

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

**Efecto modulador de la administración de lidocaína  
intravenosa sobre la respuesta inflamatoria sistémica  
secundaria a la ventilación unipulmonar en un modelo  
experimental de cirugía de resección pulmonar**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Ana Isabel Galve Marqués**

**DIRIGIDA POR**

**Ignacio Garutti Martínez  
Carlos María Simón Adiego  
Javier Casanova Barea**

Madrid

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**EFFECTO MODULADOR DE LA ADMINISTRACIÓN DE  
LIDOCAÍNA INTRAVENOSA SOBRE LA RESPUESTA  
INFLAMATORIA SISTÉMICA SECUNDARIA A LA  
VENTILACIÓN UNIPULMONAR EN UN MODELO  
EXPERIMENTAL DE CIRUGÍA DE RESECCIÓN  
PULMONAR.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Ana Isabel Galve Marqués**

Bajo la dirección de los doctores:

**Ignacio Garutti Martínez**

**Carlos María Simón Adiego**

**Javier Casanova Barea**

**Madrid, 2023**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**EFFECTO MODULADOR DE LA ADMINISTRACIÓN DE  
LIDOCAÍNA INTRAVENOSA SOBRE LA RESPUESTA  
INFLAMATORIA SISTÉMICA SECUNDARIA A LA  
VENTILACIÓN UNIPULMONAR EN UN MODELO  
EXPERIMENTAL DE CIRUGÍA DE RESECCIÓN  
PULMONAR.**

**Programa de Doctorado de Investigación Biomédica**

**Ana Isabel Galve Marqués**

Bajo la dirección de los doctores:

**Ignacio Garutti Martínez**

**Carlos María Simón Adiego**

**Javier Casanova Barea**

Madrid, 2023





*“La inspiración existe, pero tiene que encontrarte trabajando”*

*Pablo Picasso.*

*“El genio se hace con un 1% de talento, y un 99% de trabajo”*

*Albert Einstein.*



Mi más sincero agradecimiento:

Al doctor Ignacio Garutti Martínez, por su cabeza privilegiada y llena de ideas. Por sus ánimos y motivación constante, su inmensa paciencia y confianza en que iba a conseguir terminar este proyecto, me lo creí yo también gracias a él. Al doctor Carlos Simón Adiego, por saber ver cada detalle y por su trabajo minucioso y exigente en cada corrección. Al doctor Javier Casanova Barea, por haber estado siempre para ayudarme, a pesar de los contratiempos.

Gracias a los tres, por el tiempo y trabajo tan valioso depositado en este proyecto.

Al personal de la Unidad de Medicina y Cirugía experimental del Hospital Universitario Gregorio Marañón, por su colaboración y por permitirnos hacer uso de las instalaciones. Al personal del Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense, especialmente a Lisa, siempre dispuesta a resolver mis preguntas, has sido de gran ayuda para mí. A los compañeros y residentes que dedican horas de trabajo al “universo experimental”, sin vosotros no existiría este trabajo. Gracias por la colaboración y el trabajo en equipo.

La persona a la que más agradecida estoy, por haber sacado este trabajo adelante conmigo a pesar de todas las dificultades, es a mi marido Pablo. Gracias por cuidar de Pablo e Inés para que yo tuviera ese tiempo tan necesario y difícil de encontrar que ha precisado esta tesis. Es difícil plasmar aquí todos los esfuerzos que has tenido que hacer para que este proyecto vea la luz. Gracias por aguantar mis momentos de agobio y frustración a lo largo del camino y por creer tanto en mí. Finalmente lo hemos conseguido, por eso esto es tan tuyo como mío.

Gracias a mi madre, Anabel, doctora en Psicología, por alentarme y sosegar me cuando lo veía imposible, eres un referente para mí y estoy segura de que si no me

hubieras hecho ver la importancia que posee una tesis doctoral, habría sido capaz de tirar la toalla en momentos de crisis.

A mi padre Salva, por enseñarme la importancia del esfuerzo y el trabajo diario, sé que estás más orgulloso de este trabajo que yo misma.

A José Miguel y a Paula, por haber sido parte del proceso, gracias por motivarme.

Mi última mención y la más especial es para mis hijos, Pablo e Inés, de 2 años y 7 meses de edad. Sois con diferencia las personas que más difícil me lo habéis puesto, pero a la vez, esto es por vosotros. Quiero que el día de mañana veáis que con esfuerzo las cosas siempre salen adelante.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN .....</b>	<b>7</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>13</b>
<b>1.INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>18</b>
<b>1.1 RESPUESTA INFLAMATORIA ASOCIADA A LA CIRUGÍA:.....</b>	<b>20</b>
1.1.1 ORGANIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE DEL ORGANISMO ANTE LA CIRUGÍA:.....	24
1.1.2 MARCADORES BIOLÓGICOS DE INFLAMACIÓN.....	29
1.1.3 SEÑALIZACIÓN CELULAR .....	35
1.1.4 ÓXIDO NÍTRICO .....	37
1.1.5 KLOTTO .....	39
1.1.6 APOPTOSIS .....	40
<b>1.2 RESPUESTA INFLAMATORIA ASOCIADA A LA VENTILACIÓN MECÁNICA.....</b>	<b>44</b>
1.2.1 DAÑO PULMONAR ASOCIADO A VENTILACIÓN MECÁNICA.....	44
1.2.2 DAÑO PULMONAR ASOCIADO A LA VENTILACIÓN UNIPULMONAR .....	45
<b>1.3 PAPEL DEL HÍGADO EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA .....</b>	<b>49</b>
1.3.1 MEDIADORES INFLAMATORIOS E HÍGADO .....	52
1.3.2 RELACIÓN ENTRE LA RESPUESTA INFLAMATORIA LOCAL Y SISTÉMICA A NIVEL HEPÁTICO ...	56
1.3.3 DAÑO HEPÁTICO ASOCIADO A VENTILACIÓN UNIPULMONAR.....	59
1.3.4 DAÑO HEPÁTICO ASOCIADO A CIRUGÍA .....	61
1.3.5 DAÑO HEPÁTICO PRODUCIDO POR ISQUEMIA REPERFUSIÓN.....	62
<b>1.4 LIDOCAÍNA .....</b>	<b>64</b>
1.4.1 GENERALIDADES DE LA LIDOCAÍNA .....	64
1.4.2 EFECTOS CLÁSICOS.....	64
1.4.3 EFECTO COMO ANALGÉSICO.....	64

1.4.4 OTROS EFECTOS CLÍNICOS DE LA LIDOCAÍNA .....	65
1.4.5 LIDOCAÍNA E INFLAMACIÓN .....	65
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>72</b>
2.1 HIPÓTESIS.....	74
2.2 OBJETIVOS.....	74
2.2.1 OBJETIVO PRINCIPAL.....	74
2.2.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS.....	74
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>76</b>
3.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN: .....	78
3.2 MATERIAL FUNGIBLE Y SISTEMA DE MONITORIZACIÓN EMPLEADO.....	79
3.3 QUIRÓFANO E INSTALACIONES .....	80
3.4 PROTOCOLO ANESTÉSICO .....	82
3.5 PROTOCOLO QUIRÚRGICO .....	86
3.6 DISEÑO EXPERIMENTAL Y GRUPOS DE ESTUDIO .....	87
3.7 MEDICIONES REALIZADAS Y TOMA DE MUESTRAS .....	89
3.7.1 DISEÑO DEL PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	89
3.7.2 RECOGIDA DE VARIABLES HEMODINÁMICAS .....	89
3.7.3 RECOGIDA VARIABLES GASOMÉTRICAS .....	90
3.7.4 MUESTRAS DE TEJIDO HEPÁTICO .....	91
3.7.5 DETERMINACIÓN DE MARCADORES BIOQUÍMICOS EN BIOPSIA HEPÁTICA .....	91
3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	94
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>96</b>
4.1 PARÁMETROS GASOMÉTRICOS, HEMODINÁMICOS Y RESPIRATORIOS:.....	98
4.2 DETERMINACIONES EN BIOPSIA HEPÁTICA: .....	101
4.2.1 MARCADORES INFLAMATORIOS ANALIZADOS EN HÍGADO:.....	102

4.2.2 METABOLISMO DEL ÓXIDO NÍTRICO ANALIZADO EN BIOPSIA HEPÁTICA:.....	114
4.2.3 MARCADORES DE APOPTOSIS ANALIZADOS EN BIOPSIA HEPÁTICA:.....	117
<b>5. DISCUSIÓN .....</b>	<b>126</b>
5.1 PARÁMETROS HEMODINÁMICOS, GASOMÉTRICOS Y RESPIRATORIOS:.....	132
5.2 MARCADORES DE LA INFLAMACIÓN: .....	134
5.3 METABOLISMO DEL ÓXIDO NÍTRICO (NO):.....	139
5.4 APOPTOSIS: .....	141
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>146</b>
<b>7.BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>150</b>



## **LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS EN ORDEN ALFABÉTICO:**

Ac: anticuerpo

AL: anestésico/s local/es

ALI: Acute lung injury

BAL: Lavado broncoalveolar

CRP: cirugía de resección pulmonar

EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica

FC: Frecuencia cardíaca

FGF: factor de crecimiento de fibroblastos

FMO: fracaso multiorgánico

IC: Índice cardíaco

IRVS: Índice de resistencia vascular sistémica

IFN- $\gamma$ : interferón gamma

IKB: proteínas inhibidoras de NF $\kappa$ B

IL: interleuquina

IOT: intubación orotraqueal

I/R: isquemia-reperfusión

KC: células de Kupffer

LB: linfocito B

LRS: lung resection surgery

LT: linfocito T

MCP-1: proteína quimiotáctica de monocitos

MCL-1: proteína de diferenciación celular de leucemia mieloide inducida

MPO: mieloperoxidasa

NF $\kappa$ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NK: natural killer

NOS: óxido nítrico sintasa

OLV: one lung ventilation

PAM: Presión arterial media

PEEP: presión positiva al final de la espiración.

PMN: polimorfonucleares neutrófilos

PpAW: presión pico en la vía aérea

ROS: especies reactivas de oxígeno

SDRA: síndrome de distrés respiratorio del adulto

SIR: síndrome de isquemia reperfusión

SRIS: síndrome de respuesta inflamatoria sistémica

TNF-  $\alpha$ : factor de necrosis tumoral alfa

VBP: ventilación bipulmonar

VILI: ventilation induced lung injury/daño pulmonar inducido por ventilación mecánica

VM: ventilación mecánica

VPH: vasoconstricción pulmonar hipóxica

VT: volumen tidal.

VUP: ventilación unipulmonar

VVS: variabilidad de volumen sistólico

# Resumen

## 1. INTRODUCCIÓN

La ventilación unipulmonar (VUP) es un procedimiento utilizado frecuentemente en anestesia torácica, siendo necesaria para colapsar un pulmón en intervenciones quirúrgicas realizadas mediante videotoracoscopia o toracotomía, aislando el pulmón enfermo del sano.

La VUP provoca intensos cambios fisiopatológicos en la ventilación y perfusión pulmonar. Otros factores que también influyen en la relación ventilación/perfusión y que son propios de procedimientos quirúrgicos que requieren ventilación unipulmonar son la toracotomía y la anestesia. La instauración de la VUP y el colapso del pulmón contralateral crean un cortocircuito transpulmonar derecha-izquierda, ya que todo el flujo que perfunde el pulmón no ventilado llega a las cavidades izquierdas sin oxigenar, incrementándose la diferencia alvéolo arterial de O<sub>2</sub> y disminuyendo la PaO<sub>2</sub>. Se desencadenan mecanismos compensatorios activos como la vasoconstricción pulmonar hipóxica (VPH), que reducen la proporción de flujo que llega al pulmón no ventilado y por tanto atenúan la caída de la PaO<sub>2</sub>. La VUP puede inducir una respuesta proinflamatoria, incluyendo liberación de citoquinas y migración de leucocitos en el pulmón ventilado. Durante la VUP se produce, en mayor o menor grado, un daño pulmonar agudo (Acute Lung Injury; ALI) que eleva la morbimortalidad postoperatoria en cirugía de resección pulmonar. En el inicio de este proceso inflamatorio son determinantes los macrófagos alveolares y sus mediadores inflamatorios, especialmente las citoquinas. Las citoquinas proinflamatorias, así como el óxido nítrico y otros radicales libres pueden inducir apoptosis.

Esta respuesta inflamatoria no se encuentra localizada únicamente a nivel pulmonar, los mediadores inflamatorios, a través de la circulación sistémica, alcanzan órganos periféricos distales, entre ellos el hígado. Por tanto, las complicaciones derivadas de la cirugía torácica ocasionan daño a nivel sistémico y la causa de la muerte no es el fallo respiratorio, sino una disfunción multiorgánica secundaria a una respuesta sistémica.

Los anestésicos locales (AL) son usados tradicionalmente como antiarrítmicos y anestésicos por su capacidad para bloquear los canales de sodio. Sin embargo, poseen efectos importantes en otros contextos clínicos a dosis inferiores que las utilizadas para bloquear los canales de sodio. Producen un efecto antiinflamatorio, especialmente sobre la inmunidad celular, a través de distintos mecanismos como la modulación de la producción, liberación y actividad de las citoquinas, la disminución de la adhesión y quimiotaxis de los neutrófilos y la reducción de producción de superóxido. El hígado es un órgano especialmente sensible a la inflamación y con un papel fundamental en la regulación de la misma, por lo que estudiar la aplicación de AL en la modulación de la respuesta inflamatoria sistémica cobra especial relevancia. No se ha estudiado previamente el impacto de los AL sobre el daño secundario sistémico a nivel hepático de la VUP en cirugía de resección pulmonar (CRP).

## 2. HIPÓTESIS

La cirugía de resección pulmonar con ventilación unipulmonar se asocia a una respuesta sistémica que puede ser medida por la expresión de mediadores inflamatorios en el hígado. Sería posible modular la respuesta inflamatoria sistémica y con ello atenuar la inflamación a nivel hepático mediante tratamientos realizados próximos al inicio del periodo de ventilación unipulmonar.

La administración de lidocaína durante la cirugía podría modular la respuesta

inflamatoria hepática y por tanto la respuesta inflamatoria sistémica postoperatoria.

### 3. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es investigar la posible modulación por parte de la lidocaína intravenosa sobre la expresión de mediadores proinflamatorios a nivel hepático tras un procedimiento de resección pulmonar con ventilación unipulmonar.

### 4. MATERIAL Y MÉTODOS

El procedimiento consiste en realizar una cirugía de resección pulmonar con VUP durante un período de 120 minutos en 18 cerdos. Se dividen a los animales en tres grupos de 6:

- Grupo 1, LIDOCAÍNA: se administra 1,5 mg/kg/iv tras la inducción anestésica y una perfusión continua de mantenimiento con lidocaína 1,5 mg/kg/h hasta el final.
- Grupo 2, CONTROL: se administra en iguales cantidades un bolo inicial y una perfusión continua de mantenimiento, pero de solución salina 0,9%.
- Grupo 3, SHAM. En este grupo se realiza toracotomía y ventilación bipulmonar (VBP) exclusivamente. No se lleva a cabo VUP ni lobectomía.

Se monitorizan parámetros respiratorios, gasométricos y hemodinámicos. Se obtienen biopsias hepáticas a las 24 horas de realizar el procedimiento. Se analizan mediadores inflamatorios, metabolismo del óxido nítrico y apoptosis.

### 5. RESULTADOS

Los resultados observados en nuestro trabajo son los siguientes:

- 1- Con la administración de lidocaína intravenosa observamos que se atenúa la respuesta inflamatoria hepática.

- 2- Las variables hemodinámicas, gasométricas y parámetros respiratorios se mantuvieron estables durante los procedimientos en todos los grupos.
- 3- La ventilación unipulmonar y la cirugía de resección pulmonar ocasionan un aumento en la liberación de marcadores proinflamatorios medidos en biopsia hepática, como podemos observar al comparar el grupo SHAM con los otros dos grupos de trabajo.
- 4- En cirugía de resección pulmonar que precisa ventilación unipulmonar existe un aumento de la expresión de los niveles de IL-1, TNF-  $\alpha$ , NFkB, MCP-1 en biopsia hepática. La administración de lidocaína intravenosa atenúa este incremento.
- 5- Los grupos que se someten a cirugía de resección pulmonar con ventilación unipulmonar muestran menor expresión de I $\kappa$ B $\beta$  que el grupo SHAM. La administración de lidocaína atenúa este descenso de I $\kappa$ B $\beta$  en comparación con el grupo control.
- 6- Se observa un aumento en la expresión de IL-10, citoquina antiinflamatoria, en el grupo en el que se administra lidocaína.
- 7- Observamos un aumento en la expresión de proteínas apoptóticas a nivel hepático en el grupo control. La administración de lidocaína intravenosa atenúa dicho incremento.
- 8- En cirugía de resección pulmonar que precisa ventilación unipulmonar existe un aumento de la expresión de iNOS en hígado que se atenúa con la administración de lidocaína intravenosa. Los niveles de eNOS aumentan en el grupo lidocaína.
- 9- Los niveles de KLOTHO en hígado disminuyen su expresión con la administración de lidocaína intravenosa.

## 6. CONCLUSIONES

Nuestros resultados sugieren que el uso intraoperatorio de perfusión de lidocaína intravenosa modula la respuesta inflamatoria hepática postoperatoria asociada a la cirugía de resección pulmonar, especialmente por los efectos antiinflamatorios, antiapoptóticos y por la protección del metabolismo del óxido nítrico



# Summary

## 1. INTRODUCTION

One-lung ventilation (OLV) is a procedure widely used in the thoracic anesthesia, being necessary to isolate a lung in surgical interventions performed by video-assisted thoracoscopy or thoracotomy, isolating the diseased lung from the healthy one.

The OLV produces physiopathological changes in pulmonary ventilation and perfusion. Other factors that also influence the ventilation/perfusion relationship and that are typical of surgical procedures that require OLV are thoracotomy and anesthesia. The instauration of the OLV and the collapse of the other lung creates a transpulmonary right - left side shunt, the whole flow that perfused the not drafted lung comes to the left cavities without becoming oxygenated. Therefore, there is an increase in the alveolar-arterial O<sub>2</sub> difference and a decrease in PaO<sub>2</sub>. Active compensatory mechanisms are triggered such as hypoxic pulmonary vasoconstriction (HPV), which reduce the proportion of flow that reaches the non-ventilated lung and therefore attenuate the fall in PaO<sub>2</sub>. OLV can induce a proinflammatory response, including cytokine release and leukocyte migration in the ventilated lung. During OLV, acute lung damage (Acute Lung Injury; ALI) occurs to a greater or lesser degree, which increases postoperative morbidity and mortality in lung resection surgery. Alveolar macrophages and the inflammatory mediators they produce are decisive, especially cytokines. Proinflammatory cytokines, as well as nitric oxide and other free radicals can induce apoptosis.

This inflammatory response is not located only at the pulmonary level, inflammatory mediators reach distal peripheral organs through the systemic circulation, including the liver. Therefore, the complications derived from thoracic surgery cause systemic damage

and the cause of death is not respiratory failure, but multi-organ dysfunction secondary to a systemic response.

Local anesthetics (LA) are traditionally used as antiarrhythmics and anesthetics due to their ability to block sodium channels, however, they have important effects in other clinical contexts at lower doses than those used to block sodium channels. They also produce an anti-inflammatory effect, especially on cellular immunity, through different mechanisms, such as the modulation of the production, release and activity of cytokines, the decrease in adhesion and chemotaxis of neutrophils, as well as reducing the superoxide production.

The liver is an organ that is especially sensitive to inflammation and plays a fundamental role in regulating it, so studying the application of LA in the modulation of the inflammatory response is particularly relevant. The impact of LA on secondary systemic liver damage from OLV in lung resection surgery (LRS) has not been previously studied.

## 2. HYPOTHESIS

Lung resection surgery with one-lung ventilation is associated with a systemic response that can be measured by the expression of inflammatory mediators in the liver. It would be possible to modulate the systemic inflammatory response and thereby attenuate inflammation at the liver level through treatments carried out close to the beginning of the one-lung ventilation period. The administration of lidocaine during surgery could modulate the hepatic inflammatory response and therefore the postoperative systemic inflammatory response.

### 3. OBJECTIVES:

The general objective of this work is to investigate the possible modulation by intravenous lidocaine on the expression of proinflammatory mediators at the liver level after a lung resection procedure with one-lung ventilation.

### 4. MATERIAL AND METHODS

The procedure consists of performing a lung resection surgery with contralateral OLV in a total of 18 pigs. Animals are randomly divided into three groups, each with 6 pigs:

- Group 1, LIDOCAINE: 1.5 mg/kg/iv is administered after anesthetic induction and a continuous maintenance perfusion with lidocaine 1.5 mg/kg/h until the end of the procedure.

- Group 2, CONTROL: an initial bolus and a continuous maintenance infusion are administered in equal amounts, but with 0.9% saline solution.

- Group 3: SHAM group. In this group, thoracotomy and double lung ventilation were performed exclusively. OLV and lobectomy were not performed.

Respiratory and hemodynamic parameters are monitored. Blood gases are obtained and transpulmonary thermodilution is performed at certain times. Liver biopsies are obtained 24 hours after the procedure. Inflammatory mediators, nitric oxide metabolism and apoptosis are analyzed.

### 5. RESULTS

- 1- The administration of intravenous lidocaine produced an attenuation of the inflammatory response at the liver level.

- 2- Hemodynamic variables, blood gases and respiratory parameters remained stable during the procedures in all groups.

3- One-lung ventilation and lung resection surgery cause an increase in the release of pro-inflammatory markers measured in liver biopsy, as we can see when comparing the SHAM group with the other two work groups.

4- In lung resection surgery that requires one-lung ventilation, there is an increase in the expression of IL-1, TNF- $\alpha$ , NF $\kappa$ B, and MCP-1 levels in liver biopsy. The administration of intravenous lidocaine attenuates this increase.

5- The groups that underwent lung resection surgery with one-lung ventilation showed lower I $\kappa$ B $\beta$  expression than the SHAM group. Furthermore, the administration of lidocaine reduces its increase.

6- An increase in the expression of IL-10, an anti-inflammatory cytokine, is observed in the group in which lidocaine is administered.

7- We observed how the different apoptotic proteins, BAX, BCLXI, and especially BAD, BAK, MCL-1 and PUMA increase their expression at the liver level. Maintenance with continuous infusion of intravenous lidocaine attenuates this increase.

8- In lung resection surgery that requires one-lung ventilation, there is an increase in the expression of iNOS in the liver that is attenuated with the administration of intravenous lidocaine. eNOS levels increase in the lidocaine group.

9- KLOTHO levels in the liver decrease its expression with the administration of intravenous lidocaine.

## 6. CONCLUSIONS

Our results suggest that the intraoperative use of intravenous lidocaine perfusion modulates the postoperative hepatic inflammatory response associated with lung

resection surgery, especially due to its anti-inflammatory and anti-apoptotic effects and the protection of nitric oxide metabolism.

# **1. Introducción**



## 1.1 RESPUESTA INFLAMATORIA ASOCIADA A LA CIRUGÍA:

La respuesta inflamatoria causada en el organismo a consecuencia de un procedimiento quirúrgico es conocida como respuesta al estrés, y engloba un conjunto de procesos que tienen el objetivo de maximizar el potencial de curación del organismo.

El proceso inflamatorio secundario a la cirugía es un hecho inherente al trauma, que se inicia durante la intervención quirúrgica y que se prolonga en los siguientes días de postoperatorio. La respuesta inflamatoria puede ser exagerada o por el contrario insuficiente, en estos casos se ha visto una asociación con peores resultados en el postoperatorio (1).

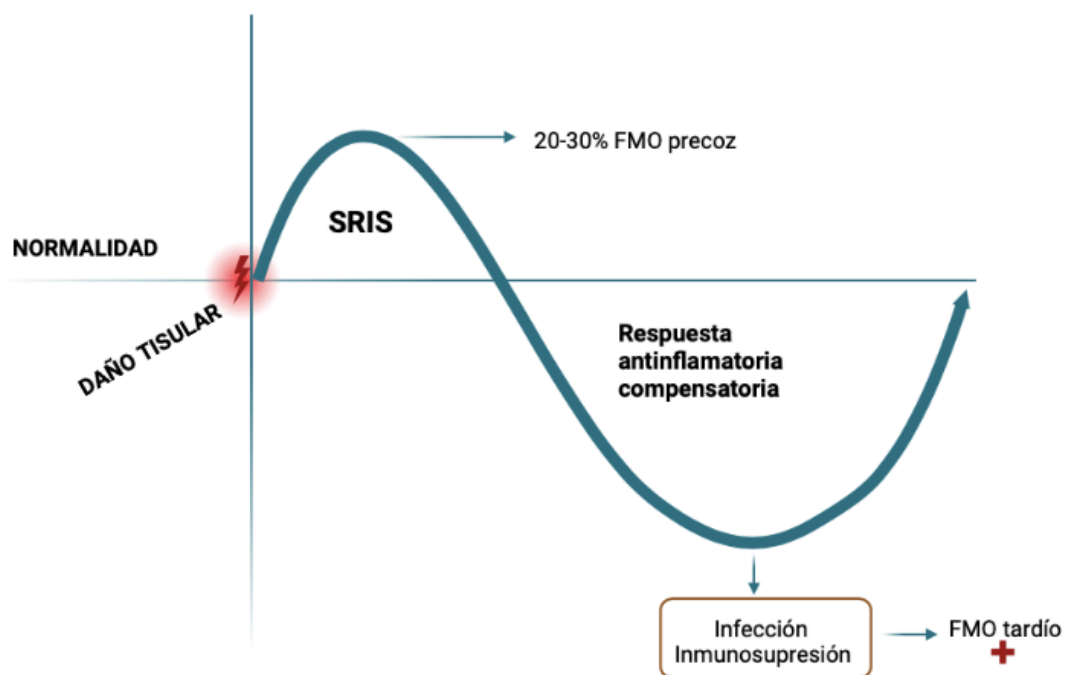


Figura 1: Respuesta inflamatoria bifásica tras el daño tisular. SRIS: síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, en un 20-30% de los casos persiste y da lugar a FMO precoz, sino da paso a la respuesta antiinflamatoria compensatoria. FMO: fracaso multiorgánico. (Elaboración propia).

La respuesta al estrés fue descrita tiempo atrás por diferentes autores como Francis Moore o Davis Cuthberston (2), quienes la describieron como una respuesta inmune, inflamatoria y metabólica bifásica a la lesión.

En una primera fase o “fase de shock” tiene lugar una respuesta coordinada dirigida a la supervivencia inmediata. Se caracteriza por vasoconstricción periférica, hipotermia y desviación de la sangre a órganos vitales. La segunda fase o “fase de hipermetabolismo” es proporcional al grado de la lesión producida en la cirugía. En esta fase aumentan la liberación de mediadores inflamatorios, el consumo de oxígeno y la producción de CO<sub>2</sub>. Existe una mayor actividad de células reparadoras, los leucocitos precisan glucosa, y aumenta el catabolismo del músculo para conseguirla dado que los almacenes de la misma se agotan. Esta fase se asocia taquicardia y a un aumento del gasto cardiaco, que precisan mayor consumo de oxígeno (1).

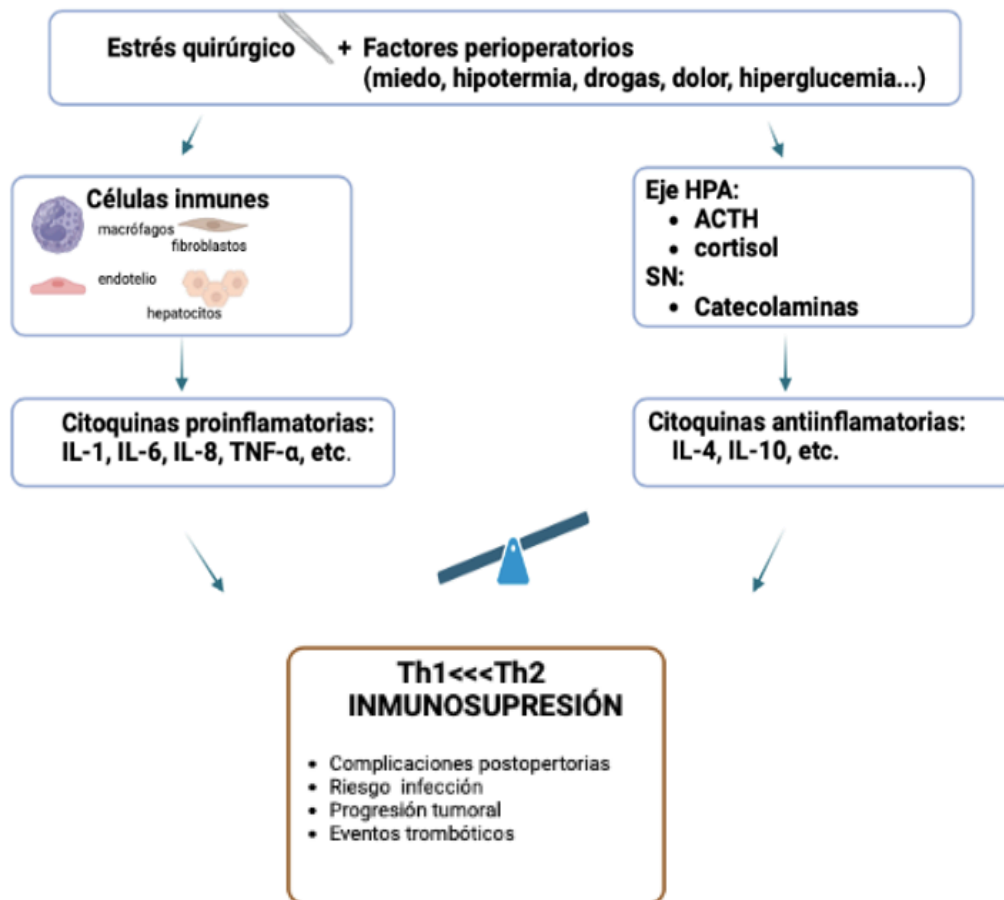


Figura 2: Respuesta endocrina y biológica a la lesión quirúrgica y cambios inmunológicos que conlleva. HPA: eje hipotálamico-pituitario-adrenal. SN: sistema nervioso. ACTH: hormona adrenocorticotropa. (Elaboración propia).

Además, la respuesta al estrés comienza con la activación del eje hipotálamo-pituitario-suprarrenal y el sistema nervioso simpático, canalizándose vía nervios aferentes desde el lugar en el que se ocasiona el daño tisular (3). Esto desencadena una producción y secreción aumentada de ACTH, cortisol, catecolaminas, hormona antidiurética, cortisol, insulina, glucagón y hormona del crecimiento, así como de mediadores de la inflamación (citoquinas), en un esfuerzo por proporcionar energía al huésped. Existe por tanto una retención de líquidos y sal para mantener la homeostasis cardiovascular.

Este catabolismo o estado de “alto estrés” mantenido agotaría los recursos endógenos y la respuesta se volvería desadaptativa. Moore y cols (4) observaron que en condiciones normales el catabolismo disminuía 4-5 días después de la lesión; proceso al que llamó transición del "catabolismo" al "anabolismo", donde se reduce la demanda de gluconeogénesis, se resuelve la vasodilatación y disminuye la necesidad de altos niveles de catabolismo.

Las manifestaciones de la fase hipermetabólica se pueden ver clínicamente en todos los pacientes postoperados, siendo mayor cuanto más agresiva es la cirugía; el aumento del cortisol tiene efecto inmunosupresor y antiinflamatorio, así como la elevación de los niveles de catecolaminas. El cortisol, además, interfiere con la producción de citoquinas y prostaglandinas, afecta a la agregación de macrófagos impidiendo su concentración en la zona de la lesión y disminuyendo su poder fagocítico. Con respecto a sus efectos sobre los linfocitos, promueve la apoptosis de linfocitos T (LT) y la dominancia de Th2, afectando negativamente a las células natural killer (NK) a la hora de ejercer sus acciones (5).

Los procedimientos quirúrgicos causan daño tisular que activa la respuesta inflamatoria sistémica y genera cambios en el sistema neuroendocrino, inmune y metabólico. La anestesia y el dolor pueden alterar aún más el desempeño inmunológico. Se ha observado como la anestesia regional provoca el bloqueo de los nervios aferentes y de esta manera, actúa como mediador de la protección inmunitaria (6).

*El objetivo último de la respuesta inflamatoria ante una agresión quirúrgica es el de preservar la integridad del organismo, la reparación de los tejidos dañados y el mantenimiento de la homeostasis.*

### 1.1.1 ORGANIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE DEL ORGANISMO ANTE LA CIRUGÍA:

El sistema inmunitario a su vez se subdivide en dos, el sistema inmunitario innato (no específico) y el adaptativo (específico), ambos compuestos por elementos humorales y celulares que protegen al organismo frente a patógenos extraños y frente al cáncer.

Las respuestas inmunes se regulan por células presentadoras de antígenos, componentes de la inmunidad innata, y por las subclases de Linfocitos T (LT) auxiliares Th1 y Th2 que forman parte de la inmunidad específica. Cuando una célula fagocítica ingiere un antígeno, lo presenta en su membrana y la producción y amplificación de células clones de linfocitos T y B (LB) se estimula, constituyendo este el mecanismo inicial de la respuesta inmunitaria (7) (3).

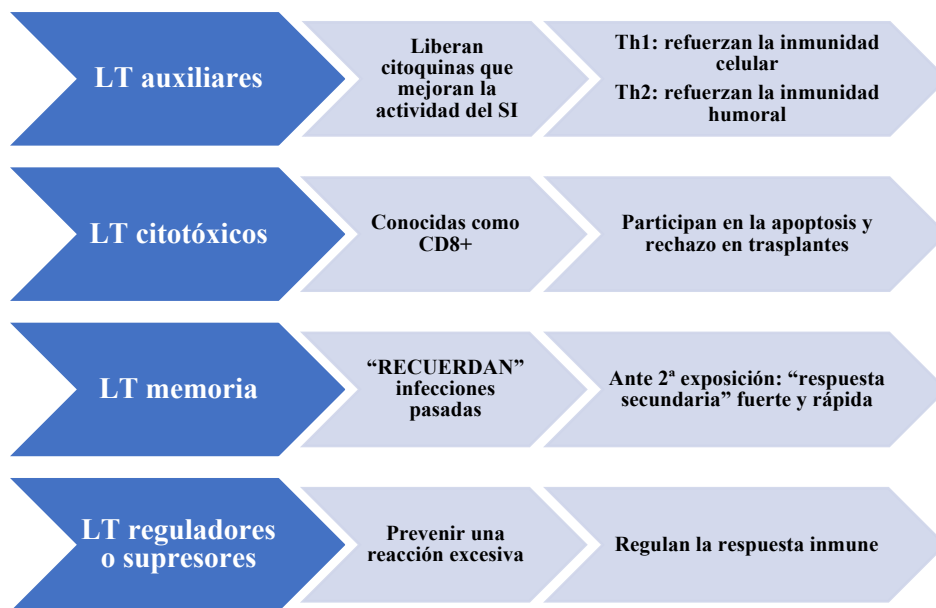


Gráfico 1: Diferenciación de los LT. Efectos y características. LT: Linfocitos T, SI: Sistema inmune (3). (Elaboración propia).

Los LB son responsables de la inmunidad humoral en la respuesta adaptativa. Los LT auxiliares secretan citoquinas que ayudan a la maduración de las células B en células plasmáticas secretoras de anticuerpos (Ac) o células B de memoria; los Ac secretados, se unen a su patógeno complementario facilitando su eliminación por parte de las células fagocíticas en un proceso que se conoce como opsonización. Cuando un antígeno se presenta de manera repetida, se activan los LB de memoria y se inicia una respuesta inflamatoria humoral secundaria rápida.

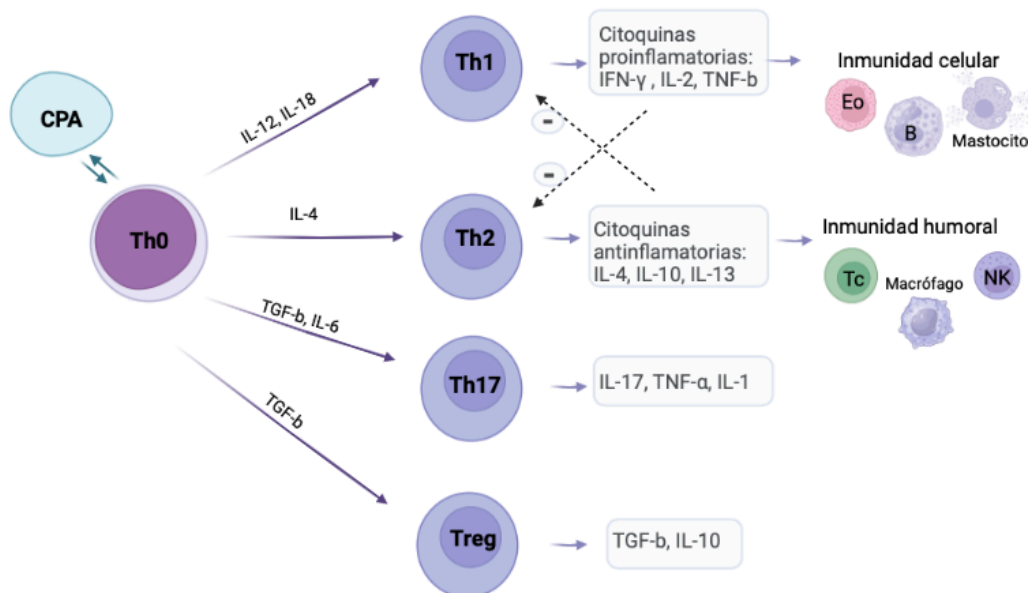


Figura 3: Diferenciación de los linfocitos T y producción de citoquinas. (Elaboración propia).

En fases tempranas de la inflamación predominan las citoquinas Th1 que son IL-2, IL-12, TNF-β e IFN-γ, que estimulan también la síntesis de óxido nítrico (NO) y la inmunidad celular. El aumento del cortisol, las catecolaminas y otros reactantes de fase aguda generados en la respuesta al estrés, dan lugar a un predominio antiinflamatorio posterior de Th2 (8) (citoquinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13) que promueven la inmunidad humoral (3).

Las células Th0 son los precursores de Th1 y Th2, en esta diferenciación hacia Th1 o Th2 se ha visto que influyen las citoquinas producidas por el sistema inmune innato. Las respuestas Th1 y Th2 se inhiben mutuamente (9).

Tabla 1: principales citoquinas inflamatorias

Principales citoquinas proinflamatorias	Principales citoquinas antiinflamatorias
IL-12, IFN- $\gamma$ e TNF- $\alpha$	IL-4, IL-10.(9)

El daño tisular ocasiona un aumento de marcadores inflamatorios, especialmente de IL-1 y TNF- $\alpha$  por parte de las células fagocíticas y del endotelio, lo que constituye el inicio de la “cascada inflamatoria”. Al inicio, la cascada inflamatoria se manifiesta a nivel local de manera “compartimentalizada” y posteriormente, puede propagarse en un proceso conocido como “**descompartimentalización**” a nivel sistémico. Conforme los mediadores inflamatorios alcanzan determinadas concentraciones, son vertidos al torrente sanguíneo y alcanzan los órganos diana (10) (11).

