo largo de la historia como una herramienta fundamental en el tratamiento de los pacientes con insuficiencia respiratoria, lo que ha permitido una mejoría en su pronóstico. Casi el 40% de los pacientes ventilados mecánicamente presentarán dificultades en la desconexión de la VM, que pueden ser de causa multifactorial. Un retraso en la desconexión puede implicar un aumento de la estancia en los servicios de medicina intensiva (SMI), así como un peor pronóstico¹⁻³ y un aumento de la mortalidad de casi el 12% respecto a los pacientes que no la presentan⁴.

Es en las últimas décadas cuando se ha centrado la atención en el estudio de la disfunción diafragmática inducida por la ventilación (DDIV)⁵ como una complicación más de la VM. Este término hace referencia a la disfunción diafragmática que se produce de forma precoz tras la instauración de la VM⁶. La existencia de DDIV empeora el pronóstico y se asocia a un fracaso en la extubación, con un aumento de los días de VM⁷⁻¹² y de la mortalidad¹³⁻¹⁶. No obstante, en la actualidad no se realiza una monitorización rutinaria de la función diafragmática en muchas unidades, por lo que cabe pensar que esta entidad se encuentra sistemáticamente infradiagnosticada¹⁷.

Disfunción diafragmática inducida por la ventilación mecánica

Aunque la debilidad de la musculatura respiratoria se podría incluir dentro de la afectación muscular global del paciente crítico, en la última década se ha desarrollado el concepto de DDIV¹⁸. Este término se refiere a la disfunción de la musculatura diafragmática secundaria al efecto negativo de la propia VM y que puede ocurrir, en paralelo o no, con la afectación del resto de musculatura.

Estudios previos habían descrito que la completa inactividad diafragmática que se producía en los pacientes ventilados con modalidades controladas producía una pérdida rápida y progresiva de la función diafragmática^{19,20}. Sin embargo, fue Vassilakopoulos quien, por primera vez en 2004, acuñó el término DDIV¹⁸. La DDIV se define como un descenso progresivo de la fuerza muscular diafragmática que ocurre de forma precoz tras el inicio de la VM^{8,21}. La importancia clínica de la DDIV radica en su pronta aparición y afecta hasta a un 65% de los pacientes ventilados⁷.

Fisiopatología de la disfunción diafragmática inducida por la ventilación

Son varios los estudios que han demostrado que la utilización de modalidades de VM controlada (VMC), donde el esfuerzo inspiratorio no proviene del paciente y no se realiza una contracción activa del diafragma, producen en menos de 24 h una disfunción contráctil y atrofia diafragmática tanto en animales de experimentación como en humanos^{20,22,23}. El músculo atrofico presenta una pérdida de fuerza y una menor excursión diafragmática debida a la disminución del área de sección transversal de las fibras musculares, que se traduce en una menor capacidad inspiratoria^{7,24}. A

continuación se exponen los fundamentos fisiopatológicos que se asocian a la DDIV.

Atrofia diafragmática

La atrofia diafragmática inducida por la VMC ocurre de manera extremadamente rápida²². En animales de experimentación, en las primeras 12-18 h de VMC ya se puede evidenciar una atrofia diafragmática significativa, sin observarse signos de atrofia periférica²⁵. Por tanto, la atrofia diafragmática inducida por la VM es significativamente mayor a la atrofia por desuso que se produce en la musculatura esquelética²². El grupo de Levine encontró hallazgos similares en pacientes ventilados con VMC entre las 18 y las 69 h, y demostraron una reducción significativa (en torno a un 53-57% con respecto a voluntarios sanos) tanto de las fibras tipo 1 como tipo 2 en la sección transversal de biopsias diafragmáticas²³.

Cambios en la ultraestructura de las fibras musculares

La VMC da lugar a alteraciones tiempo-dependientes en la ultraestructura de las fibras musculares diafragmáticas^{19,26,27}. Inicialmente aparecen áreas con miofibrillas anormales por desorganización miofibrilar y alteraciones en las líneas Z¹⁹. Posteriormente aparecerán áreas de regeneración de fibras musculares sin signos de inflamación²⁷. Y finalmente, si la VM se prolonga en el tiempo (más de 3 días) se producirá un aumento de vacuolas lipídicas citoplasmáticas probablemente en relación con un proceso autofágico²⁷⁻²⁹.

Disfunción contráctil

El grupo de Le Bourdelles fue el primero en describir, en 1994, mediante un modelo animal, la aparición de una disfunción contráctil diafragmática tras 48 h del inicio de VMC³⁰. La VM prolongada promueve una disminución de la fuerza diafragmática progresiva y tiempo-dependiente²⁰. Al igual que ocurre con la atrofia, 12 h de VMC son suficientes para evidenciar una reducción en la fuerza diafragmática^{31,32}. Varios estudios han demostrado que el pico de presión inspiratoria máxima es menor en pacientes sometidos a VM de forma prolongada comparado con controles¹⁸.

Alteraciones en el recambio proteico

La atrofia y la disfunción diafragmática que se producen con relación al uso de VMC ocurren de forma primaria debido a un descenso en la síntesis proteica y a un aumento de la proteólisis^{23,33}. La síntesis proteica del diafragma puede disminuir un 30% después de solo 6 h de VM³³. Por otra parte, el aumento de la proteólisis se encuentra en relación con la activación de vías de proteasas (calpaína, caspasa-3 y sistema ubiquitín-proteasoma), vías de apoptosis y activación de autofagia^{34,35}. Hooijman et al. analizaron la actividad de la vía de la ubiquitín-proteasoma en muestras de biopsia diafragmática de pacientes ventilados durante cirugía torácica. En estos pacientes, en los que existía un aumento significativo de esta vía, se demostró un descenso de aproximadamente un 25% de la

sección transversal de las fibras musculares diafragmáticas, tanto lentas como rápidas, y un descenso de su fuerza contráctil^{36,37}.

Aumento del estrés oxidativo

Durante la VMC se producen alteraciones en la morfología mitocondrial que provocan alteraciones de su función y exceso de creación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Se observa un aumento del estrés oxidativo a nivel diafragmático, que funciona como desencadenante de la activación de las vías de la calpaína y caspasa-3 a este nivel^{34,38,39}. En pacientes donantes en muerte encefálica se ha confirmado la aparición muy precoz (18 h) de una reducción del diámetro de las fibras musculares diafragmáticas con la evidencia de fenómenos de estrés oxidativo y activación de proteasas a nivel diafragmático²³. Por otra parte, la VM prolongada da lugar a una disminución de la capacidad antioxidante en el diafragma, reflejada por el descenso de los niveles de glutatión, CuZn superóxido dismutasa y de la actividad glutatión peroxidasa⁴⁰.

Efecto de la patología crítica sobre la función diafragmática

Aunque se conocen las consecuencias de la disfunción diafragmática debido a la VM en modalidad control, las vías que provocan su aparición son aún desconocidas. La inactividad diafragmática induce la aparición de atrofia diafragmática de manera progresiva y tiempo-dependiente^{6,25}. Sin embargo, existen otros factores cuya presencia aumenta el riesgo de desarrollo de DDIV y de que la afectación diafragmática sea más importante. La sepsis y el fallo multiorgánico son los factores que se han asociado de una forma más robusta, con un mayor grado de disfunción diafragmática en los pacientes sépticos que en los pacientes con shock de otra etiología⁷. La situación proinflamatoria que existe en estas patologías puede dar lugar a una reducción en la síntesis proteica, así como a un incremento en la proteólisis, pudiendo desencadenar por sí misma una pérdida de masa muscular aguda^{9,41}.

Factores concomitantes y el tratamiento con fármacos (corticoides o relajantes musculares, por ejemplo) pueden exacerbar la DDIV. Sobre los relajantes musculares, existen 2 estudios realizados en ratones que confirman que el uso de rocuronio exacerba la disfunción contráctil inducida por la VM^{42,43}. Con respecto al efecto de los corticoides sobre la función diafragmática, existen datos contradictorios. En el estudio de Sassoon et al. se encontró una asociación entre la administración de metilprednisolona a altas dosis y el descenso de la fuerza inspiratoria en un modelo experimental⁴⁴. Sin embargo, el grupo de Maes demostró que la administración de una única dosis de corticoesteroides disminuía el efecto deletéreo producido por la VM⁴². Datos experimentales han relacionado la presencia de hiperglucemia con el descenso de la fuerza diafragmática, en relación con un aumento de los procesos de estrés oxidativo⁴⁵.

Modalidades de ventilación mecánica invasiva y disfunción diafragmática inducida por la ventilación

Las alteraciones diafragmáticas de la DDIV, secundarias a la ventilación en modalidad controlada, se han evidenciado en modelos animales y humanos y son de aparición muy precoz^{8,23,26,33,46,47}. Esta modalidad, en la que el diafragma se encuentra totalmente inactivo, puede producir una mayor atrofia y disfunción contráctil, con el consiguiente descenso de la fuerza diafragmática. A diferencia de las modalidades de VMC, en la VM no controlada el paciente debe realizar esfuerzo inspiratorio. Esta acción podría, como sugieren varios autores, prevenir el efecto deletéreo de la ventilación en modalidad control. En el estudio de Doering et al.

se evidenciaba que el uso de forma prolongada de niveles altos de presión en modalidades de presión soporte, producía también atrofia y disfunción contráctil⁴⁸. Por el contrario, Futier et al. sugieren que la VM asistida y la presión soporte reducirían la proteólisis e incrementarían la síntesis proteica a nivel diafragmático⁴⁹. Asimismo, en el estudio de Gayan-Ramírez et al. se refuerza la idea de que la inactividad del diafragma es el principal factor que promueve la DDIV, con la demostración que periodos cortos de respiración espontánea durante la VMC retardaban los efectos de la VMC sobre el diafragma⁵⁰. Los cambios en la configuración diafragmática podrían prevenirse manteniendo los niveles de esfuerzo inspiratorio proporcionados por la presión soporte⁵¹.

Ventilación mecánica no invasiva y oxigenoterapia de alto flujo

Existe solo un estudio que evalúa la funcionalidad diafragmática después del inicio de la VM no invasiva. En él se concluye que existe un descenso de la fuerza generada por el diafragma tras el inicio de esta y que se relaciona con niveles elevados de presión soporte⁵². La VMNI ejerce una presión positiva, con un cierto grado de aplanamiento y estiramiento muscular, que podría ser el origen de la disfunción.

La oxigenoterapia de alto flujo aporta hasta 60 l/min de gas con la F_{iO_2} correspondiente, que genera niveles bajos de presión positiva y cambios en el patrón ventilatorio, con aumento del volumen circulante⁵³ pero sin que existan, hasta el momento, estudios que analicen su repercusión sobre la función diafragmática. Sin embargo, mediante este sistema de soporte respiratorio el paciente mantiene en todo momento la completa activación diafragmática, por lo que sus consecuencias deberían ser escasas.