Se ha visto relación entre los niveles plasmáticos de citoquinas proinflamatorias y el daño tisular, siendo mayores las concentraciones en los casos de mayor daño tisular (12). Estudios en cirugía vascular y ortopédica han observado como IL-1 y TNF- $\alpha$  ocasionan un aumento de IL-6 proporcional al grado de lesión tisular (13).

En condiciones fisiológicas, existe una red de citoquinas proinflamatorias, antiinflamatorias e inhibidores de citoquinas que se encuentran en equilibrio. El **balance entre la respuesta pro/antiinflamatoria** es un proceso clave ya que el desequilibrio entre las mismas determina el desarrollo de la enfermedad y las complicaciones postoperatorias

(8) (14-15). Diferentes estudios han descrito como tanto la hiperinflamación inicial descontrolada como la inmunosupresión continuada son objetivos principales para restablecer un equilibrio entre ambas fuerzas (pro/antinflamación) (2)(16). La respuesta inmune disminuida podría ocasionar infecciones secundarias a la inmunosupresión, así como una respuesta exagerada del sistema inmune podría conducir al síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) y al fracaso multiorgánico (FMO) (17).

Las diferentes células del sistema inmunitario liberan citoquinas. El grado de liberación y expresión de las mismas depende del tipo de cirugía que se realiza, su duración, localización, agresividad, e influyen también los agentes anestésicos empleados. Las citoquinas inflamatorias afectan a todos los órganos a nivel sistémico. El hecho de poder modular la respuesta inflamatoria sistémica puede ayudar a evitar/disminuir el daño potencial de las mismas (18). Kehlet y cols observaron como la cirugía mínimamente invasiva posiblemente sea la manera más eficaz de minimizar la depresión inmunitaria postoperatoria, atenuar la cascada inflamatoria y la liberación de linfocitos y minimizar la desviación de la respuesta Th2, que se asocia con menor estancia hospitalaria y una recuperación más rápida. El adecuado control analgésico intra y postoperatorio se asocian también a una menor respuesta inflamatoria (19) (20) (5). El uso de AL y de anestesia regional son otras acciones que han demostrado ser eficaces a la hora de minimizar la respuesta inflamatoria al bloquear los nervios aferentes y por tanto disminuir infecciones en el postoperatorio (6,21,22).



Figura 4: Respuesta al estrés y factores que intervienen. (Elaboración propia).

La respuesta inflamatoria es muy variable, dependiendo de factores como el propio individuo, la agresión sufrida y la patología o comorbilidades de base, por lo que existe una amplia variabilidad interindividual. Una respuesta mal organizada contribuye a la lesión orgánica perioperatoria y a mayores complicaciones postoperatorias (23) (54).

*Uno de los objetivos principales del equipo quirúrgico es por tanto preservar en equilibrio la respuesta inmunitaria intraoperatoria; respuesta que clásicamente se ha considerado como “protectora”, pero que actualmente conocemos que tiene unos efectos perjudiciales no despreciables en el organismo como hipotensión, sangrado, hiperglucemia, hipotermia, dolor y alteraciones en la inmunidad entre otros (8).*

## **1.1.2 MARCADORES BIOLÓGICOS DE INFLAMACIÓN**

### ***1.1.2.1 RESPUESTA CELULAR EN LA INFLAMACIÓN***

La inflamación en términos generales, es una respuesta que ocurre por parte del organismo ante un evento dañino como puede ser un traumatismo, lesión o la presencia de un patógeno. Esto ocasiona una liberación de mediadores vasoactivos, plaquetas y otras sustancias al torrente sanguíneo, que dan lugar a vasodilatación y a un aumento de la permeabilidad vascular. Aparecen así los clásicos signos de calor, rubor, hinchazón y dolor debido a la interacción de mediadores inflamatorios con los sistemas sensoriales (24).

La respuesta inflamatoria inicial constituye una “reacción de fase aguda”. La elevación de citoquinas en esta fase es muy importante, ya que éstas modulan la inflamación y la coordinan, induciendo quimiotaxis o atracción de los neutrófilos hacia la zona afectada, mediando así la respuesta inflamatoria sistémica, que aumenta con los mediadores inflamatorios liberados por los leucocitos polimorfonucleares (PMN). Se puede producir en este contexto fiebre y reacciones de fase aguda, se movilizan neutrófilos de la médula ósea y se promueve la proliferación de linfocitos.

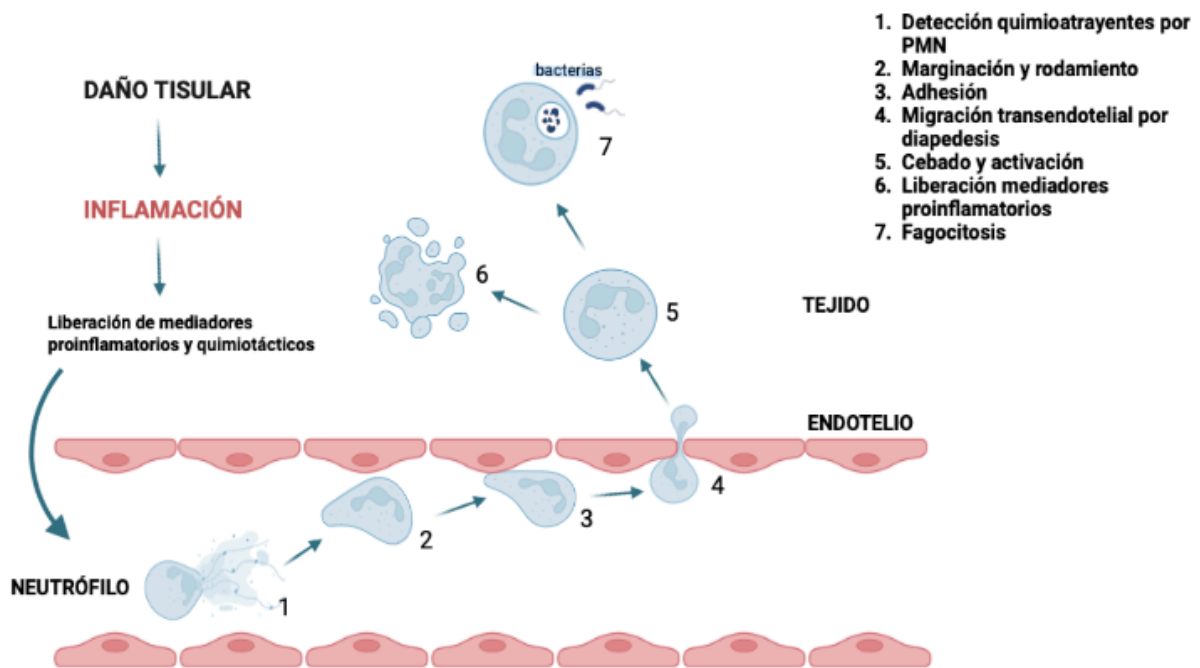


Figura 5: Estadios de la respuesta inflamatoria, migración del leucocito polimorfonuclear (24). (Elaboración propia).

Los leucocitos PMN neutrófilos son las células efectoras principales de la respuesta inflamatoria celular. La respuesta inflamatoria induce a las células (principalmente PMN y monocitos) a migrar hacia el área afectada, en la que destruyen patógenos, en gran parte por fagocitosis (25). Este proceso se divide en varias etapas:

1. En el lugar de la infección/inflamación se liberan citoquinas, se activa el sistema del complemento y las bacterias producen quimioatrayentes que son detectados por los leucocitos PMN.

2 y 3. Una vez detectados los quimioatrayentes, los PMN mediante una técnica de rodamientos se adhieren a las células endoteliales. La adhesión está mediada por diferentes sustancias como histamina, factores del complemento, IL-1 e IL-8, TNF- $\alpha$  y factor activador de plaquetas (26).

4. Migración transendotelial por diapédesis: los PMN atraviesan las brechas que se sitúan entre las células endoteliales adyacentes. Posteriormente, en un proceso conocido como quimiotaxis, migran hacia los quimioatrayente de los patógenos.

5. Cebado y activación: Los patógenos están opsonizados, es decir, recubiertos por proteínas específicas como inmunoglobulinas o proteínas de fase aguda. Los PMN se ceban o activan, expresando mayores receptores en sus membranas.

6. Liberación de sustancias/degranulación: los PMN generan radicales libres de oxígeno y otras sustancias proinflamatorias. El aumento de la captación de oxígeno (independiente de la respiración mitocondrial) es necesario para generar estos radicales, y se conoce como “estallido respiratorio”.

7. Fagocitosis: Los patógenos son eliminados por fagocitosis y por la liberación de concentraciones elevadas de metabolitos reactivos de oxígeno en el fagosoma.

*La respuesta inflamatoria es necesaria para la reparación estructural y funcional del tejido lesionado. Como hemos comentado previamente, las respuesta hiperactivas o exageradas, que destruyen en lugar de proteger, son críticas en el desarrollo de una serie de estados patológicos perioperatorios, como el dolor postoperatorio, el síndrome de dificultad respiratoria del adulto (SDRA), el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) y el fracaso multiorgánico (FMO). La modulación perioperatoria de tales respuestas es un objeto relevante en la práctica clínica de la anestesiología, y los AL pueden desempeñar un papel importante al respecto (24).*

### ***1.1.2.2 CITOQUINAS EN LA INFLAMACIÓN***

Las citoquinas forman parte de la respuesta celular y tienen un papel esencial como mecanismo de defensa y reparación ante una agresión/trauma sufrido en el organismo, siendo moduladoras de la respuesta inflamatoria.

Son polipéptidos o glicoproteínas de bajo peso molecular, esenciales para la comunicación intercelular. Actúan de manera específica sobre receptores celulares activando señales intracelulares y vías de señalización intercelular, originando respuestas en cascada (27). Regulan las expresiones de los genes y pueden ser producidas por diferentes tipos de células inmunes como linfocitos y macrófagos activados (28), o por células no inmunes como células endoteliales, fibroblastos y células del estroma.

Su acción principal es modular el proceso inflamatorio, aunque forman parte de numerosos procesos fisiológicos como pueden ser la diferenciación y maduración celular, quimiotaxis, inflamación aguda y crónica, respuesta inmunológica y apoptosis entre muchos otros. Además, tienen un papel importante en la defensa y reparación de las lesiones inducidas por trauma, como es por ejemplo una intervención quirúrgica.

Asimismo, las citoquinas regulan la producción y actividad de otras citoquinas. Las citoquinas proinflamatorias juegan un rol importante en el síndrome de isquemia/reperfusión (SIR) que ha sido analizado en múltiples estudios (29,30) (31).

#### **1.1.2.2.1 Factor de necrosis tumoral, TNF- $\alpha$ :**

Citoquina proinflamatoria de 17kd y 157 aminoácidos, secretada por diferentes células como macrófagos, LT, natural killer (NK) y neutrófilos. Su papel es importante en la diferenciación de monocitos a macrófagos, la activación de macrófagos, el reclutamiento de neutrófilos y macrófagos y la formación de granulomas (32).

Su función ha sido analizada tanto de forma aislada como en múltiples modelos de lesión por I/R en una variedad de lechos vasculares. Identificándose funciones en el hígado, corazón, cerebro, riñones, extremidades posteriores, y la I/R (33). Promueve la lesión en lechos vasculares, y su bloqueo con factores anti TNF reduce dicha lesión de una manera dependiente de los neutrófilos.

TNF promueve la generación de lesión pulmonar aguda, su papel en la lesión pulmonar aguda no isquémica ocurre a través del daño inducido por el lipopolisacárido y complejos inmunes que involucran la membrana basal. Se han definido diferentes roles de TNF- $\alpha$  en modelos dependientes de neutrófilos.

La capacidad de las preparaciones recombinantes de IL-1 y TNF- $\alpha$  para causar directamente daño pulmonar también parece depender del reclutamiento de neutrófilos (34). Huber y cols. realizando un bloqueo de TNF- $\alpha$  e IL-1 previo a I/R pulmonar en modelos murinos, observaron como existe una disminución importante en el número de neutrófilos pulmonares y una menor fuga capilar (34). La administración de TNF- $\alpha$  recombinante en modelos animales puede provocar fiebre, acidosis láctica, disfunción miocárdica, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) y muerte (17) (35) se han observado también efectos como leucopenia y trombocitopenia en humanos (36).

Niveles elevados de TNF- $\alpha$  se correlacionan con gravedad y peor pronóstico en procesos de sepsis (17) (34). La administración de Ac anti- TNF- $\alpha$  ha demostrado protección en determinadas patologías, en modelos experimentales con diferentes animales, por ejemplo, en ratones “*knock out*” para TNF- $\alpha$ , se observa como resisten el colapso hemodinámico y la muerte por endotoxinas (17). En pulmón tras administrar anticuerpos anti TNF- $\alpha$  se reduce el daño vascular, el acúmulo de neutrófilos pulmonares, el número de leucocitos en el BAL y la expresión del ARN mensajero. El grado de protección proporcionado por el bloqueo de TNF- $\alpha$  está entre 40%-60% (33).

#### 1.1.2.2.2. Interleuquina 1, IL-1:

Citoquina proinflamatoria producida por múltiples tipos celulares. Se presenta en dos formas, denominadas IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (33).

Ambos polipéptidos ejercen las mismas funciones biológicas y se unen al mismo receptor de membrana celular, pero mientras la IL-1 $\beta$  se secreta al medio extracelular, IL-1 $\alpha$  permanece unida a la membrana de la célula que la produce. Entre la variedad de sus acciones proinflamatorias se incluyen la quimioatracción de leucocitos, la estimulación de fagocitos, el aumento de la producción de citoquinas y quimiocinas en sentido descendente y los efectos variables sobre el crecimiento y la muerte celular.

En el *shock* séptico se produce liberación masiva de IL-1 a la circulación, induciendo fiebre y síntesis de reactantes de fase aguda (37). Los estudios relacionados con I/R en miembros inferiores han demostrado que el bloqueo del receptor IL-1 proporciona protección ante la misma.

#### 1.1.2.2.3 Interleuquina 10, IL-10:

Es una citoquina con alto poder antiinflamatorio, considerada la citoquina inmunosupresora por excelencia, capaz de inhibir la activación y función de las células T, monocitos y macrófagos. Desarrolla un papel multifuncional con diversos efectos en la mayoría de células hematopoyéticas.

Su función más relevante es la de limitar las respuestas inflamatorias, pero también regula el crecimiento y diferenciación de células B, NK, mastocitos, granulocitos y TNF- $\alpha$  entre otras (38).

Inhibe la síntesis de TNF- $\alpha$  e IL-1 y antagoniza su acción aumentando el número de citoquinas antagonistas e inhibidores de citoquinas. Se han realizado estudios en los que se observa como la administración de IL-10 recombinante humana tiene un potencial

papel terapéutico importante, disminuyendo la concentración de TNF- $\alpha$  en plasma, reduciendo el daño tisular medido por infiltración de neutrófilos (34).

#### 1.1.2.2.4 Proteína quimiotáctica de monocitos 1, MCP-1:

Proteína quimioatrayente de monocitos 1, CCL2 o MCP, producida por varios tipos celulares desde fibroblastos a células monocíticas y de la microglía (34).

MCP-1 está implicada en el reclutamiento celular de NK, leucocitos, neutrófilos y concretamente en el de monocitos tanto in vivo como in vitro (29). Tiene un papel importante en la respuesta inmune, regula procesos como la migración y la infiltración de monocitos, linfocitos T y NK (39). Ha sido estudiada in vitro e in vivo observándose anomalías en el proceso de reclutamiento de monocitos al anular su expresión. Su expresión aumenta en diferentes patologías inflamatorias como miocarditis (40), peritonitis u osteoartritis entre otras, en este último caso se ha relacionado con la progresión de la enfermedad, lo que podría hacer de MCP-1 un potencial biomarcador de la enfermedad (41).

### 1.1.3 SEÑALIZACIÓN CELULAR

El proceso de señalización celular implica la transmisión de señales entre diferentes células del organismo, según la distancia entre dichas células la señal puede llegar por contacto directo, de manera paracrina (corta distancia), endocrina (larga distancia) o autocrina (una célula se envía a sí misma una señal).

La señalización abarca los procesos en los que las células emiten o reciben un mensaje, lo procesan, y generan una respuesta, manteniéndose la comunicación entre sí y con el entorno.

### ***1.1.3.1. Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas, NFκB:***

Es un factor de transcripción del ADN, regula la expresión génica y posee una importante función en la biología celular e inmunológica (42). Vía activación de NFκB, IL-1 y TNF-α regulan al alza la expresión de quimiocinas (43).

Se encuentra en la mayoría de estirpes celulares animales y su expresión es necesaria para la formación adecuada de la inmunidad, el reconocimiento de patógenos, la respuesta innata del sistema inmune, la inflamación y la inmunidad adaptativa (44). Se localiza en el citoplasma celular y su capacidad para la transcripción del ADN del gen diana es inducida por la transducción de señales. La regulación defectuosa del NFκB está relacionada con el cáncer, enfermedades inflamatorias y autoinmunes, shock séptico, infecciones virales o un desarrollo inmune inadecuado (45) .

El control sobre NFκB se lleva a cabo por dos factores proteicos, un miembro de la familia IκB de proteínas inhibidoras de NFκB y el complejo IκB quinasa (IKK). La red NFκB se compone de cinco monómeros de proteínas miembros de la familia (p65/RelA, RelB, cRel, p50 y p52) (46).

La actividad de NFκB se puede inducir por varias vías (47):

- Vía canónica: a través de TNF-α o IL-1β y señales de antígeno se activan dímeros que en estado basal están en el citoplasma unidos a inhibidores de NFκB (IκBs). Cuando el ligando estimulante es reconocido por su receptor, se activa el complejo quinasa (IKK), este se dirige a IκB para la fosforilación. En las células en reposo, las proteínas IκB evitan que el NFκB se una al ADN pero cuando existe la señal de localización nuclear NFκB, este se disocia de su proteína inhibidora IκB y se transporta al núcleo donde lleva a cabo su función transcripcional (48).

- La **vía no canónica** es de cinética retardada y da como resultado una respuesta más persistente.

#### **1.1.3.2. IκB:**

Las proteínas IκB son vitales para regular la vía NFκB. Funcionan generalmente como inhibidores de la misma, al bloquear la unión NF-κB-ADN y retenerlo transcripcionalmente inactivo en el citoplasma. (44). La eliminación de IκBα activa NFκB que se transloca rápidamente en el núcleo, donde puede unirse a secuencias de ADN específicas y elevar sus niveles de transcripción.

#### **1.1.4 OXIDO NÍTRICO**

El óxido nítrico desarrolla numerosas funciones en la biología celular y el proceso inflamatorio. Conocido inicialmente por su capacidad vasodilatadora, en el sistema inmune se observó su presencia en los macrófagos estimulados por citoquinas o por un proceso infeccioso.

Se han identificado tres enzimas diferentes de óxido nítrico sintasa (NOS) (49):

- NOS neuronal (nNOS): regula la neurotransmisión.
- NOS endotelial (eNOS): Su actividad depende del aumento de calcio citosólico. Produce NO en la regulación de homeostasis vascular.
- NOS inducible (iNOS): La expresión de iNOS ocurre en respuesta a diferentes estímulos inflamatorios, es decir, se induce, de manera normal no está presente en las células. Su actividad es independiente del calcio. Una vez su expresión ha sido inducida, puede dar lugar a concentraciones elevadas de NO con efectos en la inflamación e inmunidad (50).

El NO es un efector de la inflamación para eliminar infecciones y regular respuestas

inmunes adaptativas, debido a su efecto antiinflamatorio y antioxidante.

Cuando el organismo se encuentra en un estado de hipoxia, se produce un desacoplamiento en la conversión de NOS y se producen radicales de oxígeno (ROS) para inducir lesión por I/R. El papel antiinflamatorio del NO protege frente a fenómenos de I/R en diferentes órganos (51) (50) y protege al endotelio contra las lesiones causadas por el estrés oxidativo y la inflamación aguda. Disminuye la lesión tisular durante la sepsis in vivo y en toxicidades (52), inhibe directamente el crecimiento de especies bacterianas, y este gas aumenta la actividad bactericida del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que producen los neutrófilos y macrófagos activados (53).

Los macrófagos, neutrófilos y células T pueden ser inducidos y expresar la isoforma inducible de óxido nítrico (iNOS) como respuesta a diferentes estímulos. El exceso de producción de NO por la isoforma iNOS se ha relacionado con la patogénesis del shock séptico y con lesión tisular, que pueden conducir a un FMO. Existen asimismo inhibidores de esta isoforma que atenúan la inflamación en diversos órganos; por ejemplo, se ha observado como el bloqueo in vivo de iNOS disminuye el secuestro de PMN, atenuando la inflamación pulmonar aguda. La expresión de iNOS se induce en células epiteliales y en macrófagos cuando existe un proceso inflamatorio, el aumento excesivo de producción de NO ocasiona daño tisular, disfunción y remodelación del tejido (50).

Los inhibidores de iNOS aumentan in vivo el número de PMN que se adhiere al endotelio de las células mesentéricas (24). La alteración en la regulación de iNOS se ha visto implicada en la patogénesis de diferentes enfermedades inflamatorias y del sistema inmune. Los altos niveles de NO pueden ocasionar daño tisular.

### 1.1.5 KLOTHO

Las proteínas Klotho se describieron inicialmente como moléculas de membrana esenciales para los receptores del factor de crecimiento de fibroblastos endocrinos (FGF) (54). Colectivamente, estas proteínas forman un sistema endocrino único que gobierna múltiples procesos metabólicos en mamíferos, existen varias isoformas.

La proteína  $\alpha$  Klotho sirve como correceptor de FGF23 (54). Una parte de la proteína  $\alpha$ -Klotho es eliminada por las proteasas de la membrana y se detecta en fluidos como forma soluble. Esta forma soluble puede actuar como una hormona por sí misma, sobre el metabolismo del calcio, fosfato y potasio, con efectos antioxidantes potentes, participando también en la respuesta antiinflamatoria (55) (56).

Determinadas citoquinas, entre las que destaca TNF- $\alpha$ , redujeron la producción de Klotho en células cultivadas de riñón en un porcentaje elevado (57) . Estas citoquinas podrían ser, por tanto, responsables de la mayor parte de la reducción de la hormona antienvjecimiento en situaciones de inflamación.

El proceso inflamatorio podría promover la secreción de Klotho, que actúa como factor antiinflamatorio. Existen estudios recientes en pacientes con fibrosis quística se vio como la administración exógena de Klotho inhibió la secreción de IL-8, lo que apoya su papel como mediador inflamatorio. En pacientes sépticos se ha visto que los niveles de Klotho más altos coinciden con el pico de la infección. Todavía es necesario aumentar la investigación en esta área (58).

Estos hallazgos abren puertas a varias formas del tratamiento del envejecimiento acelerado asociado a la inflamación, motivo por el cual hemos incorporado mediciones de Klotho en nuestro modelo experimental.

### **1.1.6 APOPTOSIS**

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso ordenado y complejo, cuyo objetivo es mantener un equilibrio entre la mitosis y creación de nuevas células y la desaparición de células dañadas o innecesarias. Es necesaria para mantener el control del organismo, su desarrollo y su crecimiento. Forma parte de un sinfín de procesos en la embriogénesis, como el recambio celular epitelial o la eliminación de células dañadas en el organismo, ocasionando una lesión mínima en los tejidos subyacentes (59). Constituye un proceso diferente a la necrosis, que se caracteriza por ser un proceso incontrolado de muerte celular que normalmente sigue a una agresión/lesión importante y que afecta a los tejidos que rodean.

La apoptosis se activa bajo condiciones de hipoxia, estrés, daño por I/R y durante la producción de ROS en el daño por reperfusión. Cuando existe un fallo en la apoptosis, comienza un proceso de replicación indiscriminada con acúmulo de células dañadas que podría desencadenar un proceso tumoral, lo que constituye una “diana” de múltiples estudios e investigaciones.

El inicio de la apoptosis ocurre por la activación de una serie de proteasas conocidas como caspasas, que pueden ser iniciadoras o ejecutoras. El daño celular lleva a las caspasas iniciadoras a un estado activo que posteriormente activa a las caspasas ejecutoras, quienes ocasionan daño en el material genético de la célula y sus orgánulos, creando un cuerpo apoptótico y expresando moléculas de adhesión para ser fagocitado (61,62).

#### ***1.1.6.1 Vía extrínseca de la apoptosis:***

En esta vía se encuentran involucradas interacciones mediadas por receptores transmembrana conocidos como receptores de muerte, miembros de la superfamilia del

TNF (63). Su activación siempre conduce a la muerte de la célula. El proceso se inicia detectando los ligandos de la muerte que producen células como NK o macrófagos. Estos ligandos se unen con los receptores de muerte en la membrana de la célula diana, activándose así la vía extrínseca de la apoptosis, a través del reclutamiento de la procaspasa 8, su dimerización y activación a caspasa 8, para escindir la caspasa-3, que luego induce la muerte celular mediante proteólisis en las células dañadas (30).

Se ha estudiado en modelos experimentales de ratón el papel de las caspasas, observándose como la ausencia de casapasa 8 hace que no exista respuesta a los ligandos de muerte (64).

#### ***1.1.6.2 Vía intrínseca de la apoptosis:***

En esta vía se media la apoptosis intracelularmente, se conoce también como vía mitocondrial. Las moléculas pro-apoptóticas como PUMA y Bax se activan e inician el proceso de apoptosis (61).

En numerosos tejidos puede inducirse la apoptosis por causas como daño en el ADN o mecanismos de estrés celular, aumentando las especies reactivas de oxígeno en la mitocondria (65). Cuando existe daño en el ADN se activa la expresión del gen supresor tumoral p53, que se acumula en el núcleo y citosol celular y a continuación activa proteínas proapoptóticas. PUMA y NOXA se expresan por el gen p53 y codifican para los dos miembros de la familia proapoptótica BCL 2 que actúan a nivel de la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, Bax y Bak.

La caspasa iniciadora de la vía intrínseca es la caspasa 9, que activa a la procaspasa 3 a su forma activa, la caspasa 3 ejecutora (61). Bcl-2 es una familia de proteínas cuyo papel es clave en la vía intrínseca de la apoptosis, mediante la implicación en la permeabilidad de la membrana mitocondrial. La proteína de supresión tumoral p53 tiene

una función crítica en la regulación de esta familia de proteínas. Su proteína fundadora es el protooncogén Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) y se puede dividir la familia en varias subfamilias de proteínas:

- Subfamilia Bcl-2: Bcl-2, Bcl-XL, MCL-1, etc., son proteínas antiapoptóticas que promueven la supervivencia celular.

MCL-1 desarrolla una función importante en el control apoptótico celular, es esencial en la embriogénesis y en el mantenimiento y control de los LB y LT (66).

En los pacientes con sepsis grave aumenta la expresión de MCL-1 en los neutrófilos (54), esto podría indicar que es posible modular los niveles de MCL-1 como objetivo terapéutico viable para el tratamiento de la inflamación relacionada con neutrófilos.(67)

- Subfamilia Bax: Bax, Bak son proteínas proapoptóticas que determinan o no si la célula se compromete a la apoptosis o aborta el proceso.
- Subfamilia BH3 proapoptótica: Bad y PUMA entre otras.

Bax y Bak son necesarias para la apoptosis intracelular funcione, se ha observado como las células que son resistentes a ellas son resistentes a mecanismos de apoptosis. Bax se localiza en el citosol de diversos orgánulos y Bak en el interior de las mitocondrias. Ante una señal de muerte celular Bax se inserta en la membrana externa mitocondrial y Bak sufre un cambio conformacional que incluye la permeabilización de la membrana externa mitocondrial con la liberación de factores como el citocromo c. La subfamilia de proteínas bcl-2 antiapoptóticas impiden esta liberación.(68)

Los miembros de la subfamilia BH3 funcionarían como iniciadores de la vía, para ejercer su acción necesitan a Bax y Bak. Por ejemplo, la caspasa-8 ejecutora, activada por señales de receptores de muerte celular origina una serie de modificaciones que servirá

como ligando para favorecer la activación de Bax y Bak. La actividad de esta subfamilia está regulada a nivel transcripcional y postraduccional por factores como el *p53*.

Además de en la inflamación, la apoptosis juega un papel importante en la patogénesis de daño pulmonar agudo. El aumento de la apoptosis de las células epiteliales pulmonares se ha asociado con la lesión pulmonar inducida por la ventilación mecánica (VM) y con la aparición de daño pulmonar en el SDRA (69)

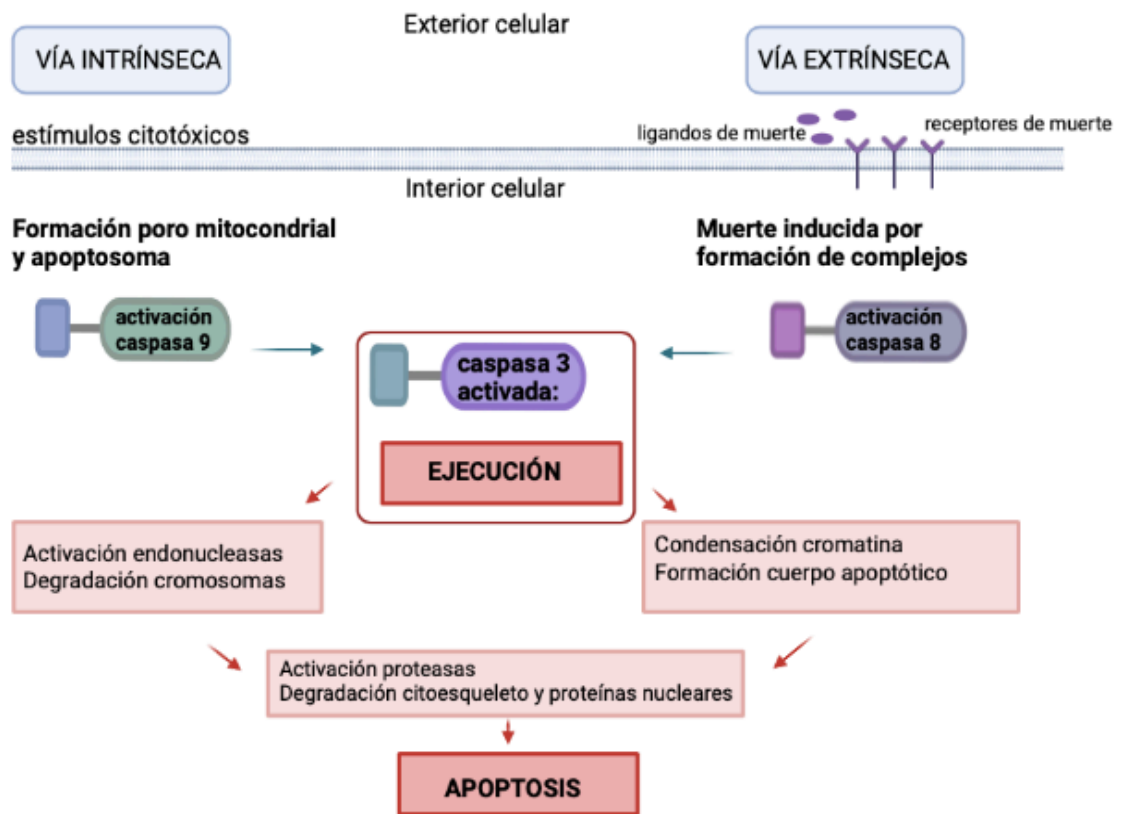


Figura 6: mecanismos de apoptosis (61) (Elaboración propia).

### 1.1.6.3 PUMA

Proteína proapoptótica de la subfamilia BH3. Actúa como mediador clave de la función de *p53* en el citosol, liberándola de complejos inactivos como el BCL-xL. Al liberarse, *p53* puede activar directamente a Bax o Bak e iniciar la cascada de señalización de apoptosis a través de la permeabilización de la membrana externa de la mitocondria.

La p53 a nivel nuclear induce la expresión de diferentes proteínas, incluida PUMA. Esta se une fuertemente a las proteínas antiapoptóticas, siendo necesaria para la apoptosis inducida por daño en el material cromosómico.

Su mecanismo de acción ha sido estudiado in vitro con paneles de péptidos, los datos sugieren que el despliegue que PUMA ocasiona en Bcl-xL constituye un mecanismo imprevisto para aumentar la complejidad de la señalización dentro de las vías apoptóticas (70). PUMA desempeña un papel importante en la apoptosis mediada por p53. Se demostró que, in vitro, la sobreexpresión de PUMA se acompaña de una mayor expresión de Bax, translocación a las mitocondrias, liberación de citocromo c y reducción del potencial de membrana mitocondrial (71).

## **1.2 RESPUESTA INFLAMATORIA ASOCIADA A LA VENTILACIÓN MECÁNICA**

### **1.2.1 DAÑO PULMONAR ASOCIADO A VENTILACIÓN MECÁNICA**

La VM controlada es un procedimiento de “respiración artificial” necesario cuando se lleva a cabo una anestesia general, que altera la fisiología del ciclo respiratorio normal, repercutiendo a nivel local y sistémico (72). Su uso ocasiona en mayor o menor grado una respuesta inflamatoria pulmonar, relacionada tanto con los parámetros ventilatorios como con la técnica anestésica utilizada.

Se conoce como daño pulmonar inducido por ventilación mecánica (VILI: ventilation induced lung injury) a la lesión pulmonar inducida por la VM. Esta somete al pulmón a fuerzas que alteran su estructura y sus propiedades elásticas (73), causando sobredistensión en los alveolos y fracturando la barrera alveolocapilar, lo que promueve una respuesta inflamatoria inicialmente local que da lugar a la translocación de proteínas y edema en el espacio aéreo repercutiendo a nivel sistémico (74).

Numerosos estudios experimentales y clínicos han demostrado como el uso de determinadas maniobras que afecten a la presión y volumen del aire introducido a los pulmones puede disminuir el impacto de la respuesta inflamatoria pulmonar y sistémica (73) (75). Esto se traduce en una mejoría de la función pulmonar post-operatoria, las complicaciones pulmonares postoperatorias y la estancia hospitalaria (76,77).

*La VM es per se un estímulo pro-inflamatorio en pulmones sanos. Se ha demostrado en múltiples estudios, como la ventilación con volúmenes tidal (VT) bajos y un nivel de presión positiva al final de la espiración (PEEP) moderado, reducen la respuesta y liberación de mediadores pro-inflamatorios y la mortalidad del SDRA (78) (79).*

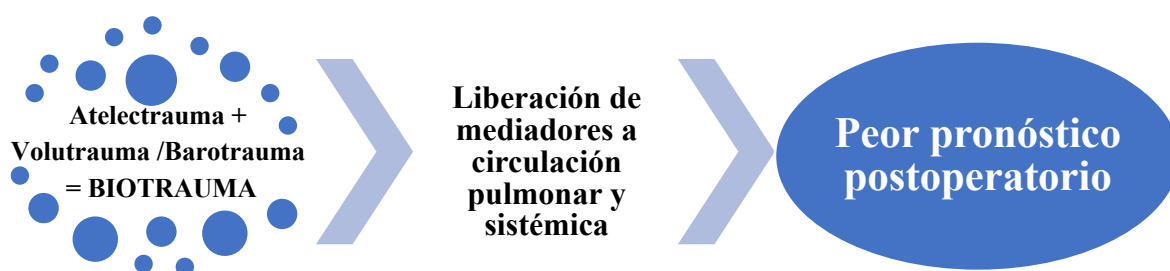


Gráfico 2: Mecanismo de daño pulmonar inducido por ventilación mecánica (VILI) (73)

## 1.2.2 DAÑO PULMONAR ASOCIADO A LA VENTILACIÓN UNIPULMONAR

### 1.2.2.1 Daño del pulmón dependiente:

El daño ocasionado por el uso de la VM mencionado anteriormente, se hace más notorio y relevante en el pulmón ventilado cuando se precisa de VUP. Es necesario un exhaustivo control del VT para evitar sobredistensión alveolar, volúmenes excesivos al

final de la inspiración pueden generar atrapamiento aéreo o una PEEP excesiva. El daño alveolar es mayor en VUP que en ventilación bipulmonar (VBP), sobre todo si no se adecúan los parámetros individualmente, por lo que en esta situación se exagera el daño pulmonar producido por el atelecto/baro/volutrauma (80). Kozian y cols. observaron como la sobredistensión pulmonar y daño alveolar causado por VUP desencadenan un aumento y secuestro de leucocitos PMN pulmonares en modelo porcino tras 90 minutos de VUP (81). La liberación de citoquinas por las células pulmonares tras VUP es menor cuando se utiliza una estrategia de ventilación protectora, mejorando también los índices de oxigenación y disminuyendo las complicaciones postoperatorias (82,83).

Parece que hay una interferencia importante debido a especies reactivas de oxígeno y citoquinas liberadas a la circulación que puede causar lesiones en el pulmón contralateral. Múltiples vías parecen converger en daño al endotelio y al glicocalix, lo que a su vez, facilita la fuga vascular y la migración celular (84). El uso de altas presiones durante la VUP ocasiona todavía una mayor respuesta inflamatoria al existir colapso del pulmón contralateral y manipulación quirúrgica del pulmón (85). Así pues, la ventilación protectora rutinaria durante VUP reduce el daño pulmonar postoperatorio.

La ventilación protectora con agentes volátiles puede reducir el riesgo de ALI y parece mejorar los resultados del paciente, pero no elimina el riesgo completamente. La investigación sobre agentes antiinflamatorios y estabilizadores de glicolisis es prometedora para futuras intervenciones profilácticas (86).

#### ***1.2.2.2 Daño del pulmón no dependiente:***

La VUP no produce daños únicamente en el pulmón ventilado o dependiente, también el pulmón no dependiente sufre daños derivados de fenómenos de isquemia/reperfusión (I/R); debido a la disminución del flujo sanguíneo al pulmón no

dependiente(87) causado por la VPH y la subsiguiente reperfusión pulmonar asociada a la re-insuflación pulmonar (88). Además, a esto se añade la manipulación quirúrgica inherente a la intervención.

Al colapso pulmonar que sufre el pulmón no dependiente, se añade la isquemia, que incrementa la lesión pulmonar al ocasionar aumento de TNF- $\alpha$ , edema pulmonar, disminución de los metabolitos del óxido nítrico y aumento de la permeabilidad microvascular. La I/R y la exposición a mediadores de la inflamación deterioran el glucocálix, a esto se añade la hipoperfusión ocasionada por la VPH, que induce cambios hipoxémicos (86).

La reexpansión del pulmón no dependiente tras su colapso previo expone a los alveolos a una tensión significativa. El reclutamiento pulmonar libera citoquinas inflamatorias (TNF e IL-1 especialmente) en el pulmón no dependiente. Se produce también extravasación de proteínas, migración y activación de neutrófilos alveolares y liberación de ROS que ocasionan un daño estructural mayor. El daño producido por estrés oxidativo aumenta cuanto mayor es el periodo de VUP (89). Las maniobras de reclutamiento escalonadas son preferibles a las de capacidad vital o presión sostenida, que dañan más la membrana alveolocapilar (90).

La manipulación quirúrgica causa daño alveolar difuso, edema intersticial, micro atelectasias, infiltración de neutrófilos y zonas con hemorragias, la lesión es mayor a mayor manipulación y el daño ocasionado por la misma no es despreciable.

*La lesión por I/R pulmonar consiste en una inflamación "estéril" compleja, que involucra un rápido estrés oxidativo y respuestas posteriores de todas las células a nivel global dentro del pulmón. Finalmente lleva a la ruptura de las barreras endoteliales y epiteliales, ocasionando un edema potencialmente mortal y un intercambio de gases*

defectuoso (88). Algunos de los principales actores son las células inmunes innatas que se activan rápidamente después de la reperfusión y que inducen lesiones tisulares directas o aumentan la inflamación a través de la producción de citoquinas proinflamatorias y patrones moleculares asociados al daño (91,92).

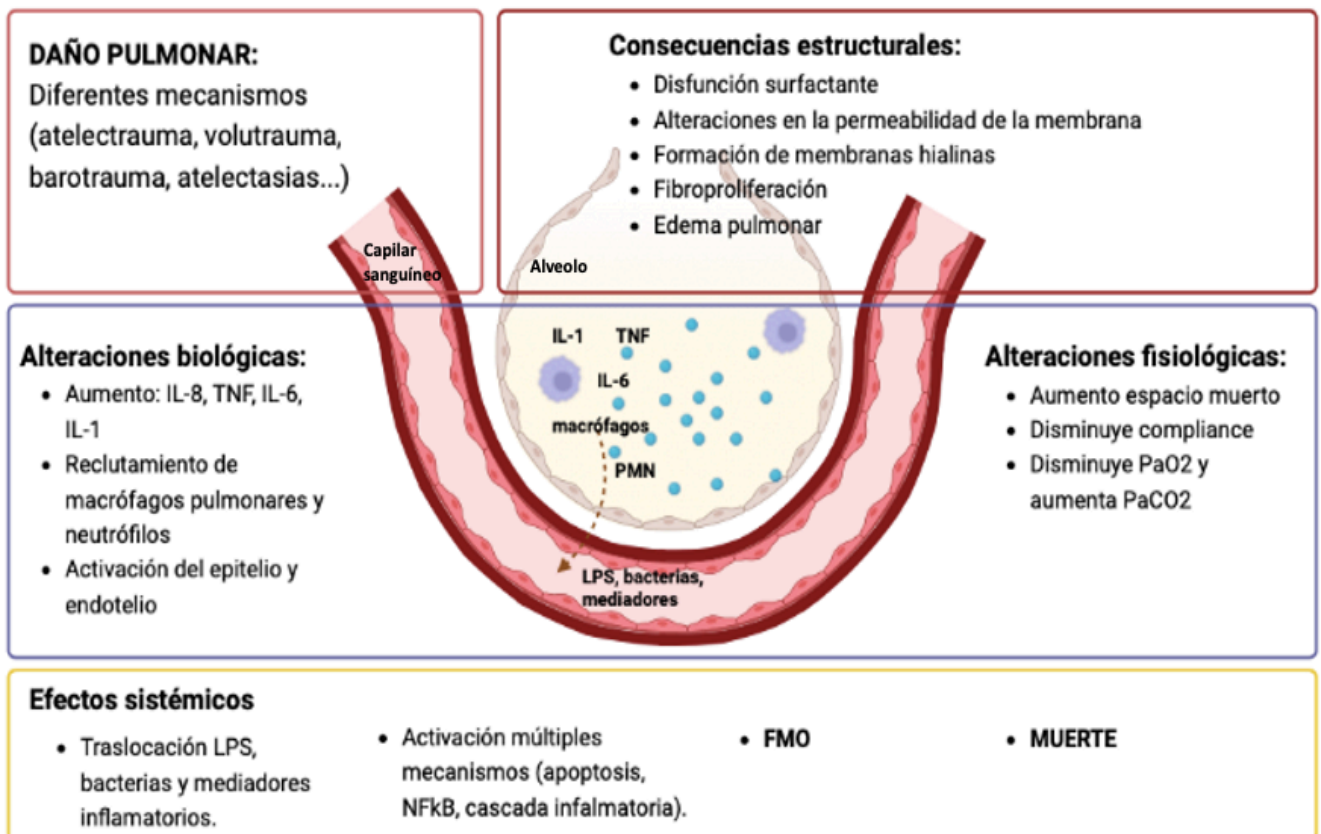


Figura 7: Daño pulmonar ocasionado por diferentes mecanismos. Lo que conlleva a daños estructurales, fisiológicos, biológicos y sistémicos. Los mediadores inflamatorios creados en el pulmón alcanzan la circulación sistémica y causan daño periférico. FMO: Fracaso multiorgánico, LPS: Lipopolisacáridos. (Elaboración propia).

Los diferentes mecanismos que causan lesión en ambos pulmones durante la VM y dañan la barrera alveolocapilar son los responsables del **biotrauma** resultante ocasionado.

El biotrauma hace referencia al impacto de la VM en la liberación de mediadores proinflamatorios al espacio aéreo, al daño producido por inflamación alveolar y a la subsecuente apoptosis y procesos de fibroproliferación que ocurren en respuesta a

este daño. Esto ocasiona una disminución de compliance pulmonar, aumento espacio muerto, hipoxia e hipercapnia, además de liberación de citoquinas, reclutamiento de células inflamatorias y activación de neutrófilos que dañan el glucocálix y favorecen la apoptosis de células parenquimatosas (82,86). La lesión local pulmonar, a través de la translocación de bacterias, lipopolisacáridos, y mediadores proinflamatorios liberados a la circulación sistémica contribuyen a un peor pronóstico postoperatorio, fracaso multiorgánico y a la muerte (73).

La lesión y fractura de la barrera alveolocapilar y la consecuente respuesta inflamatoria local, alteran la permeabilidad de la membrana y originan traslocación de proteínas y edema, así como liberación de mediadores inflamatorios al torrente sanguíneo (74). El acúmulo de mediadores de la inflamación a nivel local puede diseminarse a nivel sistémico por medio de la circulación sanguínea y **“descompartimentalizar”** la inflamación a nivel sistémico, como desarrollaremos más adelante.

### **1.3 PAPEL DEL HÍGADO EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA**

El hígado es un órgano principal del organismo, con una función imprescindible para el funcionamiento fisiológico adecuado y el correcto desarrollo de la inmunidad e inflamación. Es responsable del aclaramiento de determinadas sustancias como endotoxinas sistémicas, patógenos y proteínas inflamatorias liberadas durante la respuesta inflamatoria y que activan respuestas inmunes. Su rol en procesos inflamatorios y en sepsis tiene un doble filo, siendo por una parte responsable de la eliminación de patógenos y toxinas, y por otra responsable de la inflamación e inmunosupresión y daño a los órganos (93).

El hígado en su reacción de fase aguda ante una agresión/lesión, libera citoquinas hepáticas y sufre cambios circulatorios ante procesos infecciosos y sepsis, lo que puede

conducir a una disfunción hepática y FMO. Es capaz de potenciar los efectos sistémicos de mediadores inflamatorios y toxinas derivados del mal aclaramiento hepático, incrementando el impacto de la respuesta inflamatoria a nivel sistémico (94).

Los macrófagos hepáticos o células de Kupffer constituyen el 90% de los macrófagos del sistema reticuloendotelial, en el hígado existen también células NK y células madre pluripotentes capaces de diferenciarse en cualquier linaje leucocitario. La estimulación de las células de Kupffer libera citoquinas que atraen neutrófilos con el objetivo de eliminar patógenos y productos bacterianos de la circulación sanguínea, función crucial en la resolución del proceso inflamatorio/infeccioso.

En resumen, el hígado modula la respuesta inflamatoria y elimina patógenos del organismo para mantener la homeostasis inmunológica. Si no es capaz de realizar adecuadamente dicho mantenimiento, puede producirse una disfunción hepática (93).

La descompartmentalización pulmonar de los mediadores inflamatorios a nivel sistémico a través de su liberación al torrente sanguíneo con su consecuente afectación de los órganos periféricos, entre ellos el hígado, pueden desencadenar en fallo hepático que potencialmente puede condicionar un fracaso multiorgánico y disminuir la supervivencia en los casos más graves (95) (96).

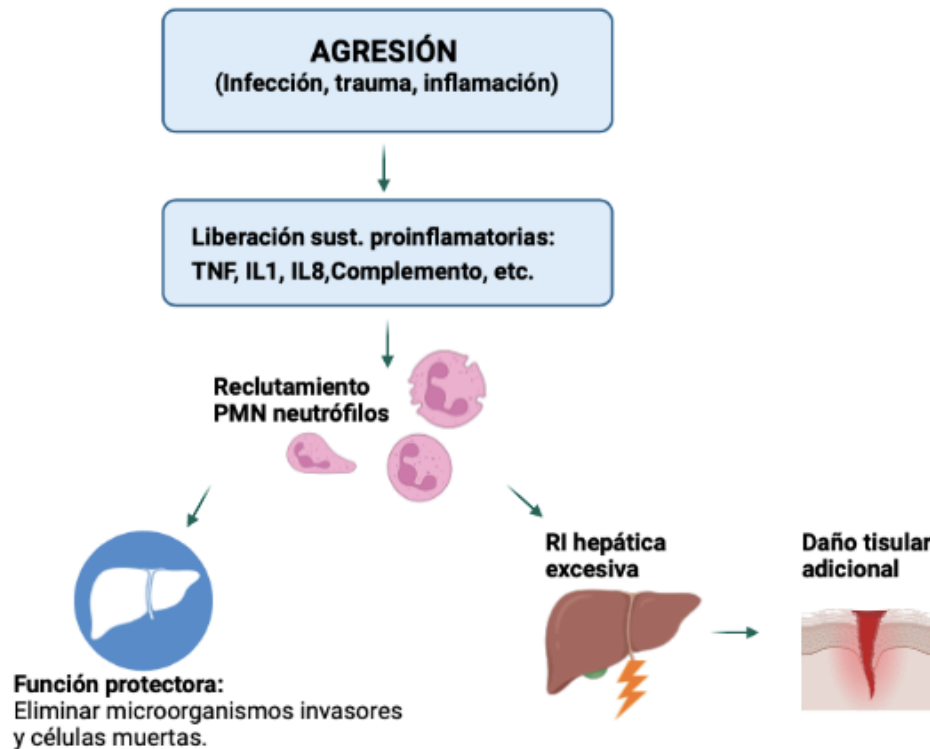


Figura 8: Inicio de la respuesta inflamatoria. (Elaboración propia).

La inflamación ocasionada por un estímulo agresivo trauma o infección, provoca un incremento de mediadores inflamatorios (IL-1, IL-8, TNF, complemento, etc.), radicales libres, y un aumento de las interacciones entre moléculas de adhesión de PMN y células endoteliales vasculares, acumulándose PMN cebados y parcialmente activados en la vasculatura hepática (11).

El reclutamiento de PMN neutrófilos en la vasculatura hepática no causa como tal daño tisular (11), es el proceso de quimiotaxis el que desencadena la extravasación de los mismos y el consecuente daño a los hepatocitos. Una de las características determinantes de las citoquinas proinflamatorias es su capacidad quimiotáctica, que provoca una extravasación de PMN y degranulación de los mismos, se liberan proteasas y otras sustancias lesivas (peróxido de oxígeno, ácido hipocloroso...) que son las responsables

de ocasionar daño en los hepatocitos, estrés oxidativo intracelular, disfunción mitocondrial y muerte celular (97).

Las células hepáticas necróticas liberan sustancias mediadoras que promueven todavía más hepatitis neutrofílica y daño tisular en el hígado (98). Por tanto, una respuesta inflamatoria no controlada puede desencadenar un empeoramiento progresivo.

*Los leucocitos PMN tienen su papel en numerosas afecciones hepáticas entre las que encontramos I/R, sepsis, hepatitis, lesión de órganos a distancia o shock. El primer paso o mecanismo fisiopatológico principal que tiene que tener lugar es la acumulación de PMN neutrófilos en los sinusoides y vasculatura hepática que hemos comentado previamente (11). Posteriormente ocurrirá la migración y citotoxicidad de los mismos en la que juegan un papel importante las moléculas de adhesión (10).*

### **1.3.1 MEDIADORES INFLAMATORIOS E HÍGADO**

Respecto a los mediadores inflamatorios descritos previamente y en relación a sus roles a nivel hepático, TNF- $\alpha$  es la principal molécula efectora en el daño hepatocelular inflamatorio por I/R. Activa las vías proapoptóticas celulares a través de la activación de la vía de señalización NF-kB (29).

El estrés oxidativo inhibe la vía NF-kB del hepatocito inducida por I/R y facilita la muerte celular mediada por TNF- $\alpha$  (99). Tanto TNF- $\alpha$  como IL-1 a través de mediadores de la inflamación inducen la acumulación de neutrófilos en los sinusoides hepáticos, lo que sugiere que la existencia de gradientes locales de citoquinas pueden dirigir el movimiento de los neutrófilos intrahepáticos (11).

En situación basal, determinadas células del hígado expresan precursores de IL-1 que en condiciones patológicas regularizan al alza la expresión de IL-1 en casi todas las células, principalmente en los macrófagos hepáticos o células de Kupffer (100). Los

modelos experimentales in vivo demuestran mecanismos comunes en el fallo hepático agudo; cuando existe un daño hepático aumenta la expresión de IL-1, que regula positivamente el proceso proinflamatorio disminuyendo el inhibidor hepático de los niveles de kappa B ( $I\kappa B$ ) y activando la vía NF- $\kappa B$ . Estos sucesos, llevan a un aumento de secreción de IL-6 y TNF- $\alpha$  (100) que contribuye a la apoptosis y en última instancia, al daño hepático y la muerte celular. La interacción de los neutrófilos y macrófagos promueve la maduración de IL-1 ocasionando inflamación hepática en la respuesta de I/R. Se ha observado en estudios clínicos la contribución de IL-1 al daño hepático agudo, el aumento en los niveles de citoquinas proinflamatorias y su activador caspasa tiene una correlación positiva con la hepatitis aguda en humanos.

El aumento de los niveles de TNF- $\alpha$  a nivel hepático, secundario a CRP con VUP, conlleva a un aumento de la transcripción del ARNm de MCP-1, quien ejerce su poder quimiotáctico con el consecuente acúmulo de las células de Kupffer en los sinusoides hepáticos. Estudios previos de nuestro grupo, como el de Rancan y cols. (26) o Simón y cols (101) en modelos porcinos, evidencian como tras un periodo de I/R pulmonar aumenta la transcripción de ARNm de MCP-1 a nivel hepático, y existe un aumento en el grupo control de los niveles de TNF- $\alpha$ . En el SIR, la concentración de MCP-1 y TNF- $\alpha$  aumenta en las muestras pulmonares analizadas por biopsia pulmonar (101). Se postula que uno de los mecanismos por los cuales aumenta MCP-1 podría ser el aumento previo de los niveles de TNF- $\alpha$ . También se han objetivado en el BAL de diferentes patologías pulmonares, como el edema de pulmón o el SDRA, niveles superiores de MCP-1, por lo que su expresión aumentada se relaciona con inflamación a nivel pulmonar (102).

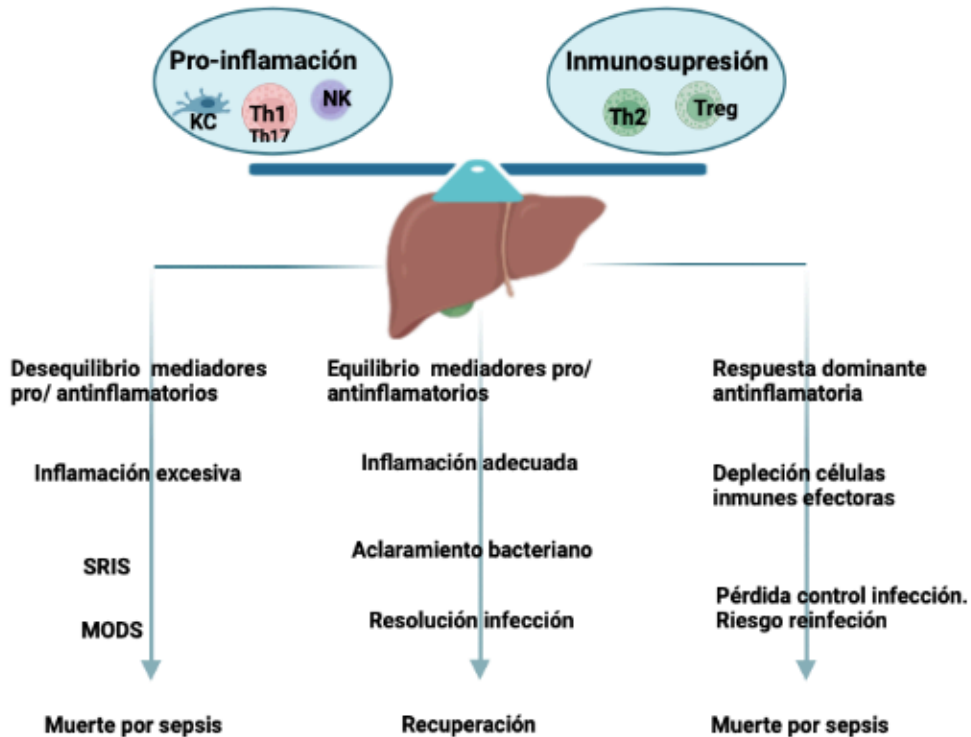


Figura 9: El balance entre mediadores pro y antiinflamatorios es crítico para regular la respuesta inmune sistémica y sus potenciales complicaciones.

En relación al estrés oxidativo hepático; este puede desarrollarse a partir de fuentes enzimáticas (xantina oxidasa, NADPH oxidasa, sistema NOS desacoplado, etc.) o no enzimáticas (hemoglobina y mioglobina). El estrés oxidativo mediado por enzimas está ampliamente implicado en órganos como pulmón, hígado, corazón, músculo, páncreas, estómago y riñón. La NOS es un factor de estrés oxidativo importante en hígado, corazón y endotelio aórtico (30).

Los hepatocitos tras contactar con determinadas moléculas liberan mediadores de la inflamación iNOS, su expresión libera NO de alto rendimiento y contribuye al proceso inflamatorio y a la aparición de hepatopatía. Cuando se lleva a cabo una resección hepática y posteriormente tiene lugar una regeneración, se observa una expresión moderada de iNOS que ayuda a inhibir la apoptosis y favorecer la regeneración tisular (103). Según un estudio recientemente publicado por Dongiovanni y cols, en el que se

estudian los niveles de Klotho en biopsia hepática de pacientes que presentan hígado graso, se concluye que Klotho podría ejercer un papel protector contra la lipotoxicidad y la inflamación en los hepatocitos (58).

En el proceso de apoptosis, Song Cheng y cols (48) sugieren que durante la regeneración hepática temprana, la regulación a la baja de PUMA puede contribuir a la supresión de la apoptosis y la inflamación, promoviendo de esta manera el proceso regenerativo. Y que, por tanto, la regulación por disminución de PUMA insensible a p53 sería esencial en la fase temprana de la regeneración hepática tras realizar una hepatectomía parcial en ratones.

Las interacciones entre PUMA y Bcl-xl pueden ser un mecanismo citoprotector clave en la respuesta al estrés oxidativo estimulado por la resección hepática. El ligando FasL dirigido por IL-6 promueve la apoptosis mediada por NF- $\kappa$ Bp65/PUMA en la gastropatía hipertensiva portal.

El papel de PUMA ha sido estudiado en la regeneración hepática tras realizar cirugía de resección, situación en la que es importante mantener el equilibrio entre “muerte y regeneración”. En situación normal, estudiando la respuesta en hígado de ratón, existe una disminución de los niveles de PUMA durante las 24-72 horas tras una resección hepática, lo que indica que la apoptosis está bajo control estricto de la represión de PUMA durante el proceso normal. Existe un aumento de la expresión de PUMA en la proliferación anormal hepática, causada por hepatitis y carcinoma hepatocelular (CHC).

### **1.3.2 RELACIÓN ENTRE LA RESPUESTA INFLAMATORIA LOCAL Y SISTÉMICA A NIVEL HEPÁTICO**

La descompartimentalización de la respuesta inflamatoria cobra especial relevancia en la afectación hepática. Cuando los mediadores pulmonares alcanzan el torrente sanguíneo el proceso inflamatorio se expande y perpetúa a nivel sistémico (105). Ha sido evidenciado por varios autores como los pulmones son el primer órgano que suele verse afectado cuando existe lesión de órganos periféricos o FMO (105). El pulmón presenta una extensa red de capilares que filtra toda la sangre y está cargado de neutrófilos y macrófagos productores de citoquinas. Constituye el primer lecho capilar que recibe la sangre con mediadores inflamatorios liberados por tejido postisquémico o lesionado (106).

El pulmón actúa por tanto como fuente primaria de mediadores de señalización que luego se vierten en la circulación sistémica y provocan respuestas patológicas en los órganos periféricos (107). La respuesta inflamatoria sistémica también repercute y exagera la lesión pulmonar, empeorando ALI y FMO, de esta manera influyen la una sobre la otra, poniendo de manifiesto la continua relación entre ambas (108).

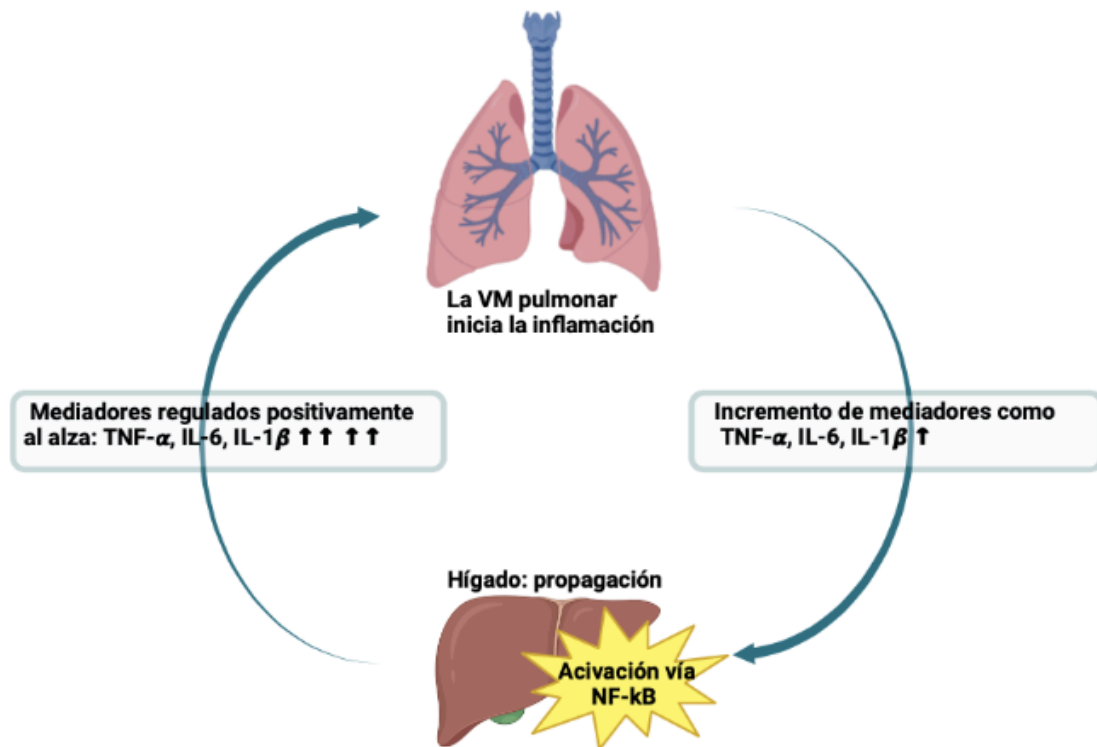


Figura 10: Diagrama resumen de la respuesta inflamatoria local y sistémica (109). VM: Ventilación mecánica. (Elaboración propia).

Numerosos estudios han demostrado *in vitro* e *in vivo* con modelos murinos entre otros, como los mediadores inflamatorios formados primariamente en el pulmón provocan la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales del hígado (25), activan las células endoteliales hepáticas y PMN circulantes, aumentando su adhesión y provocando un secuestro de PMN (11,109). Esto se consigue con modelos de pulmón de ratón perfundidos aisladamente, a los que se ocasiona lesión directa (aspiración de ácido, inyección de lipopolisacáridos) o indirecta (VM con diferentes VT) para posteriormente medir la histología e inflamación pulmonar, y la liberación de mediadores al medio circulatorio. La posterior exposición de las células hepáticas al solución de perfusión pulmonar obtenido del modelo de pulmón aislado, permite evaluar la importancia de la respuesta inflamatoria y el impacto que se ocasiona en órganos periféricos (107).

Los mecanismos por los cuales los mediadores inflamatorios producidos por el pulmón son amplificados secundariamente ocasionando inflamación sistémica no se conocen exactamente. Se puede observar cómo dichos mediadores están regulados positivamente por el hígado en modelos in vitro e in vivo de inflamación por VM (107). La repercusión a nivel sistémico se ha objetivado además por el aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno, la activación de la vía intracelular NF-KB, expresión de selectinas y moléculas de adhesión (108). Parece existir un mecanismo dependiente de NFkB de amplificación de citoquinas proinflamatorias por parte de las células endoteliales hepáticas secundario a la VM (109).

Los mediadores proinflamatorios liberados tras un daño pulmonar inducen la activación de los PMN circulantes promoviendo inflamación hepática, aumentando los PMN a nivel hepático y de otros órganos afectados por la respuesta sistémica a través del mecanismo de reclutamiento de PMN y el aumento de las moléculas de adhesión, lo cual provoca secuestro de PMN en órganos sistémicos, principalmente el hígado. Existen estudios que apoyan la disfunción hepática como factor pronóstico de la supervivencia del paciente con ALI o SDRA (110) (111).

Se ha analizado la función antiinflamatoria del surfactante pulmonar, este recubre los alveolos y regula a la baja la inflamación y la tensión superficial para mantener estable a los alveolos. Al administrar surfactante exógeno se observa como existe una regulación a la baja de marcadores inflamatorios en el pulmón, lo que podría tener efecto protector sobre la inflamación sistémica. Este hallazgo respalda también el concepto de que las terapias dirigidas a modular la respuesta inflamatoria a nivel pulmonar pueden afectar a la inflamación sistémica (108) (112).

La vía de señalización NF-KB es la vía intracelular más reconocida por su relevancia en la fisiopatología de la inflamación. Se activa por diferentes receptores

(como IL-1 y TNF entre otros), lo que conduce a una serie de respuestas proinflamatorias, como la regulación al alza de moléculas de adhesión y regulación de la transcripción de citoquinas y quimiocinas (113). Parece que existe un mecanismo dependiente de NF-KB de amplificación de citoquinas proinflamatorias por parte del hígado activado, esta cascada de señalización es clave porque puede ser activada por numerosos factores, entre ellos el estrés físico, estrés oxidativo o citoquinas proinflamatorias.

*En conclusión, la respuesta inflamatoria genera un aumento de mediadores inflamatorios a nivel pulmonar, que por medio del torrente sanguíneo se expanden a nivel sistémico. Estos niveles se amplifican tras la exposición a células endoteliales del hígado, en una regulación ascendente desadaptativa de la respuesta inflamatoria sistémica en la que interviene un mecanismo dependiente de la vía NF-KB, ya que la inhibición de esta vía puede mitigar la respuesta. (109)*

### **1.3.3 DAÑO HEPÁTICO ASOCIADO A VENTILACIÓN UNIPULMONAR**

En CRP en la que se precisa VUP el estrés oxidativo que se produce es todavía mayor. Confluyen diferentes mecanismos, como hemos descrito en profundidad anteriormente, como son la agresión quirúrgica, fenómenos de I/R en pulmón no dependiente y la lesión inducida por ventilación mecánica (VILI) en el pulmón dependiente, que incrementan el impacto de la respuesta inflamatoria, ALI, SDRA y FMO (105) (114).

La lesión sistémica derivada de la VM es mayor con la utilización de VT elevados (10-15 ml/kg), diferentes estudios confirman que el impacto de altos VT resulta en una amplificación de la respuesta inflamatoria sistémica, por lo que la transición de la respuesta inflamatoria local a sistémica, es decir, la “descompartimentalización” podría estar directamente relacionada con la estrategia ventilatoria adoptada (107).

El objetivo en CRP es limitar la lesión local causada por la VM con el uso de VT bajos y una PEEP adecuada. Cuando existe una lesión preexistente a nivel pulmonar por los diferentes motivos expuestos, se ocasionan efectos proinflamatorios en las células endoteliales hepáticas, que empeora aún más si hay un aumento del VT (108) (107).

Así pues, se consigue demostrar que además de efectos a nivel pulmonar, la ventilación con bajos VT reduce la inflamación sistémica, pues disminuye la respuesta biológica en las células endoteliales hepáticas (107). Por lo que la adecuada manipulación de los parámetros respiratorios, así como el uso de fármacos y terapias que atenúen la respuesta inflamatoria sistémica, son una oportunidad determinante para intervenir en el proceso inflamatorio. La diana de estos tratamientos deberían ser múltiples mediadores inflamatorios liberados por el pulmón lesionado, es decir, el “biotrauma”.

Tanto el pulmón como el hígado, constituyen importantes reservorios de células inmunes como neutrófilos, monocitos y macrófagos (115). La reexpansión pulmonar tras VUP, libera sustancias proinflamatorias que ocasionan daño relacionado con estrés oxidativo en las proteínas y en los lípidos y aumentan los niveles de marcadores inflamatorios en plasma (116), como se ha visto con IL-6 tras VUP y CRP, lo que condiciona un daño sistémico que afecta a nivel hepático (107).

Las manifestaciones clínicas de daño hepático agudo no son frecuentes en la cirugía de resección pulmonar, sin embargo el hígado juega un papel importante en la respuesta inflamatoria sistémica y es especialmente sensible a la I/R (117,118). La depuración hepática alterada de microorganismos patógenos y toxinas de la circulación, y la liberación de citocinas hepáticas pueden tener efectos sistémicos importantes y contribuir a la patogenia de la insuficiencia multiorgánica. La evolución de la disfunción hepática en el contexto de una enfermedad crítica es de gran importancia pronóstica. Por tanto, el SDRA que puede presentarse hasta en un 2% tras la cirugía de resección

pulmonar se considera una disfunción multiorgánica secundaria a una respuesta sistémica (94).

Tener la posibilidad de modular la respuesta inflamatoria sistémica podría prevenir/reducir el daño causado por la misma y se han estudiado numerosas estrategias terapéuticas al respecto (112).

#### **1.3.4 DAÑO HEPÁTICO ASOCIADO A CIRUGÍA**

Autores previos han demostrado el impacto de la respuesta inflamatoria asociada a la cirugía sobre el hígado. Duan y cols analizaron la función hepática en cirugía cardiaca congénita infantil 24 horas antes hasta cinco después de la cirugía, observando que con frecuencia existía alteración de la función hepática, lo que puede deteriorar el pronóstico. Además, relacionan la ventilación mecánica como un factor independiente para la alteración de la función hepática (119). Neri y cols analizaron los cambios en la función hepática tras cirugía laparoscópica, siendo estos en la mayoría de ocasiones transitorios cuando el hígado preoperatorio presentaba una función normal (120). Cimino y cols observaron que una inflamación local intensa estudiada a través del aumento de linfocitos, se asocia con un mejor pronóstico, mientras que la inflamación sistémica, medida por aumento de biomarcadores (PCR, linfocitos neutrófilos) en la sangre periférica, se asocia significativamente con un mal pronóstico en muchos tipos de cáncer (121). Dimpolou y cols analizaron los cambios en citoquinas pre y post operatorias encontrando un incremento de citoquinas inflamatorias después de la cirugía abdominal y relaciona la aparición de las complicaciones postoperatorias con una ratio alterada de IL-10/TNF- $\alpha$  (122).

### **1.3.5 DAÑO HEPÁTICO PRODUCIDO POR ISQUEMIA REPERFUSIÓN**

La CRP en la que es necesario el uso de VUP, ocasiona una respuesta inflamatoria y un periodo de I/R que, sin ser tan prolongado como el proceso de I/R precisado para la cirugía de trasplante pulmonar, es capaz de ocasionar daños a nivel sistémico (123). Tras una CRP u otros procesos de cirugía torácica no es habitual observar una lesión hepática clínica significativa, sin embargo es esperable que exista afectación subclínica hepática cuando ha existido un proceso de I/R pulmonar con su consecuente respuesta inflamatoria sistémica (29). El hígado es un órgano especialmente sensible a los mediadores de la inflamación y a la I/R (105).

El daño hepático secundario a la I/R de diferentes órganos como son el pulmón o riñón (123) ha sido ampliamente estudiado, el fallo renal activa el estrés oxidativo y se promueven los procesos de inflamación, apoptosis y daño tisular en los hepatocitos (124). Un desequilibrio entre la endotelina y los niveles de NO ocasiona daño en la microcirculación hepática cuando comienza la reperfusión, la activación del NF $\kappa$ B a nivel hepático promueve la formación de citoquinas proinflamatorias y de moléculas de adhesión. Estos dan como resultado la producción de radicales libres derivados del oxígeno y el reclutamiento de neutrófilos, lo que contribuye a una mayor lesión celular.

Tras la reperfusión existe una exposición a mediadores de la inflamación, los neutrófilos se acumulan en la vasculatura hepática incrementando la expresión de integrinas y otros receptores de superficie de neutrófilos causando una fusión de vesículas secretoras con la membrana celular. Generalmente los neutrófilos que causan daño en las células parenquimatosas son los que se extravasan de los sinusoides (97).

Se han estudiado y aplicado medidas terapéuticas para atenuar el daño ocasionado por la IR en modelos animales de trasplante (95) y cirugía de resección hepática.(126)

La lesión hepática secundaria producida por I/R pulmonar, es causada inicialmente por los mediadores inflamatorios derivados de los neutrófilos previamente reclutados en dicho órgano tras la liberación de mediadores inflamatorios al torrente sanguíneo que ocasionan alteraciones en los hepatocitos. Los principales efectores para que esto suceda son una mayor expresión de MCP-1 secundaria a la I/R pulmonar (29) y un aumento en los niveles de IL-1 y TNF- $\alpha$ , que inician la cascada inflamatoria que posteriormente se va sucediendo y ampliando. Kato y cols realizaron un estudio en I/R hepática, analizando en murinos IL-1 “*knockout*” sometidos a 90 minutos de isquemia y hasta 24 horas de reperfusión observando como la acumulación de neutrófilos hepáticos y el daño tisular era menor en dichos ratones comparados con el grupo de ratones que sí presentaban IL-1 (127).

Las quimiocinas, son también mediadores de neutrófilos y reclutadoras de los mismos en la vasculatura hepática (10). Se han realizado estudios en animales en los que se utilizan Ac contra determinadas citoquinas y esto protege contra los fenómenos de I/R a nivel hepático, pues en los casos en los que se administraban dichos Ac se encontró menor número de neutrófilos acumulados en el hígado post-isquemia y por tanto se atenuó la lesión mediada por ellos (127) (128). Hasta el momento no existen estudios que apliquen estas terapias antimedidores de la inflamación en modelos de daño hepático secundario a I/R pulmonar.

Existen investigaciones previas de nuestro grupo (29) que han estudiado la inflamación hepática secundaria a I/R pulmonar en un modelo de autotrasplante pulmonar porcino, encontrando un efecto protector del sevoflurano en la inflamación hepática que ocurre como consecuencia de la atenuación del daño de I/R, con una reducción de niveles de TNF- $\alpha$  e IL-1, lo que a su vez impacta en una menor expresión de MCP-1 y una menor activación de la vía NFkB y de la apoptosis. El mediador por excelencia de la vía

extrínseca de la apoptosis es TNF- $\alpha$  y al disminuir sus niveles con la administración de sevoflurano es posible una modulación de la misma (29).

## **1.4 LIDOCAÍNA**

### **1.4.1 GENERALIDADES DE LA LIDOCAÍNA**

La lidocaína es un AL perteneciente al grupo de las amidas que fue sintetizado por Nils Loefgren. Su mecanismo de acción como AL se produce mediante el bloqueo de la propagación del impulso nervioso, impidiendo la entrada de iones sodio a través de la membrana nerviosa al disminuir la permeabilidad de dichos canales. Bloqueando, por tanto, la fase inicial del potencial de acción (24,129).

### **1.4.2 EFECTOS CLÁSICOS**

Los usos terapéuticos clásicos de la lidocaína, relacionados con el bloqueo de los canales de sodio, son como AL y como antiarrítmico (130).

### **1.4.3 EFECTO COMO ANALGÉSICO**

Su eficacia analgésica al administrarla por vía intravenosa se ha descrito en diferentes aspectos como, por ejemplo; la disminución de la irritación al administrarla junto al propofol o rocuronio en la inducción anestésica, en la inducción de secuencia rápida, la reducción de la reacción cardiovascular ante la intubación orotraqueal, la disminución del dolor de garganta y como profilaxis del broncoespasmo. Se utiliza cada vez de manera más frecuente como coadyuvante de la anestesia general, es uno de los fármacos más usados en la conocida como “opioid free” anestesia o anestesia libre de opiáceos, o para reducir el consumo de los mismos (131). Está descrito su uso para el manejo del dolor visceral y crónico, en parte por su efecto anti-hiperalgésico (129).

Se reconoce que estas acciones son independientes del bloqueo de los canales de sodio, pues actúa en este contexto sobre células que carecen de estos canales, como son por ejemplo los PMN. Además, el uso de bloqueadores específicos de canales de sodio no impide su efecto y muchos de las acciones se han observado incluso a dosis inferiores a las necesarias para causar bloqueo de los canales del sodio (24).

#### **1.4.4 OTROS EFECTOS CLÍNICOS DE LA LIDOCAÍNA**

Existen numerosos estudios en animales que muestran el papel neuroprotector de la lidocaína intravenosa utilizada sobre todo en perfusión continua, dosis bajas reducen el tamaño de la zona cerebral infartada y atenúa la apoptosis neuronal (130,132), así como su aplicación en el estatus epiléptico. También tiene propiedades beneficiosas en íleo paralítico, disminuyendo el consumo de opioides por los efectos antiinflamatorios que posee (133).

Las infusiones de lidocaína intravenosa se han visto aumentadas y muestran su efectividad en el tratamiento de numerosas condiciones como puede ser la proctalgia, la tos inducida por fentanilo, cefaleas y el hipo postoperatorio refractario a otros tratamientos (130).