Diagnóstico y monitorización

En muy pocos SMI se realiza una monitorización rutinaria de la función de la musculatura respiratoria, bien por infraestimación de su importancia, bien por las dificultades técnicas para llevarla a cabo¹⁷. El diagnóstico de DDIV es inicialmente de sospecha en los pacientes ventilados mecánicamente en los que se han solucionado los factores intercurrentes, pero que presentan dificultad en la retirada de la VM. En el caso de la DDIV no se ha encontrado relación entre la exploración clínica y el grado de disfunción diafragmática⁵⁴, por lo que las exploraciones complementarias son obligadas para el diagnóstico (tabla 1). A continuación se detallan algunos de los métodos diagnósticos que reflejan mejor la contribución del diafragma a la respiración, unos útiles solo en investigación y otros aplicables en la práctica clínica.

Presión transdiafragmática y esofágica

La presión esofágica es un buen estimador de la presión pleural^{55,56}. Si además de la presión esofágica disponemos de la presión gástrica, podemos calcular la presión transdiafragmática (Pdi), que no es más que la diferencia entre la presión pleural y la abdominal, la cual permite un cálculo específico de la fuerza diafragmática^{7,13,57,58}. El *gold standard* en los pacientes que no pueden colaborar en el estudio es el cálculo de la Pdi a través de la estimulación magnética cervical del nervio frénico^{8,54,59}. Sin embargo, su principal limitación reside en que es una técnica invasiva y no disponible en la mayoría de SMI.

Desde el inicio de la VM se puede detectar un descenso de la Pdi⁵⁹. Dicho descenso aumenta de forma logarítmica con los días de VM⁸. Por otra parte, en el estudio de Demoule et al.⁷ se evidenció que valores de Pdi menores de 11 cmH₂O en el primer día de

Tabla 1

Pruebas para la evaluación de la función diafragmática en pacientes en ventilación mecánica

	Precisa colaboración	Comentario	Valores	Útil en clínica	Útil en investigación
Invasivas					
<i>Medidas de presión</i>					
P _{lmax}	Sí	Evaluación fuerza muscular respiratoria global	-30 (M)/ -45 cmH ₂ O (H) ^a	+	+++
P _E max	Sí	Influencia: comunicación, sedación, ansiedad No útil como parámetro aislado	> 60 (M)/80 cmH ₂ O (H) ^a	+	+++
P _{0.1}	No	Intensidad del estímulo respiratorio Condicionado por centro respiratorio No útil como parámetro aislado	0 a -2 cmH ₂ O ^a	+	++
P _d imax.	Sí	Compleja interpretación y dificultosa colocación Pacientes sin soporte ventilatorio	> 15 cmH ₂ O ^a	-	++
P _d iEM	No	Útil en pacientes sedados y ventilados <i>Gold standard</i>	> 10 cmH ₂ O ^b	+	+++
EMG	No	Técnicamente dificultoso	No valores estándar	+	+
Índice Gilbert	No	Contribución del diafragma a la presión respiratoria	> 0,3 ^b	+	+++
Fluoroscopia	Sí	No útil en pacientes ventilados mecánicamente		+	+
No-invasivas					
<i>Ecografía diafragmática</i>					
Grosor	No	Útil en pacientes ventilados. Reproducible	> 2 mm ^b	+++	++
Fracción de acortamiento	No	Útil en pacientes ventilados. Reproducible	> 20%	+++	++
Excursión	No	Medida de funcionalidad en pacientes en respiración espontánea	> 10 mm ^b	+++	++

P_diEM: presión transdiafragmática por estimulación magnética del nervio frénico; P_dimax: presión transdiafragmática máxima; P_Emax: presión espiratoria máxima; P_lmax: presión inspiratoria máxima.

^a Valores de sujetos sanos.

^b Valores en pacientes ventilados.

ingreso en el SMI condicionaban un peor pronóstico, una mortalidad elevada (49%) y un aumento en los días de VM^{7,14}.

El cálculo del índice de Gilbert a través de la P_di (Δ Presión gástrica/ Δ P_di) durante una inspiración normal evalúa la generación de presión durante una respiración de reposo, reflejo de la fuerza generada por el diafragma⁶⁰. Watson y colaboradores, mediante ecografía diafragmática y P_di en pacientes sometidos a cirugía cardiotorácica, encontraron buena correlación entre valores bajos de excursión diafragmática e índices de Gilbert bajos⁶¹.

P_{0.1}

La P_{0.1} mide la presión negativa generada por el paciente contra una vía aérea artificial en los 100 primeros milisegundos de un esfuerzo inspiratorio, siendo un reflejo del impulso neuromuscular transmitido por el nervio frénico⁶². Aunque tiene limitaciones, es una medida de estímulo central y es un indicador de función diafragmática^{63,64}. Esta medida ha sido incorporada en los respiradores artificiales, lo que la ha convertido en una variante clínica accesible a pie de cama⁶⁵.

Ultrasonografía

La necesidad de un diagnóstico precoz y de una técnica accesible y no invasiva justifica el empleo creciente de la ecografía para la evaluación y seguimiento de la función diafragmática y del esfuerzo inspiratorio⁶⁶. Sus limitaciones residen en la variabilidad inter e intraobservador y en la posibilidad de aplicar el estudio dinámico (excursión diafragmática) solo en pacientes sin VM⁶⁷⁻⁷⁰. Por otra parte, son varios los estudios que han demostrado buena precisión y reproducibilidad de los ultrasonidos en la valoración de la función diafragmática, tanto en voluntarios sanos como en pacientes críticos^{52,69}.

El grosor diafragmático (como signo de atrofia), la fracción de acortamiento y el estudio de la movilidad diafragmática (como signo de actividad diafragmática) son los parámetros más evaluados por ecografía.

Excursión diafragmática

Para valorar el desplazamiento diafragmático debemos utilizar una sonda de 3,5-5 MHz, que se posicionará debajo de la parrilla costal a nivel de la línea medioclavicular, dirigiendo el haz de ultrasonidos perpendicular al tercio posterior de dicho hemidiafragma. Durante la inspiración, el diafragma normal se desplaza de forma caudal y, por tanto, se acercará al transductor (fig. 1).

Los valores normales en pacientes no ventilados sanos son diferentes para hombres y mujeres (18 ± 3 y 16 ± 3 mm, respectivamente)⁶⁹, siendo similares a valores basales encontrados en pacientes ventilados mecánicamente⁷¹. Se define disfunción diafragmática como una excursión menor de 10 mm o una excursión negativa (o movimiento paradójico). Estos valores serían también buenos predictores de un fracaso en la desconexión del paciente⁷².

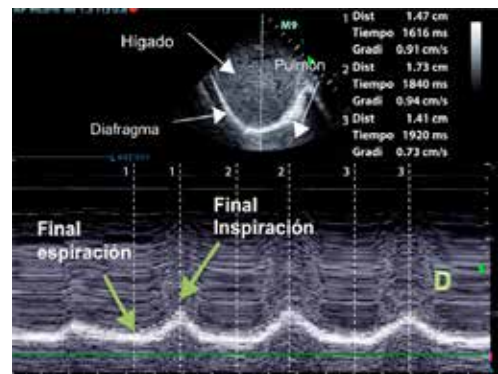


Figura 1. Medición mediante modo-M de la excursión diafragmática durante una inspiración normal. El diafragma se puede observar como línea hiperecogénica marcada con una flecha. La excursión se mide como la diferencia entre el final de la inspiración y el final de la espiración (cm).

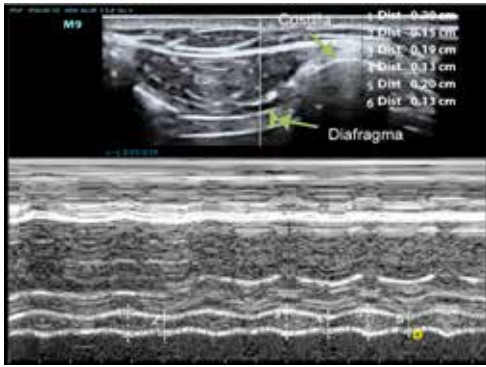


Figura 2. Medición de la variación del grosor diafrágico mediante modo-M a nivel de hemidiafragma derecho. El diafragma se visualiza como 3 líneas paralelas: 2 hiperecogénicas con una central hipocogénica y de mayor grosor. El número 1 representa el grosor inspiratorio y el número 2, el grosor espiratorio. La fracción de acortamiento diafrágico es la diferencia entre el grosor inspiratorio y el grosor espiratorio.

Grosor diafrágico

El grosor del diafragma depende de la masa muscular, y esta se correlaciona con la capacidad vital forzada⁷³. La disminución del grosor diafrágico se asocia al descenso de amplitud valorada por electromiografía y puede indicar la presencia de atrofia^{23,74}.

El grosor diafrágico es cuantificable de forma sencilla por ultrasonografía, siendo el hemidiafragma derecho, a través de su ventana hepática, más accesible que el izquierdo⁵¹. Para medir el grosor utilizaremos una sonda de 10-12 MHz, colocándola de manera perpendicular sobre el 9.º-10.º espacio intercostal en la línea axilar anterior, para observar parte de la zona de aposición del diafragma con la caja torácica. En esta área, el diafragma se observa como 3 capas de distintas densidades dispuestas paralelamente (pleura, diafragma y peritoneo)^{51,70}. El grosor diafrágico se mide mediante la realización de un modo M o con la imagen 2D durante una espiración no forzada (fig. 2). El grosor diafrágico normal en pacientes ventilados es de $2,4 \pm 0,8$ mm, indicando atrofia valores por debajo de 2 mm⁵¹. Se consideran valores normales ratios de 1,8, aceptándose como límite inferior ratios de 1,2⁶⁸.

Variación del grosor diafrágico

La variación del grosor diafrágico puede calcularse usando un modo M mediante la fórmula que se muestra en la figura 3. La variación del grosor diafrágico puede utilizarse como un indicador de la capacidad diafrágica para generar presión^{52,75}. Una variación <20% podría ser considerada como un predictor de fracaso de la desconexión de la VM⁵⁴, con una mejor predicción que el uso del índice de Tobin⁷⁶.

El grupo de Grosu encontró un descenso diario del 6% del grosor diafrágico dentro de las primeras 48 h de ventilación mediante modalidades asistidas⁶⁷. En el estudio de Schepens et al., donde la mayoría de pacientes recibían ventilación en modalidad control, este valor fue del 10,9%⁷¹. Aunque no se encontró una asociación directa entre el grosor y la ventilación en modalidad control,

$$\text{Variación grosor diafrágico} = \frac{\text{Grosor al final de la inspiración} - \text{Grosor al final de la espiración}}{\text{Grosor al final de la espiración}}$$

Figura 3. Fórmula para el cálculo de la variación del grosor diafrágico.

los datos anteriormente mencionados muestran un mayor descenso del grosor en los pacientes principalmente ventilados con modalidad controlada.