#### **1.4.5 LIDOCAÍNA E INFLAMACIÓN**

##### ***1.4.5.1 Potenciales mecanismos propuestos que justifican la acción antiinflamatoria***

La lidocaína posee importantes propiedades antiinflamatorias y es capaz de modular y atenuar tanto la respuesta inflamatoria a diferentes niveles, como los fenómenos de apoptosis (24)(129). La cascada inflamatoria tiene graves consecuencias en el hígado, donde se producen diferentes tipos de lesiones, como edema intracelular y edema intersticial, malformaciones en el tejido hepático y necrosis de hepatocitos. (97).

Tabla 2: Efectos de la lidocaína.

Efectos celulares que podemos encontrar de la lidocaína, procesos en los que interviene:
• Altera unión PMN- endotelio.
• Disminuye adherencia al endotelio, movilidad y migración, < n° de leucocitos acumulados.
• Aumentan los niveles de citoquinas anti-inflamatorias (IL-10).
• Inhibe la producción de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ etc.).
• Inhibe la producción de especies reactivas de oxígeno.
• Efectos sobre la producción de NO.

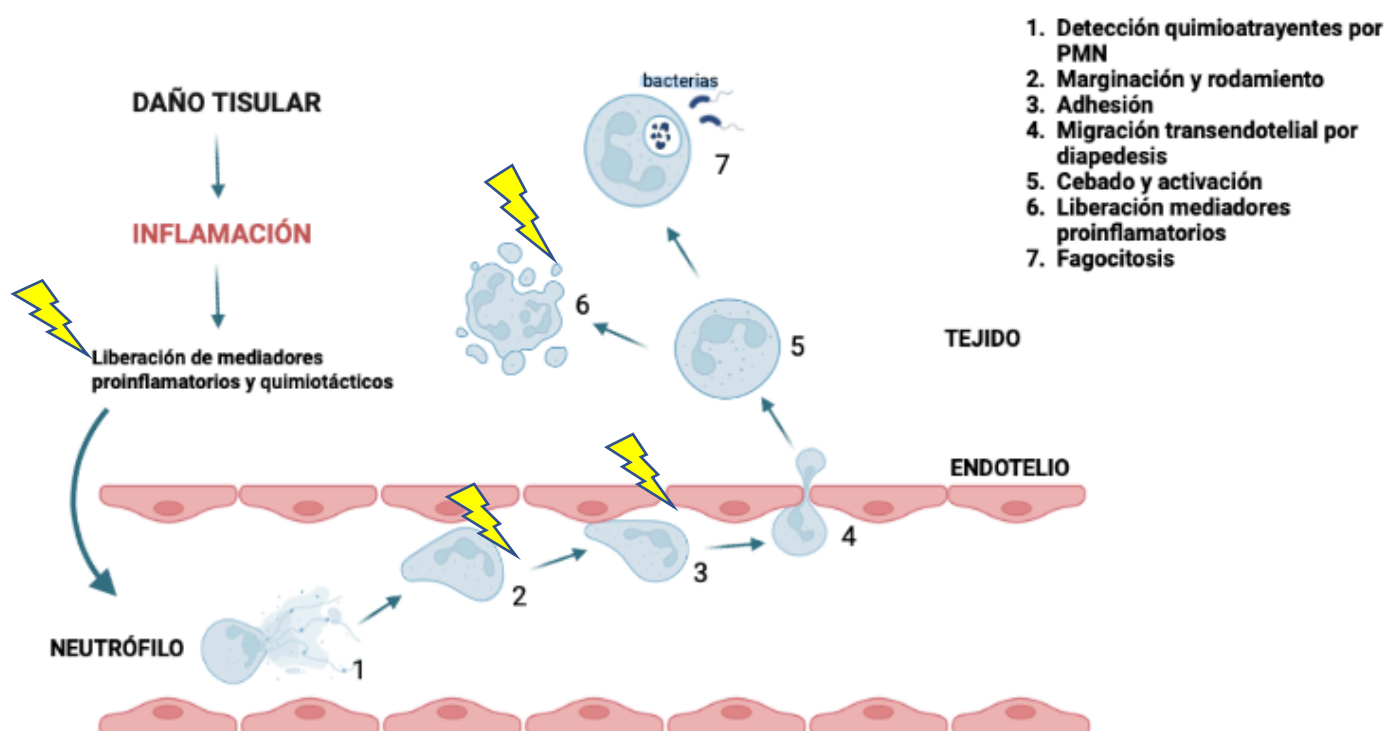


Figura 11: Lugares de acción de la lidocaína intravenosa en los diferentes estadios de la migración del leucocito polimorfonuclear en la respuesta inflamatoria, señalados por flechas amarillas (24) (Elaboración propia).

Existen varias revisiones excelentes sobre el papel de los AL en la respuesta inflamatoria y numerosas publicaciones en las que se muestra como prácticamente a todos los niveles de la cascada inflamatoria se ven afectados por los anestésicos locales. La lidocaína inhibe el cebado de los PMN y altera la adhesión celular de neutrófilos al endotelio, disminuye su migración transendotelial al disminuir su movilidad hacia la zona de la inflamación. Actúa también en procesos de fagocitosis, y disminuye la liberación de mediadores inflamatorios como histamina, leucotrienos o radicales libres y atenúa la expresión de citoquinas, lo que tiene evidente repercusión clínica que se traduce en un menor impacto de la respuesta inflamatoria (130). Actúa además sobre las células epiteliales y endoteliales, disminuyendo la lesión y daño que estas sufren a casusa de la liberación de citoquinas inflamatorias (69).

Reduce la liberación in vitro e in vivo de citoquinas proinflamatorias como IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  y NFkB entre otros, al inhibir la activación de neutrófilos. (131)

Parece ser que la lidocaína no interfiere en la activación de los PMN, sin embargo, inhibe su respuesta y potenciación ante estímulos como la inflamación, es decir, inhibe el proceso de cebado de los PMN. Esto podría explicar porque parece prevenir las respuestas inflamatorias hiperactivas sin afectar la defensa del huésped o suprimir la inflamación normal (129).

El efecto de la lidocaína en el sistema inmune se debe a mecanismos multifactoriales relacionados con la inhibición reversible y dependiente de tiempo de receptores acoplados a proteínas G. Estos receptores median numerosos procesos relacionados con el estrés oxidativo y la inflamación (134).

Cuando existe una CRP, aumenta la expresión de citoquinas proinflamatorias y esto repercute a nivel sistémico y en los eventos que suceden durante el periodo postoperatorio. Existen estudios en animales que han comprobado la modulación de la respuesta inflamatoria y de la apoptosis en modelo porcino de CRP (69). Tanto la cirugía como la VUP generan un aumento de IL-1, TNF- $\alpha$ , NFkB y MCP-1 entre otras. TNF- $\alpha$  desempeña un papel fundamental en la transmisión de la respuesta inflamatoria local a sistémica. La administración de lidocaína intravenosa atenúa los cambios inflamatorios, reduciendo los niveles de mediadores pro inflamatorios y aumentando las citoquinas antiinflamatorias.

Hay estudios en ratas con lesión nerviosa crónica en los que se demuestra como la inyección de lidocaína alivia el dolor neuropático, reduce la lesión espinal y la apoptosis celular, disminuyendo los niveles de IL-6 y IL-1beta. Además, la administración local de lidocaína se ha mostrado efectiva en los procesos inflamatorios de colon y disminuye en cirugía abdominal los niveles de IL-1, IL-6, IL-8 y factores del complemento (130) (135) (133). También se ha estudiado el papel de la administración de lidocaína sobre las células T, observándose como anula su proliferación y suprime la expresión de las citoquinas proinflamatorias derivadas de las células T como son IL-2 y TNF- $\alpha$  mediante la inhibición mediada por el NFkB de la expresión de ARNm (89).

En cuanto a la relación entre la lidocaína intravenosa y la vía de señalización NFkB, parece que la lidocaína tiene un efecto beneficioso en la modulación de la respuesta inflamatoria al inhibir la vía de señalización NFkB (136) (137). El mecanismo por el cual esto sucede no está dilucidado del todo, pero se ha postulado que puede ejercer este efecto a través de la modulación de diferentes citoquinas y proteínas nucleares de alta movilidad como la HMGB1; su expresión se relaciona con la activación de NFkB y

se ha visto que la lidocaína y otras terapias dirigidas anti-HMGB1 disminuyen la actividad de NFkB (138).

*Por tanto, existe un gran potencial y cada vez es más frecuente en el uso de infusiones sistémicas a baja dosis de anestésicos locales, destacando la lidocaína, para tratar y mejorar los resultados de diversas afecciones y procedimientos. Muchos de estos estudios, sin embargo, se han realizado solo en modelos animales y se necesitan más ensayos en humanos antes de que la implementación completa de las infusiones de anestésico local en diversas afecciones pueda tener lugar en la práctica clínica.*

#### **1.4.5.2 Efecto en la apoptosis:**

El papel de la lidocaína ha sido estudiado por Wei Xing y cols (139) en relación con el hepatocarcinoma, parece ser que la modulación de la inmunosupresión, la reducción de la respuesta al estrés, las dosis reducidas de opioides y los efectos antiinflamatorio y de AL que posee la lidocaína podría relacionarse con la inhibición de la proliferación celular en procesos tumorales.

Este mecanismo de supresión tumoral parece directamente relacionado con la apoptosis.

Los AL inducen apoptosis por medio de la activación de caspasas y regulación de vías de señalización. Existe un aumento de la expresión de Bax y Bcl-2, lo que conduce a la activación de la caspasa 3, relevante en la fase de ejecución. Se ha relacionado también que los AL puedan aumentar la desmetilación y esto, influir en la progresión del tumor.

La apoptosis está asociada con la activación de cisteína proteasas intracelulares conocidas como caspasas. La activación de caspasa-3 juega un papel fundamental en la fase de ejecución de la apoptosis. La familia Bcl-2 es un regulador crítico del proceso

apoptótico y consta de inhibidores y promotores. Observamos que el tratamiento con lidocaína resultó en una disminución en los niveles de Bcl-2 con un aumento concomitante en los niveles de Bax. En conjunto, estos resultados indican claramente que la activación de caspasa-3 y la familia Bcl-2 juegan un papel importante en la apoptosis de HepG2 inducida por la lidocaína (139)

En un estudio experimental porcino de CRP (69) se investigó la relación entre cirugía de resección pulmonar, VUP y daño pulmonar agudo. Se administró lidocaína intravenosa para evaluar la respuesta inflamatoria local y la apoptosis, obteniéndose resultados favorecedores en el grupo experimental al que se administra lidocaína intravenosa, observándose como existe una disminución de los mediadores inflamatorios y una modulación de la apoptosis.

#### ***1.4.5.3 Lidocaína e inflamación hepática***

La cascada inflamatoria repercute a nivel de los órganos diana, y conlleva graves consecuencias a nivel del hígado. Existen pocos estudios en los que se haya estudiado el impacto de la administración de lidocaína intravenosa y la modulación de la respuesta inflamatoria a nivel hepática.

Estudios in vivo e in vitro en hígado han demostrado como los AL tienen acción como moduladores de la respuesta inflamatoria. Gallos y cols analizaron ratones a los que se provoca una sepsis y se les administra una perfusión continua de lidocaína intravenosa al 5 o 10% a dosis entre 2.5-5 mg/kg/h. Realizaron determinaciones de citoquinas proinflamatorias, ARNm y mieloperoxidasa, apoptosis renal y supervivencia a la semana.

El estudio demuestra cómo el grupo donde se administra lidocaína intravenosa presenta una supervivencia mejorada, concentraciones plasmáticas de Cr, AST, ALT y ARNm de marcadores proinflamatorios menores, niveles menores de TNF- $\alpha$  y menor actividad de MPO y expresión de moléculas de adhesión intracelular (140).

La administración de lidocaína intravenosa atenúa la respuesta inflamatoria y la apoptosis. Se cree que estos efectos están relacionados con la disminución de NFkB e IL-6 que se encuentran aumentados en sepsis.

Otros estudios como el de Wang y cols van en la misma línea, demostrando de atenuación de la respuesta inflamatoria con perfusiones de lidocaína intravenosa a 3-9mg/kg.

La concentración plasmática óptima para la lidocaína intravenosa es de 1-2 mg/kg, está por debajo de los 5mg/ml que es la concentración óptima requerida para bloquear los impulsos de fibra nerviosa periférica, motivo por el cual los efectos mencionados no se explican por el bloqueo de los canales de sodio (129).

## **2. Hipótesis y Objetivos**



## **2.1 HIPÓTESIS**

La cirugía de resección pulmonar con ventilación unipulmonar se asocia a una respuesta sistémica que puede ser medida por la expresión de mediadores inflamatorios en el hígado. La administración de lidocaína intravenosa durante la cirugía puede modular esta respuesta hepática y por tanto la respuesta inflamatoria sistémica postoperatoria.

## **2.2 OBJETIVOS**

### **2.2.1 OBJETIVO PRINCIPAL**

El objetivo principal de este trabajo es investigar la posible modulación por parte de la lidocaína intravenosa sobre la expresión de mediadores proinflamatorios a nivel hepático tras un procedimiento de resección pulmonar con ventilación unipulmonar. El estudio se realiza, en un modelo experimental porcino, analizando dichos mediadores en hígado a las 24 horas de intervenir a un grupo tratado intraoperatoriamente con lidocaína, a un grupo control y a un grupo con cirugía simulada.

### **2.2.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS**

- 1) Comparar los parámetros ventilatorios, valores hemodinámicos y gasométricos en los tres grupos experimentales durante el intra y postoperatorio.
- 2) Estudiar el efecto de la administración intraoperatoria por vía intravenosa de la lidocaína sobre las vías de señalización proinflamatorias en el parénquima hepático.
- 3) Analizar el potencial efecto sobre los mediadores de estrés oxidativo y el metabolismo del óxido nítrico de la administración intraoperatoria de lidocaína en las muestras de parénquima hepático.

- 4) Investigar el potencial efecto de la administración intraoperatoria por vía intravenosa de la lidocaína sobre las vías de la apoptosis en el hígado.

# **3. Material y Métodos**



Estudio experimental, aleatorizado y ciego. El estudio ha sido realizado con la autorización de los Comités de Investigación (CI) y de Ética en Experimentación Animal (CEEA) del Hospital General Universitario Gregorio Marañón (HGUGM). El proyecto se regulará en la normativa legal y, en especial, en la Ley 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio, y en el Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por la que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluida la docencia. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las leyes europeas y españolas para el cuidado de animales de experimentación.

### **3.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN:**

Llevamos a cabo los experimentos utilizando un total de 18 cerdos de la raza mini pig, machos y hembras, con un peso promedio entre 30-40 kg. La raza mini pig, fue creada inicialmente con fines de investigación y experimentación. Es el resultado de la mezcla de otras razas porcinas (entre ellas kune-kune, pigmeo o vietnamita) con el objetivo de mejorar las condiciones del animal, obteniéndose así, cerdos de un tamaño y de un peso menor, buen estado de salud, condiciones de higiene optimizadas y un comportamiento más dócil. El desarrollo de la raza comenzó a finales de 1960 en el Instituto de reproducción animal y genética de la Universidad de Göttingen, Alemania.

En el desarrollo del proyecto experimental, los modelos porcinos son trasladados en una jaula individual al centro experimental el día previo a realizar el experimento. Se mantienen en el animalario en condiciones de humedad y temperatura adecuadas hasta

que se realiza el mismo, humedad relativa del 55% y temperatura de 20-22°C respectivamente.

Los modelos porcinos fueron sometidos a una intervención quirúrgica en la que se realiza toracotomía izquierda para lobectomía caudal utilizando ventilación unipulmonar.

### **3.2 MATERIAL FUNGIBLE Y SISTEMA DE MONITORIZACIÓN EMPLEADO**

- Material para la intubación orotraqueal:
  - Pala de laringoscopio Macintosh.
  - Tubo Murphy con balón de neumotaponamiento del número 6-6.5, según el tamaño y peso del cerdo. El tubo se introduce al inicio de manera usual, para realizar ventilación bipulmonar. Cuando es necesario progresarlo para realizar intubación selectiva del bronquio principal derecho, se secciona la parte distal del tubo y se realiza una conexión con un segundo tubo, del número 8.5-9 y se fija con esparadrapo.
  - Fiador de Rush para guiar el tubo de intubación orotraqueal (IOT).
  - Pinzas de Magill: para guiar el tubo si hay dificultades en la IOT.
  - Vendaje para fijar el tubo adecuadamente y que no se movilice durante la cirugía.
- Fibrobroncoscopio flexible Karl-Storz 3,7mm, con canal de trabajo.
- Introdutores vasculares: se canaliza mediante técnica de Sheldinger una arteria y una vena femoral (catéter femoral Arrow-Howes calibre 7 French). Es preciso canalizar ambas, arteria y vena, para poder monitorizar parámetros hemodinámicos y volumétricos con el sistema de monitorización mediante termodilución transpulmonar.

- Catéter venoso central trilumen 4 French, 13 centímetros, ARROW.
- Catéter de termodilución marca PiCCO arterial (Pulse Contour Cardiac Output; Pulsion Medical Systems ®, Munich, Alemania): (PV2014L16 arteria femoral de adulto pequeño Ø 4F, longitud 16 cm).
- Sistema de monitorización PiCCO Plus ® 2002: Se trata de un sistema de monitorización que nos permite obtener parámetros volumétricos a través de termodilución transpulmonar. También proporciona parámetros hemodinámicos calibrados continuos a través de un algoritmo, que proporciona tendencias continuas entre calibraciones de estos parámetros hemodinámicos analizando de la onda de presión arterial. Estos parámetros también se pueden calibrar mediante termodilución transpulmonar.

Ilustración 1: Sistema de monitorización PiCCO Plus ®



### 3.3 QUIRÓFANO E INSTALACIONES

Se utilizaron las instalaciones de la Unidad de Cirugía Experimental del Hospital Gregorio Marañón, y se realizaron los experimentos en los quirófanos situados en su interior. Estos quirófanos disponen de dos mesas quirúrgicas, cuatro lámparas quirúrgicas

de alta intensidad y equipo de instrumental quirúrgico estándar, así como material específico de cirugía torácica.

Ilustración 2: Vista panorámica del quirófano de la Unidad de Cirugía Experimental.



Ilustración 3. Mesa con el material quirúrgico.



Desde el punto de vista anestésico se dispone de material y de la monitorización necesaria: un respirador Dräger SA 1 (Dräger Medical, Lübeck, Alemania) que comprobamos previo a su utilización, capnografía (Ohmeda 5250 RGM (General Electric Health Care, USA), monitor PiCCO, bombas de infusión de medicación y todos los fármacos y material necesarios. Es posible realizar gasometrías in situ gracias a un

analizador de gases GEM Premiere 5000. Las instalaciones cuentan con un desfibrilador con palas externas e internas Life Pulse (HVE, Miami, USA). Para realizar la cirugía torácica, se dispone del material estéril quirúrgico necesario. El procedimiento se realiza en una mesa de quirófano con lámpara quirúrgica.

### **3.4 PROTOCOLO ANESTÉSICO**

Se utiliza un protocolo estandarizado y realizado por el equipo, de manera que se trata a todos los animales de la misma manera desde el punto de vista anestésico. Como se ha comentado previamente, los animales llegan el día de antes al animalario. Se realiza un periodo de ayuno de 18 horas previas al procedimiento, a excepción de agua, que se permite beber libremente hasta 2 horas antes.

El día de la intervención se premedica al animal en su jaula individual, se utiliza para ello Ketamina intramuscular 10mg/kg (Ketolar®, Parke Davis, Pfizer, Dublin, Ireland) que se administra 20-30 minutos antes. Posteriormente se realiza el traslado a la mesa quirúrgica y se canaliza en primer lugar una vía venosa periférica, generalmente en pabellón auricular a nivel de la vena dorsal de la oreja (abbocath 20G). Se coloca en posición decúbito supino, se realiza monitorización continua de registro electrocardiográfico y saturación periférica de oxígeno por pulsioximetría, y se preoxigena con oxígeno al 100% para posteriormente proceder a la inducción anestésica. Se administra para ello vía intravenosa, fentanilo 3 mcg/kg (Fentanest, Kern Pharmaceuticals, Houston, TX), propofol al 1% 4 mg/Kg (Diprivan, AstraZeneca, Macclesfield, Cheshire, UK), y atracurio 0,6 mg/kg (Tracrium, Glaxo Smith Kline, Brentford, UK). Se realiza profilaxis antibiótica con penicilina benzatínica administrada vía intramuscular (600.000 UI IM) antes de la intervención quirúrgica.

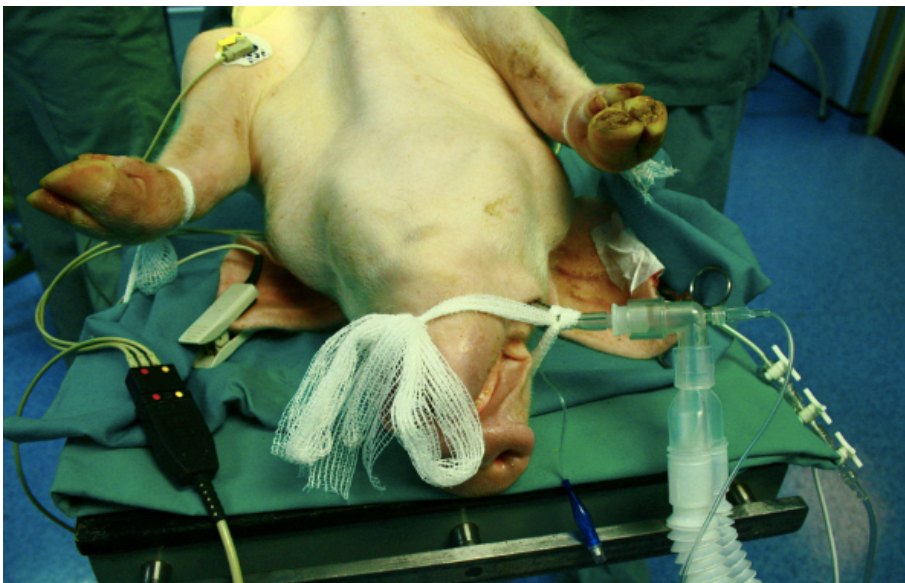
Se procede tras inducción a la IOT con tubo del nº 6.5 con neumotaponamiento, se posiciona el tubo a unos 2-3 cm de la carina para realizar ventilación bipulmonar. Se

comprueba la correcta posición del tubo mediante visualización con fibrobroncoscopio (Fibrobroncoscopio flexible Karl-Storz 3,7mm, con canal de trabajo).

Ilustración 4: Intubación orotraqueal del modelo porcino.



Ilustración 5: Modelo experimental anestesiado, intubado y monitorizado, previamente a iniciar la cirugía.



El mantenimiento se realiza con perfusión continua de propofol 2% (Diprivan®, AstraZeneca) 8-10 mg/Kg/h con bomba de infusión intravenosa continua y bolos de fentanilo 2mcg/kg y atracurio según los requerimientos. Se administra fluidoterapia de

mantenimiento con cristaloides, ringer lactato (Hartmann Braun, Barcelona) 5-6ml/kh/h y si la intervención lo requiere, es posible administrar coloide, hidroxietil almidón 130/0,4 (Voluven® 6%, Fresenius Kabi) en bolus.

Se conecta el tubo de IOT al respirador modelo Dräger SA 1 (Dräger Medical, Lübeck, Alemania) y se realiza ventilación mecánica controlada por volumen, utilizándose un protocolo de ventilación de protección pulmonar. Para ello, se administra un volumen corriente de 8 ml/kg, que se disminuye a 6 ml/kg durante ventilación unipulmonar. La presión pico del respirador se limita a un máximo de 35 cm H<sub>2</sub>O en ventilación bipulmonar, se fija una PEEP de 5 cm de H<sub>2</sub>O y una relación inspiración- espiración de 1:2. La frecuencia respiratoria se establece en 12-15 respiraciones por minuto en función de la pCO<sub>2</sub>, el objetivo es pCO<sub>2</sub> en gases arteriales entre 35 y 45mmHg y mantener normocapnia, EtCO<sub>2</sub> 35-40mmHg. Se utiliza una FiO<sub>2</sub> aproximada del 60%, si es preciso se aumenta para evitar hipoxemia durante el procedimiento.

Se monitorizan los parámetros respiratorios, capnografía, presión pico, presión media y compliance pulmonar. Cuando se precisa ventilación unipulmonar antes de abrir la pleura izquierda, se secciona la parte proximal del tubo de IOT al respirador y se realiza una conexión con un segundo tubo de Murphy del número 8.5-9, se progresa entonces el tubo endotraqueal hasta el bronquio principal derecho, esto se puede hacer guiado con el fibrobroncoscopio o comprobarlo con el mismo después de la manipulación y/o cambio de posición quirúrgica.

Se mantiene ventilación unipulmonar durante 120 minutos, después se realiza la maniobra inversa, retirando nuevamente el tubo de IOT y colocándolo a 3cm de la carina para iniciar ventilación bipulmonar.

Se canalizan la arteria y la vena femorales derechas y se conecta el monitor PiCCO para la medición del gasto cardiaco y para realizar termodiluciones seriadas. Para ello, se disecciona el paquete femoral vascular, aislando y controlando con ligaduras arteria y vena femorales e introduciendo un catéter vascular (Arrow-Howes 7 French), la canalización de los vasos se lleva a cabo por medio de la técnica de Sheldinger. A través de los mismos se introduce un catéter trilumen vía venosa y un catéter de termodilución PiCCO (PV2014L16 arteria femoral de adulto pequeño con diámetro 4 French y longitud de 160 mm) a través de la vía arterial.

Ilustración 6: Canalización quirúrgica del paquete femoral.



Cuando el equipo quirúrgico finaliza el procedimiento y se comienza con el cierre por planos de la toracotomía, se suspende la perfusión continua de propofol, se despierta posteriormente al animal y tras cerciorarnos de que la mecánica ventilatoria espontánea es adecuada y que oxigena correctamente se procede a extubar al animal. Durante el postoperatorio se pautan analgésicos como ketorolaco 30 mg (Droal®, Vita S.A., La Paz, Bolivia) intramuscular y dexketoprofeno para el dolor y se deja libre acceso al agua.

A las 24 horas del postoperatorio el animal es trasladado nuevamente al quirófano donde se realiza una segunda inducción anestésica de las mismas características que la redactada anteriormente. El mantenimiento anestésico se realiza con propofol en perfusión continua.

A la finalización del procedimiento con la recogida de muestras, el animal es sacrificado tras la administración de un bolo de propofol de 2 mg/kg para conseguir un plano profundo de hipnosis y a la inducción de cardioplejia con la administración de cloruro potásico.

### **3.5 PROTOCOLO QUIRÚRGICO**

Una vez realizados los procedimientos pertinentes por parte de anestesiología y con los vasos canalizados, se coloca al animal en posición de decúbito lateral derecho. Se procede a la limpieza la zona de la intervención con povidona iodada y se realiza un campo quirúrgico con paños estériles.

Se realiza una toracotomía izquierda entre las costillas quinta y sexta, a través de la cisura interlobar, llevándose a cabo una disección minuciosa del paquete vascular, identificándose y ligando arteria, vena y bronquio caudales. Se inicia VUP y se realiza lobectomía caudal y tras 120 minutos de ventilación unipulmonar (VUP 120), se observa y comprueba que la re-expansión del lóbulo craneal sea adecuada y que no existan fugas a nivel de la sutura quirúrgica y se mantiene al animal con ventilación bipulmonar (VBP) durante 60 minutos (VBP60). Posteriormente, tras realizar las determinaciones señaladas, y una vez reiniciada la VBP se revisa la expansión del lóbulo craneal y la estanqueidad de la sutura bronquial, procediéndose al cierre por planos de la toracotomía dejando un tubo de drenaje intrapleural que se conecta a un sistema de flujo unidireccional (válvula de Heimlich).

Tras despertar a animal y pasadas las 24 horas de la intervención se le traslada nuevamente a quirófano y se realiza de nuevo una anestesia general, siguiendo el mismo protocolo anestésico anteriormente descrito. A continuación, se procede a la recogida de muestras: estudio gasométrico y hemodinámico, extracción de sangre para estudios bioquímicos y biopsia hepática.

Para facilitar la toma de biopsias hepáticas, previo a la colocación del animal en decúbito lateral, se realiza una laparotomía media subxifoidea de unos 5 o 6 cm.

Una vez tenemos las muestras necesarias, se profundiza anestésicamente al modelo porcino y se sacrifica realizando una cardioplejia con la administración de cloruro potásico.

### **3.6 DISEÑO EXPERIMENTAL Y GRUPOS DE ESTUDIO**

El estudio se ha realizado en la Unidad de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid. Fue concedida la aprobación del Comité de Experimentación Animal y del Comité de Investigación de la institución, prestando especial énfasis a la anestesia y alivio del dolor.

Se dividen los 18 animales en tres grupos, cada uno de seis animales. Se realiza un abordaje por toracotomía izquierda y una lobectomía caudal en todos ellos. La asignación a cada grupo se realiza de manera aleatoria mediante el uso de Excel (Microsoft Corp), no se conoce por parte de anestesiología ni de cirugía torácica.

- Grupo 1: grupo de tratamiento con LIDOCAÍNA. En este grupo, se realiza el protocolo descrito y se administra un bolo de lidocaína intravenosa de 1,5 mg/kg intravenoso tras la inducción anestésica y una perfusión continua de mantenimiento con lidocaína 1.5 mg/kg/h hasta el final del procedimiento.

- Grupo 2: grupo CONTROL. En el grupo control se administran los mismos volúmenes, un bolo inicial y una perfusión continua de mantenimiento, pero lo que se administra es suero fisiológico (solución salina 0,9%).

- Grupo 3: grupo SHAM. En este grupo se realiza toracotomía y ventilación bipulmonar exclusivamente. No se lleva a cabo ventilación unipulmonar ni lobectomía. Se toman las mismas muestras y se realizan los mismos estudios hemodinámicos que en los otros dos grupos.

Se obtienen determinaciones de los parámetros hemodinámicos, gasométricos y respiratorios en los siguientes momentos: al inicio del estudio (basal), a los 120 minutos (120' VUP) de la ventilación unipulmonar, a los 60 minutos de reiniciar la ventilación bipulmonar (60' VBP), y 24h después de la cirugía. Se obtiene biopsia hepática a las 24 horas.

### 3.7 MEDICIONES REALIZADAS Y TOMA DE MUESTRAS

#### 3.7.1 DISEÑO DEL PROTOCOLO EXPERIMENTAL

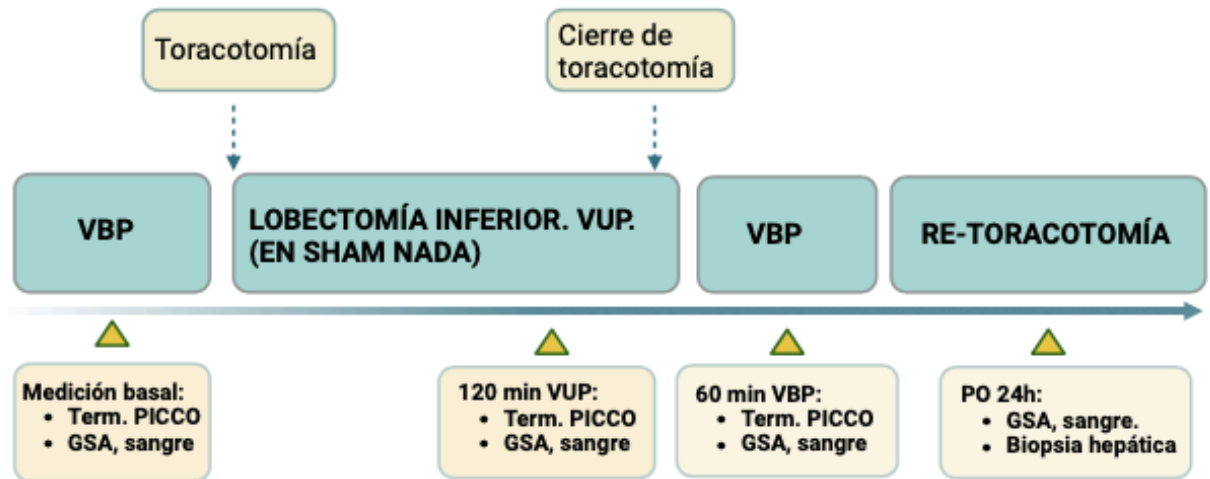


Figura 12: Diseño protocolo experimental.

VBP: ventilación bipulmonar, VUP: ventilación unipulmonar, GSA sangre: gasometría y bioquímica sanguínea, Term. PICCO: mediciones obtenidas mediante termodilución con PICCO, PO: postoperatorio, Min: minutos.

#### 3.7.2 RECOGIDA DE VARIABLES HEMODINÁMICAS

Se utiliza el monitor PICCO para obtener los parámetros hemodinámicos y se realiza periódicamente termodilución transpulmonar. En primer lugar, se canalizan la vena y arteria femoral, siguiendo la técnica de Sheldinger, y se insertan un catéter venoso central trilumen y un catéter de sistema PICCO con sensor distal de temperatura para poder realizar la termodilución. Con un volumen aproximado de unos 20-30 ml de suero fisiológico frío se hace la termodilución, el suero es inyectado a través de la vía venosa central y circula a través del sensor de temperatura y posteriormente por el organismo del

animal, pasando por su corazón y pulmones. El sensor de temperatura realiza una nueva medición de temperatura a los pocos segundos, y obtenemos gracias a ello la variación de temperatura, generándose una curva de disipación. Gracias al uso de la termodilución transpulmonar obtenemos numerosos parámetros hemodinámicos.

En el análisis estadístico se obtienen mediciones continuas de: Presión arterial media (PAM), frecuencia cardiaca (FC), variación de volumen sistólico (VVS) y gasto cardiaco (GC). El volumen del gasto cardiaco se calcula mediante la ecuación Stewart-Hamilton de la superficie bajo la curva de termodilución transpulmonar

Monitorización de variables hemodinámicas:

Precarga	Volumen global al final de la diástole
Postcarga	Resistencias vasculares sistémicas (RVS)
Contractilidad	Velocidad de aumento de presión
Respuesta a volumen	VVS
Edema pulmonar	Agua extravascular

### 3.7.3 RECOGIDA VARIABLES GASOMÉTRICAS

Al inicio del procedimiento se canalizan los vasos femorales (arteria y vena), las gasometrías se extraen de la arteria femoral, se realizan en la misma sala de quirófano y se obtienen diferentes parámetros, como pH sanguíneo, presión parcial de oxígeno (pO<sub>2</sub>) y de dióxido de carbono (pCO<sub>2</sub>), iones, bicarbonato y hemoglobina, entre otros. Las extracciones se realizan en diferentes momentos durante el procedimiento: medición basal, medición a los 120 minutos de la ventilación unipulmonar, medición a 60 minutos tras volver a iniciar la ventilación bipulmonar y medición a las 24 horas tras la lobectomía. (Ver figura del protocolo experimental).

### **3.7.4 MUESTRAS DE TEJIDO HEPÁTICO**

Durante el experimento se toma una muestra hepática por animal de experimentación, para llevar a cabo los estudios bioquímicos pertinentes. La toma de la biopsia hepática se realiza 24 horas después de la lobectomía.

Cada una de las muestras hepáticas se introduce en un criotubo procediendo a su inmediata congelación en nitrógeno líquido. Las muestras se almacenan en un congelador que las mantiene a una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis bioquímico.

### **3.7.5 DETERMINACIÓN DE MARCADORES BIOQUÍMICOS EN BIOPSIA HEPÁTICA**

#### ***3.7.5.1. DETERMINACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)***

Se midió en suero como contenido de nitrito + nitrato ( $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ ), mediante la reacción de Griess como concentración de ion nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) tras reducción de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) a  $\text{NO}_2^-$ . Brevemente, después de la incubación del plasma con *Escherichia coli*  $\text{NO}_3^-$  reductasa y NADPH+ ( $37^{\circ}\text{C}$ , 30 min), 300  $\mu\text{l}$  de reactivo de Griess (diclorhidrato de naftilendiamina al 0,5 %, sulfonilamida al 5 %, ácido fosfórico al 25 % ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ )) (Sigma-Aldrich, MI, EE. UU.) La reacción se realizó a  $22^{\circ}\text{C}$  durante 20 min y se midió la absorbancia a 546 nm, utilizando como estándar una solución de nitrito de sodio ( $\text{NaNO}_2$ ).

La señal medida fue lineal de 1 a 150 mM. ( $r=0,994$ ,  $p<0,001$ ,  $n=5$ ). El umbral de detección fue de 2  $\mu\text{M}$ . La reproducibilidad del experimento se evaluó en tres experimentos independientes y cada uno se repitió tres veces. La variación media intraensayo calculada fue inferior al 5%.

### **3.7.5.3 EXPRESIÓN DE RNA MENSAJERO (MCP-1, IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-10, NF- $\kappa$ B, iNOS)**

Se realizó la medición en biopsia hepática mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR).

El ARN se aisló de muestras de hígado porcino utilizando el método descrito por Chomczynski (140) utilizando el kit de reactivos TRI (Molecular Research Center, Inc, Cincinnati, OH, EE. UU.), siguiendo el del fabricante. La pureza del ARN se midió con electroforesis en gel de agarosa 1, y las concentraciones de ARN y la relación 260/280 se determinaron mediante espectrofometría BioDrop™ (Fisher Scientific, MA, EE. UU.).

La transcripción inversa de 2 mg de ARN para la síntesis de ADNc se realizó utilizando el kit de transcripción inversa StaRT (AnyGenes, París, Francia). qRT-PCR se realizó con el termociclador 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems, MA, EE. UU.) con TB Green® Ex Taq™ (Tli RNase H Plus) (Takara Bio Inc., Shiga, Japón) y concentraciones de 300 nM de cebadores específicos validados (AnyGenes, París, Francia). Los ciclos de amplificación de qPCR fueron un ciclo de 95 °C de 10 min, seguido de 45 ciclos a 95 °C de 10 s y a 60 °C de 30 s y finalmente análisis de la curva de fusión, siguiendo las recomendaciones del fabricante (95 °C de 10 s), 65 °C durante 30 s y 95 °C durante 0 s).

Se usó la amplificación del ARNm de 18S como control de carga para cada muestra. El nivel de expresión génica se analizó por triplicado para cada muestra. Los cambios relativos en la expresión del ARNm se calcularon utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (142)

#### **3.7.5.4 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, BAD, BAX, BAK, Bcl-2, MCL-1, iNOS, eNOS y NF- $\kappa$ B) Y VARIABLES RELACIONADAS CON LA APOPTOSIS (PUMA, KHLOTO)**

Se realizó el análisis en biopsia hepática mediante Western blot utilizando anti-TNF- $\alpha$  (Endogen), anti-IL1b y anti-IL6 específicos (Bio Genesis), anti-óxido nítrico Sintasa I, anti-óxido nítrico Sintasa II, anti-óxido nítrico Sintasa III, (Chemicon International, Inc.), anti-NFkappaB (Endogen) y anti-IkappaB (Endogen).

Se utilizó transferencia Western para medir los niveles de TNF- $\alpha$ , IL-1b, IL-6, iNOS, eNOS, Nf- $\kappa$ B e  $\kappa$ Bb. Brevemente, muestras de hígado, después de la homogeneización con tampón de lisis RIPA modificado (PBS, Igepal, desoxicolato de sodio (D5670-5G), SDS al 10 %, PMSF, EDTA 0,5 M y EGTA 100 mM) a las que se añadió un cóctel de inhibidores de proteasa (Sigma #P-2714), PMSF (#P7626, 1 mM), ortovanadato de sodio (#S6506, 2 mM) y pirofosfato de sodio (#S6422, 20 mM), se sonicaron y se hirvieron durante 10 min a 100 °C en una proporción de 1:1 con gel- tampón de carga (100 mmol/L TrisHCl [pH 6,8], 4 % SDS, 20 % glicerol, azul de bromofenol 0,1, 200 mmol/L ditiotreitól).

Los equivalentes de proteína total (25  $\mu$ g) para cada muestra se separaron mediante SDS-PAGE usando geles de acrilamida prefabricados Mini-PROTEAN® TGX™ al 10 % (Bio-Rad Laboratories, CA, EE. UU.) y se transfirieron a una membrana de PVDF usando Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad Laboratories, CA, EE. UU.).

La membrana se colocó inmediatamente en tampón de bloqueo que contenía leche descremada al 5 % en Tris 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM y Tween-20 al 0,01 %. Se dejó bloquear la transferencia a 37 °C durante 1 h. La membrana se incubó con un anticuerpo policlonal de conejo (1:1000) durante 12 h a 4 °C, seguido de una incubación

con un anticuerpo secundario IgG anti-conejo de cabra (Santa Cruz Biotechnology, CA, EE. UU.) (1:7000).

La detección de proteínas se realizó con el kit de ensayo Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad Laboratories, CA, EE. UU.) y ECL Plus (Amersham Life Science Inc., Buckinghamshire, Reino Unido) mediante quimioluminiscencia con el BioRad® ChemiDoc MP Imaging System para determinar las densidades ópticas relativas. Se usaron marcadores de proteína teñidos previamente para las determinaciones del peso molecular. El gen de mantenimiento GAPDH se utilizó como control de carga (1:5000) (Santa Cruz, CA, EE. UU.). Las proteínas se cuantificaron utilizando el software BioRad® Image Lab (Bio-Rad Laboratories, CA, EE. UU.).

### **3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se recogieron los datos del experimento en una base Access diseñada para el proyecto. Para determinar si los datos siguieron una distribución normal se utilizó el test de Shapiro-Wilk. Para determinar si en el tiempo basal los resultados de los distintos grupos experimentales eran homogéneos, se realizó el test de ANOVA-F. Para determinar si las diferencias que existen entre las medias de los diferentes grupos eran estadísticamente significativas se realizó un ANOVA de medidas repetidas. Tras haber rechazado la Hipótesis nula de igualdad de medias mediante ANOVA, se utilizó el test de Tukey para la comparación de medias entre diferentes experimentos. Todos los datos se expresan como media  $\pm$  la desviación estándar de la media. El análisis de resultados se realizó con el paquete estadístico SPSS 23.

Se utilizó la prueba de Kruskal - Wallis para identificar cualquier diferencia significativa entre los tres grupos (la hipótesis nula fue rechazada con un valor  $\alpha = 0,05$ ).

A continuación, usamos la prueba U de Mann–Whitney para analizar los pares de muestras específicas que mostraran diferencias significativas.

## **4. Resultados**



#### **4.1 PARÁMETROS GASOMÉTRICOS, HEMODINÁMICOS Y RESPIRATORIOS:**

La administración de lidocaína intravenosa no afecta a los resultados gasométricos ni hemodinámicos obtenidos en los diferentes grupos a estudio, durante el experimento ni durante las 24 horas siguientes.

Con respecto a los parámetros respiratorios, la administración de lidocaína tampoco se relaciona con cambios a nivel de las presiones respiratorias entre los tres grupos. Únicamente se observa de manera no significativa una menor presión en la vía aérea y un aumento de la oxigenación durante el periodo de ventilación unipulmonar con respecto a los grupos Control y SHAM.

Obtenemos determinaciones de los parámetros hemodinámicos, gasométricos y respiratorios en los siguientes momentos del experimento; se realiza una medición basal, a los 120 minutos (120') de la ventilación unipulmonar, a los 60 minutos de reiniciar la ventilación bipulmonar (60'), y la última medición se realiza a las 24h.

Tabla 3: Valores hemodinámicos medidos durante el perioperatorio.

	GRUPO	MEDICIÓN BASAL Media (SD)	MEDICIÓN VUP 120' Media (SD)	MEDICIÓN VBP + 60' Media (SD)	MEDICIÓN 24Horas Media (SD)
FC (lpm)	SHAM	89.0 (24)	88.0 (17)	87.8 (10)	95.0 (16)
	CON	94.6 (14)	90.8 (8)	96.8 (8)	82.8 (16)
	LIDO	85.2 (12)	107.8 (25)	108.8 (9)	94.8 (11)
PAM (mmHg)	SHAM	93 (11)	102 (11)	114 (14)	106 (22)
	CON	92 (27)	97 (10)	124 (17)	104 (10)
	LIDO	99 (16)	102 (18)	119 (10)	98 (15)
IC (l/min/m <sup>2</sup> )	SHAM	2.73 (0,6)	2.83 (1.2)	3.45 (1.1)	3.02 (1.1)
	CON	3.47 (0.8)	3.14 (0,4)	3.74 (1.0)	2.84 (0.9)
	LIDO	3.75 (1.2)	3.11 (0.9)	3.90 (1.0)	2.67 (0.4)
VVS (%)	SHAM	19.0 (5.4)	11.2 (6.6)	18.0 (5.1)	25.7 (9.1)
	CON	18.4 (6.2)	15.0 (2.7)	14.6 (4.3)	17.8 (7.4)
	LIDO	15.4 (4.9)	11.0 (4.6)	16.6 (3.6)	24.4 (5.3)
RVSI (dyn/s/cm <sup>5</sup> /m <sup>2</sup> )	SHAM	2897 (939)	3126 (1383)	3067 (1604)	2948 (1050)
	CON	1899 (496)	2349 (409)	2739 (664)	2798 (1185)
	LIDO	2270 (1089)	3008 (1600)	2595 (884)	2893 (629)

Datos expresados como media (DS: desviación estándar). VUP: Ventilación unipulmonar, VBP: Ventilación bipulmonar, SHAM, CON: grupo control, LIDO: grupo lidocaína. FC: Frecuencia cardiaca, PAM: Presión arterial media, IC: índice cardiaco, VVS: variabilidad de volumen sistólico, IRVS: Índice de resistencia vascular sistémica.

Tabla 4: Datos obtenidos en las gasometrías arteriales durante el perioperatorio.

	GRUPO	MEDICIÓN BASAL Media (SD)	MEDICIÓN VUP 120' Media (SD)	MEDICIÓN VBP + 60' Media (SD)	MEDICIÓN 24Horas Media (SD)
SatO2 (%)	SHAM	99.5 (1.2)	100 (0.0)	100 (0.0)	100 (0.0)
	CON	100 (0.0)	99.2 (0.9)	99.0 (1.1)	99.8 (0.4)
	LIDO	98.8 (2.2)	99.8 (0.4)	99.8 (0.4)	100 (0.0)
ANOVA		No Sign.	No sign.	No Sign.	No Sign.
PaO2 (mmHg)	SHAM	279 (77)	256 (45)	251 (51)	252(54)
	CON	236 (55)	176 (27)	235 (48)	245(59)
	LIDO	266 (83)	200 (30)	235 (52)	267(43)
ANOVA		No Sign.	0.03(*, #)	No Sign.	No Sign.
PaCO2 (mmHg)	SHAM	41.3 (4.2)	41.3 (4.0)	45.0 (8.7)	39.2 (6.6)
	CON	41.4 (5.9)	43.4 (6.8)	48.0 (9.7)	38.8 (6.9)
	LIDO	41.0 (6,5)	45.2 (6.6)	46.2 (7.9)	40.0 (3.0)
ANOVA		No Sign.	No Sign.	No Sign.	No Sign.
pH	SHAM	7.5 (0.0)	7.5 (0.0)	7.5 (0.1)	7.5 (0.1)
	CON	7.5 (0.1)	7.5 (0.1)	7.4 (0.1)	7.5 (0.1)
	LIDO	7.5 (0.1)	7.4 (0.1)	7.4 (0.1)	7.5 (0.0)
ANOVA		No Sign.	No Sign.	No Sign.	No Sign.

Datos expresados como media (DS: desviación estándar). VUP: Ventilación unipulmonar, VBP: Ventilación bipulmonar, SHAM, CON: grupo control, LIDO: grupo lidocaína. PaO2: presión arterial de oxígeno, PaCO2: presión arterial de dióxido de carbono. No Sign.: No significativo, CON vs SHAM (\*). SHAM vs LIDO (#).

Tabla 5: Parámetros respiratorios obtenidos durante el perioperatorio.

	GRUPO	MEDICIÓN BASAL Media (SD)	MEDICIÓN VUP+ 120' Media (SD)	MEDICIÓN VBP + 60' Media (SD)	MEDICIÓN 24Horas Media (SD)
PpVA (cmH20)	SHAM	28.2 (3.1)	30.5 (8.8)	32.8 (11)	31.6 (8.5)
	CON	28.4 (3.8)	34.8 (7.1)	32.2 (9.7)	31.6 (6.9)
	LIDO	27.9 (3.3)	35.6 (5.4)	31.2 (7.2)	32.8 (7.4)
ANOVA		No Sign.	0.041(*, #)	No Sign.	No Sign.
Pmedia (cmH20)	SHAM	7.0 (0.6)	7.2 (1.7)	7.7 (1.6)	8.3 (1.8)
	CON	7.0 (1.0)	7.6 (1.7)	7.8 (1.3)	7.6 (1.1)
	LIDO	7.0 (3.0)	8.6 (0.5)	9.4 (1.9)	8.8 (1.0)
ANOVA		No Sign.	No Sign.	No Sign.	No Sign.

Datos expresados como media (DS: desviación estándar). VUP: Ventilación unipulmonar, VBP: Ventilación bipulmonar, SHAM, CON: grupo control, LIDO: grupo lidocaína. PpAW: Presión pico en la vía aérea, Pmedia: Presión media en la vía aérea. No Sign.: No significativo, CON vs SHAM (\*). SHAM vs LIDO (#).

#### 4.2 DETERMINACIONES EN BIOPSIA HEPÁTICA:

Las mediciones de nuestro trabajo se realizan en muestras de biopsia hepática tomadas de cada modelo animal porcino a las 24 horas de realizar el procedimiento.

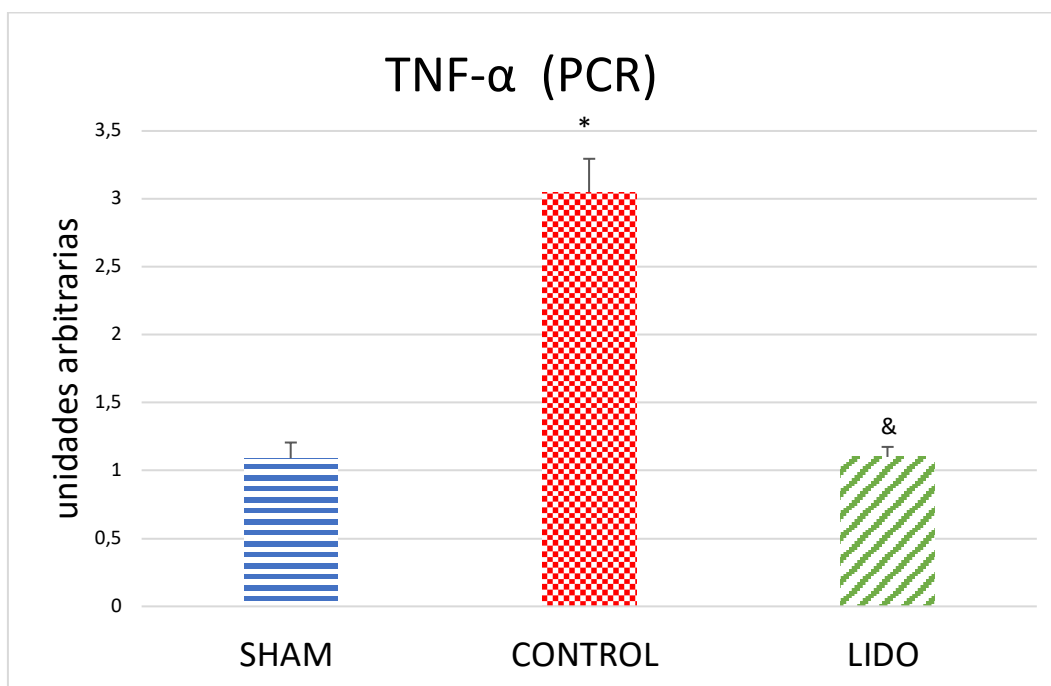
## 4.2.1 MARCADORES INFLAMATORIOS ANALIZADOS EN HÍGADO:

### 4.2.1.1 Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ):

Los valores de TNF- $\alpha$  en las muestras de las biopsias hepáticas obtenidas a las 24 horas de la cirugía mostraban un incremento significativo en el grupo CON en comparación con el SHAM ( $p < 0,001$ ). Sin embargo, los valores fueron similares entre el grupo SHAM y LIDO.

Además, en los animales del grupo LIDO los valores de TNF- $\alpha$  fueron claramente menores que en los del grupo control ( $P < 0,001$ ).

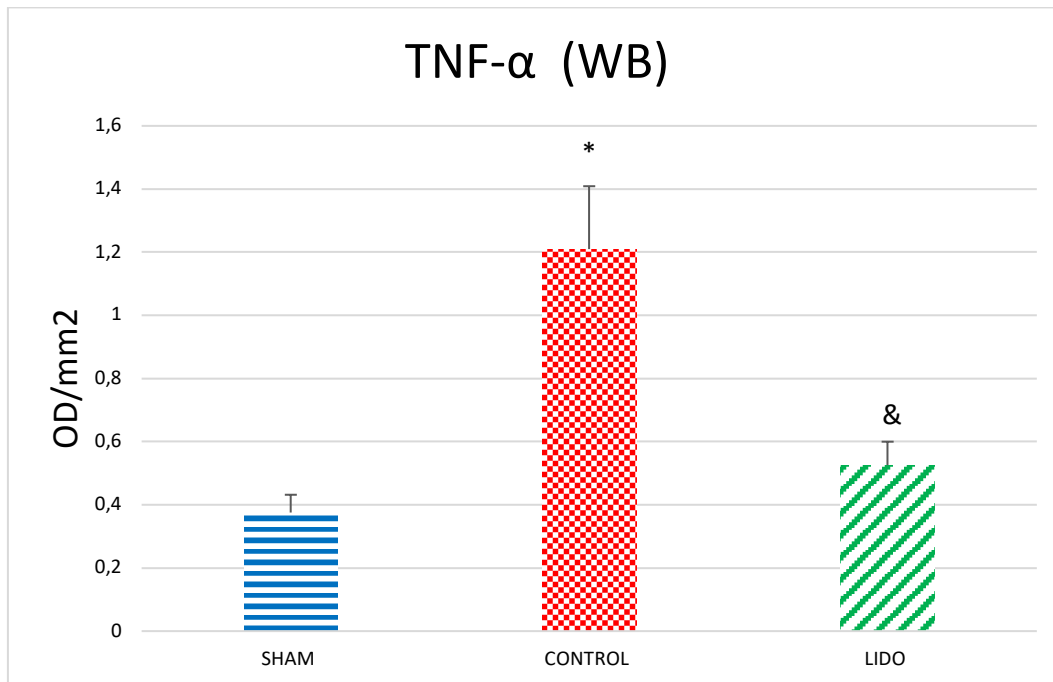
Gráfico 8: Expresión de factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) analizado por PCR en biopsia hepática.



\*:  $p < 0,05$  grupo CON versus grupo SHAM. &:  $p < 0,05$  grupo LIDO versus grupo CON.

Asimismo, en la medición realizada mediante técnica de WB los valores de TNF- $\alpha$  son superiores en el grupo CON en relación al SHAM y LIDO (ANOVA  $p=0,001$ ).

**Gráfico 9. Expresión de factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) analizado mediante WB en biopsia hepática.**

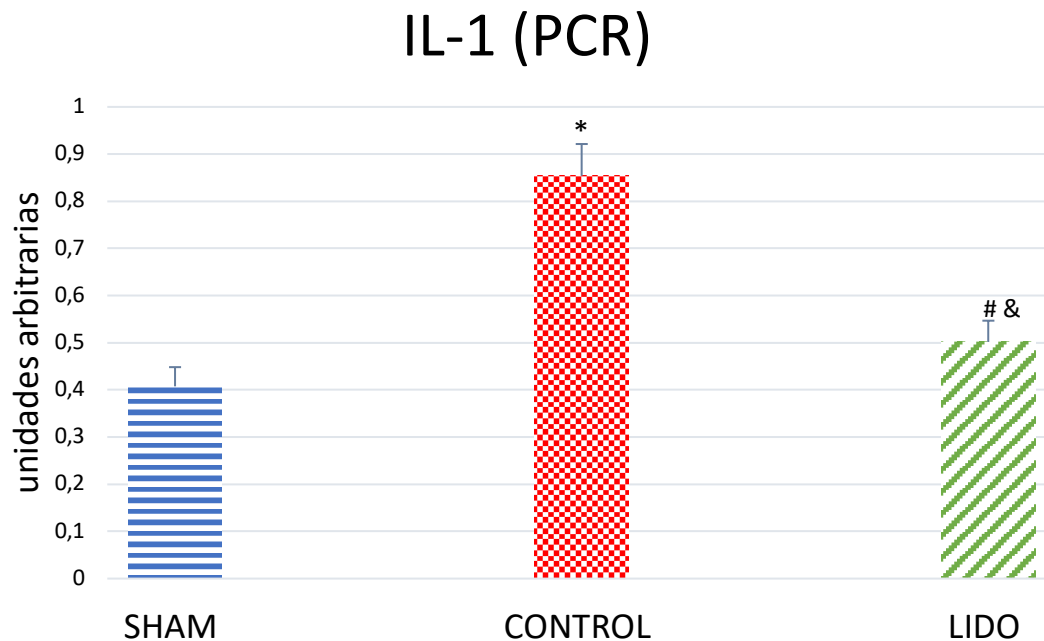


\*:  $p < 0,05$  grupo CON versus grupo SHAM. &:  $p < 0,05$  grupo LIDO versus grupo CON.

#### 4.2.1.2 Interleuquina 1 (IL-1):

En la comparación entre grupos de las mediciones obtenidas mediante PCR de IL-1 a las 24 horas del procedimiento existen diferencias significativas (ANOVA  $p=0,004$ ). Se objetiva un aumento en el grupo CON y LIDO respecto al SHAM ( $p=0,004$  y  $P=0,003$ ) respectivamente. Además, de los niveles de IL-1 en el grupo CON respecto al grupo LIDO se encuentran aumentados ( $p=0,008$ ).

Gráfico 10. Expresión de interleuquina 1 (IL-1) medidos por PCR en biopsia hepática.

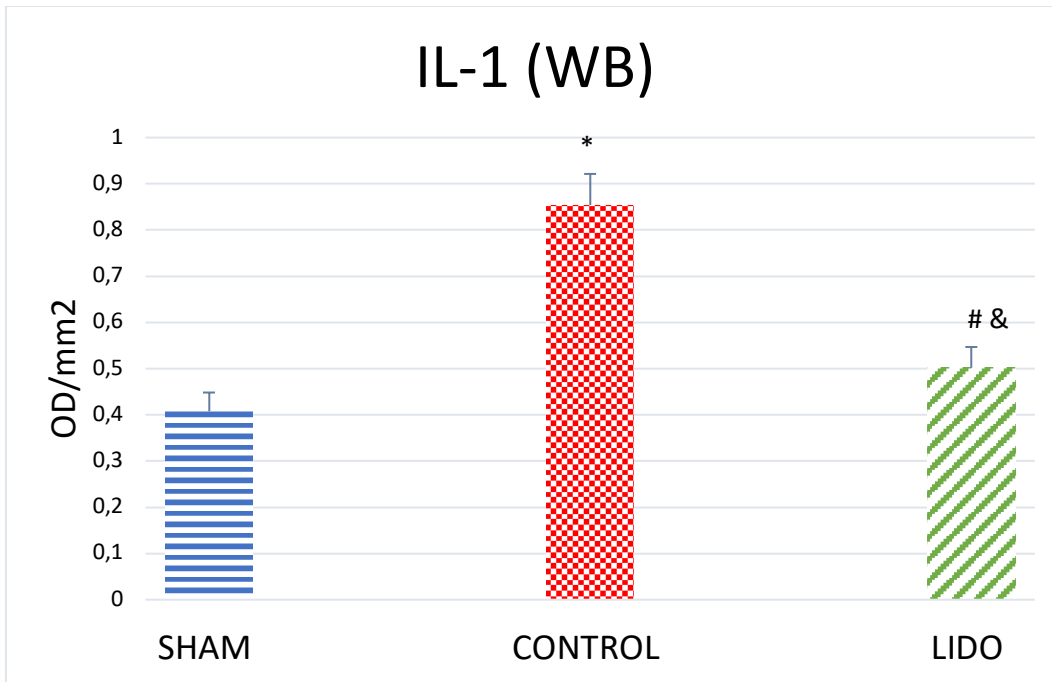


\*:  $p < 0,05$  grupo CON versus grupo SHAM. #:  $p < 0,05$  grupo LIDO versus grupo SHAM. &:  $p < 0,05$  grupo LIDO versus grupo CON

Cuando se realiza la medición de IL-1 por técnica de WB encontramos diferencias también (ANOVA  $p=0,004$ ), los niveles de IL-1 aumentan en el grupo CON y LIDO en relación al SHAM ( $p = 0,004$  y  $p = 0,003$  respectivamente).

IL-1 es superior en el grupo CON respecto al grupo LIDO.

Gráfico 11. Expresión de interleuquina 1 (IL-1) medidos por WB en biopsia hepática.

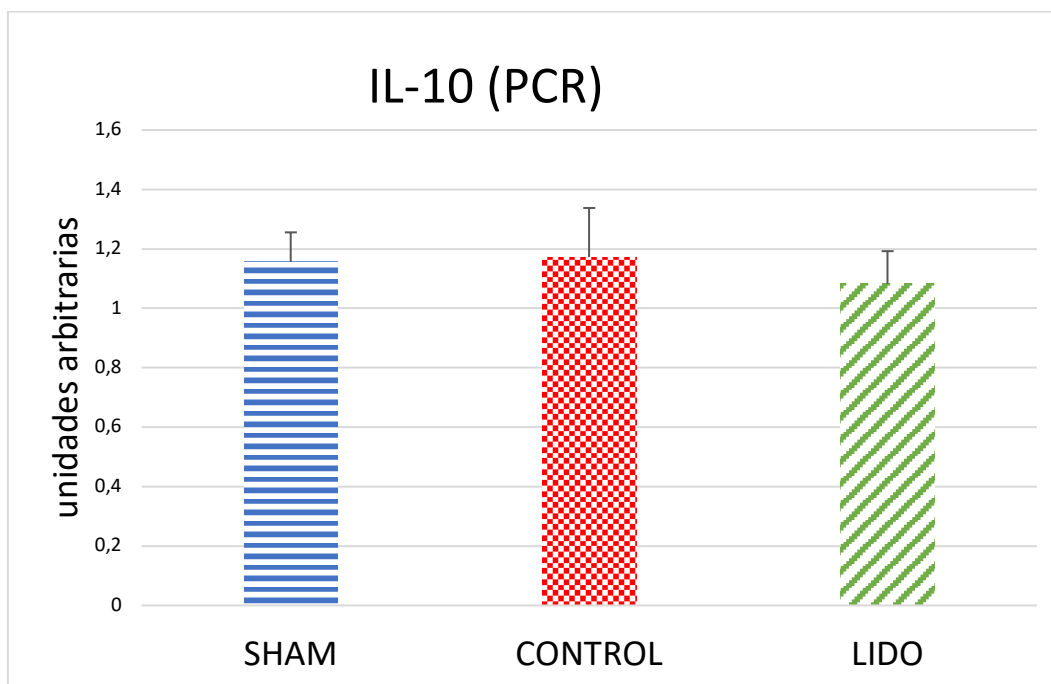


\*:  $p < 0,05$  grupo CON versus grupo SHAM. #:  $p < 0,05$  grupo LIDO versus grupo SHAM. &:  $p < 0,05$  grupo LIDO versus grupo CON

#### 4.2.1.3 Interleuquina 10 (IL-10):

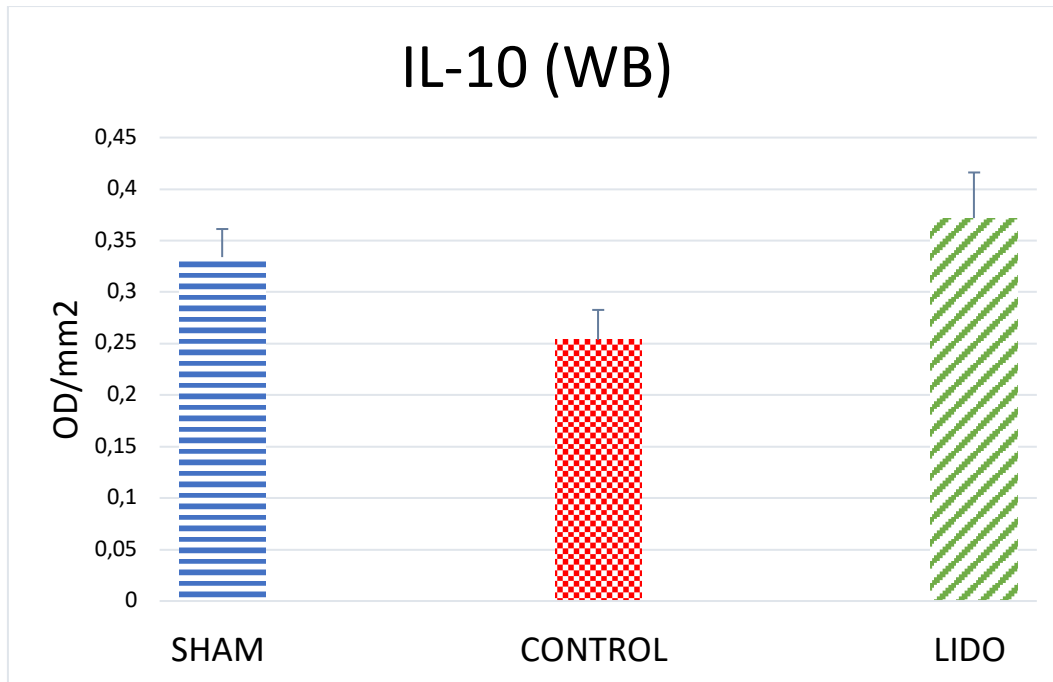
En la comparación entre los tres grupos de niveles de IL-10 analizados mediante técnica PCR no encontramos diferencias. Los valores de IL-10 se encuentran disminuidos en el grupo LIDO con respecto al resto de los grupos.

**Gráfico 12: Expresión de interleuquina 10 (IL-10) analizados mediante PCR en biopsia hepática.**



Con respecto a los valores obtenidos al utilizar la técnica de WB los resultados no son muy diferentes, no existen diferencias entre grupos, IL-10 es inferior en los grupos CON y SHAM en comparación con el grupo LIDO.

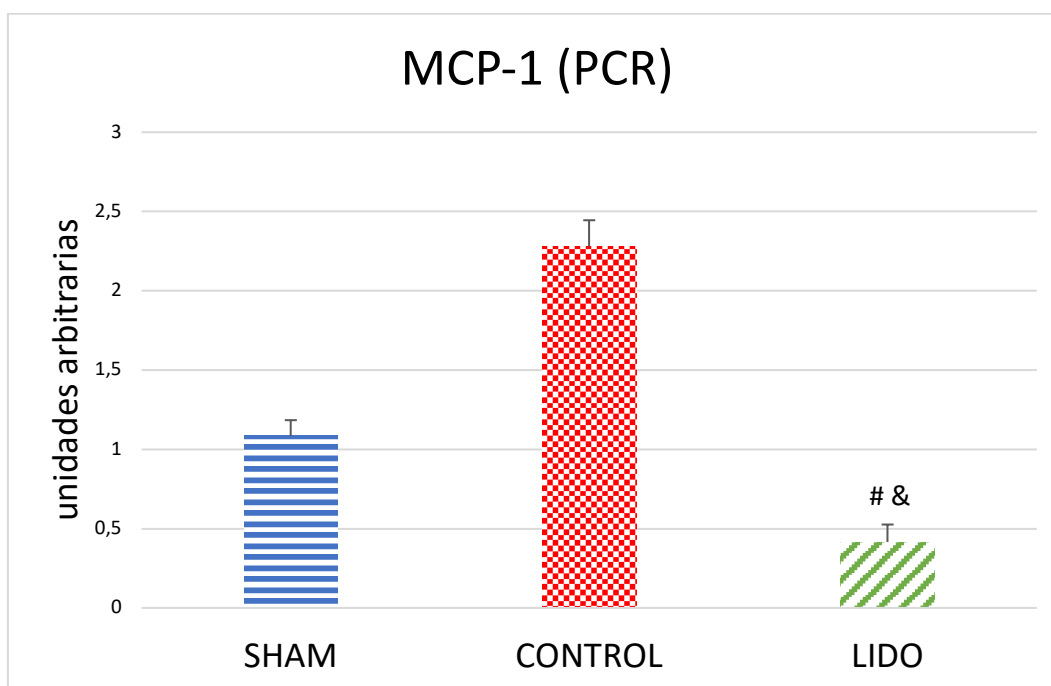
Gráfico 13. Expresión de interleuquina 10 (IL-10) analizados mediante WB en biopsia hepática.



#### 4.2.1.4 Proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1):

En la medición realizada por PCR a las 24 horas del procedimiento se observan diferencias entre grupos. MCP-1 en el grupo CONTROL es superior al grupo SHAM ( $p=0,078$ ), también es superior en el grupo LIDO respecto al SHAM ( $p=0,003$ ). MCP1 en el grupo CONTROL presenta un valor significativamente mayor que en el grupo LIDO ( $p=0,004$ ).

Gráfico 14. Expresión de proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) medidos por PCR en biopsia hepática.

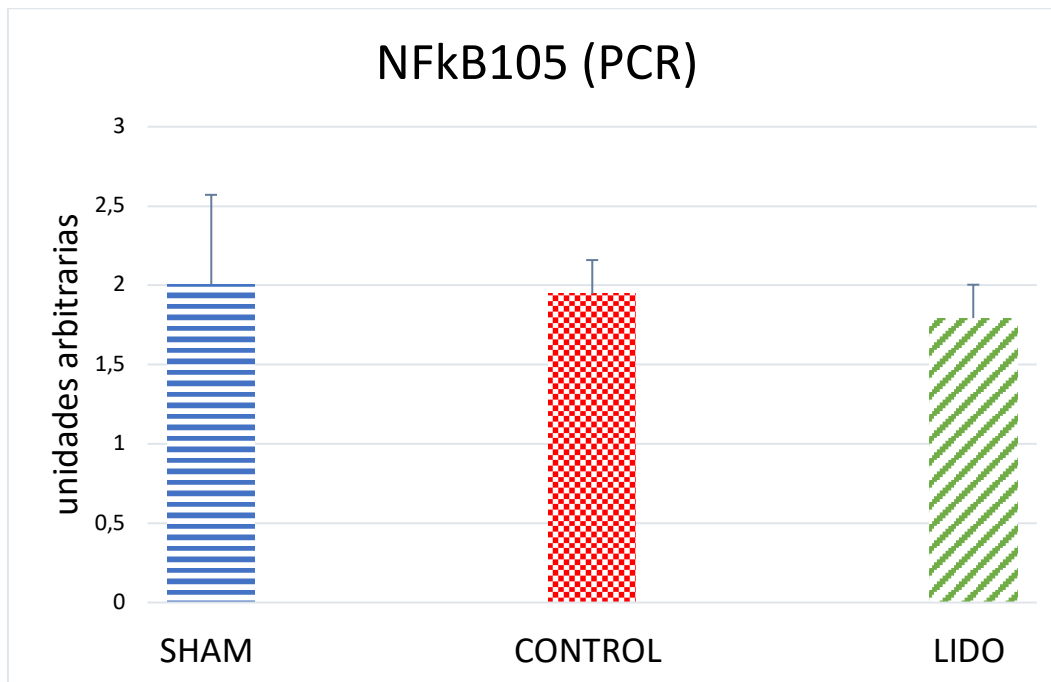


#:  $p < 0,05$  grupo LIDO versus grupo SHAM. &:  $p < 0,05$  grupo LIDO versus grupo CON

#### 4.2.1.5 Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NFkB):

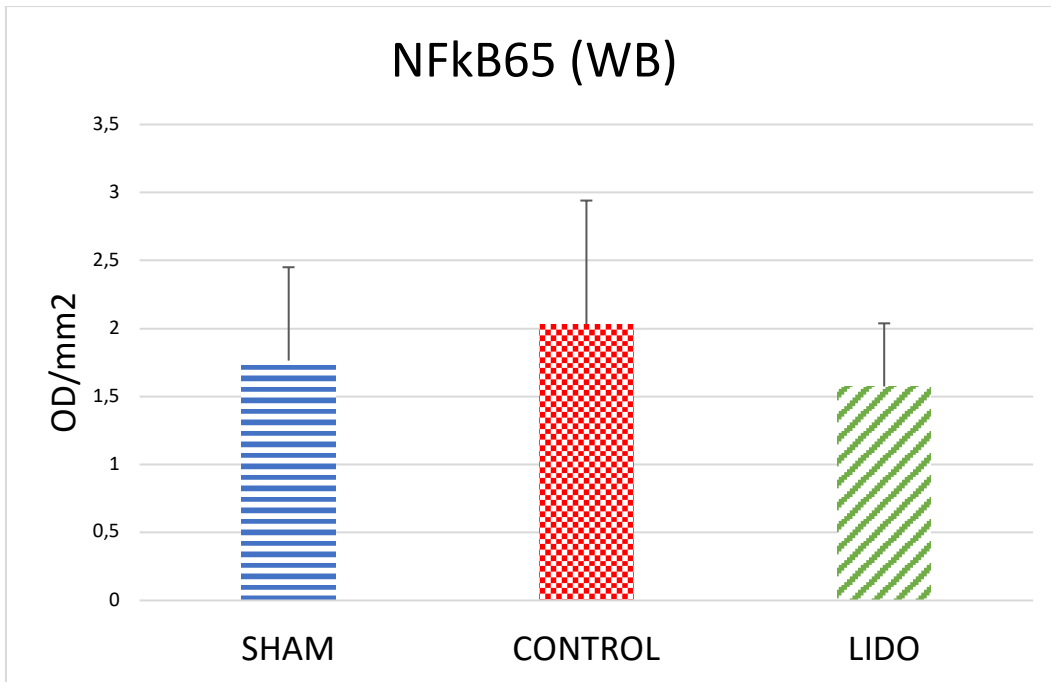
En la medición por PCR de NFkB105 no encontramos diferencias significativas al comparar los valores en las muestras hepáticas analizadas (ANOVA  $p=0,749$ ).

**Gráfico 15. Expresión de factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de células B activadas105 (NFkB105) medidos por PCR analizado en biopsia hepática.**

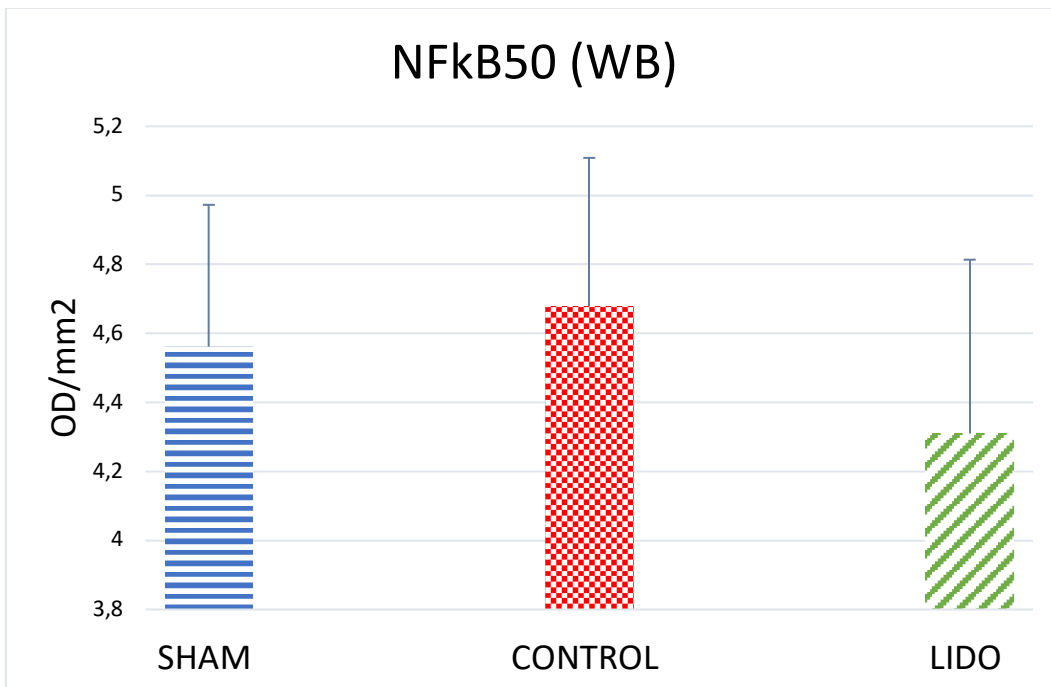


En el resto de proteínas analizadas de la familia NFkB (65, 50, 52) por técnica de WB tampoco se objetivan diferencias, NFkB65 (ANOVA:  $p= 0,522$ ) NFkB50 (ANOVA:  $p=0,749$ ) y NFkB52 (ANOVA:  $p=0,337$ ).