En pacientes sometidos a VM, al contrario que la excursión diafrágica, el cambio de grosor diafrágico reflejaría realmente la contracción diafrágica activa. Así lo demuestra el estudio del grupo de Goligher, el cual no observa variaciones del mismo en pacientes relajados y sí en voluntarios sanos y pacientes sometidos a distintos métodos de VM⁷⁴. En pacientes no ventilados la variación del grosor ha demostrado estar relacionada de forma directa con los volúmenes pulmonares^{70,77,78} y con la presión inspiratoria máxima⁷⁹ y, por lo tanto, supondría una medición indirecta de la actividad contráctil y de la carga de trabajo del diafragma.

Marcadores analíticos

En análisis de sangre no se ha hallado relación entre la aparición de atrofia de la musculatura respiratoria y un aumento en las cifras de enzimas de origen muscular como la creatinina o la mioglobina⁹. Un aumento de la proteína esquelética troponina I podría ser, en un futuro, utilizado como un marcador de lesión muscular diafrágica⁸⁰⁻⁸².

Conclusiones

La disfunción diafrágica del paciente ventilado mecánicamente es una patología todavía desconocida e infradiagnosticada. Aparece de forma prematura desde el inicio de la VM, está asociada a factores de riesgo como la sepsis y el fallo multiorgánico, y afecta a un porcentaje elevado de pacientes, siendo motivo de fracaso de la extubación.

Son necesarios futuros estudios para determinar los procesos iniciales que desencadenan el inicio de la alteración proteica y para el desarrollo de técnicas no invasivas y accesibles en la cabecera del paciente que permitan establecer un diagnóstico temprano, con un papel cada vez más importante para la ultrasonografía.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

A la Sra. Marta Gas, del Servicio de Medicina Intensiva del Hospital del Mar de Barcelona, por su predisposición y amable colaboración.

Bibliografía

- Hermans G, van den Berghe G. Clinical review: Intensive care unit acquired weakness. *Crit Care*. 2015;19:274.
- Tobin MJ. Advances in mechanical ventilation. *N Engl J Med*. 2001;344:1986-96.
- Dreyfuss D, Saumon G. State of the art: Ventilator-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157:294-323.
- Peñuelas O, Frutos-Vivar F, Fernández C, Anzueto A, Epstein SK, Apezteguía C, et al. Characteristics and outcomes of ventilated patients according to time to liberation from mechanical ventilation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;184:430-7.
- Jubran A. Critical illness and mechanical ventilation: Effects on the diaphragm. *Respir Care*. 2006;51:1054-61.
- Jaber S, Jung B, Matecki S, Petrof BJ. Clinical review: Ventilator-induced diaphragmatic dysfunction — human studies confirm animal model findings! *Crit Care*. 2011;15:206.
- Demoule A, Jung B, Prodanovic H, Molinari N, Chanques G, Coirault C, et al. Diaphragm dysfunction on admission to the intensive care unit. Prevalence, risk factors, and prognostic impact—a prospective study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;188:213-9.
- Hermans G, Agten A, Testelmans D, Decramer M, Gayan-Ramirez G. Increased duration of mechanical ventilation is associated with decreased diaphragmatic force: A prospective observational study. *Crit Care*. 2010;14:R127.

9. Puthuchery ZA, Rawal J, McPhail M, Connolly B, Ratnayake G, Chan P, et al. Acute skeletal muscle wasting in critical illness. *JAMA*. 2013;310:1591–600.
10. Hermans G, Van Mechelen H, Clerckx B, Vanhullebusch T, Mesotten D, Wilmer A, et al. Acute outcomes and 1-year mortality of intensive care unit-acquired weakness. A cohort study and propensity-matched analysis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;190:410–20.
11. Sharshar T, Bastuji-Garin S, Stevens RD, Durand MC, Malissin I, Rodriguez P, et al. Presence and severity of intensive care unit-acquired paresis at time of awakening are associated with increased intensive care unit and hospital mortality. *Crit Care Med*. 2009;37:3047–53.
12. Latronico N, Bolton CF. Critical illness polyneuropathy and myopathy: A major cause of muscle weakness and paralysis. *Lancet Neurol*. 2011;10:931–41.
13. Jaber S, Petrof BJ, Jung B, Chanques G, Berthet J, Rabuel C, et al. Rapidly progressive diaphragmatic weakness and injury during mechanical ventilation in humans. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183:364–71.
14. Supinski GS, Ann Callahan L. Diaphragm weakness in mechanically ventilated critically ill patients. *Crit Care*. 2013;17:R120.
15. Dasta JF, McLaughlin TP, Mody SH, Piech CT. Daily cost of an intensive care unit day: The contribution of mechanical ventilation. *Crit Care Med*. 2005;33:1266–71.
16. Esteban A, Ferguson ND, Meade MO, Frutos-Vivar F, Apezteguia C, Brochard L, et al. Evolution of mechanical ventilation in response to clinical research. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;177:170–7.
17. Heunks LMA, Doorduyn J, van der Hoeven JG. Monitoring and preventing diaphragm injury. *Curr Opin Crit Care*. 2015;21:34–41.
18. Vassilakopoulos T, Petrof BJ. Ventilator-induced diaphragmatic dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;169:336–41.
19. Sassoon CSH, Caiozzo VJ, Manka A, Sieck GC. Altered diaphragm contractile properties with controlled mechanical ventilation. *J Appl Physiol*. 2002;92:2585–95.
20. Powers SK, Shanley RA, Coombes JS, Koesterer TJ, McKenzie M, Van Gammeren D, et al. Mechanical ventilation results in progressive contractile dysfunction in the diaphragm. *J Appl Physiol*. 2002;92:1851–8.
21. Petrof BJ, Jaber S, Matecki S. Ventilator-induced diaphragmatic dysfunction. *Curr Opin Crit Care*. 2016;16:19–25.
22. Powers SK, Kavazis AN, Levine S. Prolonged mechanical ventilation alters diaphragmatic structure and function. *Crit Care Med*. 2009;37 Suppl:S347–53.
23. Levine S, Nguyen T, Taylor N, Friscia M, Budak M, Powers SK, et al. Rapid disuse atrophy of diaphragm fibers in mechanically ventilated humans. *N Engl J Med*. 2008;358:1327–35.
24. Powers SK, Wiggs MP, Solland KJ, Smuder AJ. Ventilator-induced diaphragm dysfunction: Cause and effect. *AJP Regul Integr Comp Physiol*. 2013;305:464–77.
25. Shanley A, Zergergoglu MA, Lennon SL, Sugiura T, Yimlamai T, Enns D, et al. Mechanical ventilation-induced diaphragmatic atrophy is associated with oxidative injury and increased proteolytic activity. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166:1369–74.
26. Capdevila X, Lopez S, Bernard N, Sugiura T, Yimlamai T, Enns D, et al. Effects of controlled mechanical ventilation on respiratory muscle contractile properties in rabbits. *Intensive Care Med*. 2003;29:103–10.
27. Radell P, Edström L, Stibler H, Eriksson LI, Ansved T. Changes in diaphragm structure following prolonged mechanical ventilation in piglets. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2004;48:430–7.
28. Bernard N, Matecki S, Py G, Lopez S, Mercier J, Capdevila X. Effects of prolonged mechanical ventilation on respiratory muscle ultrastructure and mitochondrial respiration in rabbits. *Intensive Care Med*. 2003;29:111–8.
29. Malicdan MC, Noguchi S, Nonaka I, Saftig P, Nishino I. Lysosomal myopathies: an excessive build-up in autophagosomes is too much to handle. *Neuromuscul Disord*. 2008;18:521–9.
30. Le Bourdelles G, Viïres N, Boczkowski J, Seta N, Pavlovic D, Aubier M. Effects of mechanical ventilation on diaphragmatic contractile properties in rats. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994;149:1539–44.
31. Criswell DS, Shanley RA, Betters J, McKenzie MJ, Sellman JE, Van Gammeren D, et al. Cumulative effects of aging and mechanical ventilation on in vitro diaphragm function. *Chest*. 2003;124:2302–8.
32. Davis RT, Bruells CS, Stables JN, McCullough DJ, Powers SK, Behnke BJ. Mechanical ventilation reduces rat diaphragm blood flow and impairs oxygen delivery and uptake. *Crit Care Med*. 2012;40:2858–66.
33. Shanley RA, Van Gammeren D, Deruiseau KC, Zergergoglu M, McKenzie MJ, Yarasheski K, et al. Mechanical ventilation depresses protein synthesis in the rat diaphragm. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170:994–9.
34. Hudson MB, Smuder AJ, Nelson WB, Bruells CS, Levine S, Powers SK. Both high level pressure support ventilation and controlled mechanical ventilation induce diaphragm dysfunction and atrophy. 2013;40:1254–60.
35. Hussain SNa, Mofarrahi M, Sigala I, Kim KH, Vassilakopoulos T, Maltais F, et al. Mechanical ventilation-induced diaphragm disuse in humans triggers autophagy. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;182:1377–86.
36. Hooijman PE, Beishuizen A, Witt CC, de Waard MC, Girbes ARJ, Spoelstra-de Man A, et al. Diaphragm muscle fiber weakness and ubiquitin-proteasome activation in critically ill patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;191:1126–38.
37. Barreiro E, Sznajder J, Nader GA, Budinger GRS. Muscle dysfunction in patients with lung diseases. A growing epidemic. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;191:616–9.
38. Picard M, Azuelos I, Jung B, Giordano C, Matecki S, Hussain S, et al. Mechanical ventilation triggers abnormal mitochondrial dynamics and morphology in the diaphragm. *J Appl Physiol*. 2015;118:1161–71.
39. Whidden MA, Smuder AJ, Wu M, Hudson MB, Nelson WB, Powers SK. Oxidative stress is required for mechanical ventilation-induced protease activation in the diaphragm. *J Appl Physiol*. 2010;108:1376–82.
40. Falk DJ, Deruiseau KC, van Gammeren DL, Deering MA, Kavazis AN, Powers SK. Mechanical ventilation promotes redox status alterations in the diaphragm. *J Appl Physiol*. 2006;101:1017–24.
41. Vesali RF, Cibicki N, Jakobsson T, Klaude M, Wernerman J, Rooyackers O. Protein metabolism in leg muscle following an endotoxin injection in healthy volunteers. *Clin Sci (Lond)*. 2010;118:421–7.
42. Maes K, Testelmans D, Cadot P, DeRuisseau K, Powers SK, Decramer MA, et al. Effects of acute administration of corticosteroids during mechanical ventilation on rat diaphragm. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;178:1219–26.
43. Testelmans D, Maes K, Wouters P, Gosselin N, Deruiseau K, Powers SK, et al. Rocuronium exacerbates mechanical ventilation-induced diaphragm dysfunction in rats. *Crit Care Med*. 2006;34:3018–23.
44. Sassoon CSH, Zhu E, Pham HT, Nelson RS, Fang L, Baker M, et al. Acute effects of high-dose methylprednisolone on diaphragm muscle function. *Muscle Nerve*. 2008;38:1161–72.
45. Callahan LA, Supinski GS. Hyperglycemia-induced diaphragm weakness is mediated by oxidative stress. *Crit Care*. 2014;18:R88.
46. Tang H, Lee M, Khuong A, Wright E, Shrager JB. Diaphragm muscle atrophy in the mouse after long-term mechanical ventilation. *Muscle Nerve*. 2013;48:272–8.
47. Welvaart WN, Paul M, Stienen GJM, van Hees HW, Loer S, Bouwman R, et al. Selective diaphragm muscle weakness after tracheal inactivity during thoracic surgery. *Ann Surg*. 2011;254:1044–9.
48. Doering LV, Imperial-Perez F, Monsein S, Esmailian F. Preoperative and postoperative predictors of early and delayed extubation after coronary artery bypass surgery. *Am J Crit Care*. 1998;7:37–44.
49. Futier E, Constantin JM, Combaret L, Mosoni L, Roszyk L, Sapin V, et al. Pressure support ventilation attenuates ventilator-induced protein modifications in the diaphragm. *Crit Care*. 2008;12:R116.
50. Gayan-Ramirez G, Testelmans D, Maes K, Rácz GZ, Cadot P, Zádor E, et al. Intermittent spontaneous breathing protects the rat diaphragm from mechanical ventilation effects. *Crit Care Med*. 2005;33:2804–9.
51. Goligher EC, Laghi F, Detsky ME, Farias P, Murray A, Brace D, et al. Measuring diaphragm thickness with ultrasound in mechanically ventilated patients: Feasibility, reproducibility and validity. *Intensive Care Med*. 2015;41:642–9.
52. Vivier E, Dessap AM, Dimassi S, Vargas F, Lyazidi A, Thile A, et al. Diaphragm ultrasonography to estimate the work of breathing during non-invasive ventilation. *Intensive Care Med*. 2012;38:796–803.
53. Masclans JR, Pérez-Terán P, Roca O. Papel de la oxigenoterapia de alto flujo en la insuficiencia respiratoria aguda. *Med Intensiva*. 2015;39:505–15.
54. Jung B, Moury PH, Mahul M, de Jong A, Galia F, Prades A, et al. Diaphragmatic dysfunction in patients with ICU-acquired weakness and its impact on extubation failure. *Intensive Care Med*. 2016;42:853–61.
55. Akoumianaki E, Maggioro SM, Valenza F, Bellani G, Jubran A, Loring S, et al. The application of esophageal pressure measurement in patients with respiratory failure. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;189:520–31.
56. Talmor D, Sarge T, Malhotra A, O'Donnell CR, Ritze R, Lisbon A, et al. Mechanical ventilation guided by esophageal pressure in acute lung injury. *N Engl J Med*. 2008;359:2095–104.
57. Hamnegard CH, Wragg S, Mills G, Kyroussis D, Road J, Daskos G, et al. The effect of lung volume on transdiaphragmatic pressure. *Eur Respir J*. 1995;8:1532–6.
58. Mier A, Brophy C, Moxham J, Green M. Twitch pressures in the assessment of diaphragm weakness. *Thorax*. 1989;44:990–6.
59. Watson AC, Hughes PD, Louise Harris M, Hart N, Ware RJ, Wendon J, et al. Measurement of twitch transdiaphragmatic, esophageal, and endotracheal tube pressure with bilateral anterolateral magnetic phrenic nerve stimulation in patients in the intensive care unit. *Crit Care Med*. 2001;29:1325–31.
60. Gilbert R, Auschincloss JH, Peppi D. Relationship of rib cage and abdomen motion to diaphragm function during quiet breathing. *Chest*. 1981;80:607–12.
61. Watson AC, Hughes PD, Louise Harris M, Hart N, Ware RJ, Wendon J, et al. Ultrasonographic diagnostic criterion for severe diaphragmatic dysfunction after cardiac surgery. *Chest*. 2009;135:401–7.
62. Kera T, Aihara A, Inomata T. Reliability of airway occlusion pressure as an index of respiratory motor output. *Respir Care*. 2013;58:845–9.
63. Umbrello M, Formenti P, Longhi D, Galimberti A, Piva I, Pezzi A, et al. Diaphragm ultrasound as indicator of respiratory effort in critically ill patients undergoing assisted mechanical ventilation: A pilot clinical study. *Crit Care*. 2015;19:1–10.
64. Ko R, Ramos L, Chalela JA. Conventional weaning parameters do not predict extubation failure in neurocritical care patients. *Neurocrit Care*. 2009;10:269–73.
65. Fernandez R, Raurich JM, Mut T, Blanco J, Santos A, Villagra A. Extubation failure: Diagnostic value of occlusion pressure (P0.1) and P0.1-derived parameters. *Intensive Care Med*. 2004;30:234–40.
66. Baldwin CE, Paratz JD, Bersten AD. Diaphragm and peripheral muscle thickness on ultrasound: Intra-rater reliability and variability of a methodology using non-standard recurrent positions. *Respirology*. 2011;16:1136–43.
67. Grosu HB, Lee YI, Lee J, Eden E, Eikeremann M, Rose KM. Diaphragm muscle thinning in patients who are mechanically ventilated. *Chest*. 2012;142:1455–60.
68. Boon AJ, Harper CJ, Ghahefaroli LS, Strommen JA, Watson JC, Sorenson EJ. Two-dimensional ultrasound imaging of the diaphragm: Quantitative values in normal subjects. *Muscle Nerve*. 2013;47:884–9.
69. Boussuges A, Gole Y, Blanc P. Diaphragmatic motion studied by M-mode ultrasonography. *Chest*. 2009;135:391–400.