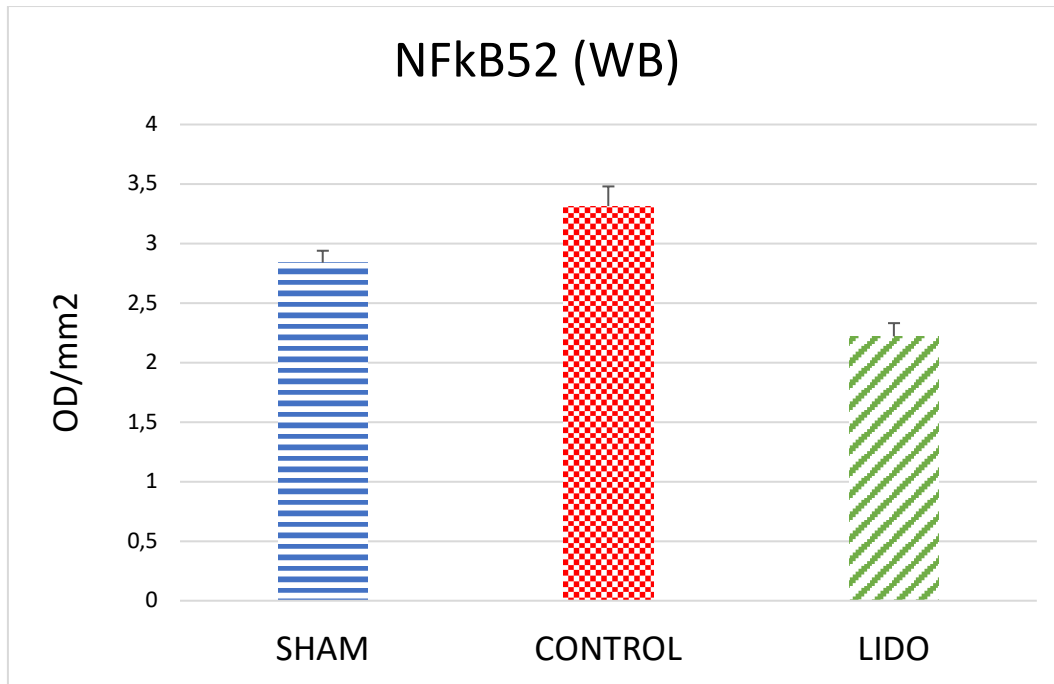
**Gráfico 16. Expresión de factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de células B activadas 65 (NFkB65) medido por WB en biopsia hepática.**



**Gráfico 17. Expresión de factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de células B activadas 50 (NFkB50) medidos por WB en biopsia hepática.**



**Gráfico 18. Expresión de factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de células B activadas52 (NFkB52) medidos por WB en biopsia hepática.**



#### 4.2.1.6 *IκBα* e *IκBβ*:

En la medición de *IκBα* no existen diferencias entre grupos, en el caso *IκBβ* si encontramos diferencias en la comparación entre grupos (ANOVA:  $p=0,004$ ).

Los grupos que se sometieron a cirugía con VUP mostraron menor expresión de *IκBβ* que el grupo SHAM. Además, los valores en el grupo de LIDO fueron menores que en el grupo CON ( $p=0,006$ )

Gráfico 19. Expresión de *IκBα* analizados mediante WB en biopsia hepática.

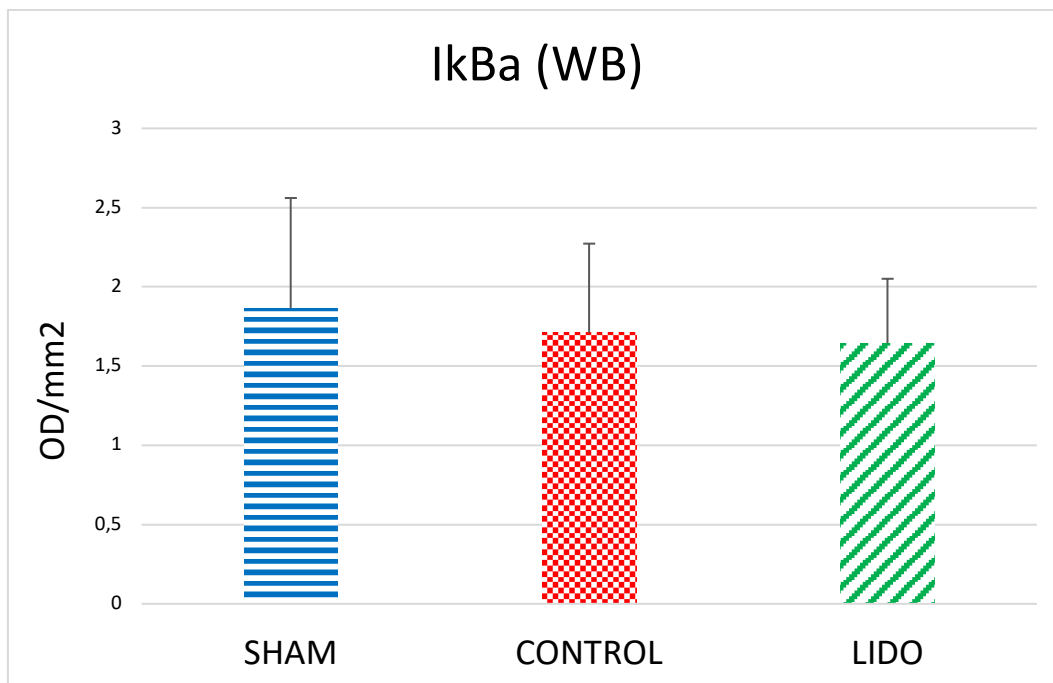
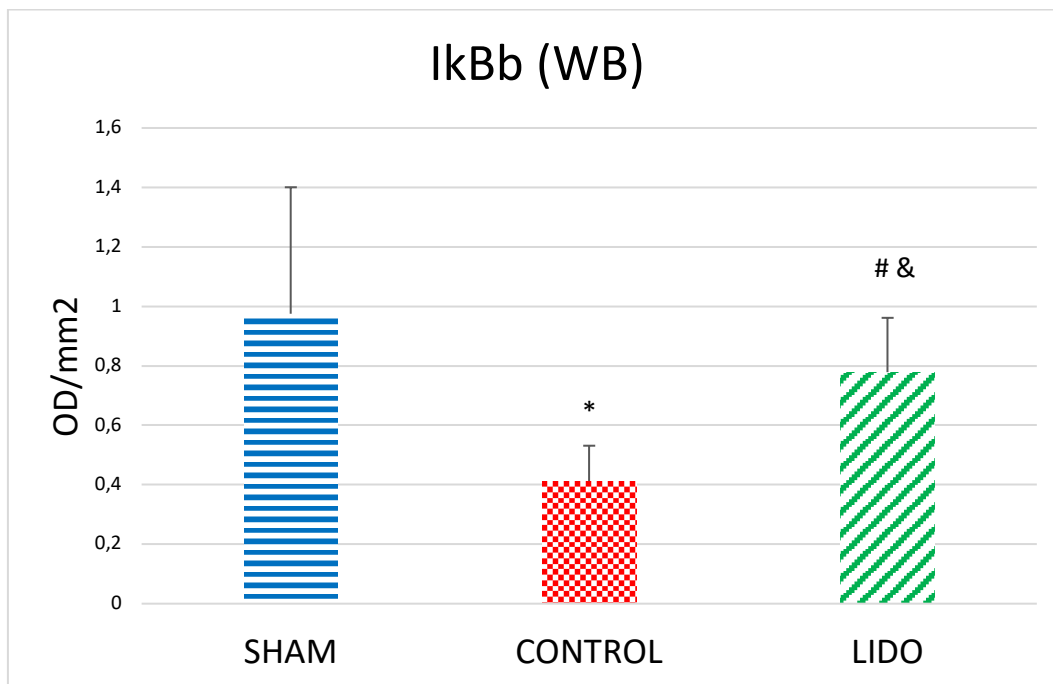


Gráfico 20. Expresión de IκBβ analizados mediante WB en biopsia hepática.

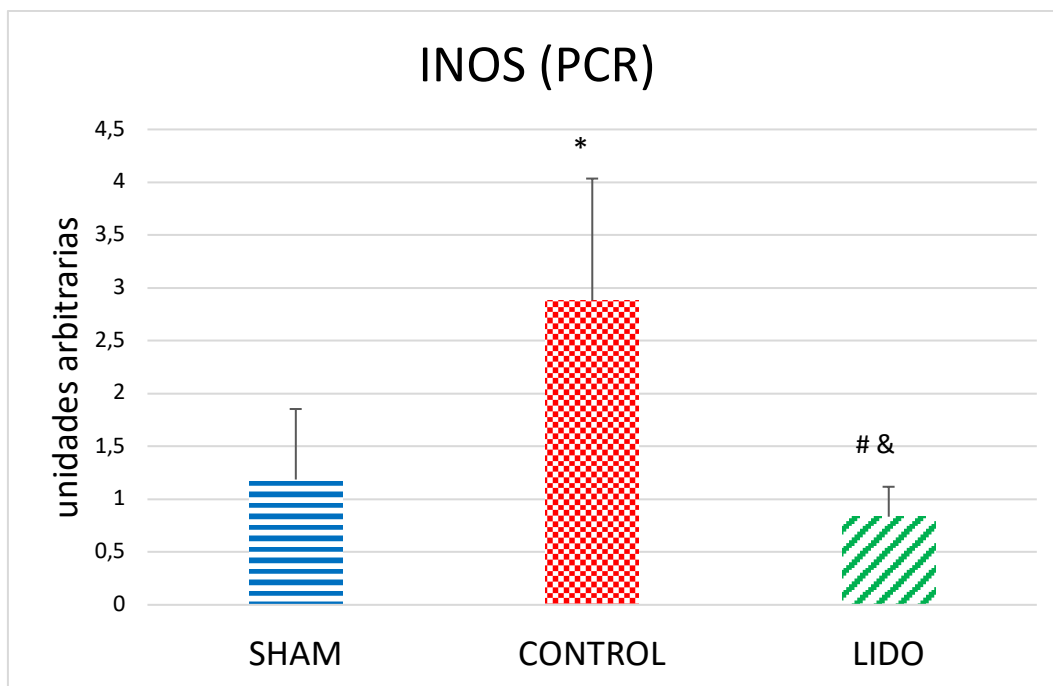


\*:  $p < 0,05$  grupo CON versus grupo SHAM #:  $p < 0,05$  grupo LIDO versus grupo SHAM. &:  $p < 0,05$  grupo LIDO versus grupo CON

#### 4.2.2 METABOLISMO DEL ÓXIDO NÍTRICO ANALIZADO EN BIOPSIA HEPÁTICA:

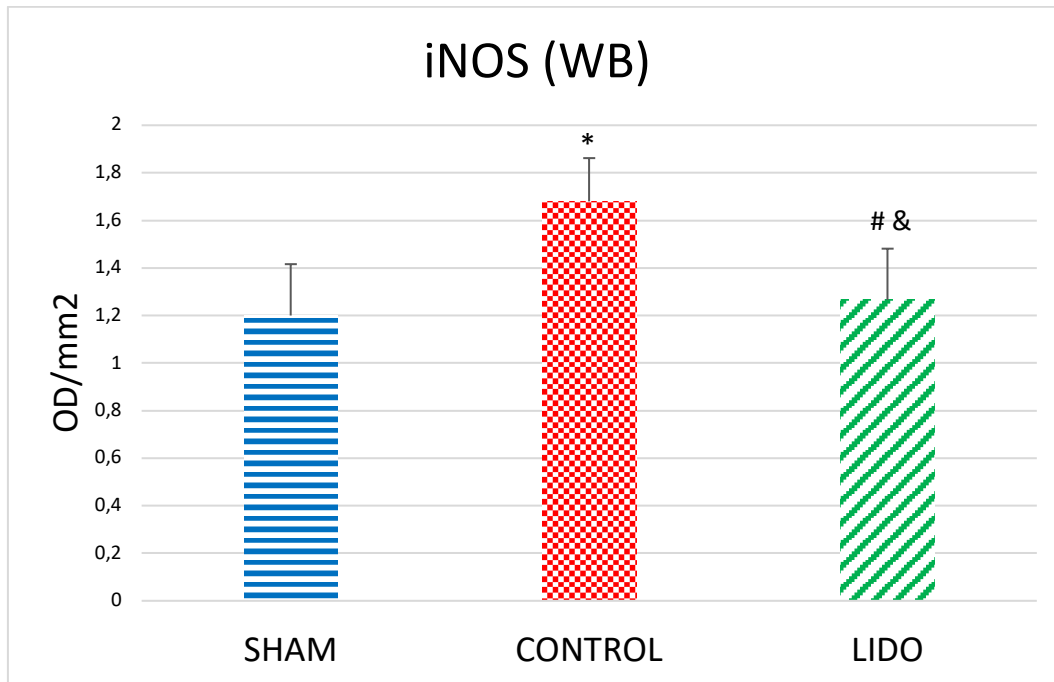
La enzima de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) está aumentada en el grupo CONTROL y LIDO con respecto al SHAM ( $P=0,01$  y  $p=0,005$  respectivamente). Además, el grupo CON presentó unos niveles significativamente mayores que el de la Lido ( $p=0,004$ ). Estos resultados fueron similares cuando la medición se realizó con la técnica de WB.

Gráfico 21. Expresión de iNOS analizados mediante técnica PCR en biopsia hepática.



\*:  $p < 0,05$  grupo CON versus grupo SHAM #:  $p < 0,05$  grupo LIDO versus grupo SHAM. &:  $p < 0,05$  grupo LIDO versus grupo CON

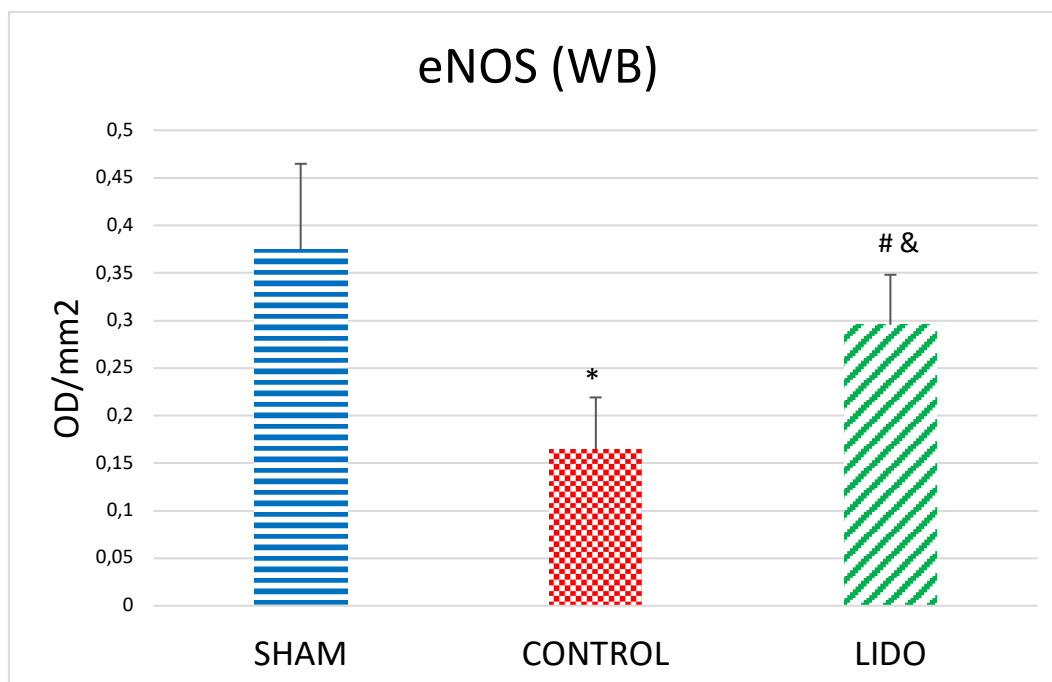
Gráfico 22. Expresión de iNOS analizados mediante técnica WB en biopsia hepática.



\*:  $p < 0,05$  grupo CON versus grupo SHAM #:  $p < 0,05$  grupo LIDO versus grupo SHAM. &:  $p < 0,05$  grupo LIDO versus grupo CON

En el caso de la enzima de óxido nítrico endotelial (eNOS) La eNOS mostró una menor expresión en los grupos CON y LIDO que en el grupo SHAM ( $p=0,006$  y  $p=0,001$ ), habiendo además unos menores valores en el grupo CON frente al grupo LIDO ( $p=0,011$ ).

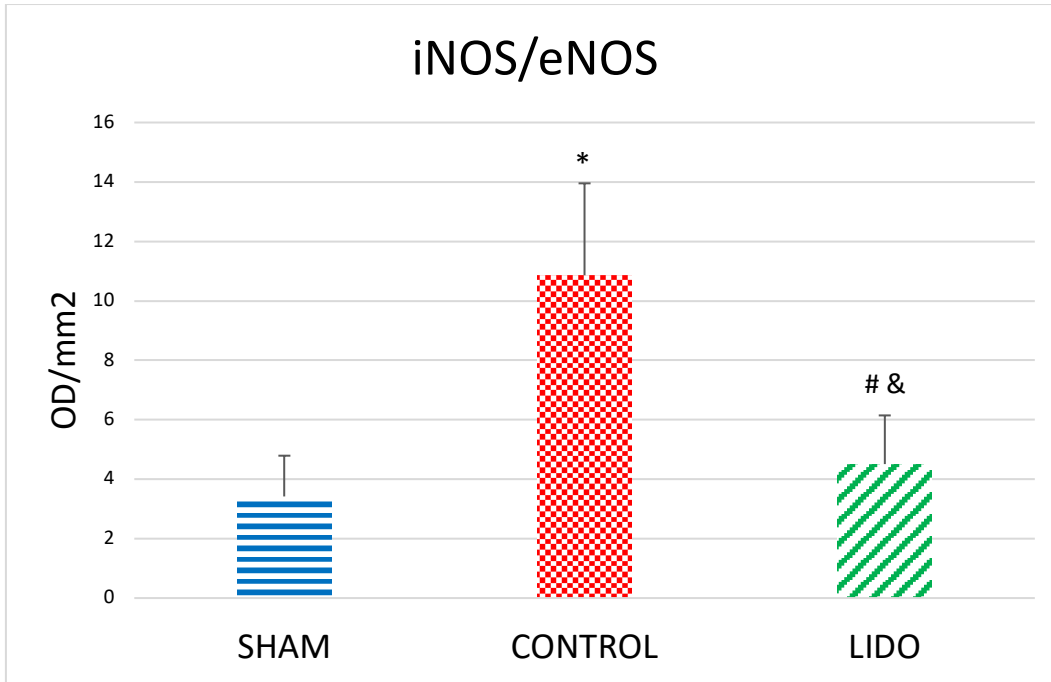
Gráfico 23. Expresión de eNOS analizados mediante técnica WB en biopsia hepática.



\*:  $p < 0,05$  grupo CON versus grupo SHAM #:  $p < 0,05$  grupo LIDO versus grupo SHAM. &:  $p < 0,05$  grupo LIDO versus grupo CON

La relación iNOS/eNOS es superior significativamente en el grupo CONTROL con respecto a SHAM ( $p = 0,006$ ) y LIDO ( $p = 0,005$ ) si comparamos los valores de ambas en la biopsia hepática.

Gráfico 24. Relación entre la expresión de iNOS/eNOS en biopsia hepática.



\*:  $p < 0,05$  grupo CON versus grupo SHAM #:  $p < 0,05$  grupo LIDO versus grupo SHAM. &:  $p < 0,05$  grupo LIDO versus grupo CON

#### 4.2.3 MARCADORES DE APOPTOSIS ANALIZADOS EN BIOPSIA HEPÁTICA:

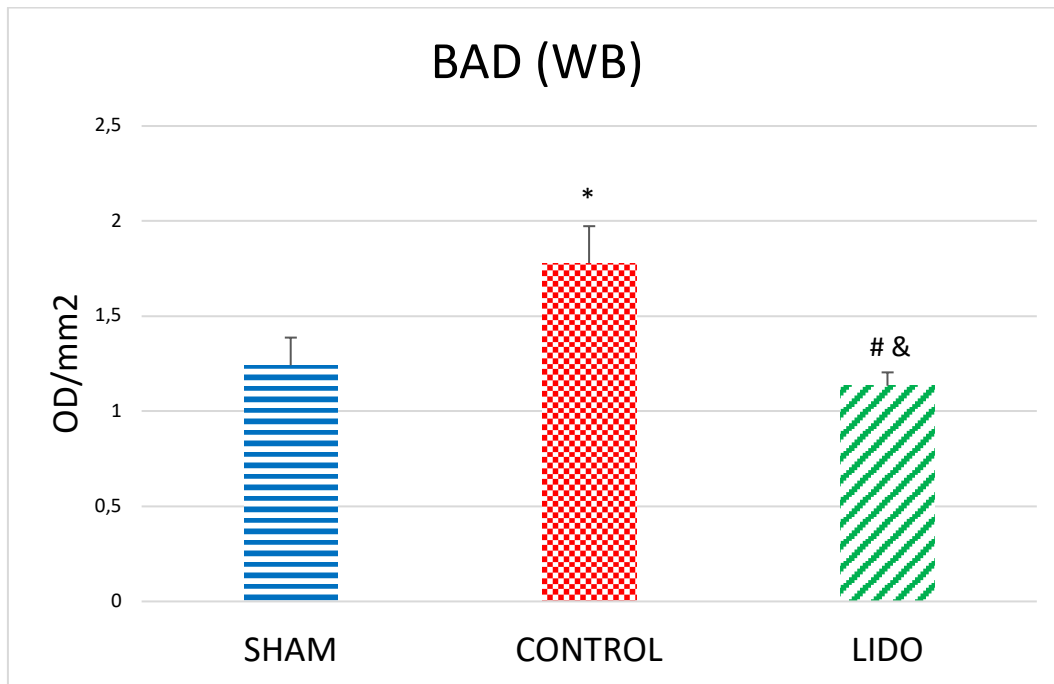
##### 4.2.3.1: *BAD*

En cuanto a la variable de apoptosis *BAD* existen diferencias al comparar los tres grupos (ANOVA:  $p=0,004$ ).

Objetivamos niveles superiores de *BAD* en el grupo CON respecto al SHAM, así como niveles más bajos en el grupo LIDO respecto al SHAM.

Las mediciones de *BAD* son mayores en el grupo CONTROL respecto al LIDO.

Gráfico 25. Expresión de BAD analizados mediante técnica WB en biopsia hepática

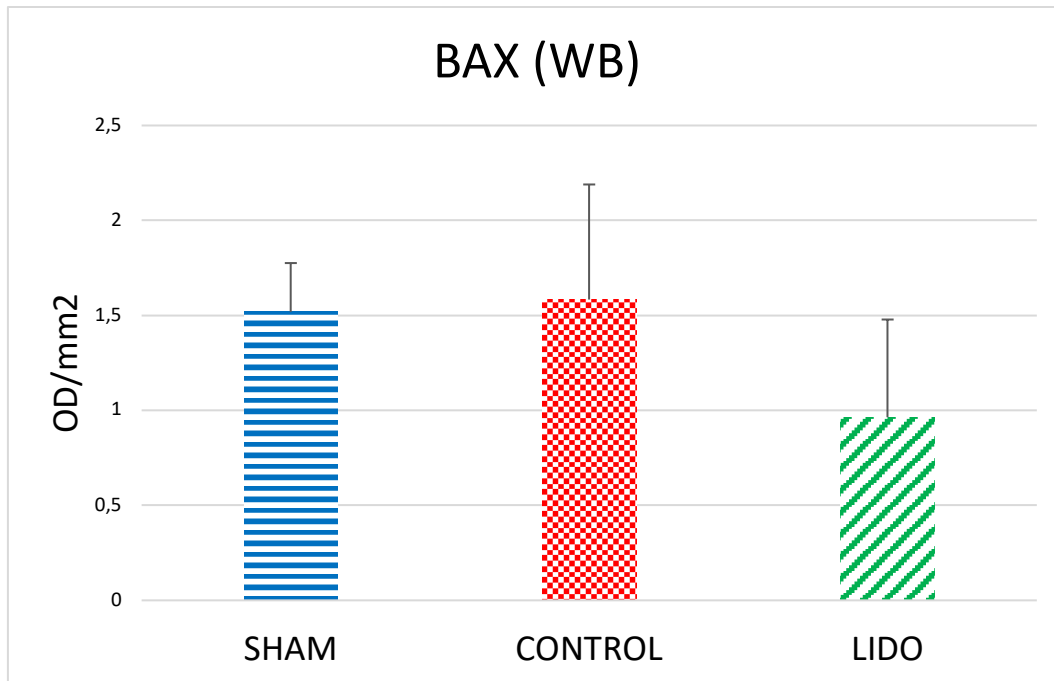


#:  $p < 0,05$  grupo LIDO versus grupo SHAM. \*:  $p < 0,05$  grupo CON versus grupo SHAM. &:  $p < 0,05$  grupo LIDO versus grupo CON.

#### 4.2.3.2: BAX

No se observan diferencias en el análisis entre los tres grupos de trabajo en cuanto a BAX (ANOVA:  $p=1$ )

Gráfico 26. Expresión de BAX analizados mediante técnica WB en biopsia hepática.

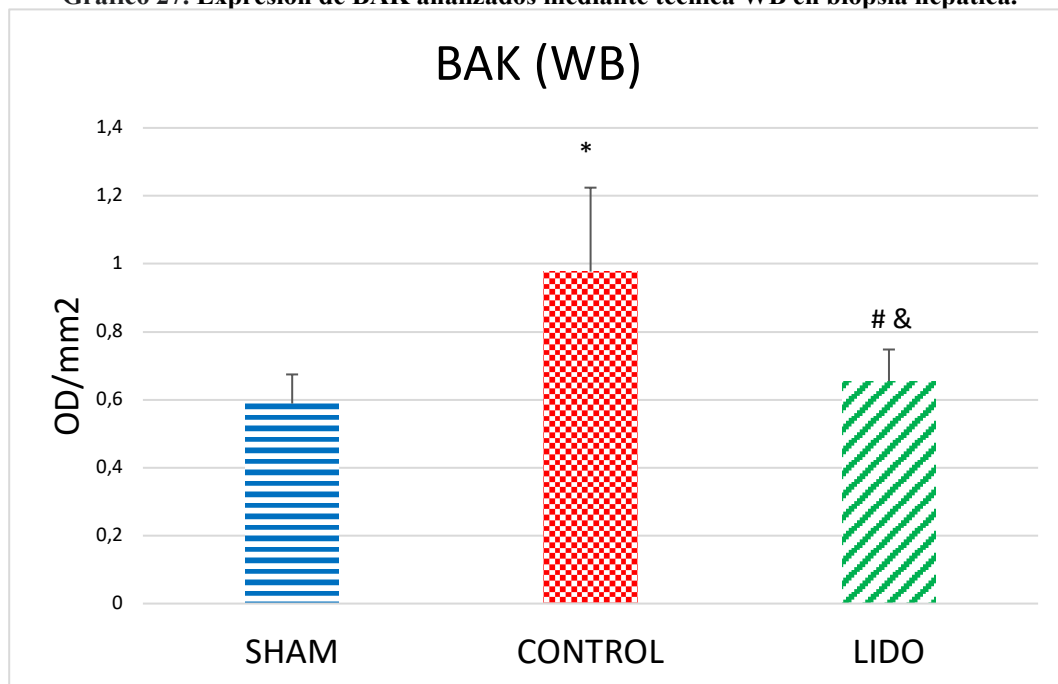


#### 4.2.3.3: BAK

Las mediciones de BAK realizadas por WB arrojan diferencias (ANOVA:  $p=0,004$ ).

Existen mayores niveles de BAK en el grupo CONTROL respecto al grupo SHAM ( $p = 0,004$ ) y el grupo LIDO.

Gráfico 27. Expresión de BAK analizados mediante técnica WB en biopsia hepática.

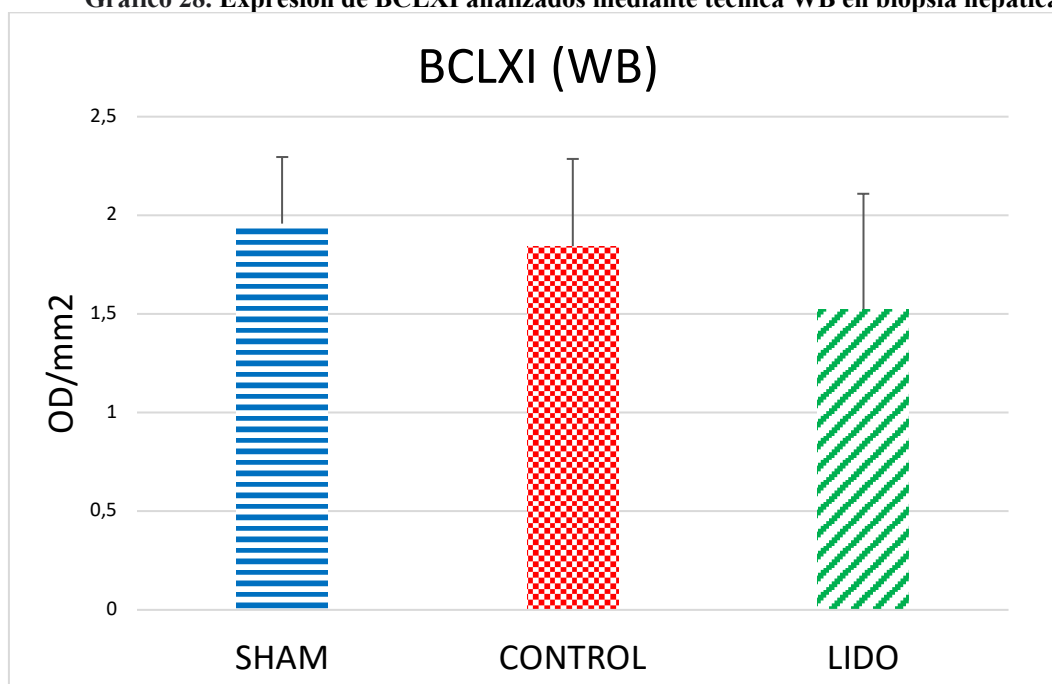


#:  $p < 0,05$  grupo LIDO versus grupo SHAM. \*:  $p < 0,05$  grupo CON versus grupo SHAM. &:  $p < 0,05$  grupo LIDO versus grupo CON.

#### 4.2.3.4: BCLXI:

Las mediciones de BCLXI no evidencian diferencias entre los grupos (ANOVA:  $p=0,631$ )

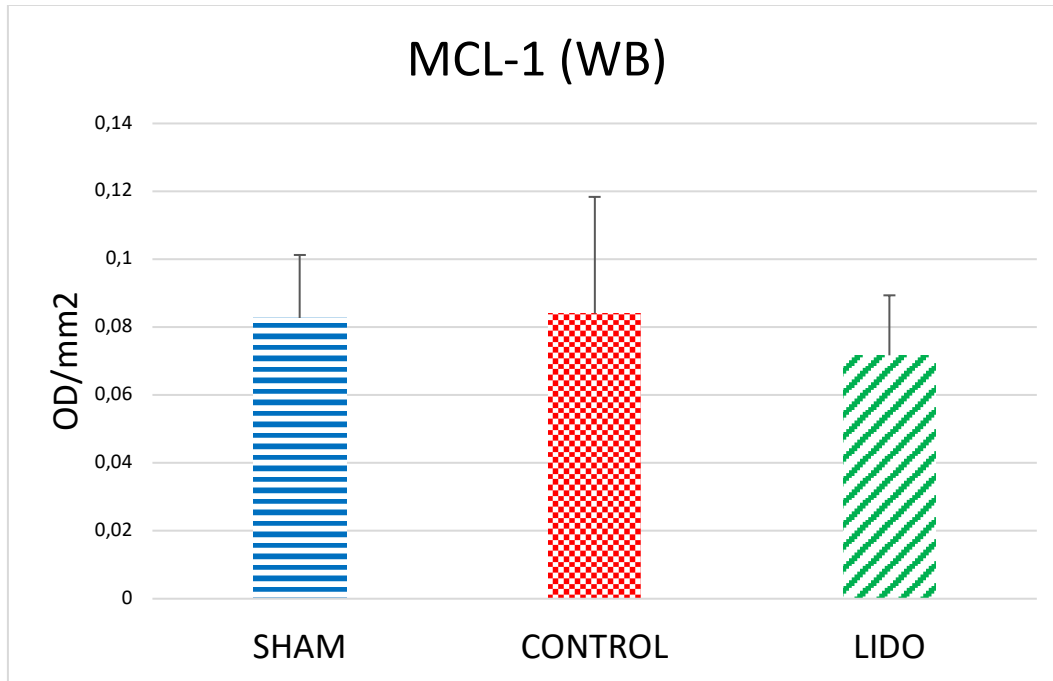
Gráfico 28. Expresión de BCLXI analizados mediante técnica WB en biopsia hepática.



#### 4.2.3.5: *Proteína de diferenciación celular de leucemia mieloide inducida, MCL-1:*

Al realizar las mediciones de MCL-1 por WB a las 24 horas del procedimiento no se arrojan diferencias en el análisis entre los grupos, (ANOVA:  $p=0,631$ ).

Gráfico 29. Expresión de MCL-1 en biopsia hepática.

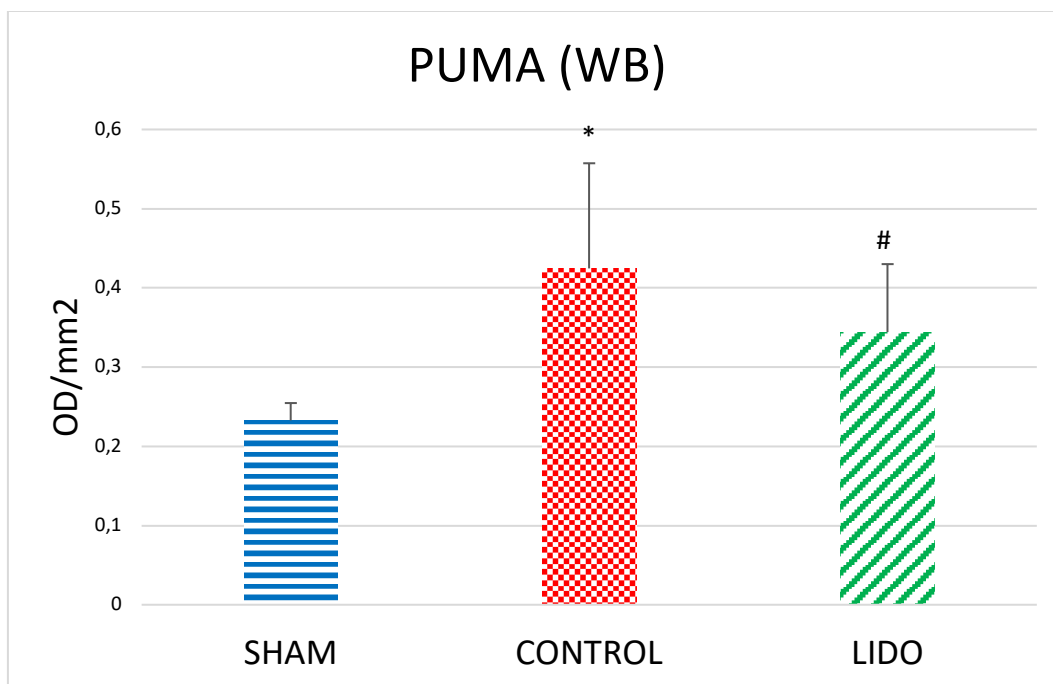


#### 4.2.3.6 PUMA:

La comparación entre los tres grupos fue diferente (ANOVA:  $p=0,004$ )

En cuanto a la variable de apoptosis PUMA, sus niveles estuvieron elevados significativamente en los grupos LIDO y CON respecto al SHAM ( $p=0,004$  y  $p=0,007$  respectivamente), sin que existieran diferencias al compararse entre ellos.

Gráfico 30. Expresión de PUMA analizados mediante WB en biopsia hepática.

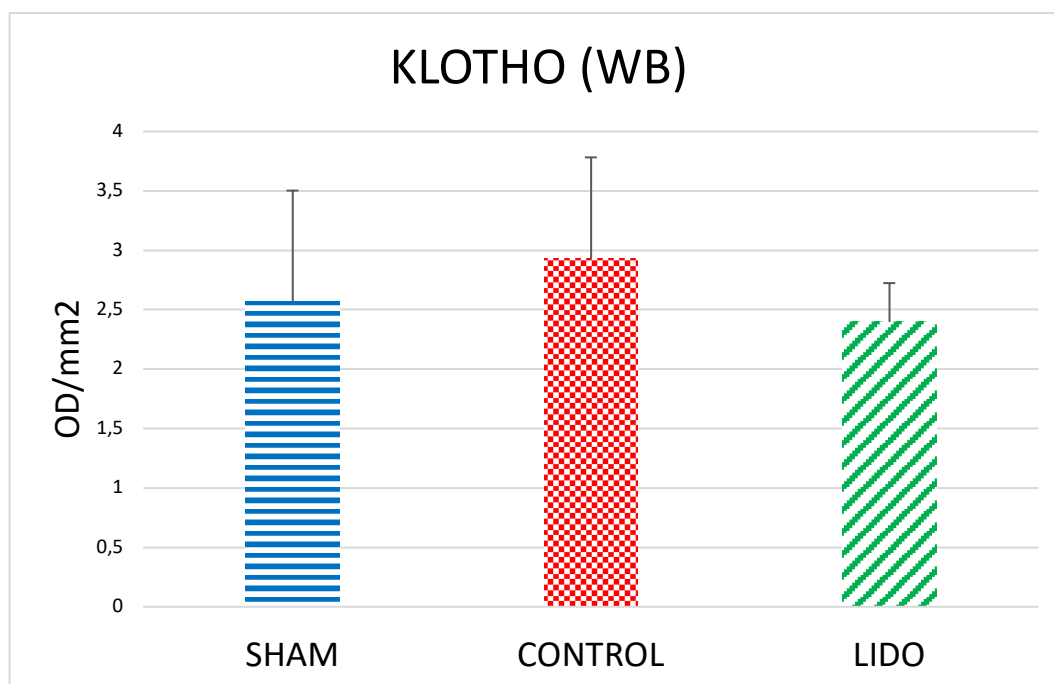


\*:  $p<0,05$  grupo CON versus grupo SHAM. #:  $p<0,05$  grupo LIDO versus grupo SHAM.

#### 4.2.3.7 KLOTHO:

Con respecto a los niveles de KLOTHO, no existen diferencias en el análisis de los grupos (ANOVA:  $p=0,423$ ).

Gráfico 31. Expresión de KLOTHO analizados mediante WB en biopsia hepática.





## **5. Discusión**



En nuestro estudio experimental se comprueba cómo la administración de lidocaína intravenosa durante la intervención quirúrgica es capaz de atenuar la respuesta inflamatoria hepática, en un modelo experimental porcino de cirugía de resección pulmonar con VUP.

Diferentes estudios han analizado como los procedimientos de cirugía torácica en los que se precisa VUP, con los consecuentes periodos de I/R e hipoxia en el pulmón no ventilado (necesarios para realizar la cirugía de resección pulmonar), ocasionan una respuesta inflamatoria local que secundariamente conlleva a una respuesta sistémica con la consecuente afectación hepática (31) (143) (144). Nuestros resultados muestran como el daño de una intervención quirúrgica a nivel torácico afecta secundariamente a nivel sistémico, al objetivar un aumento en los marcadores inflamatorios en las muestras obtenidas de biopsia hepática. Dicha inflamación, según nuestros resultados, es atenuada por la administración de lidocaína intravenosa.

La inflamación forma parte de la patogenia de la gran mayoría de las enfermedades del hígado y se encuentra regulada por mediadores inflamatorios como las citoquinas y quimiocinas (145). En la mayor parte de los procedimientos quirúrgicos se observa un aumento de marcadores bioquímicos hepáticos en sangre periférica, como pueden ser la bilirrubina, las enzimas hepáticas o el INR. La mayoría de estos cambios son transitorios y clínicamente irrelevantes (120) (119), pero es importante remarcar que la cirugía puede desencadenar con mayor facilidad una descompensación hepática en pacientes que padecen previamente una enfermedad hepática subyacente (146).

Todo procedimiento quirúrgico conlleva en mayor o menor medida una respuesta inflamatoria, como se describe detalladamente al inicio de este trabajo. En esta respuesta al estrés quirúrgico, se ven involucrados diferentes mecanismos y mediadores que

ocasionan daño a nivel hepático (1). Sagredo y cols, además de otros autores, han evidenciado el daño hepático secundario a cirugía bariátrica, tras la que se observan casos de fallo hepático. Parece ser que además de la esteatosis preexistente en dichos pacientes, existen otros factores favorecedores autoinmunes y mediadores inflamatorios que activan vías de la inflamación (147). También se ha descrito inflamación y daño hepático secundario a cirugía cardíaca (148) o a cirugía abdominal tanto laparoscópica como abierta (149). Siguiendo la línea de trabajo de otros autores, nuestros resultados ponen de manifiesto un aumento en la respuesta inflamatoria hepática tras un procedimiento de cirugía torácica.

Las células de Kupffer son macrófagos localizados en el hígado y uno de los tipos celulares más activos, constituyen uno de los principales productores de citoquinas y mediadores de la inflamación. Estos macrófagos, juegan un papel determinante en el estrés celular y la patogenia de la inflamación hepática (150), y son considerados células clave en las diferentes etapas del proceso inflamatorio. En el hígado en estado “inactivado” se encuentran células inmunitarias innatas, principalmente células de Kupffer, pero también NK entre otras. Tras la activación inmune, mediada por sustancias inflamatorias como quimiocinas y citocinas, se produce un gran flujo de células inmunitarias innatas y adaptativas que infiltran en el hígado (151), como se observa en el análisis de las muestras de biopsia hepática de nuestro trabajo.

Pensamos que es en las células de Kupffer principalmente donde radica la protección que ofrece la administración de lidocaína intravenosa en el proceso de daño hepático inflamatorio perioperatorio (145). La activación de las células de Kupffer hepáticas mediante receptores de reconocimiento de patrones induce a la liberación de mediadores proinflamatorios (TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, quimiocinas, etc.). Estos mediadores a su vez secretan mayores cantidades de quimiocinas en las células hepáticas, generándose

gradientes de quimiocinas que promueven la migración transendotelial de otras células inmunes hacia el hígado, exacerbando el daño por citotoxicidad mediado por el sistema inmune a nivel del hepatocito (152). Algunos estudios han mostrado que la lesión por I/R hepática se puede atenuar o agravar por la supresión o potenciación de la actividad de las células de Kupffer respectivamente (152) .

En el presente estudio se demuestra el importante papel que tiene la VUP en el biotrauma que se produce durante la intervención quirúrgica y durante las 24 horas posteriores a la realización de la misma, ya que los animales del grupo SHAM (grupo en el que no se realiza VUP ni CRP) desarrollan una menor respuesta inflamatoria hepática en comparación con los otros grupos. Lo cual, es justificable por la ventilación mecánica del pulmón dependiente y por el proceso de I/R en el pulmón no ventilado (153).

El hígado posee un papel determinante en la regulación de la respuesta inflamatoria sistémica y es un órgano especialmente sensible a los cambios inflamatorios, por lo que se le considera un órgano diana a estudio relevante (118) (94). Además, se encuentra relacionado con otros órganos, de tal manera que se ve afectado por el biotrauma ocasionado a nivel pulmonar tras CRP con VUP, del mismo modo que su afectación impacta en otros órganos periféricos como el pulmón, riñones o intestino entre otros.

En procedimientos de cirugía torácica, concretamente en CRP tras el uso de VUP, tiene lugar un aumento de macrófagos alveolares locales y una acumulación de neutrófilos liberadores de sustancias pro inflamatorias. Los pulmones son el primer órgano en verse afectado localmente por el proceso de “descompartimentalización”; proceso ampliamente descrito en nuestro trabajo y base fundamental para que tenga lugar el desarrollo de una respuesta sistémica secundaria con afectación hepática. Los mediadores formados primariamente en el pulmón se vierten al torrente sanguíneo, lo que

provoca la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales del hígado (156), activa PMN circulantes, aumenta su migración y adhesión, y provoca un secuestro de PMN en los hepatocitos (11,109). En nuestro trabajo se observa una atenuación de mediadores proinflamatorios en el grupo al que se administra lidocaína intravenosa.

Liu y cols, en un estudio experimental sobre modelo murino al que se induce sepsis y se analiza la relación enterohepática, observan un importante aumento de los niveles de expresión de mRNA de TNF- $\alpha$  e IL-1 (71). La relación entre el daño hepático e intestinal ha sido analizado previamente por otros autores en modelos experimentales (157) (158). Parece que los mediadores inflamatorios intestinales llegan al hígado vía vena porta y activan las células de Kupffer, que son la fuente principal de citoquinas en situaciones de inflamación. Liu y cols hipotetizan que el daño intestinal en sepsis se ve agravado por la liberación de mediadores hepáticos inflamatorios, que alcanzan la luz intestinal vía biliar, y observan en su estudio como al colocar un drenaje biliar externo (interrumpiendo la circulación enterohepática) disminuyen significativamente los niveles de expresión de mRNA de TNF- $\alpha$  e IL-1 liberados por las células de Kupffer (71).

*Existen medidas terapéuticas descritas para minimizar el daño pulmonar ocasionado por la cirugía y la VUP a nivel pulmonar. Sin embargo, la modulación de la respuesta inflamatoria sistémica hepática ha sido menos estudiada, nuestro grupo describió previamente como el sevoflurano tiene efecto modulador inflamatorio a nivel hepático tras CRP (29).*

*Nuestro trabajo actual tiene como objetivo dar otro paso más allá, y evalúa si los anestésicos locales, concretamente la lidocaína administrada vía intravenosa, es capaz de modular la respuesta inflamatoria sistémica secundaria a la cirugía de resección pulmonar, observándose unos resultados favorecedores en el trabajo realizado.*

## **5.1 PARÁMETROS HEMODINÁMICOS, GASOMÉTRICOS Y RESPIRATORIOS:**

El control hemodinámico es imprescindible desde el punto de vista del anesthesiólogo, para poder realizar el procedimiento quirúrgico y así completar el experimento con éxito. Se monitorizan los siguientes parámetros hemodinámicos: frecuencia cardiaca, presión arterial media, índice cardiaco, volumen de variación sistólico e índice de resistencias vasculares sistémicas. No se observan en nuestro trabajo diferencias en cuanto a hemodinámica entre los tres grupos.

Con respecto a la cirugía torácica en la práctica clínica, cada vez es más frecuente el uso de técnicas anestésicas que incluyen bloqueos epidurales y paravertebrales asociados a la anestesia general, con el objetivo de optimizar el control hemodinámico y el dolor (159). Garutti y cols analizan por primera vez los efectos hemodinámicos del catéter paravertebral, en su estudio se administra un bolo de lidocaína a través del catéter de 5mg/kg durante la VUP en CRP. Se observa que la contractilidad cardiaca disminuye transitoriamente sin efectos en la precarga (160). Este efecto puede deberse a la absorción sistémica de lidocaína y a su efecto simpaticolítico, que se ha analizado previamente en estudios experimentales confirmando los hallazgos encontrados con respecto a la contractilidad cardiaca (161) (162).

Las dosis clínicas a las que se utiliza la lidocaína intravenosa en la práctica habitual no deben superar la concentración sérica de 5 µg /ml (131) (163) (164), si estas dosis se superan pueden aparecer efectos secundarios no deseados y tóxicos a nivel cardiológico y del sistema nervioso central. Con el uso del bloqueo paravertebral se observan en la clínica niveles en sangre de hasta 3 µg/ml (165).

En nuestro trabajo, a los modelos porcinos del grupo lidocaína, se les administra un bolo de lidocaína 1,5mg/kg seguido de una perfusión continua de 1,5mg/kg/h, y

aunque no se realizan mediciones de la concentración de lidocaína en sangre, las dosis utilizadas se encuentran en todo momento dentro del margen de seguridad del fármaco. No se superan los 5 µg /ml de concentración sérica, además, todos los modelos porcinos se encuentran monitorizados de manera continua con registro electrocardiográfico.

En un estudio clínico reciente de nuestro grupo de investigación se utilizan idénticas dosis que en la presente investigación y se observa que los niveles plasmáticos de lidocaína al final de la intervención son de 3,4 mcg/mL. Solo un paciente de los 55 a los que se administra lidocaína intravenosa obtuvo un valor >5 mcg/mL, en concreto 5,8 mcg/mL (166).

Además, en el entorno intraoperatorio, estas dosis son menos tóxicas que en los pacientes no anestesiados, debido a que su administración conjunta con otros fármacos necesarios para realizar una anestesia general mantiene al paciente en un estado basal de bajo consumo metabólico. Además, algunos de los efectos de otros anestésicos administrados contrarrestan en cierto modo los potenciales efectos indeseados de la administración de lidocaína.

Con respecto a los parámetros respiratorios y gasométricos, es de suma importancia mantener una oxigenación adecuada en todo momento (167), poniendo especial atención durante los periodos de VUP. Con el uso de VUP se aumenta la presión pulmonar en un fenómeno conocido como VPH, a consecuencia de la hipoxia en dicho campo pulmonar, y se crea un cortocircuito transpulmonar o “shunt” a través del pulmón atelectásico (168). En nuestro modelo experimental no se observan diferencias significativas en cuanto a presión arterial de oxígeno entre los tres grupos experimentales, tampoco en el resto de parámetros hemodinámicos recogidos.

Existe disparidad en la bibliografía en cuanto a la oxigenación arterial utilizando técnicas de anestesia general o combinada (169). En un estudio previo de nuestro grupo

se observa una disminución de la PaO<sub>2</sub> en el grupo sometido a anestesia general con catéter epidural vs anestesia general intravenosa administrada de manera única (170), probablemente porque la administración de AL contrarresta por su efecto vasodilatador los efectos de la VPH. Sin embargo, otros trabajos como el de Von Dossow y cols concluyen en su análisis que la anestesia combinada mejora la oxigenación arterial durante la VUP (171) si se compara con la anestesia general. Casati y cols tampoco observan empeoramiento de la oxigenación en VUP con anestesia combinada (172). En nuestro estudio no se observan diferencias en cuanto a oxigenación entre los diferentes grupos a estudio, por lo que se cree que dentro de los efectos de la administración de lidocaína no se encuentra una afectación de la VPH.

En nuestro trabajo se monitoriza la presión pico en la vía aérea de manera continua en los tres grupos sin observar diferencias entre ellos. Se ha relacionado la administración de lidocaína intravenosa con la profilaxis de episodios de broncoespasmo y reactividad bronquial, en nuestro trabajo no se observa afectación de la mecánica ventilatoria en ninguno de animales.

## **5.2 MARCADORES DE LA INFLAMACIÓN:**

La lidocaína tiene efecto sobre la producción de citoquinas; su administración aumenta los niveles de citoquinas antiinflamatorias (IL-10) y disminuye la cantidad de citoquinas inflamatorias (IL-1, IL-6, TNF $\alpha$ ) (23) (173) ((24,174) (175) (176). Se ha descrito que la administración de lidocaína intravenosa reduce la capacidad de los PMN para adherirse al endotelio y su capacidad de migrar al foco de la inflamación al interferir con la adhesión y la migración de los mismos, reduciendo con ello su acumulación en el lugar de inflamación. Además, la lidocaína atenúa la inflamación vascular, lo que minimiza la lesión en el endotelio y por tanto, disminuye la hiperpermeabilidad

inflamatoria (177) (129,173). Estas acciones que describimos de la lidocaína se ven reflejadas en los resultados de nuestro trabajo, donde la administración de la misma ocasiona un descenso de los niveles de IL-1 y TNF $\alpha$  en el grupo lidocaína, así como un aumento de los niveles de IL-10. El mecanismo por el cual esto sucede parece independiente de su efecto sobre los canales de sodio, y podría estar relacionado con la liberación por parte de las células del endotelio capilar de prostaciclina y el efecto de la lidocaína sobre las moléculas de adhesión y sobre los procesos de migración y adhesión del PMN neutrófilo.

En nuestro trabajo se observa un incremento en la producción de radicales libres de oxígeno y de las moléculas de adhesión a consecuencia del procedimiento quirúrgico. Este suceso se relaciona con un incremento de las interacciones entre los PMN neutrófilos y las células del endotelio vascular hepático, incremento que se atenúa por la administración intravenosa de lidocaína. Es bien conocido el papel de MCP-1 como regulador de la activación, migración e infiltración de monocitos y macrófagos al sitio de inflamación, así como su función es determinante para el inicio de la respuesta inflamatoria (178). En nuestro estudio la administración de lidocaína intravenosa se asocia a una disminución de la expresión de MCP-1 en comparación con los animales de los grupos que no recibieron este fármaco. Creemos que esto constituye uno de los mecanismos por los que la lidocaína atenúa en nuestros resultados la inflamación hepática, ya que una menor expresión de MCP-1 probablemente conduce a una menor acumulación de PMN neutrófilos en la vasculatura y sinusoides hepáticas.

Además, Gallos y cols soportando el papel relevante de la lidocaína sobre la MCP-1, observan resultados similares a los nuestros en la prevención de daño hepatorenal. En su estudio se utiliza un modelo de rata séptica tratada con lidocaína intravenosa. Se encuentra que su administración mejora la supervivencia, disminuye las moléculas de

adhesión celular y la proteína quimioatrayente de monocitos MCP-1, así como los niveles de otros mediadores inflamatorios (179). Lo cual, nos permite hipotetizar que el modelo de actuación de la lidocaína a nivel de los PMN macrófagos del pulmón puede ser extrapolable a los PMN hepáticos, por lo que su efecto modulador de la inflamación puede estar relacionado directamente por los efectos que la lidocaína tiene sobre las células de Kupffer.

A lo descrito previamente, se suma el conocido papel que la lidocaína tiene sobre las vías de señalización. La vía de señalización NF- $\kappa$ B es conocida por ser una de las más relevantes en el proceso de la inflamación (108,113), y su activación conlleva una mayor expresión de citocinas y quimiocinas proinflamatorias y a un mayor daño tisular hepático (180).

Yuan y cols observan que en el proceso de inflamación hepática perioperatoria aumenta la expresión de NF $\kappa$ B y de TNF- $\alpha$  en tejido hepático. Se utiliza para ello un modelo experimental murino al que se induce inflamación hepática con aceites, etanol y dextrosa, y se objetiva un aumento en la inducción de iNOS a nivel hepático. Este incremento de iNOS se correlaciona con daño hepático especialmente por necroinflamación y un descenso de eNOS, así como una mayor expresión de NF $\kappa$ B (180)

Existen diferentes investigaciones que soportan el papel en modelo murino de daño hepático relacionado con la inflamación, también del papel de la lidocaína intravenosa para inhibir la respuesta inflamatoria mediante la regulación a la baja de la vía de señalización de NF $\kappa$ B (71) (181) (182). Karnina y cols en un modelo experimental murino de daño musculoesquelético inducido al que se administra lidocaína intravenosa y se compara con un grupo control, observan como los niveles de TNF- $\alpha$  y NF $\kappa$ B disminuyen de manera significativa en el grupo de la lidocaína (182). Además, otros investigadores como Lahat y cols describen tras estudiar líneas de células T humanas

estimuladas que la administración de lidocaína intravenosa bloquea a la vía NFkB por un mecanismo dosis dependiente. Su administración también inhibe la proliferación de LT y de citoquinas proinflamatorias derivadas de LT (IL-2, TNF-  $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) de manera dosis dependiente al inhibir la expresión de su mRNA mediada por el factor NFkB (183) .

Aunque en nuestro estudio no se muestra que la administración de lidocaína altere directamente a esta vía de señalización, probablemente porque no se alcanzan dosis tan elevadas como en los estudios mencionados, sí que se aprecia que el inhibidor citoplasmático de NF-KB (IKB), que bloquea la activación y translocación al núcleo de la NF-Kb, se encuentra disminuido en el grupo control y no sufre cambios en el grupo de la lidocaína. Por ello, se cree que al menos una parte del efecto protector de la lidocaína visto en nuestra investigación, se debe al mantenimiento de los niveles de los inhibidores de esta vía. Probablemente, esta inhibición se relaciona con el efecto del NO sobre IKB, tal y como se ha demostrado en otros estudios previos (113) (184) (185).

Como se ha comentado previamente, la VUP es considerada un modelo clínico de I/R. En nuestro trabajo se observa una protección frente a los fenómenos de I/R en el grupo lidocaína, que concuerda con la reconocida protección frente a I/R demostrada por otros autores (186). El papel de la lidocaína en la atenuación del daño por I/R en diferentes órganos como el cerebro, pulmón, corazón o hígado ha sido ampliamente analizado (24) (190,191). La lidocaína disminuye de la adhesión y migración de los PMN, inhibe los neutrófilos activados y como consecuencia, evita la liberación de radicales de oxígeno (16, 19) (187) (188). También se ha relacionado a la lidocaína con un efecto como estabilizador de membrana de los hepatocitos en la I/R (189).

Basándonos en la protección que ofrece la lidocaína frente al daño por I/R en diferentes órganos se diseña el trabajo actual, para evidenciar los efectos de la administración de la misma analizando biopsias hepáticas. Se utiliza para ello un modelo

porcino que es el más parecido fisiológicamente al ser humano, y se encuentran resultados a favor de la protección de lidocaína en daño secundario hepático a I/R pulmonar.

La I/R es un mecanismo importante de daño hepático, sobre todo en cirugía de resección hepática o cirugía de trasplante hepático, aunque en menor escala la I/R que tiene lugar en pulmón tras CRP con VUP repercute a nivel hepático y otros órganos al descompartimentalizarse la respuesta local a nivel sistémico. Existen numerosos estudios de I/R en diferentes órganos con afectación hepática (123) .

La lesión celular producida durante la isquemia se amplifica tras la reperfusión, liberándose patrones que son reconocidos por los receptores de las células de Kupffer, que como respuesta liberan citoquinas y quimiocinas, aumentando los niveles de las mismas, pudiendo superar entre cien y mil veces su valor basal (145).

El mecanismo por el cual la lidocaína atenúa el daño por I/R podría estar relacionado con su interferencia en las diferentes fases de la movilidad de los PMN neutrófilos hacia el lugar afectado y su adhesión al endotelio, disminuyendo así el número de neutrófilos efectores y como resultado de las moléculas proinflamatorias liberadas por los mismos en el lugar de inflamación, especialmente de TNF- $\alpha$  e IL-1. Los neutrófilos median la lesión tisular post-isquémica liberando ROS y enzimas proteolíticas, la adherencia del neutrófilo al endotelio es un proceso de varios pasos que implica la secuencia de moléculas de adhesión (177). Por tanto, el daño de los PMN en la inflamación “estéril” que supone la I/R disminuye con la administración de lidocaína.

En diferentes trabajos con modelos animales experimentales porcinos y caninos se observa como la lidocaína reduce el daño por I/R y minimiza la extensión de la zona infartada en el miocardio. El mecanismo por el que esto sucede se relaciona con un menor número de PMN en la zona de lesión por la interacción del AL con el proceso de adhesión, y con la inhibición de otras funciones del PMN como liberación de ROS (177).

Los PMN tratados con lidocaína cambian morfológicamente, se forman menos pseudópodos y rugosidades en su membrana, además se tornan más redondeados. La lidocaína actúa inhibiendo los canales rápidos de sodio y los canales lentos de calcio (129), el aumento en el calcio citosólico libre en PMN y en células endoteliales es un evento de señalización para la adhesión leucocito-endotelio, y tiene función reguladora en la permeabilidad vascular, adhesión y migración de PMN. Todas estas señales de activación se ven inhibidas con la administración de lidocaína intravenosa (192). El efecto de la lidocaína en la adhesión y secuestro de PMN puede ser el mecanismo de acción principal por el que se disminuye la lesión por I/R en nuestro trabajo, además, puede tener efectos adicionales su efecto bloqueador de los canales de iones de calcio.

### **5.3 METABOLISMO DEL ÓXIDO NÍTRICO (NO):**

El NO y sus derivados juegan un rol importante en la fisiología y fisiopatología hepática. Es bien conocida la relación entre el aumento de la concentración de NO en situaciones como la infección, inflamación o sepsis, involucrándose incluso en la fisiopatología del desarrollo de un fallo hepático en estas entidades (193).

En el hígado, las isoformas de NOS predominantes son iNOS y eNOS. En general, el efecto de la eNOS en los sinusoides y hepatocitos es protector frente al desarrollo de enfermedades (194), mientras que la iNOS se relaciona con el desarrollo de procesos patológicos, como necrosis e inflamación, activación de la vía NFkB y expresión elevada de ARNm de TNF- $\alpha$  (195) (196).

Cuando existe una lesión/agresión hepática, se expresan mayores niveles de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) por parte de los hepatocitos, lo que produce grandes cantidades de NO. Este hecho contribuye a la lesión celular, debido a la acción proinflamatoria de iNOS, disminuye el NO disponible y se produce mayor estrés oxidativo (103) (197).

Regular la producción en grandes cantidades de la isoforma iNOS en situaciones de agresión/inflamación es un punto crítico en la supervivencia celular y la respuesta inflamatoria, motivo por el cual en nuestro trabajo se miden los niveles de iNOS y eNOS en biopsia hepática.

En nuestro trabajo se observa un efecto protector de la lidocaína frente al desajuste entre el equilibrio de iNOS/eNOS.

La administración de lidocaína intravenosa en nuestro modelo experimental produce un descenso de iNOS y un incremento de eNOS en el grupo lidocaína respecto a las mediciones obtenidas en los demás grupos. Probablemente exista una compensación entre ambas isoformas y es por ello que el metabolismo de NO<sub>x</sub> se mantiene estable, demostrando el efecto protector hepático de la lidocaína en el metabolismo del NO.

Yuan y cols en un estudio en el que utilizan un modelo murino de daño hepático inflamatorio, encuentran que el aumento de NO hepático es atribuible a un descenso de eNOS e incremento de iNOS, pues ratones “knockout” para iNOS se encuentran protegidos contra dicha lesión hepática (180). Otros estudios también encuentran relación entre el incremento de iNOS y la lesión hepática inflamatoria (198) (199).

En distintos estudios experimentales donde se emplean líneas celulares de macrófagos (184,189) se demuestra como la administración de lidocaína inhibe la producción de NO de forma dependiente de la dosis (200) (201). Parece ser que esta suprime la captación de L-arginina e inhibe la expresión de iNOS, por un mecanismo que posiblemente involucra a los canales de sodio dependientes de voltaje (189).

En otros cultivos celulares (33) también se ha observado un efecto inhibitor de TNF- $\alpha$  inducido por la activación de eNOS en las células endoteliales microvasculares de pulmón, lo que previene la producción de NO y la propagación de la señalización

inflamatoria (181). Sin embargo, a nivel hepático no existe una extensa bibliografía al respecto, por lo que se consideran relevantes las mediciones obtenidas en nuestro trabajo en relación al metabolismo del NO.

Previamente nuestro grupo ha mostrado como la lidocaína proporciona un equilibrio entre ambas isoformas a nivel pulmonar (69). Varias investigaciones experimentales previas realizadas en macrófagos, observan como la administración de lidocaína tiene efectos protectores sobre el metabolismo del NO al disminuir significativamente los niveles de iNOS (35). Huang y cols en su estudio tratan los macrófagos con LPS, inductor/activador de receptores (destacando el TLR4) de membrana de macrófagos hepáticos, y se observa que estos aumentan la producción de NO a partir de la isoforma iNOS y activan la vía NFkB al liberar ROS (203). Con dicha estimulación celular se permite valorar los efectos inhibidores de la administración de lidocaína sobre iNOS. Se confirma que la lidocaína tiene efectos inhibidores significativos en la transcripción de iNOS, haciendo evidente la capacidad antiinflamatoria de la lidocaína (189).

En nuestro estudio se observa como la lidocaína suprime la liberación de NO por parte de los macrófagos activados puede ser la clave de la atenuación del daño hepático, en un contexto de daño hepático inflamatorio postoperatorio.

#### **5.4 APOPTOSIS:**

La apoptosis ocupa un papel importante en el daño del hepatocito de muchas de las enfermedades hepáticas. Los diferentes mecanismos de la apoptosis hepática se complican por múltiples vías de señalización y múltiples mecanismos de apoptosis, pudiendo dominar uno en cada etapa sobre los otros (185). En nuestro estudio, se comprueba como el balance entre los mediadores pro y anti apoptóticos en las biopsias

hepáticas de los modelos experimentales que habían recibido lidocaína se inclina hacia un efecto antiapoptótico.

La inflamación es inherente al proceso quirúrgico y causa activación de neutrófilos, célula efectora por excelencia del proceso inflamatorio, por lo que el control de los mismos por el proceso de apoptosis es vital durante la inflamación.

La respuesta inflamatoria asociada a cirugía inhibe el proceso de apoptosis de los neutrófilos *in vitro*, especialmente en la primera hora postoperatoria pero extendiéndose este impacto hasta las 24h postoperatorias, lo que se asocia con fenómenos de I/R, procesos inflamatorios y SRIS (15). Esta inhibición puede estar relacionada con la liberación de más neutrófilos inmaduros al torrente sanguíneo tras la cirugía. Parece que la administración exógena o los niveles elevados de interleuquina IL-10 contrarrestan esta inhibición de la apoptosis de neutrófilos durante el postoperatorio por parte de las citoquinas proinflamatorias, al contrario que el efecto de IL-6 que contribuye a aumentar la supervivencia de los neutrófilos, fenómeno que *in vitro* se puede contrarrestar con la administración de IL-10 (204).

Fanning y cols observan en cirugía traumatológica como la administración de plasma de los pacientes intervenidos obtenido a las 24 del postoperatorio contrarresta la inhibición de la apoptosis de neutrófilos y el aumento de IL-6, a diferencia del plasma obtenido la primera hora postquirúrgica (204).

Existe bibliografía que analiza la apoptosis hepática con cirugía de resección intestinal masiva, observando que no solo la nutrición parenteral necesaria tras estos procedimientos conlleva una disfunción hepática, sino que la cirugía per se causa daños y aumenta la apoptosis (205). Se ha descrito también en cirugía torácica, como la VUP ocasiona un incremento en la concentración de macrófagos en los alveolos pulmonares, estos macrófagos son la fuente principal de producción de TNF- $\alpha$ , además de otros

mediadores inflamatorios, que cuando alcanzan determinadas concentraciones se vierten al torrente sanguíneo y favorecen procesos de apoptosis en neutrófilos (206). En nuestro trabajo, se pone de evidencia un aumento en la producción de TNF- $\alpha$ , que se libera a consecuencia del daño producido por la cirugía de resección pulmonar y el uso de ventilación unipulmonar asociado a la misma, con el consecuente impacto favorecedor que esto conlleva en los procesos de apoptosis.

Se ha demostrado el papel protector antiapoptótico de la lidocaína en diferentes estados inflamatorios (125) (207) (173). Pero existen resultados contradictorios ya que no todos los estudios observan este efecto antiapoptótico de la lidocaína (185) (208). La bibliografía en relación al papel de la lidocaína en procesos de I/R encuentra un papel claramente antiapoptótico de la misma, aunque los mecanismos todavía no están claros (190) (209) (207).

Existen numerosos estudios del rol antiapoptótico de la lidocaína en I/R cerebral donde se postulan como posibles mecanismos de la inhibición de la apoptosis un descenso en la actividad del citocromo c y de las caspasas ejecutoras, por lo que su administración podría ser un tratamiento de prevención en el daño isquémico cerebral (190). También en I/R tras eventos coronarios, se ve una reducción en la zona del infarto con la administración de lidocaína iv, y aunque los mecanismos no están dilucidados por completo, apuntan más a su acción antiapoptótica que a su efecto antiinflamatorio (207).

Los mecanismos concretos por los que la lidocaína atenúa la apoptosis no están completamente claros. Se sabe que bloquea por un lado la vía extrínseca de la apoptosis al disminuir la cantidad de citoquinas proinflamatorias, especialmente el TNF- $\alpha$  (210). Por otro lado, bloquea la vía intrínseca mediante el descenso en las proteínas de la familia bcl-2 y de PUMA. El aumento de determinados mediadores inflamatorios como puede ser el TNF- $\alpha$  están relacionado con el inicio de la apoptosis. En nuestro modelo

experimental, se analizan marcadores de apoptosis que corresponden a la activación de la misma por la denominada vía intrínseca, y se observa analizando muestras de biopsia hepática obtenidas a las 24 horas del procedimiento, como la administración intravenosa de lidocaína en CRP con VUP disminuye los niveles de las proteínas proapoptóticas a estudio (BAX, BAD, BAD, BCLXI y PUMA). Es por ello que podemos atribuir a la lidocaína propiedades de modulación en la respuesta apoptótica hepática secundaria a CRP con VUP.

Pensamos que la disminución de expresión de la proteína proapoptótica PUMA fue el determinante mayor del efecto antiapoptótico observado en nuestro estudio. PUMA es una proteína que actúa como mediador clave de la función de p53 en el citosol, que es un importante factor de transcripción que activa y regula la apoptosis. Song Cheng y cols (55) analizan niveles de la proteína proapoptótica PUMA en hígados de modelos murinos tras hepatectomía de hasta un 70%. Se sugiere que, durante la regeneración hepática temprana la regulación a la baja de PUMA puede contribuir a la supresión de la apoptosis y la inflamación. Se analiza cómo tras cirugía de resección hepática existe un incremento de los niveles de PUMA, BAX y BCL-XL progresivo, que se relaciona con un aumento de la apoptosis, aumento de la inducción de las células de Kupffer e incremento de infiltración de neutrófilos, así como mayor número de hepatitis fulminante y de mortalidad. La lidocaína disminuye la expresión de PUMA en nuestro estudio en comparación con el grupo CONTROL. El mecanismo por el cual esto sucede puede estar relacionado con la regulación negativa del gen p53 y una regulación positiva de BCLXL, que ocasiona un efecto citoprotector en la regeneración hepática.

En el estudio de Song Chen y cols se manipulan o inducen los niveles de PUMA en hígado utilizando vectores de adenovirus, se observa como en la expresión de PUMA altamente inducida provoca hepatitis fulminante 48horas después del tratamiento y su

inducción de manera más ligera se relaciona con una mortalidad mayor durante el postoperatorio y un incremento de la apoptosis, niveles superiores de BAX, estimulación de las células de Kupffer que liberan mayores cantidades de quimiocinas y mayor acúmulo de neutrófilos con respecto al grupo control (104).

Además, la administración de lidocaína en células tumorales parece tener un impacto beneficioso. Parece que tanto *in vitro* como *in vivo* su administración inhibe la proliferación y migración de células cancerosas e induce la apoptosis (211). Se ha observado el papel antitumoral de la lidocaína en diferentes cánceres, entre ellos el hepatocarcinoma, los estudios coinciden en que la lidocaína en concentraciones clínicamente relevantes, tiene efecto antiproliferativo en el hepatocarcinoma, efectos tiempo y dosis dependientes (212,213). Algunos de los mecanismos por los cuales la lidocaína parece tener acciones beneficiosas en determinados tumores parece relacionado con su capacidad inducción de la apoptosis de células tumorales, que en ocasiones se ha relacionado con la regulación de MAPK, aumento de la expresión de BAX y caspasas ejecutoras como la caspasa 3 o un descenso en los niveles de la proteína antiapoptótica bcl-2 (214).

## **6. Conclusiones**



Las conclusiones son las siguientes:

- 1) La cirugía de resección pulmonar con ventilación unipulmonar se asocia en nuestro estudio a un aumento de expresión de los mediadores inflamatorios hepáticos
- 2) Nuestros resultados sugieren que el uso intraoperatorio de perfusión de lidocaína intravenosa modula la respuesta inflamatoria hepática postoperatoria asociada a la cirugía de resección pulmonar con ventilación unipulmonar.
- 3) La administración de lidocaína intravenosa durante este procedimiento se asocia a un efecto antiapoptótico a nivel del parénquima hepático.
- 4) Los resultados obtenidos sugieren que la administración intravenosa de lidocaína durante la cirugía de resección pulmonar con ventilación unipulmonar puede ejercer en el hígado un efecto de protección sobre el metabolismo del óxido nítrico.



## **7. Bibliografía**



1. Kohl BA, Deutschman CS. The inflammatory response to surgery and trauma: Current Opinion in Critical Care. 2006 Aug;12(4):325–32.
2. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Chalidis B, Hall GM. Surgical stress response. Injury. 2006 Dec;37:S3–9.
3. Scholl R, Bekker A, Babu R. R Scholl, A Bekker, R Babu. Neuroendocrine and Immune Responses to Surgery. The Internet Journal of Anesthesiology. 2012 Volume 30 Number 3.
4. MOORE FD. TERMINAL MECHANISMS IN HUMAN INJURY. Am J Surg. 1965 Sep;110:317-23.
5. Meiler SE. Long-term Outcome After Anesthesia and Surgery: Remarks on the Biology of a Newly Emerging Principle in Perioperative Care. Anesthesiology Clinics of North America. 2006 Jun;24(2):255–78.
6. Novak-Jankovič V. Novak-Jankovič V, Markovič-Božič J. Regional anaesthesia in thoracic and abdominal surgery. Acta Clin Croat. 2019 Jun;58(Suppl 1):96-100. Acta Clinica Croatica. 2019;
7. Zhu J. T Helper Cell Differentiation, Heterogeneity, and Plasticity. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2018 Oct;10(10):a030338.
8. Kurosawa S, Kato M. Anesthetics, immune cells, and immune responses. J Anesth. 2008 Aug;22(3):263–77.
9. Elenkov IJ, Chrousos GP. Stress Hormones, Proinflammatory and Antiinflammatory Cytokines, and Autoimmunity. Annals of the New York Academy of Sciences. 2002 Jun;966(1):290–303.
10. Dorman RB, Gujral JS, Bajt ML, Farhood A, Jaeschke H. Generation and functional significance of CXC chemokines for neutrophil-induced liver injury during endotoxemia. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. 2005 May;288(5):G880–6.
11. Bajt ML, Farhood A, Jaeschke H. Effects of CXC chemokines on neutrophil activation and sequestration in hepatic vasculature. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. 2001 Nov 1;281(5):G1188–95.
12. Kruijmel JW, Pesman GJ, Sweep CGJ, Van Der Vliet JA, Liem T, Jansen JBMJ, et al. Depression of plasma levels of cytokines and ex-vivo cytokine production in relation to the activity of the pituitary-adrenal axis, in patients undergoing major vascular surgery. Cytokine. 1999 May;11(5):382–8.
13. Høgevoid HE, Lyberg T, Kähler H, Haug E, Reikerås O. CHANGES IN PLASMA IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  AND IL-6 AFTER TOTAL HIP REPLACEMENT SURGERY IN GENERAL OR REGIONAL ANAESTHESIA. Cytokine. 2000 Jul;12(7):1156–9.
14. Menger MD, Vollmar B. Surgical trauma: hyperinflammation versus immunosuppression? Langenbecks Arch Surg. 2004 Nov;389(6):475–84.
15. Fanning NF, Porter J, Shorten GD, Kirwan WO, Bouchier-Hayes D, Cotter TG, et al. Inhibition of neutrophil apoptosis after elective surgery. 1999;126(3).
16. Mannick JA, Rodrick ML, Lederer JA. The Immunologic Response To Injury. Journal of the American College of Surgeons. 2001 Sep;193(3):237–44.
17. Zanotti S, Kumar A, Kumar A. Cytokine modulation in sepsis and septic shock. Expert Opinion on Investigational Drugs. 2002 Aug;11(8):1061–75.
18. Hsing CH, Wang JJ. Clinical implication of perioperative inflammatory cytokine alteration. Acta Anaesthesiologica Taiwanica. 2015 Mar;53(1):23–8.
19. Homburger JA, Meiler SE. Anesthesia drugs, immunity, and long-term outcome. Current Opinion in Anaesthesiology. 2006 Aug;19(4):423–8.
20. Kehlet H. Multimodal approach to control postoperative pathophysiology and

rehabilitation. *British Journal of Anaesthesia*.

21. Beilin B, Shavit Y, Trabekin E, Mordashev B, Mayburd E, Zeidel A, et al. The Effects of Postoperative Pain Management on Immune Response to Surgery: Anesthesia & Analgesia. 2003 Sep;822–7.
22. Wada H, Seki S, Takahashi T, Kawarabayashi N, Higuchi H, Habu Y, et al. Combined Spinal and General Anesthesia Attenuates Liver Metastasis by Preserving Th1/Th2 Cytokine Balance. *Anesthesiology*. 2007 Mar 1;106(3):499–506.
23. O'Dwyer MJ, Owen HC, Torrance HDT. The perioperative immune response: Current Opinion in Critical Care. 2015 Aug;21(4):336–42.
24. Hollmann MW, Durieux ME. Local Anesthetics and the Inflammatory Response: A New Therapeutic Indication? *Anesthesiology*. 2000 Sep;93(3):858–75.
25. Ley K, Reutershan J. Leucocyte-Endothelial Interactions in Health and Disease. In: Moncada S, Higgs A, editors. *The Vascular Endothelium II* [Internet]. Springer Berlin Heidelberg; 2006 [cited 2023 May 12]. p. 97–133. (Handbook of Experimental Pharmacology; vol. 176/II). Available from: [http://link.springer.com/10.1007/3-540-36028-X\\_4](http://link.springer.com/10.1007/3-540-36028-X_4)
26. Fox-Robichaud A, Kubes P. Molecular mechanisms of tumor necrosis factor $\alpha$ -stimulated leukocyte recruitment into the murine hepatic circulation. *Hepatology*. 2000 May;31(5):1123–7.
27. Dinarello CA. Historical insights into cytokines. *Eur J Immunol*. 2007 Nov;37(S1):S34–45.
28. Zhang JM, An J. Cytokines, Inflammation, and Pain. *International Anesthesiology Clinics*. 2007;45(2):27–37.
29. Rancan L, Huerta L, Cusati G, Erquicia I, Isea J, Paredes SD, et al. Sevoflurane Prevents Liver Inflammatory Response Induced by Lung Ischemia-Reperfusion. *Transplantation*. 2014 Dec 15;98(11):1151–7.
30. Wu MY, Yiang GT, Liao WT, Tsai APY, Cheng YL, Cheng PW, et al. Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2018;46(4):1650–67.
31. Jaeschke H. Mechanisms of Liver Injury. II. Mechanisms of neutrophil-induced liver cell injury during hepatic ischemia-reperfusion and other acute inflammatory conditions. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2006 Jun;290(6):G1083–8.
32. Sacco R, Shah S, Leeson R, Moraschini V, de Almeida Barros Mourão CF, Akintola O, et al. Osteonecrosis and osteomyelitis of the jaw associated with tumour necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) inhibitors: a systematic review. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2019 Oct;
33. Krishnadasan B, Naidu BV, Byrne K, Fraga C, Verrier ED, Mulligan MS. The role of proinflammatory cytokines in lung ischemia-reperfusion injury. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2003 Feb;125(2):261–72.
34. Huber TS, Gaines GC, Welborn MB 3rd, Rosenberg JJ, Seeger JM, Moldawer LL. Anticytokine therapies for acute inflammation and the systemic inflammatory response syndrome: IL-10 and ischemia/reperfusion injury as a new paradigm. *Shock*. 2000 Jun;13(6):425-34.
35. Kumar A, Krieger A, Symeonides S, Kumar A, Parrillo JE. Myocardial dysfunction in septic shock: Part II. Role of cytokines and nitric oxide. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*. 2001 Aug;15(4):485–511.
36. van der Poll T, van Deventer SJ, Hack CE, Wolbink GJ, Aarden LA, Büller HR, ten Cate JW. Effects on leukocytes after injection of tumor necrosis factor into healthy humans. *Blood*. 1992 Feb 1;79(3):693-8.