70. Cohn D, Benditt JO, Eveloff S, McCool FD. Diaphragm thickening during inspiration. *J Appl Physiol*. 1997;83:291–6.
71. Schepens T, Verbrugge W, Dams K, Corthouts B, Parizel PM, Jorens PG. The course of diaphragm atrophy in ventilated patients assessed with ultrasound: A longitudinal cohort study. *Crit Care*. 2015;19:422.
72. Kim WY, Suh HJ, Hong S-B, Koh Y, Lim C-M. Diaphragm dysfunction assessed by ultrasonography: Influence on weaning from mechanical ventilation. *Crit Care Med*. 2011;39:2627–30.
73. Noda Y, Sekiguchi K, Kohara N, Kanda F, Toda T. Ultrasonographic diaphragm thickness correlates with compound muscle action potential amplitude and forced vital capacity. *Muscle Nerve*. 2015;53:522–7.
74. Goligher EC, Fan E, Herridge MS, Murray A, Vorona S, Brace D, et al. Evolution of diaphragm thickness during mechanical ventilation: impact of inspiratory effort. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;192:1–56.
75. Matamis D, Soilemezi E, Tsagourias M, Akoumianaki E, Dimassi S, Boroli F, et al. Sonographic evaluation of the diaphragm in critically ill patients. Technique and clinical applications. *Intensive Care Med*. 2013;39:801–10.
76. DiNino E, Gartman EJ, Sethi JM, McCool FD. Diaphragm ultrasound as a predictor of successful extubation from mechanical ventilation. *Thorax*. 2014;69:423–7.
77. Summerhill EM, el-Sameed YA, Glidden TJ, McCool FD. Monitoring recovery from diaphragm paralysis with ultrasound. *Chest*. 2008;133:737–43.
78. Polkey MI, Hamnegård C, Hughes PD, Rafferty GF, Green M, Moxham J. Influence of acute lung volume change on contractile properties of human diaphragm. *J Appl Physiol*. 1998;85:1322–8.
79. Ueki J, De Bruin PF, Pride NB. In vivo assessment of diaphragm contraction by ultrasound in normal subjects. *Thorax*. 1995;50:1157–61.
80. Foster GE, Nakano J, Sheel AW, Simpson JA, Road JD, Reid WD. Serum skeletal troponin I following inspiratory threshold loading in healthy young and middle-aged men. *Eur J Appl Physiol*. 2012;112:3547–58.
81. Nedergaard A, Karsdal Ma, Sun S, Henriksen K. Serological muscle loss biomarkers: An overview of current concepts and future possibilities. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2013;4:1–17.
82. Simpson JA, van Eyk J, Iscoe S. Respiratory muscle injury, fatigue and serum skeletal troponin I in rat. *J Physiol*. 2004;554:891–903.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Critical Care

journal homepage: www.journals.elsevier.com/journal-of-critical-care

Aeration changes induced by high flow nasal cannula are more homogeneous than those generated by non-invasive ventilation in healthy subjects

Purificación Pérez-Terán^{a,b,*}, Judith Marin-Corral^{a,b,1}, Irene Dot^a, Sergio Sans^b, Rosana Muñoz-Bermúdez^a, Raquel Bosch^a, Clara Vila^a, Joan Ramon Masclans^{a,b,c}

^a Critical Care Department, Hospital del Mar. GREPAC – IMIM, Barcelona, Spain

^b UAB/UPF School of Medicine, Barcelona, Spain

^c HSpaFlow (Grupo Español Multidisciplinar de Terapia de Soporte con Alto Flujo en Adultos), Spain



ARTICLE INFO

Keywords:

Non-invasive ventilation
High-flow nasal cannula
Lung aeration
Diaphragmatic ultrasound
Electrical impedance tomography

ABSTRACT

Background: Non-invasive mechanical ventilation (NIV) is a standard respiratory support technique used in intensive care units. High-Flow Nasal Cannula (HFNC) has emerged as an alternative, but further evidence is needed. The lung aeration and diaphragm changes achieved with these two strategies in healthy subjects have not been compared to date.

Methods: Twenty healthy subjects were recruited. Ten were ventilated with NIV and ten underwent HFNC. Lung impedance and diaphragmatic ultrasound measurements were performed before and after 30 min of respiratory support. The Mar-index was defined as the ratio of the diaphragm excursion-time index to the respiratory rate. **Results:** Both groups showed significant decreases in respiratory rate (NIV: 14.4 (4.1) vs 10.4 (1.6), $p = 0.009$; HFNC: 13.6 (4.3) vs 7.9 (1.5) bpm, $p = 0.002$) and significant increases in the end-expiratory lung impedance (EELI) (NIV: 66,348 (10,761) vs. 73,697 (6858), $p = 0.005$; HFNC: 66,252 (9793) vs 69,869 (9135), $p = 0.012$). NIV subjects showed a significant increase in non-dependent silent spaces (4.13 (2.25) vs 5.81 (1.49)%, $p = 0.037$) while the increase was more homogeneous with HFNC. The variation in EELI tended to be higher in NIV than in HFNC (8137.08 (6152.04) vs 3616.94 (3623.03), $p = 0.077$). The Mar-index was higher in HFNC group (13.15 vs 5.27 cm-sec²/bpm, $p = 0.02$).

Conclusions: NIV and HFNC increased EELI in healthy subjects, suggesting an increase in the functional residual capacity. The EELI increase may be higher in NIV, but HFNC produced a more homogeneous change in lung ventilation. HFNC group has a higher MAR-index that could reflect a different ventilatory system adaptation.

© 2019 Published by Elsevier Inc.

1. Introduction

In recent years, non-invasive mechanical ventilation (NIV) has become a widespread technique for ventilatory support in the Intensive Care Unit (ICU) [1]. NIV is a standard care therapy in exacerbated obstructive pulmonary disease, cardiogenic pulmonary edema, and acute respiratory failure (ARF) in immunodepressed patients. Furthermore, it has been successfully used to avoid reintubation in other ARF patients including those with postextubation respiratory failure and community-acquired pneumonia [1].

In recent decades, high-flow nasal cannula (HFNC) has been described as an effective non-invasive respiratory support technique. HFNC achieves better aeration as well as oxygenation since it flushes the dead space of the nasopharyngeal cavity [2–6] and reduces inspiratory work of breathing [3]; it reduces the metabolic cost of gas conditioning as it delivers warmed and humidified air at up to 60 L/min³ and can generate a certain degree of positive airway pressure [4–10]. Its high tolerability, even among patients with ARF [11–15], makes it an excellent non-invasive oxygen delivery technique in both adults and children [16–20]. Although the intrinsic mechanisms of HFNC have been discussed [3,18], further studies are needed to assess its effects on lung volume and to determine its clinical applications, especially in adults [3,6,14,18,20,21].

Both NIV and HFNC have been proved to induce changes lung aeration, work of breathing and oxygenation in both healthy subjects and patients [4,12,20,22–25]. Currently, a number of non-invasive techniques are available to assess all these variables at the bedside. First,

* Corresponding author at: Critical Care Department, Hospital del Mar, Ps. Marítim, 25-29, 08003 Barcelona, Spain.

E-mail address: pperez@psmar.cat (P. Pérez-Terán).

¹ Both authors have contributed to the work to the same extent, and so both appear as first authors.

electrical impedance tomography (EIT) is a non-ionizing, non-invasive method for monitoring lung ventilation at the bedside. The technique generates cross-sectional images of the subject by applying high frequency and low amplitude electrical currents. Using a reconstruction algorithm, impedance images are obtained from the resulting potential differences measured in the electrodes on the surface of the thorax. EIT is capable of tracking regional ventilation, as a change in impedance correlates with tidal volume (TV) variations [22,26,27]. Among the applications of EIT are: monitoring during mechanical ventilation, optimal setting of mechanical ventilation parameters, detecting changes in lung mechanics secondary to frequent maneuvers, and detecting changes in regional ventilation after a change in the patient's position [22,26,27].

Second, lung ultrasound (LUS) allows regional and global visualization of the lung since it can detect loss of aeration and its cause, but it is not able to detect overdistention. Further, ultrasound is a good method for determining diaphragm structure and function parameters, by measuring variations in the thickness and excursion during the inspiration-expiration cycle [28–30] in both healthy and critical care patients [31,32]. Diaphragmatic excursion (DE) can be used to measure the ventilatory functionality in spontaneously breathing patients [30] while the variation in diaphragmatic thickness, also known as the diaphragm thickening fraction (TFdi), is an indicator of the diaphragm's capacity for generating pressure [31,32], and is thus an indicator of diaphragmatic failure [33]. Its limitations are the inter- and intraobserver variability and the lack of correlation between DE and diaphragmatic function in controlled mechanical ventilation [30,34,35]. A preliminary study comparing NIV and HFNC diaphragmatic and LUS measurements in ARF patients [36] reported that NIV induced a significant reduction in TFdi and LUS scores and a significant increase in DE compared to standard oxygen therapy and HFNC (while HFNC did not differ significantly from standard oxygen therapy). However, the main limitation of that study was that ultrasound cannot provide evidence of overdistention. Moreover, Palkar et al. [37] described the diaphragm excursion-time index (E-T index) as a new parameter to predict weaning outcome by means of diaphragm ultrasounds suggesting that the prolongation of the time until reaching the maximum excursion peak (Ti) may indicate an appropriate adaptation of the ventilatory apparatus to reduce the work of breathing. On the other hand, previous studies have shown that a significant decrease in the respiratory rate may be an indicator of successful HFNC [4,12–14,38]. In present study, we therefore introduced a variation of this index in an attempt to obtain an additive effect (Mar-index).

The present study tested the hypothesis that non-invasive respiratory support techniques such as NIV or HFNC may generate changes in pulmonary aeration or diaphragm mechanics in healthy subjects that can be detected by impedance and/or ultrasounds. The aim was to compare the differences in pulmonary aeration and diaphragm function generated by these two respiratory support strategies, NIV and HFNC, using EIT and ultrasound measurements in healthy subjects. Assessing these possible changes in healthy volunteers might help to predict their effects on patients with ARF, and might therefore provide key information for the design of future studies.

2. Material and methods

This original single-center prospective interventionist cohort study was conducted at the Critical Care Department of the Hospital del Mar in Barcelona. It was led by the research group (Critical Illness Research Group, GREPAC) at the Hospital del Mar's Institute of Medical Investigations (IMIM). The Ethics and Research Studies Committee approved the study on November 12, 2015 (IRB: 2015/6444/1) and written informed consent was obtained from all subjects prior to their recruitment. The paper was written in accordance with the STROBE recommendations.

2.1. Subjects

Twenty healthy subjects similar for age, sex and weight were recruited and randomized by blocs to (1) NIV vs (2) HFNC, and then consecutively included in the study depending on their group (first NIV and then HFNC). A loss of aeration evidenced by LUS at baseline was considered grounds for exclusion from the study.

2.2. Study procedures

Age, sex, body mass index (BMI) and smoking habit were registered. We allowed the breathing patterns to vary. However, before the baseline measurements all subjects rested for 5–10 min in order to reach a physiological steady state. Afterwards, they were ventilated and the same measurements were made after 30 min of each technique. Systolic blood pressure (BP), diastolic BP, mean BP, heart rate (HR), respiratory rate (RR) and peripheral capillary oxygen saturation (SpO_2) were registered at baseline and at 30 min. TV was recorded in NIV group. EIT, LUS measurements and diaphragmatic ultrasound were made at baseline and at 30 min.

2.3. Application of NIV

Conditioned room air (F_{iO_2} 0.21) was delivered with the Respiroics V60® device (Philips, Amsterdam, Netherlands) through an oronasal interface at an Inspired Positive Airway Pressure (IPAP) of 10 cmH_2O and an Expired Positive Airway Pressure (EPAP) of 6 cmH_2O throughout the procedure. The IPAP value was set to the minimum value to compensate for the resistance of the respiratory support circuit and thus ensure an acceptable TV. The EPAP value was set to match the continuous positive airway pressure generated with the HFNC, as in Parke's study [9]. The subjects were in a semi-recumbent position at 45° during the test.

2.4. Application of HFNC

Conditioned room air (F_{iO_2} 0.21) was delivered with the Optiflow® device (Fisher & Paykel healthcare, Auckland, New Zealand) at a constant flow of 60 L/min during 30 min. The humidifier (AIRVO®2, Fisher & Paykel Healthcare, Auckland, New Zealand) temperature was set to 37 °C, and the air was delivered by silicon nasal cannula (RT050/051®, Fisher & Paykel Healthcare, Auckland, New Zealand). The subjects were in a semi-recumbent position at 45° during the test, and breathed with their mouth closed.

2.5. Lung aeration measurements

1. Electrical impedance tomography: EIT was measured with the Swisstom BB²® device (Swisstom, Landquart, Switzerland). The inner surface of the belt containing the 32 electrodes (SensorBelt®, Swisstom, Landquart, Switzerland). The belt was placed around the chest along the sixth intercostal space. EIT data were continuously recorded and later analysed on a personal computer using Swisstom's EIT Data Analyser (ibeX 1.1, Swisstom, Landquart, Switzerland). An example interface image is displayed in Fig. 1. The following EIT-derived parameters were measured at baseline and 30 min as the average of 30 consecutive breaths:

- Region of interest (ROI). The tidal ventilation distribution was analysed by dividing the lung into three horizontal parallel regions (ROI) within the chest contour: ventral, central and dorsal. The software summed the ROIs and calculated their proportion to each other.
- Centre of ventilation (COV). This was the geometrical focal point of the overall ventilation expressed as a percentage of the ventral-dorsal and right-left extension of the identified lung region, where 0% refers to ventilation occurring in the most ventral lung region and 100% in the most dorsal part. The same applies for the

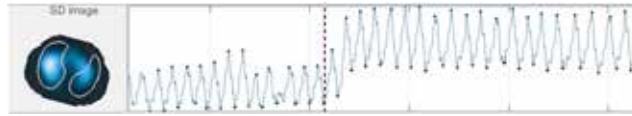


Fig. 1. Impedance changes produced by non-invasive ventilation (NIV). Note the sudden increase in arbitrary units (vertical axis) when NIV is applied.

right-left extension (0% refers to the most-right and 100% to the most left).

- Dependent and non-dependent silent spaces (DSS and NSS). The silent spaces were defined as the smallest impedance changes (<10%) of the maximal impedance change measured. They were classified into DSS and NSS by a virtual line perpendicular to the COV. Their analysis provides information about lung areas that receive less air during tidal breathing and are thus hypoventilated. If they are located on the dorsal half of the lungs (dependent areas), it is very likely that these areas will be collapsed, filled with fluid or closed; if they are located on the ventral half of the lungs (non-dependent areas), they are more likely to be distended or overdistended. The amount of silent spaces was expressed as a percentage of the entire ROI.
- End-expiratory lung impedance (EELI). EIT values at the end of the expiration (EELI) were correlated with end-expiratory lung volume (EELV), and thus with residual functional capacity and lung aeration [22,26,27]. Relative impedance values were measured in arbitrary units.
- EELI variation (Δ EELI). An increase in EELI has been associated with an increase in TV [22,26,27]. We calculated the difference between baseline and 30-min EELI.

2. Lung ultrasound: For the ultrasound measurements we used the Vivid i0 ultrasound device (General Electric, Fairfield, CT, USA). The LUS measurements were performed with a 3.5–5 MHz probe. Four quadrants of each hemithorax were examined (anterior superior, anterior inferior, lateral superior and lateral inferior) and each one was rated according to the aeration evidenced: 0 = normal aeration (A lines or < 3 B lines); 1 = moderate loss of aeration (multiple B lines); 2 = severe loss of aeration (confluent B lines); 3 = alveolar consolidation (tissue pattern). The LUS score, ranging from 0 to 24, was calculated by adding together all the quadrant rates.

2.6. Diaphragmatic function measurements

With the subject angled at 45°, DE and TFDi were measured in all subjects at baseline and at 30 min. The same experienced observer performed all the measurements and later the blind image analysis. For the DE measurement, each individual was examined with a 3.5–5 MHz probe under the right costal ridge at the level of the middle clavicle line. Using the ultrasound device's M-mode, we calculated the mean of three measurements. For the diaphragm thickness measurements we used a 10–12 MHz probe and placed it over the 9th–10th intercostal space at the level of the anterior axillary line. The M-mode was also used to perform three measures of inspiration and three of expiration. The average values were calculated, and then the TFDi was calculated using the following formula: [(end-of-inspiration thickness - end-of-expiration thickness)/end-of-expiration thickness] per 100. An explanatory image is provided in Fig. 2.

2.7. The Mar-index

The E-T index was calculated as the product of DE and Ti as previously described [37]. The new Mar-index was calculated as E-T index \times 100/RR.

Palkar et al. [37] described the diaphragm excursion-time index (E-T index) as a new parameter to predict weaning outcome by means of

diaphragm ultrasounds. The E-T index was calculated as the product of DE and the time until reaching the maximum excursion peak (Ti). The authors suggested that the prolongation of Ti might indicate an appropriate adaptation of the ventilatory apparatus to reduce the work of breathing. On the other hand, previous studies have shown that a significant decrease in the respiratory rate may be an indicator of successful HFNC [4,12–14,38]. We therefore introduced a variation of this index in an attempt to obtain an additive effect. We named the E-T index \times 100/RR the Mar-index (ie., defined by the Hospital del Mar team).

2.8. Statistical analysis

Sample size was obtained using the ARCSINUS approximation. Accepting an alpha risk of 0.05 and a beta risk of 0.2 in a two-sided test, 10 subjects were required in the first group and 10 in the second group to detect a statistically significant difference in EELI between the two proportions, assuming a proportion of 0.40 in the NIV group and 0.1 in the HFNC group. A rate of 0% losses to follow-up was estimated.

Following the results of the Kolmogorov-Smirnov test, the categorical variables were expressed as frequencies and percentages and the continuous variables as means and standard deviation (SD) when the data followed a normal distribution, or as medians and interquartile range (IR,25–75%) otherwise. The differences between the groups were analysed with the chi-square test (χ^2) for categorical variables and the Student's *t*-test or the Mann-Whitney *U* test for continuous variables. For the comparison between variables in the baseline situation and at 30 min of respiratory support, *t*-test for paired data or the Wilcoxon test were used as necessary. Statistical significance was established at $p < 0.05$. The data were analysed using the statistical package for social sciences 15.0 (IBM® SPSS Statistics®, Chicago, IL, USA) for Windows.

3. Results

Twenty healthy subjects were included, 10 of whom were ventilated with NIV and 10 with HFNC. There were no differences in age (32.5 (6.5) vs 34.8 (10.6) years), sex (60% females vs 40% males) or BMI (22.78 (3.40) vs 23.39 (3.60) kg/m²) between subjects included in the two groups ($p > 0.05$). Individuals who underwent HFNC presented a decrease in diastolic BP, though it was not clinically significant (Table 1). TV in the NIV group was 890 ml (179).

EIT results are shown in Table 1 and Figs. 3 and 4. Briefly, both techniques produced a significant decrease in RR and a significant increase in EELI. NIV also induced a significant increase in NSS after 30 min of respiratory support. Furthermore, significant decreases in left central ROI were observed in the NIV group. HFNC produced a greater decrease in RR, but Δ EELI tended to be higher with NIV.

No differences were found in classical LUS or diaphragmatic parameters between baseline and 30 min measurements in either NIV or HFNC (Table 1). A significant increase in the E-T index was evidenced in HFNC group without significant changes in the NIV group (Table 1). However, when we calculated the E-T index changes between the two techniques the median (IQ) variation between baseline and 30 min was -0.07 (-0.69 – 1.10) with NIV compared with 1.27 (0.6 – 1.74) cm-sec ($p = 0.09$) with HFNC. Associating those changes with changes in respiratory rate (E-T index \times 100/RR), defined as the Mar-index, we

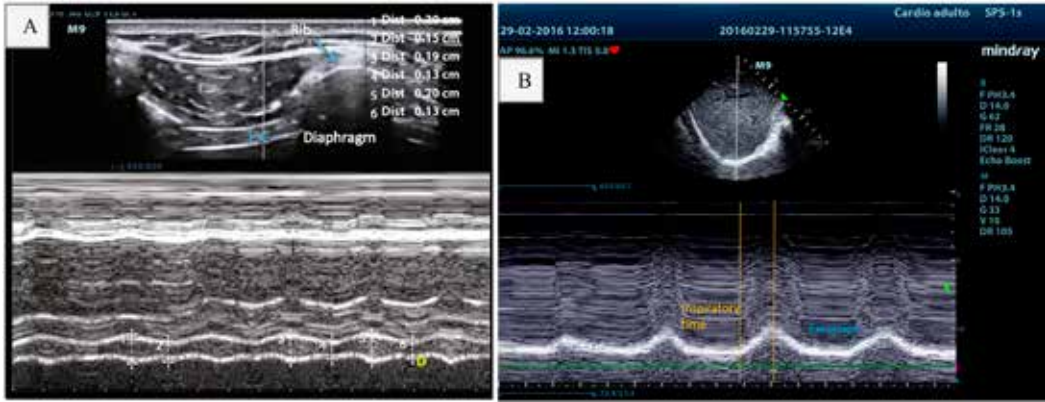


Fig. 2. (A) M-mode measurement of diaphragm thickness variation of the right hemidiaphragm. The diaphragm is seen as 3 parallel lines: 2 hyperechogenic layers and a thicker, central hypoechogenic layer. Number 1 is the inspiratory thickness and number 2 is the expiratory thickness. Diaphragm shortening fraction is the difference between the inspiratory thickness and the expiratory thickness. (B) M-mode measurement of diaphragm excursion during a normal inspiration. The diaphragm can be seen as a hyperechogenic line indicated with an arrow. The excursion is measured as the difference between the end of the inspiration and the end of expiration (cm).

found a change of 5.27 (−2.39–8.80) cm²/bpm with NIV vs 13.15 (7.36–26.51) cm²/bpm with HFNC (p = 0.02).

4. Discussion

In recent years, HFNC has been shown to be a good method of non-invasive respiratory support in the ICU. However, to our knowledge, this

is the first study comparing ventilatory changes between NIV and HFNC in healthy semi-recumbent subjects at rest.

Our results show that both strategies increase EELI in healthy subjects because, as previous studies have demonstrated, they both produce positive airway pressure [2,3,7,9,23]. A good correlation has been described between changes in lung impedance measured by EIT and changes in lung volume [27], suggesting an increase in functional residual capacity. Even though our results were not statistically significant,

Table 1
Clinical data, EIT measurements, diaphragm ultrasound and lung ultrasound results at baseline and 30 min in NIV and HFNC groups.

	NIV			HFNC		
	n = 10			n = 10		
	Baseline	30'	p	Baseline	30'	p
Clinical data						
Systolic BP, mmHg, mean (SD)	115.8 (11.2)	111.5 (14.7)	0.190	112.2 (13.1)	110.5 (13.8)	0.730
Diastolic BP, mmHg, mean (SD)	65.7 (8.6)	64.3 (6.9)	0.473	69.6 (9.4)	63.1 (6.3)	0.021
Mean BP, mmHg, mean (SD)	82.4 (6.7)	80.0 (8.4)	0.185	83.8 (9.5)	78.9 (8.3)	0.091
HR, BPM, mean (SD)	77.6 (11.1)	70.9 (12.0)	0.078	72.5 (15.2)	71.1 (13.2)	0.575
RR, bpm, mean (SD)	14.4 (4.1)	10.4 (1.6)	0.009	13.6 (4.3)	7.9 (1.5)	0.002
SpO ₂ , %, mean (SD)	98.6 (0.8)	98.8 (1.3)	0.555	98.5 (1.2)	97.9 (1.8)	0.260
EIT measurements						
ROI, right ventral region, %, mean (SD)	7.14 (6.88)	7.13 (4.82)	0.993	4.93 (3.51)	5.54 (4.07)	0.288
ROI, left ventral region, %, mean (SD)	6.10 (2.74)	5.12 (2.71)	0.05	5.76 (3.37)	5.54 (2.38)	0.673
ROI right central region, %, mean (SD)	31.32 (6.34)	33.72 (6.92)	0.165	30.46 (7.00)	30.36 (7.79)	0.943
ROI, left central region, %, mean (SD)	21.57 (4.98)	18.96 (5.80)	0.034	19.51 (8.33)	20.28 (5.98)	0.580
ROI, right dorsal region, % (SD)	20.47 (8.71)	22.55 (8.41)	0.199	25.87 (11.07)	24.20 (7.03)	0.347
ROI, left dorsal region, %, mean (SD)	13.36 (3.53)	12.48 (3.72)	0.445	13.46 (3.44)	14.05 (4.72)	0.650
COV Ventral-Dorsal axis, %, mean (SD)	58.10 (5.08)	58.34 (4.41)	0.819	60.56 (4.67)	60.12 (4.68)	0.455
COV Right-Left axis, %, mean (SD)	46.11 (5.08)	43.41 (6.43)	0.066	44.36 (8.07)	44.93 (5.87)	0.720
DSS, %, mean (SD)	1.71 (2.61)	0.38 (0.91)	0.149	0.55 (0.88)	0.62 (1.14)	0.539
NSS, %, mean (SD)	4.13 (2.25)	5.81 (1.49)	0.037	5.25 (2.19)	4.94 (1.63)	0.533
EELI, AU, mean (SD)	66.348 (10.761)	73.697 (6.8558)	0.005	66.252 (9.793)	69.869 (9.135)	0.012
Diaphragm ultrasound						
Right TFdi, %, mean (SD)	46 (18)	50 (19)	0.548	45 (22)	46 (26)	0.868
Left TFdi, %, mean (SD)	56 (38)	40 (18)	0.378	58 (34)	59 (20)	0.338
DE, mm, mean (SD)	22.49 (7.71)	20.20 (6.28)	0.803	20.84 (6.01)	21.18 (7.88)	0.812
ET-index, cm x sec, mean (SD)	3.0 (1.6)	3.1 (1.5)	0.432	2.8 (1.5)	4.2 (2.4)	0.005
Lung ultrasound						
LUS score, median (IR)	0.5 (0.0–1.0)	0.0 (0.0–0.5)	0.438	0.0 (0.0–1.2)	0.0 (0.0–0.2)	0.434

NIV: non-invasive ventilation, **HFNC:** high-flow nasal cannula, **BP:** blood pressure, **mmHg:** millimeter of mercury, **SD:** standard deviation, **ns:** non-statistically significant, **HR:** heart rate, **BPM:** beats per minute, **RR:** respiratory rate, **bpm:** breaths per minute, **SpO₂:** peripheral capillary oxygen saturation, **EIT:** electrical impedance tomography, **ROI:** region of interest, **COV:** center of ventilation, **DSS:** dependent silent spaces, **NSS:** non-dependent silent spaces, **EELI:** end-expiratory lung impedance, **AU:** arbitrary units, **ΔEELI:** end-expiratory lung impedance variation, **TFdi:** diaphragm thickening fraction, **DE:** diaphragm excursion, **ET-index:** diaphragm excursion-time, **LUS score:** lung ultrasound score, **IR:** interquartile range.

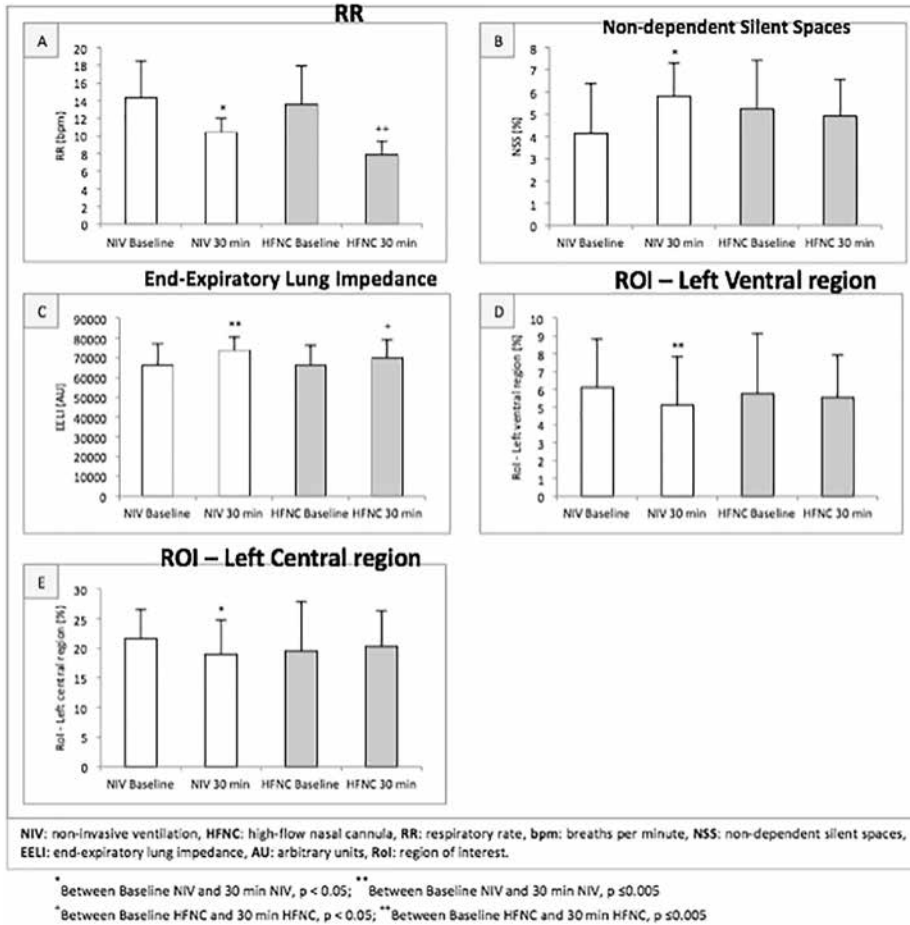


Fig. 3. Significant results between baseline and 30 min: RR (A), NSS (B), EELI (C), ROI - Left ventral region (D) and ROI - Left central region (E).

they suggest that this increase is slightly higher in NIV. However, the ventilation changes produced with HFNC are more homogeneous than with NIV. This is reflected in the significant increase of the non-dependent silent spaces in the NIV group, compared with the absence of any significant changes in the HFNC group. These homogeneous changes have previously been reported in ARF patients undergoing HFNC compared with oxygen facial mask [39]. These results may be relevant for lung injury patients, in whom NIV distribution changes may be more notable and could lead to overdistension. In that sense, Frat et al. [40] showed that HNF achieved lower mortality in the ICU and at 90 days in ARF patients compared with NIV. The authors hypothesized that this increase in mortality in NIV could be related to an increase in the ventilator-induced lung injury due to higher tidal volumes. It is probable that NIV produces this more heterogeneous aeration, and therefore the possibility of overdistension could play a fundamental role in this increase in mortality. As expected, there were no differences in any LUS measurements after NIV or HFNC. As the subjects were healthy, they presented LUS scores of 0 or very close to 0 in the baseline

measure before respiratory support. These results are consistent with the preservation of aeration detected by impedance.

There is little information in the literature on the effect of these two strategies on diaphragmatic mechanics [29], probably because of the absence of a simple and accurate method for their assessment in the ICU until the introduction of diaphragm ultrasound. In the present study, no significant differences were found in classical diaphragmatic ultrasound measurements when using either NIV or HFNC. However, when we combined the assessment of the DE with the Ti and the RR to calculate the Mar-index, it was significantly higher in the HFNC group, which probably indicates differences in the adaptation of the ventilatory apparatus. TFDi seems to be the best ultrasound parameter for measuring the diaphragmatic function [33]. However, its measurement may not be easy. What is more, diaphragmatic function is not the only determinant of weaning failure or ARF. Therefore, an index that takes into account not just the diaphragmatic function but also adaptive capacity and ventilatory function would be very useful. In this context, the Mar-index combines the information from the E-T index with an important clinical

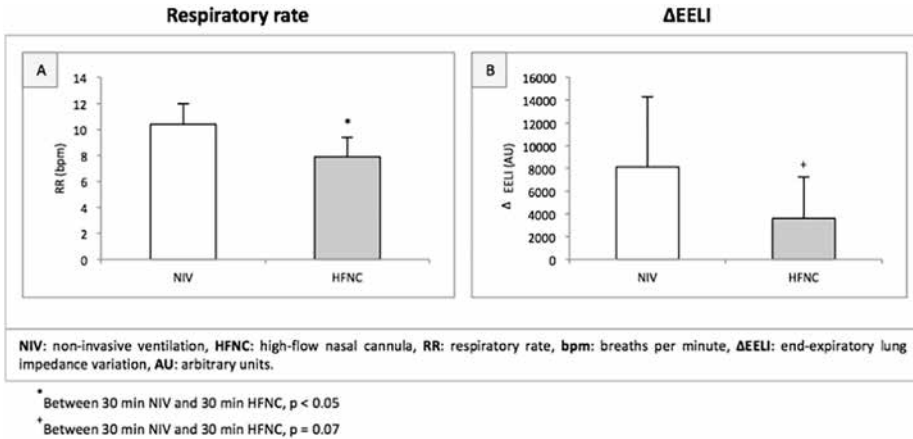


Fig. 4. Most relevant results comparing NIV and HFNC after 30 min of treatment: RR (A) and ΔEELI (B).

predictor like the respiratory rate. Therefore, it would be interesting to analyse this index during the period of weaning from mechanical ventilation or in ARF patients, and its possible relationship with outcomes.

This study has some limitations. First, the EIT only measures a cross-sectional slice of the lung, ignoring the rest of the organ. We could only measure TV directly in subjects undergoing NIV, whereas in HFNC subjects we inferred the TV variations from the EELI values. It is worth noting that several authors have reported a good correlation between variation in TV and in EELI [27]. We did not measure the partial pressure of carbon dioxide ($p\text{CO}_2$) because its non-invasive measurements in mechanically ventilated subjects are hard to apply and assess. Finally, these findings are only applicable to healthy subjects; however, they shed light on the different pathophysiological mechanisms by which these two systems act, and provide a rationale for the design of a study in ARF patients. While acknowledging these limitations, we stress that this is the first study to compare the lung and diaphragmatic effect (aeration and mechanics) of NIV and HFNC in healthy subjects using EIT and ultrasound measurements.

5. Conclusions

Both respiratory support strategies increase the functional residual capacity, as suggested by the RR decrease and EELI increase in our subjects. Ventilation changes produced by HFNC are more homogeneous than those produced by NIV. We also describe the Mar-index a new score that combines ultrasound with clinical changes and that could reflect the degree of the ventilatory system adaptation. This study may help to assess certain differences in aeration between these two non-invasive respiratory support techniques and thus develop new ventilatory support strategies for hypoxemic patients.

Funding

This study was supported by the Spanish Society of Pneumology and Thoracic Surgery (SEPAR 2015).

Conflicts of interests

The authors have no conflict of interest to declare.

Acknowledgments

We thank all the healthy subjects for participating in the study.

References

- [1] Esquinas AM, Benhamou MO, Glossop AJ, Mina B. Noninvasive mechanical ventilation in acute ventilatory failure: rationale and current applications. *Sleep Med Clin* 2017;12:597–606.
- [2] Riera J, Pérez P, Cortes J, Roca O, Masclans JR, Rello J. Effect of high-flow nasal cannula and body position on end-expiratory lung volume: a cohort study using electrical impedance tomography. *Respir Care* 2013;58:589–96.
- [3] Dysart K, Miller TL, Wolfson MR, Shaffer TH. Research in high-flow therapy: mechanisms of action. *Respir Med* 2009;103:1400–5.
- [4] Chatila W, Nugent T, Vance G, Gaughan J, Criner GJ. The effects of high-flow vs low-flow oxygen on exercise in advanced obstructive airways disease. *Chest* 2004;126:1108–15.
- [5] Williams AB, Ritchie JE, Gerard C. Evaluation of a high-flow nasal oxygen delivery system: gas analysis and pharyngeal pressures. *Intensive Care Med* 2006;32 [Suppl. 2]:19.
- [6] Frat JP, Coudroy R, Marjanovic N, Thille AW. High-flow nasal oxygen therapy and noninvasive ventilation in the management of acute hypoxemic respiratory failure. *Ann Transl Med* 2017;5:297.
- [7] Groves N, Tobin A. High flow nasal oxygen generates positive airway pressure in adult volunteers. *Aust Crit Care* 2007;20:126–31.
- [8] Kubicka ZJ, Limauro J, Darnall RA. Heated, humidified high-flow nasal cannula therapy: yet another way to deliver continuous positive airway pressure? *Pediatrics* 2008;121:82–8.
- [9] Parke RL, McGuinness SP, Eccleston ML. Nasal high-flow therapy delivers low level positive airway pressure. *Br J Anaesth* 2009;103:886–90.
- [10] Parke RL, Eccleston ML, McGuinness SP. The effects of flow on airway pressure during Nasal high-flow oxygen therapy. *Respir Care* 2011;56:1151–5.
- [11] Tiruvoipati R, Lewis D, Haji K, Botha J. High-flow nasal oxygen vs high-flow face mask: a randomized crossover trial in extubated patients. *J Crit Care* 2010;25:463–8.
- [12] Roca O, Riera J, Torres F, Masclans JR. High-flow oxygen therapy in acute respiratory failure. *Respir Care* 2010;55:408–13.
- [13] Sztymf B, Messika J, Bertrand F, Huel D, Leon R, Dreyfuss D, et al. Beneficial effects of humidified high flow nasal oxygen in critical care patients: a prospective pilot study. *Intensive Care Med* 2011;37:1780–6.
- [14] Sztymf B, Messika J, Mayot T, Lenglet H, Dreyfuss D, Ricard JD. Impact of high-flow nasal cannula oxygen therapy on intensive care unit patients with acute respiratory failure: a prospective observational study. *J Crit Care* 2011;27:324.e9–324.e13.
- [15] Parke RL, McGuinness SP, Eccleston ML. A preliminary randomized controlled trial to assess effectiveness of nasal high-flow oxygen in intensive care patients. *Respir Care* 2011;56:265–70.
- [16] Holleman-Duray D, Kaupie D, Weiss MG. Heated humidified high-flow nasal cannula: use and a neonatal early extubation protocol. *J Perinatol* 2007;27:776–81.
- [17] Woodhead DD, Lambert DK, Clark JM, Christensen RD. Comparing two methods of delivering high-flow gas therapy by nasal cannula following endotracheal extubation: a prospective, randomized, masked, crossover trial. *J Perinatol* 2006;26:481–5.
- [18] Dani C, Pratesi S, Migliori C, Bertini G. High flow nasal cannula therapy as respiratory support in the preterm infant. *Pediatr Pulmonol* 2009 Jun;44(7):629–34.

- [19] Masclans JR, Roca O. High flow oxygen therapy in acute respiratory failure. *Clin Pulm Med* 2012;19:127–30.
- [20] Spoletini G, Alotaibi M, Blasi F, Hill NS. Heated humidified high-flow nasal oxygen in adults: mechanisms of action and clinical implications. *Chest* 2015;148:253–61.
- [21] Hernández G, Roca O, Colinas L. High-flow nasal cannula support therapy: new insights and improving performance. *Crit Care* 2017;21:62.
- [22] Riera J, Riu PJ, Casan P, Masclans JR. Electrical impedance tomography in acute lung injury. *Med Intensiva* 2011;35:509–17.
- [23] Kallet RH, Diaz J. The physiologic effects of noninvasive ventilation. *Respir Care* 2009;54:102–15.
- [24] Corley A, Caruana LR, Barnett AG, Tronstad O, Fraser JF. Oxygen delivery through high-flow nasal cannulae increase and expiratory lung volume and reduce respiratory rate in post-cardiac surgical patients. *Br J Anaesth* 2011;107:998–1004.
- [25] Perbet S, Betran S, Longere B, Pereira B, Futier E, Constantin JM. Effect of high-flow nasal cannula oxygen on diaphragmatic excursion and lung volumes determined by electrical impedance tomography. *Intensive Care Med* 2015;3 [Suppl. A165].
- [26] Denai MA, Mahfouf M, Samuri SM, Panoutsos G, Brown BH, Mills GH. Absolute electrical impedance tomography (aEIT) guided ventilation therapy in critical care patients: simulations and future trends. *IEEE Trans Inf Technol Biomed* 2010;14:641–9.
- [27] Hinz J, Hahn G, Neumann P, Sydow M, Mohrenweiser P, Hellige G, et al. End-expiratory lung impedance change enables bed-side monitoring of end-expiratory lung volume change. *Intensive Care Med* 2003;29:37–43.
- [28] Orozco-Levi M, Gayete A, Rodríguez C, Ramírez-Sarmiento A, Méndez R, Tous F, et al. Evaluación funcional no-invasiva de la reserva ante la fatiga y la estructura del diafragma mediante ecografía transtorácica en modos B y M. *Arch Bronconeumol* 2010;46:571–9.
- [29] Baldwin CE, Paratz JD, Bersten AD. Diaphragm and peripheral muscle thickness on ultrasound: intra-rater reliability and variability of a methodology using non-standard recumbent positions. *Respirology* 2011;16:1136–43.
- [30] Dot I, Pérez-Terán P, Samper MA, Masclans JR. Diaphragm dysfunction in mechanically ventilated patients. *Arch Bronconeumol* 2016;53:150–6.
- [31] Vivier E, Dessap AM, Dimassi S, Vargas F, Lyazidi A, Thile A, et al. Diaphragm ultrasonography to estimate the work of breathing during non-invasive ventilation. *Intensive Care Med* 2012;38:796–803.
- [32] Matamis D, Soilemezi E, Tsagourias M, Akoumianaki E, Dimassi S, Boroli F, et al. Sonographic evaluation of the diaphragm in critically ill patients. Technique and clinical applications. *Intensive Care Med* 2013;39:801–10.
- [33] Jung B, Moury PH, Mahul M, de Jong A, Galia F, Prades A, et al. Diaphragmatic dysfunction in patients with ICU-acquired weakness and its impact on extubation failure. *Intensive Care Med* 2016;42:853–61.
- [34] Boussuges A, Gole Y, Blanc P. Diaphragmatic motion studied by M-mode ultrasonography. *Chest* 2009;135:391–400.
- [35] Grosu HB, Lee YI, Lee J, Eden E, Eikermann M, Rose KM. Diaphragm muscle thinning in patients who are mechanically ventilated. *Chest* 2012;142:1455–60.
- [36] Schreiber AF, Lu Q, Adam N, Langeron O. High-flow nasal cannula versus noninvasive ventilation on lung re-aeration and diaphragm function [abstract]. *European respiratory society international congress*; 2017 Sep 9–13. Milan. Sheffield: *European Resp Journal*; 2017 [Suppl. 61].
- [37] Palkar A, Narasimhan M, Greenberg H, Singh K, Koenig S, Mayo P, et al. Diaphragm excursion-time index: a new parameter using ultrasonography to predict extubation outcome. *Chest* 2018;153:1213–20.
- [38] Roca O, Messika J, Caralt B, García-de-Acilu M, Sztrymf B, Ricard JD, et al. Predicting success of high-flow nasal cannula in pneumonia patients with hypoxemic respiratory failure: the utility of the ROX index. *J Crit Care* 2016;35:200–5.
- [39] Mauri T, Turrini C, Eronia N, Grasselli G, Volta CA, Bellani G, et al. Physiologic effects of high-flow nasal cannula in acute hypoxemic respiratory failure. *Am J Respir Crit Care Med* 2017;195:1207–15.
- [40] Frat JP, Thille Mercat A, Girault C, Ragot S, Perbet S, et al. High-flow oxygen through nasal cannula in acute hypoxemic respiratory failure. *N Engl J Med* 2015;372:2185–96.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Critical Care

journal homepage: www.journals.elsevier.com/journal-of-critical-care



Response to the editor: Aeration changes induced by high flow nasal cannula are more homogeneous than those generated by non-invasive ventilation in healthy subjects.



To the editor,

First of all, we thank the authors of the letter "Aeration changes induced by high flow nasal cannula are more homogeneous than those generated by non-invasive ventilation in healthy subjects: comments and observations" for their interest in our article. Here we would like to discuss some of the points they raised.

Several recent studies have attempted to compare non-invasive mechanical ventilation (NIV) with high-flow oxygen therapy (HFNC) in patients with acute respiratory failure (ARF), but in our opinion the different ventilatory patterns that these techniques may generate have not been assessed in depth. Using electrical impedance tomography (EIT), Riedel et al. demonstrated the existence of a heterogeneous ventilation pattern in spontaneously breathing subjects who were applied continuous positive airway pressure (CPAP), with no changes in the dorsal regions but increases in the ventral areas after starting CPAP [1]. This heterogeneous ventilation pattern was also demonstrated in an animal model ventilated with PEEP [2]. It is true that the effect of HFNC is similar to the effect of CPAP. However, in our environment bi-level NIV is widely used in ARF patients [3]. Unlike CPAP, bi-level NIV unloads the respiratory muscles and can provide complete respiratory support [4]. Previous studies have suggested that bi-level NIV is safe in mild ARDS [5], and in a recent multicentre randomized trial Frat et al. [6] used it to compare HFNC and NIV outcomes. For all these reasons, we believe that the comparison with bi-level NIV is more justified clinically than physiologically.

With regard to conducting the study with healthy volunteers, we agree that this is a great limitation for extrapolation of the results to ARF patients. However, we believe it is a good starting point for future studies. Although the normal lung compliance determined a tidal volume (TV) above the accepted upper limit in the NIV group, TV may also be significantly higher during NIV in ARF, especially in patients with a high inspiratory demand [7]. So it is possible, although not proven, that NIV may be especially useful in patients who do not substantially increase their TV [8]. And therefore, it seems logical to think that this greater heterogeneity found in the NIV group would be even more evident in ARF patients. A study conducted with ARF patients would be necessary to confirm these results. On the other hand, it seems unlikely that after thirty minutes of the technique and with a TV that, although elevated, may be less than forced breathing, atelectasis and VILI would be generated in healthy volunteers. We do not have

clinical or echographic data to suggest this, nor have desaturations been reported in any case that supports it.

In the present study, subjects were in a semi-recumbent position at 45° during the test. Correct adaptation of the nasobuccal mask was achieved in all volunteers without evidence of air leaks. The analysis of the different ventilatory patterns by EIT allows quantification of pulmonary over-distension by means of the non-dependent silent spaces (regions with <10% impedance changes) even without a reliable estimation of lung volume with HFNC.

As we noted in the article, an important limitation of this study is the lack of monitoring of expired carbon dioxide. Both transcutaneous monitoring and the capnography would have been useful to explain the study results. Unfortunately, our group did not have these technologies at the time of the study.

Clearly, hyperventilation does not fully explain the lung damage that mechanical ventilation or even HFNC can generate. More studies are needed to analyse the impact of each of the possible factors in ARF patients. However, the objective of the present study was only to explore whether the ventilatory pattern might be a differentiating factor between the use of NIV and HFNC for further studies in ARF patients.

Funding

This study was supported by the Spanish Society of Pneumology and Thoracic Surgery (SEPAR 2015).

References

- [1] Riedel T, Richards T, Schibler A. The value of electrical impedance tomography in assessing the effect of body position and positive airway pressures on regional lung ventilation in spontaneously breathing subjects. *Intensive Care Med* 2005;31(11):1522–8.
- [2] Johansson MJ, Wiklund A, Flatebo T, et al. Positive end-expiratory pressure affects regional redistribution of ventilation differently in prone and supine sheep. *Crit Care Med* 2004;32(10):2039–44.
- [3] Rochwerg B, Brochard L, Elliott MW, et al. Official ERS/ATS clinical practice guidelines: noninvasive ventilation for acute respiratory failure. *Eur Respir J* 2017;50(2).
- [4] Hess DR. Noninvasive ventilation for acute respiratory failure. *Respir Care* 2013;58(6):950–72.
- [5] Zhan Q, Sun B, Liang L, et al. Early use of noninvasive positive pressure ventilation for acute lung injury: a multicenter randomized controlled trial. *Crit Care Med* 2012;40(2):455–60.
- [6] Frat JP, Thille AW, Mercat A, et al. High-flow oxygen through nasal cannula in acute hypoxemic respiratory failure. *N Engl J Med* 2015;372:2185–96.
- [7] Kallet RH, Diaz JV. The physiologic effects of noninvasive ventilation. *Respir Care* 2009;54:102–15.

Purificación Pérez-Terán
 Critical Care Department, Hospital del Mar, GREPAC – IMIM, Barcelona, Spain
 UAB/UPF, School of Medicine, Spain
 Corresponding author.
 E-mail address: pperez@psmar.cat

278 *Response to the editor: Aeration changes induced by high flow nasal cannula are more homogeneous than those generated by non-invasive ventilation in healthy subjects.*

Judith Marín-Corral
Critical Care Department, Hospital del Mar, GREPAC – IMIM, Barcelona,
Spain
UAB/UPF, School of Medicine, Spain

Irene Dot
Critical Care Department, Hospital del Mar, GREPAC – IMIM, Barcelona,
Spain

Joan Ramon Masclans
Critical Care Department, Hospital del Mar, GREPAC – IMIM, Barcelona,
Spain
UAB/UPF, School of Medicine, Spain
HISpaFlow, Grupo Español Multidisciplinar de Terapia de Soporte con Alto
Flujo en Adultos, Spain

2 October 2019