37. Chang DM, Hsu K, Ding YA, Chiang CH. Interleukin-1 in Ischemia-Reperfusion Acute Lung Injury. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1997 Oct;156(4):1230–4.
38. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. INTERLEUKIN -10 AND THE INTERLEUKIN -10 RECEPTOR. *Annual Review of Immunology*. 2001 Apr;19(1):683–765.
39. Maus U, Herold S, Muth H, Maus R, Ermert L, Ermert M, et al. Monocytes recruited into the alveolar air space of mice show a monocytic phenotype but upregulate CD14. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2001 Jan 1;280(1):L58–68.
40. Fuse K, Kodama M, Hanawa H, Okura Y, Ito M, Shiono T, et al. Enhanced expression and production of monocyte chemoattractant protein-1 in myocarditis. *Clinical and Experimental Immunology*. 2001 Dec 20;124(3):346–52.
41. Ni F, Zhang Y, Peng X, Li J. Correlation between osteoarthritis and monocyte chemotactic protein-1 expression: a meta-analysis. *J Orthop Surg Res*. 2020 Dec;15(1):516.
42. Fitzgerald DC, Meade KG, McEvoy AN, Lillis L, Murphy EP, MacHugh DE, et al. Tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) increases nuclear factor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) activity in and interleukin-8 (IL-8) release from bovine mammary epithelial cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2007 Mar;116(1–2):59–68.
43. McCormack G, Moriarty D, O'Donoghue DP, McCormick PA, Sheahan K, Baird AW. Tissue cytokine and chemokine expression in inflammatory bowel disease. *Inflamm res*. 2001 Oct;50(10):491–5.
44. Jin T, Yin Q. JIN, Tengchuan; YIN, Qian (ed.). *Structural Immunology*. Springer Singapore, 2019. [Internet]. 2019 [cited 2020 Feb 6]. Available from: <https://doi.org/10.1007/978-981-13-9367-9>
45. Baud V, Karin M. Is NF- $\kappa$ B a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nat Rev Drug Discov*. 2009 Jan;8(1):33–40.
46. Tak PP, Firestein GS. NF- $\kappa$ B: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest*. 2001 Jan 1;107(1):7–11.
47. Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and Function of NF- $\kappa$ B Transcription Factors in the Immune System. *Annu Rev Immunol*. 2009 Apr 1;27(1):693–733.
48. Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A. Signaling via the NF $\kappa$ B system. *WIREs Systems Biology and Medicine*. 2016 May;8(3):227–41.
49. Forstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*. 2012 Apr 1;33(7):829–37.
50. Lee M, Rey K, Besler K, Wang C, Choy J. Immunobiology of Nitric Oxide and Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase. In: Kloc M, editor. *Macrophages*. 2017. p. 181–207.
51. Kanno S, Lee PC, Zhang Y, Ho C, Griffith BP, Shears LL, et al. Attenuation of Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury by Superinduction of Inducible Nitric Oxide Synthase. *Circulation*. 2000 Jun 13;101(23):2742–8.
52. Phillips L, Toledo AH, Lopez-Neblina F, Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH. Nitric Oxide Mechanism of Protection in Ischemia and Reperfusion Injury. *Journal of Investigative Surgery*. 2009 Jan;22(1):46–55.
53. Yadav R, Samuni Y, Abramson A, Zeltser R, Casap N, Kabiraj TK, et al. Pro-oxidative synergic bactericidal effect of NO: kinetics and inhibition by nitroxides. *Free Radical Biology and Medicine*. 2014 Feb;67:248–54.
54. Kuro-o M. The Klotho proteins in health and disease. *Nature Reviews Nephrology*. 2019 Jan;15(1):27–44.

55. Chen S, Zheng J, Hao Q, Yang S, Wang J, Chen H, et al. p53-insensitive PUMA down-regulation is essential in the early phase of liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Journal of Hepatology*. 2010 Jun;52(6):864–71.
56. Martín-González C, González-Reimers E, Quintero-Platt G, Martínez-Riera A, Santolaria-Fernández F. Soluble  $\alpha$ -Klotho in Liver Cirrhosis and Alcoholism. *Alcohol and Alcoholism*. 2019 May 1;54(3):204–8.
57. Martín-Núñez E, Donate-Correa J, López-Castillo Á, Delgado-Molinos A, Ferri C, Rodríguez-Ramos S, et al. Soluble levels and endogenous vascular gene expression of KLOTHO are related to inflammation in human atherosclerotic disease. *Clinical Science*. 2017 Nov 1;131(21):2601–9.
58. Dongiovanni P, Crudele A, Panera N, Romito I, Meroni M, De Stefanis C, et al. Dongiovanni P, Crudele A, Panera N, Romito I, Meroni M, De Stefanis C, Palma A, Comparcola D, Fracanzani AL, Miele L, Valenti L, Nobili V, Alisi A.  $\beta$ -Klotho gene variation is associated with liver damage in children with NAFLD. *J Hepatol*. 2020 Mar;72(3):411-419. 2019 Oct;
59. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*. 2007 Jun;35(4):495–516.
60. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*. 2019 Jun;43(6):582-592.
61. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*. 2019 Jun;43(6):582–92.
62. Elliott MR, Ravichandran KS (2010) Clearance of apoptotic cells: implications in health and disease. *J Cell Biol* 189(7): 1059–70.
63. Bossen C, Ingold K, Tardivel A, Bodmer JL, Gaide O, Hertig S, Ambrose C, Tschopp J, Schneider P (2006) Interactions of tumor necrosis factor (TNF) and TNF receptor family members in the mouse and human. *J Biol Chem* 281(20): 13964–71.
64. Samraj AK, Keil E, Ueffing N, Schulze-Osthoff K, Schmitz I. Loss of Caspase-9 Provides Genetic Evidence for the Type I/II Concept of CD95-mediated Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*. 2006 Oct 6;281(40):29652–9.
65. Brenner D, Mak TW (2009) Mitochondrial cell death effectors. *Curr Opin Cell Biol* 21(6): 871–7.
66. Michels J, Johnson PWM, Packham G. Mcl-1. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2005 Feb;37(2):267–71.
67. Lucas CD, Dorward DA, Tait MA, Fox S, Marwick JA, Allen KC, Robb CT, Hirani N, Haslett C, Duffin R, Rossi AG. Downregulation of Mcl-1 has anti-inflammatory pro-resolution effects and enhances bacterial clearance from the lung. *Mucosal Immunol*. 2014 Jul;7(4):857-68.
68. Han BJ, Li W, Jiang GB, Lai SH, Zhang C, Zeng CC, et al. Effects of daidzein in regards to cytotoxicity in vitro, apoptosis, reactive oxygen species level, cell cycle arrest and the expression of caspase and Bcl-2 family proteins. *Oncology Reports*. 2015 Sep;34(3):1115–20.
69. Garutti I, Rancan L, Simón C, Cusati G, Sanchez-Pedrosa G, Moraga F, et al. Intravenous Lidocaine Decreases Tumor Necrosis Factor Alpha Expression Both Locally and Systemically in Pigs Undergoing Lung Resection Surgery: *Anesthesia & Analgesia*. 2014 Oct;119(4):815–28.
70. Follis AV, Chipuk JE, Fisher JC, Yun MK, Grace CR, Nourse A, et al. PUMA binding induces partial unfolding within BCL-xL to disrupt p53 binding and promote apoptosis. *Nature Chemical Biology*. 2013 Mar;9(3):163–8.
71. Liu YJ, Sun Q, Chen J, Chen MY, Ouyang B, Sun HD, et al. Biliary tract external drainage improves inflammatory mediators and pathomorphology of the intestine, liver,

- and lung in septic rats: *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*. 2018 Sep;85(3):580–7.
72. de la Gala F, Piñeiro P, Reyes A, Vara E, Olmedilla L, Cruz P, et al. Postoperative pulmonary complications, pulmonary and systemic inflammatory responses after lung resection surgery with prolonged one-lung ventilation. Randomized controlled trial comparing intravenous and inhalational anaesthesia. *British Journal of Anaesthesia*. 2017 Oct;119(4):655–63.
73. O’Gara B, Talmor D. Perioperative lung protective ventilation. *BMJ*. 2018 Sep 10;k3030.
74. Tschumperlin DJ, Oswari J, Margulies ASS. Deformation-Induced Injury of Alveolar Epithelial Cells: Effect of Frequency, Duration, and Amplitude. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2000 Aug;162(2):357–62.
75. Zupancich E, Paparella D, Turani F, Munch C, Rossi A, Massaccesi S, et al. Mechanical ventilation affects inflammatory mediators in patients undergoing cardiopulmonary bypass for cardiac surgery: A randomized clinical trial. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2005 Aug;130(2):378–83.
76. Futier E, Constantin JM, Paugam-Burtz C, Pascal J, Eurin M, Neuschwander A, et al. A Trial of Intraoperative Low-Tidal-Volume Ventilation in Abdominal Surgery. *New England Journal of Medicine*. 2013 Aug;369(5):428–37.
77. Severgnini P, Frigerio A, Novario R, Schultz MJ, Chiaranda M. Protective Mechanical Ventilation during General Anesthesia for Open Abdominal Surgery Improves Postoperative Pulmonary Function. *Perioperative Medicine*. :15.
78. Wolthuis EK, Lutter R, Hollmann M. Mechanical Ventilation with Lower Tidal Volumes and Positive End-expiratory Pressure Prevents Pulmonary Inflammation in Patients without Preexisting Lung Injury. 2008;108(1):9.
79. Kobayashi K, Saeki Y, Kitazawa S, Kobayashi N, Kikuchi S, Goto Y, et al. Three-dimensional computed tomographic volumetry precisely predicts the postoperative pulmonary function. *Surgery Today*. 2017 Nov;47(11):1303–11.
80. Kozian A, Schilling T, Röcken C, Breitling C, Hachenberg T, Hedenstierna G. Increased Alveolar Damage After Mechanical Ventilation in a Porcine Model of Thoracic Surgery. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*. 2010 Aug;24(4):617–23.
81. Kozian A, Schilling T, Fredén F, Maripuu E, Röcken C, Strang C, et al. One-lung ventilation induces hyperperfusion and alveolar damage in the ventilated lung: an experimental study. *British Journal of Anaesthesia*. 2008 Apr;100(4):549–59.
82. Shen Y, Zhong M, Wu W, Wang H, Feng M, Tan L, et al. The impact of tidal volume on pulmonary complications following minimally invasive esophagectomy: A randomized and controlled study. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2013 Nov;146(5):1267–74.
83. Yang M, Ahn HJ, Kim K, Kim JA, Yi CA, Kim MJ, et al. Does a Protective Ventilation Strategy Reduce the Risk of Pulmonary Complications After Lung Cancer Surgery? *Chest*. 2011 Mar;139(3):530–7.
84. Chatterjee S, Nieman GF, Christie JD, Fisher AB. Shear stress-related mechanosignaling with lung ischemia: lessons from basic research can inform lung transplantation. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2014 Nov 1;307(9):L668–80.
85. Murakami J, Ueda K, Hayashi M, Kobayashi T, Kunihiro Y, Hamano K. Size-capacity mismatch in the lung: a novel predictor for complications after lung cancer surgery. *Journal of Surgical Research*. 2017 Mar;209:131–8.
86. Lohser J, Slinger P. Lung Injury After One-Lung Ventilation: A Review of the Pathophysiologic Mechanisms Affecting the Ventilated and the Collapsed Lung.

Anesthesia & Analgesia. 2015 Aug;121(2):302–18.

87. Chiu S, Bharat A. Role of monocytes and macrophages in regulating immune response following lung transplantation: Current Opinion in Organ Transplantation. 2016 Jun;21(3):239–45.

88. de Perrot M, Liu M, Waddell TK, Keshavjee S. Ischemia–Reperfusion–induced Lung Injury. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2003 Feb 15;167(4):490–511.

89. Tekinbas C, Ulusoy H, Yulug E, Muharrem Erol M, Alver A, Yenilmez E, et al. One-lung ventilation: For how long? The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery. 2007 Aug;134(2):405–10.

90. Silva PL, Moraes L, Santos RS, Samary C, Ramos MBA, Santos CL, et al. Recruitment Maneuvers Modulate Epithelial and Endothelial Cell Response According to Acute Lung Injury Etiology\*: Critical Care Medicine. 2013 Oct;41(10):e256–65.

91. den Hengst WA, Gielis JF, Lin JY, Van Schil PE, De Windt LJ, Moens AL. Lung ischemia-reperfusion injury: a molecular and clinical view on a complex pathophysiological process. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 2010 Nov;299(5):H1283–99.

92. Laubach VE, Sharma AK. Mechanisms of lung ischemia-reperfusion injury: Current Opinion in Organ Transplantation. 2016 Jun;21(3):246–52.

93. Srivastava B, Gimson A. Hepatic changes in systemic infection. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2013 Aug;27(4):485–95.

94. Yan J, Li S, Li S. The Role of the Liver in Sepsis. International Reviews of Immunology. 2014 Nov 2;33(6):498–510.

95. Triantafyllou E, Woollard KJ, McPhail MJW, Antoniadou CG, Possamai LA. The Role of Monocytes and Macrophages in Acute and Acute-on-Chronic Liver Failure. Frontiers in Immunology. 2018;9.

96. Lagan AL, Melley DD, Evans TW, Quinlan GJ. Pathogenesis of the systemic inflammatory syndrome and acute lung injury: role of iron mobilization and decompartmentalization. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology. 2008 Feb;294(2):L161–74.

97. Jaeschke H. Mechanisms of Liver Injury. II. Mechanisms of neutrophil-induced liver cell injury during hepatic ischemia-reperfusion and other acute inflammatory conditions. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. 2006 Jun;290(6):G1083–8.

98. Hsing CH, Wang JJ. Clinical implication of perioperative inflammatory cytokine alteration. Acta Anaesthesiologica Taiwanica. 2015 Mar;53(1):23–8.

99. Lu L, Zhou H, Ni M, Wang X, Busuttill R, Kupiec-Weglinski J, et al. Innate Immune Regulations and Liver Ischemia-Reperfusion Injury. Transplantation. 2016 Dec;100(12):2601–10.

100. Barbier L, Ferhat M, Salamé E, Robin A, Herbelin A, Gombert JM, et al. Interleukin-1 Family Cytokines: Keystones in Liver Inflammatory Diseases. Frontiers in Immunology. 2019;10.

101. Simón Adiego C, González-Casaurrán G, Azcárate Perea L, Isea Viña J, Vara Ameigeiras E, García Martín C, et al. Procedimiento de autotrasplante pulmonar en el cerdo como modelo experimental para el estudio del síndrome de isquemia-reperusión. Archivos de Bronconeumología. 2011 Jun;47(6):283–9.

102. Lin WC, Lin CF, Chen CL, Chen CW, Lin YS. Prediction of outcome in patients with acute respiratory distress syndrome by bronchoalveolar lavage inflammatory mediators. Exp Biol Med (Maywood). 2010 Jan;235(1):57–65.

103. Martin-Sanz P, Hortelano S, Callejas NA, Goren N, Casado M, Zeini M, et al.

- Nitric Oxide in Liver Inflammation and Regeneration. *Metabolic Brain Disease*. 2003;10.
104. Chen S, Zheng J, Hao Q, Yang S, Wang J, Chen H, et al. p53-insensitive PUMA down-regulation is essential in the early phase of liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Journal of Hepatology*. 2010 Jun;52(6):864–71.
105. Ciesla DJ, Moore EE, Johnson JL, Burch JM, Cothren CC, Sauaia A. The role of the lung in postinjury multiple organ failure. *Surgery*. 2005 Oct;138(4):749–58.
106. Regel G, Grotz M, Weltner T, Sturm JA, Tscherne H. Pattern of Organ Failure following Severe Trauma. *World Journal of Surgery*. 1996 May 1;20(4):422–9.
107. Walker MG, Yao LJ, Patterson EK, Joseph MG, Cepinskas G, Veldhuizen RAW, et al. The Effect of Tidal Volume on Systemic Inflammation in Acid-Induced Lung Injury. *Respiration*. 2011;81(4):333–42.
108. Markovic N, McCaig LA, Stephen J, Mizuguchi S, Veldhuizen RAW, Lewis JF, et al. Mediators released from LPS-challenged lungs induce inflammatory responses in liver vascular endothelial cells and neutrophilic leukocytes. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2009 Dec;297(6):G1066–76.
109. Patterson EK, Yao LJ, Ramic N, Lewis JF, Cepinskas G, McCaig L, et al. Lung-Derived Mediators Induce Cytokine Production in Downstream Organs via an *NF- $\kappa$ B*-Dependent Mechanism. *Mediators of Inflammation*. 2013;2013:1–10.
110. Schwartz DB, Bone RC, Balk RA, Szidon JR. Hepatic Dysfunction in the Adult Respiratory Distress Syndrome. *Chest*. 1989 Apr;95(4):871–5.
111. Harbrecht BG, Doyle HR, Clancy KD, Townsend RN, Billiar TR, Peitzman AB. The impact of liver dysfunction on outcome in patients with multiple injuries. *Am Surg*. 2001 Feb;67(2):122–6.
112. Walker MG, Tessolini JM, McCaig L, Yao LJ, Lewis JF, Veldhuizen RAW. ELEVATED ENDOGENOUS SURFACTANT REDUCES INFLAMMATION IN AN ACUTE LUNG INJURY MODEL. *Experimental Lung Research*. 2009 Jan;35(7):591–604.
113. Lawrence T. The Nuclear Factor *NF- $\kappa$ B* Pathway in Inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2009 Dec 1;1(6):a001651–a001651.
114. Young MP, Manning HL, Wilson DL, Mette SA, Riker RR, Leiter JC, et al. Ventilation of patients with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: Has new evidence changed clinical practice?\*. *Critical Care Medicine*. 2004 Jun;32(6):1260–5.
115. Misthos P, Katsaragakis S, Milingos N, Kakaris S, Sepsas E, Athanassiadi K, et al. Postresectional pulmonary oxidative stress in lung cancer patients. The role of one-lung ventilation. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 2005 Mar;27(3):379–83.
116. Bastin AJ, Davies N, Lim E, Quinlan GJ, Griffiths MJ. Systemic inflammation and oxidative stress post-lung resection: Effect of pretreatment with N-acetylcysteine: N-acetylcysteine pre-lung resection. *Respirology*. 2016 Jan;21(1):180–7.
117. Huerta L, Rancan L, Simón C, Isea J, Vidaurre E, Vara E, et al. Ischaemic preconditioning prevents the liver inflammatory response to lung ischaemia/reperfusion in a swine lung autotransplant model†. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 2013 Jun;43(6):1194–201.
118. Bernal W. El hígado en la enfermedad sistémica: sepsis y enfermedad crítica: Sepsis y enfermedad crítica. *Clinical Liver Disease*. 2016 Nov;8(S1):S6–9.
119. Duan L, Hu G, Jiang M, Zhang C. [Postoperative abnormal liver function in children with heart surgery]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2018 Sep 28;43(9):1007–1013.
120. Neri V, Ambrosi A, Fersini A, Tartaglia N, Cianci P, Lapolla F, Forlano I. Laparoscopic cholecystectomy: evaluation of liver function tests. *Ann Ital Chir*. 2014

Sep-Oct;85(5):431-7.

121. Cimino MM, Donadon M, Giudici S, Sacerdote C, Di Tommaso L, Roncalli M, et al. Peri-tumoural CD3+ Inflammation and Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio Predict Overall Survival in Patients Affected by Colorectal Liver Metastases Treated with Surgery. *J Gastrointest Surg*. 2020 May;24(5):1061–70.

122. Dimopoulou I, Armaganidis A, Douka E, Mavrou I, Augustatou C, Kopterides P, et al. Tumour necrosis factor-alpha (TNF $\alpha$ ) and interleukin-10 are crucial mediators in post-operative systemic inflammatory response and determine the occurrence of complications after major abdominal surgery. *Cytokine*. 2007 Jan;37(1):55–61.

123. Golab F, Kadkhodae M, Zahmatkesh M, Hedayati M, Arab H, Schuster R, et al. Ischemic and non-ischemic acute kidney injury cause hepatic damage. *Kidney International*. 2009 Apr;75(8):783–92.

124. Kelly KJ. Distant Effects of Experimental Renal Ischemia/Reperfusion Injury. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2003 Jun;14(6):1549–58.

125. Casanova J, Garutti I, Simon C, Giraldez A, Martin B, Gonzalez G, et al. The Effects of Anesthetic Preconditioning with Sevoflurane in an Experimental Lung Autotransplant Model in Pigs. *Anesthesia & Analgesia*. 2011 Oct;113(4):742–8.

126. Serracino-Inglott F, Mathie RT. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *The American Journal of Surgery*. 2001;7.

127. Kato A, Gabay C, Okaya T, Lentsch AB. Specific Role of Interleukin-1 in Hepatic Neutrophil Recruitment after Ischemia/Reperfusion. *The American Journal of Pathology*. 2002 Nov;161(5):1797–803.

128. Faouzi S, Burckhardt BE, Hanson JC, Campe CB, Schrum LW, Rippe RA, et al. Anti-Fas Induces Hepatic Chemokines and Promotes Inflammation by an NF- $\kappa$ B-independent, Caspase-3-dependent Pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 2001 Dec;276(52):49077–82.

129. Estebe JP. Intravenous lidocaine. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*. 2017 Dec;31(4):513–21.

130. Wright JL, Durieux ME, Groves DS. A brief review of innovative uses for local anesthetics: Current Opinion in Anaesthesiology. 2008 Oct;21(5):651–6.

131. McCarthy GC, Megalla SA, Habib AS. Impact of Intravenous Lidocaine Infusion on Postoperative Analgesia and Recovery from Surgery: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *Drugs*. 2010 Jun;70(9):1149–63.

132. Zheng Y, Hou X, Yang S. Lidocaine Potentiates SOCS3 to Attenuate Inflammation in Microglia and Suppress Neuropathic Pain. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2019;

133. Kuo CP, Jao SW, Chen KM, Wong CS, Yeh CC, Sheen MJ, et al. Comparison of the effects of thoracic epidural analgesia and i.v. infusion with lidocaine on cytokine response, postoperative pain and bowel function in patients undergoing colonic surgery. *British Journal of Anaesthesia*. 2006 Nov;97(5):640–6.

134. Hollmann MW, Herroeder S, Kurz KS, Hoenemann CW, Struemper D, Hahnenkamp K, et al. Time-dependent Inhibition of G Protein-coupled Receptor Signaling by Local Anesthetics: *Anesthesiology*. 2004 Apr;100(4):852–60.

135. Herroeder S, Pecher S, Schönherr ME, Kaulitz G, Hahnenkamp K, Friess H, et al. Systemic Lidocaine Shortens Length of Hospital Stay After Colorectal Surgery: A Double-blinded, Randomized, Placebo-controlled Trial. *Annals of Surgery*. 2007 Aug;246(2):192–200.

136. Feng G, Liu S, Wang GL, Liu GJ. Lidocaine Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury through Inhibiting NF- $\kappa$ B Activation. *Pharmacology*. 2008;81(1):32–40.

137. Wang HL, Xing YQ, Xu YX, Rong F, Lei WF, Zhang WH. The Protective Effect of Lidocaine on Septic Rats via the Inhibition of High Mobility Group Box 1 Expression and NF- $\kappa$ B Activation. *Mediators of Inflammation*. 2013;2013:1–9.
138. Palumbo R, Galvez BG, Pusterla T, De Marchis F, Cossu G, Marcu KB, et al. Cells migrating to sites of tissue damage in response to the danger signal HMGB1 require NF- $\kappa$ B activation. *Journal of Cell Biology*. 2007 Oct 8;179(1):33–40.
139. Xing W, Chen DT, Pan JH, Chen YH, Yan Y, Li Q, et al. Lidocaine Induces Apoptosis and Suppresses Tumor Growth in Human Hepatocellular Carcinoma Cells In Vitro and in a Xenograft Model In Vivo: *Anesthesiology*. 2017 May;126(5):868–81.
140. Liu J, Zhang H, Qi Z, Zheng X. Lidocaine protects against renal and hepatic dysfunction in septic rats via downregulation of Toll-like receptor 4. *Molecular Medicine Reports*. 2014 Jan;9(1):118–24.
141. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987 Apr;162(1):156–9.
142. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. 2008;3(6):1101–8. doi: 10.1038/nprot.2008.73.
143. Truscott EA, McCaig LA, Yao LJ, Veldhuizen RAW, Lewis JF. Surfactant protein-A reduces translocation of mediators from the lung into the circulation. *Experimental Lung Research*. 2010 Aug;36(7):431–9.
144. Imai Y. Injurious Mechanical Ventilation and End-Organ Epithelial Cell Apoptosis and Organ Dysfunction in an Experimental Model of Acute Respiratory Distress Syndrome. *JAMA*. 2003 Apr 23;289(16):2104.
145. Cao S, Liu M, Sehrawat TS, Shah VH. Regulation and functional roles of chemokines in liver diseases. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2021 Sep;18(9):630–47.
146. Endale Simegn A, Yaregal Melesse D, Belay Bizuneh Y, Mekonnen Alemu W. Perioperative management of patients with liver disease for non-hepatic surgery: A systematic review. *Annals of Medicine and Surgery*. 2022 Mar;75:103397.
147. Sagredo S, Brahm J, Uribe M, Codoceo V, Smok G. Insuficiencia hepática aguda poscirugía bariátrica: caso clínico y revisión de la literatura médica. *Gastroenterología y Hepatología*. 2013 Feb;36(2):76–80.
148. Luis Téllez, Enrique Rodríguez de Santiago, Agustín Albillos, Enfermedad hepática crónica asociada con cirugía de Fontan, *Revista Española de Cardiología*, Volume 71, Issue 3, 2018, Pages 192-202,.
149. Kaffarnik M, Stoeger G, Liebich J, Grieser C, Pratschke J, Stockmann M. Liver Function, Quantified by LiMAX Test, After Major Abdominal Surgery. Comparison Between Open and Laparoscopic Approach. *World J Surg*. 2018 Feb;42(2):557–66.
150. Robinson MW, Harmon C, O’Farrelly C. Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis. *Cell Mol Immunol*. 2016 May;13(3):267–76.
151. Bigorgne AE, John B, Ebrahimkhani MR, Shimizu-Albergine M, Campbell JS, Crispe IN. TLR4-Dependent Secretion by Hepatic Stellate Cells of the Neutrophil-Chemoattractant CXCL1 Mediates Liver Response to Gut Microbiota. Samson M, editor. *PLoS ONE*. 2016 Mar 22;11(3):e0151063.
152. Montalvo-Jave EE, Escalante-Tattersfield T, Ortega-Salgado JA, Piña E, Geller DA. Factors in the Pathophysiology of the Liver Ischemia-Reperfusion Injury. *Journal of Surgical Research*. 2008 Jun;147(1):153–9.
153. Zhai Y, Petrowsky H, Hong JC, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Ischaemia-reperfusion injury in liver transplantation—from bench to bedside. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2013 Feb;10(2):79–89.

154. Ciesla DJ, Moore EE, Johnson JL, Cothren CC, Banerjee A, Burch JM, et al. Decreased progression of postinjury lung dysfunction to the acute respiratory distress syndrome and multiple organ failure. *Surgery*. 2006 Oct;140(4):640–8.
155. Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol*. 2010 Dec;10(12):826–37.
156. Ley K, Reutershan J. Ley K, Reutershan J. Leucocyte-endothelial interactions in health and disease. *Handb Exp Pharmacol*. 2006;(176 Pt 2):97-133. In: Moncada S, Higgs A, editors. *The Vascular Endothelium II*. 2006. p. 97–133.
157. Towfigh S, Heisler T, Rigberg DA, Hines OJ, Chu J, McFadden DW, et al. Intestinal Ischemia and the Gut–Liver Axis: An in Vitro Model. *Journal of Surgical Research*. 2000 Feb;88(2):160–4.
158. Halpern MD, Holubec H, Dominguez JA, Meza YG, Williams CS, Ruth MC, et al. Hepatic inflammatory mediators contribute to intestinal damage in necrotizing enterocolitis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2003 Apr 1;284(4):G695–702.
159. Cantó M, Sánchez MJ, Casas MA, Bataller ML. Bilateral paravertebral blockade for conventional cardiac surgery. *Anaesthesia*. 2003 Apr;58(4):365-70.
160. Garutti I, Olmedilla L, Pérez-Peña JM, Arnal D, Piñeiro P, Barrigon S, et al. Hemodynamic Effects of Lidocaine in the Thoracic Paravertebral Space During One-Lung Ventilation for Thoracic Surgery. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*. 2006 Oct;20(5):648–51.
161. Leone BJ, Lehot JJ, Runciman WB, Welding RN, Ramsay JG, Arvieux CC, et al. Leone BJ, Lehot JJ, Runciman WB, Welding RN, Ramsay JG, Arvieux CC, Ryder WA, Foëx P. Effects of lignocaine and bupivacaine on regional myocardial function and coronary blood flow in anaesthetized dogs. *Br J Anaesth*. 1988 May;60(6):671-9. *BRITISH JOURNAL OF ANAESTHESIA*.
162. David JS, Amour J, Duracher C, Ferretti C, Precloux P, Petit P, et al. Comparison of the effects of mepivacaine and lidocaine on rat myocardium: *European Journal of Anaesthesiology*. 2007 Feb;24(2):190–7.
163. Cui W, Li Y, Li S, Wang R, Li J. Systemic administration of lidocaine reduces morphine requirements and postoperative pain of patients undergoing thoracic surgery after propofol–remifentanil-based anaesthesia: *European Journal of Anaesthesiology*. 2010 Jan;27(1):41–6.
164. Guinet P, Estebe JP, Ratajczak-Enselme M, Bansard JY, Chevanne F, Bec D, et al. Electrocardiographic and Hemodynamic Effects of Intravenous Infusion of Bupivacaine, Ropivacaine, Levobupivacaine, and Lidocaine In Anesthetized Ewes: *Regional Anesthesia and Pain Medicine*. 2009 Jan;34(1):17–23.
165. Lemay E, Guay J, Côté C, Boivin MC, Varin F. The number of injections does not influence local anesthetic absorption after paravertebral blockade. *Can J Anesth/J Can Anesth*. 2003 Jun;50(6):562–7.
166. De La Gala F, Piñeiro P, Reyes A, Simón C, Vara E, Rancan L, et al. Effect of intraoperative paravertebral or intravenous lidocaine versus control during lung resection surgery on postoperative complications: A randomized controlled trial. *Trials*. 2019 Dec;20(1):622.
167. Cruz Pardos P, Garutti I, Piñeiro P, Olmedilla L, de la Gala F. Effects of Ventilatory Mode During One-Lung Ventilation on Intraoperative and Postoperative Arterial Oxygenation in Thoracic Surgery. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*. 2009 Dec;23(6):770–4.
168. Naeije R, Brimiouille S. Physiology in medicine: importance of hypoxic pulmonary vasoconstriction in maintaining arterial oxygenation during acute respiratory

failure. *Critical Care*. 2001;5(2):67.

169. Ishibe Y, Shiokawa Y, Umeda T, Uno H, Nakamura M, Izumi T. The effect of thoracic epidural anesthesia on hypoxic pulmonary vasoconstriction in dogs: an analysis of the pressure-flow curve. *Anesth Analg*. 1996 May;82(5):1049-55.

170. Garutti I. Arterial Oxygenation During One-Lung Ventilation: Combined Versus General Anesthesia. *ANESTH ANALG*.

171. Von Dossow V, Welte M, Zaune U, Martin E, Walter M, Rückert J, et al. Thoracic Epidural Anesthesia Combined with General Anesthesia: The Preferred Anesthetic Technique for Thoracic Surgery. *Anesthesia & Analgesia*. 2001 Apr;92(4):848-54.

172. Casati A, Mascotto G, Iemi K, Nzepa-Batonga J, De Luca M. Epidural block does not worsen oxygenation during one-lung ventilation for lung resections under isoflurane/nitrous oxide anaesthesia. *European Journal of Anaesthesiology*. 2005 May;22(5):363-8.

173. Piegeler T, Votta-Velis EG, Bakhshi FR, Mao M, Carnegie G, Bonini MG, Schwartz DE, Borgeat A, Beck-Schimmer B, Minshall RD. Endothelial barrier protection by local anesthetics: ropivacaine and lidocaine block tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced endothelial cell Src activation. *Anesthesiology*. 2014 Jun;120(6):1414-28.

174. van der Wal SEI, van den Heuvel SAS, Radema SA, van Berkum BFM, Vaneker M, Steegers MAH, et al. The *in vitro* mechanisms and *in vivo* efficacy of intravenous lidocaine on the neuroinflammatory response in acute and chronic pain. *European Journal of Pain*. 2016 May;20(5):655-74.

175. Lv X, Li X, Guo K, Li T, Yang Y, Lu W, Wang S, Liu S. Effects of Systemic Lidocaine on Postoperative Recovery Quality and Immune Function in Patients Undergoing Laparoscopic Radical Gastrectomy. *Drug Des Devel Ther*. 2021 May 3;15:1861-1872.

176. Beaussier M, Delbos A, Maurice-Szamburski A, Ecoffey C, Mercadal L. Perioperative Use of Intravenous Lidocaine. *Drugs*. 2018 Aug;78(12):1229-46.

177. Schmid RA, Yamashita M, Ando K, Tanaka Y, Cooper JD, Patterson GA. Lidocaine reduces reperfusion injury and neutrophil migration in canine lung allografts. *The Annals of Thoracic Surgery*. 1996 Mar;61(3):949-55.

178. Simón Adiego C, González-Casaurrán G, Azcárate Perea L, Isea Viña J, Vara Ameigeiras E, García Martín C, et al. Procedimiento de autotrasplante pulmonar en el cerdo como modelo experimental para el estudio del síndrome de isquemia-reperusión. *Archivos de Bronconeumología*. 2011 Jun;47(6):283-9.

179. Gallos G, Jones DR, Nasr SH, Emala CW, Lee HT. Local Anesthetics Reduce Mortality and Protect against Renal and Hepatic Dysfunction in Murine Septic Peritonitis. *Anesthesiology*. 2004 Oct 1;101(4):902-11.

180. Yuan GJ. Expression and activity of inducible nitric oxide synthase and endothelial nitric oxide synthase correlate with ethanol-induced liver injury. *World Journal of Gastroenterology*. 2006;12(15):2375.

181. Hermanns H, Hollmann MW, Stevens MF, Lirk P, Brandenburger T, Piegeler T, et al. Molecular mechanisms of action of systemic lidocaine in acute and chronic pain: a narrative review. *British Journal of Anaesthesia*. 2019 Sep;123(3):335-49.

182. Karnina R, Arif SK, Hatta M, Bukhari A, Natzir R, Hisbullah, et al. Systemic lidocaine administration influences NF- $\kappa$ B gene expression, NF- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$  protein levels on BALB/c mice with musculoskeletal injury. *Annals of Medicine and Surgery*. 2021 Sep;69:102660.

183. Lahat A, Horin SB, Lang A, Fudim E, Picard O, Chowders Y. Lidocaine down-regulates nuclear factor- $\kappa$ B signalling and inhibits cytokine production and T cell proliferation: Lidocaine down regulates inflammatory response. *Clinical & Experimental*

Immunology. 2008 Mar 19;152(2):320–7.

184. Sedoris KC, Ovechkin AV, Gozal E, Roberts AM. Differential effects of nitric oxide synthesis on pulmonary vascular function during lung ischemia-reperfusion injury. *Archives of Physiology and Biochemistry*. 2009 Feb;115(1):34–46.

185. Wang K. Molecular mechanisms of hepatic apoptosis. *Cell Death & Disease*. 2014 Jan;5(1):e996–e996.

186. Das KC, Misra HP. Prevention of reperfusion lung injury by lidocaine in isolated rat lung ventilated with higher oxygen levels. *J Postgrad Med*. 2003 Jan-Mar;49(1):17–20.

187. Hermle G, Schütte H, Walmrath D, Geiger K, Seeger W, Grimminger F. Ventilation–Perfusion Mismatch after Lung Ischemia–Reperfusion: Protective Effect of Nitric Oxide. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1999 Oct 1;160(4):1179–87.

188. Frangogiannis NG. Chemokines in ischemia and reperfusion. *Thromb Haemost*. 2007 May;97(5):738–47.

189. Huang YH, Tsai PS, Kai YF, Yang CH, Huang CJ. Lidocaine Inhibition of Inducible Nitric Oxide Synthase and Cationic Amino Acid Transporter-2 Transcription in Activated Murine Macrophages May Involve Voltage-Sensitive Na<sup>+</sup> Channel: *Anesthesia & Analgesia*. 2006 Jun;102(6):1739–44.

190. Lei B, Popp S, Capuano-Waters C, Cottrell JE, Kass IS. Lidocaine attenuates apoptosis in the ischemic penumbra and reduces infarct size after transient focal cerebral ischemia in rats. *Neuroscience*. 2004 Jan;125(3):691–701.

191. Hollmann MW, Gross A, Jelacin N, Durieux ME. Local Anesthetic Effects on Priming and Activation of Human Neutrophils. *Anesthesiology*. 2001 Jul 1;95(1):113–22.

192. Huang AJ, Manning JE, Bandak TM, Rataou MC, Hanser KR, Silverstein SC. Endothelial cell cytosolic free calcium regulates neutrophil migration across monolayers of endothelial cells. *Journal of Cell Biology*. 1993 Mar 15;120(6):1371–80.

193. Abrams GA, Trauner M, Nathanson MH. Nitric oxide and liver disease. *Gastroenterologist*. 1995 Sep;3(3):220–33.

194. Iwakiri Y, Kim MY. Nitric oxide in liver diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2015 Aug;36(8):524–36.

195. Nanji AA, Greenberg SS, Tahan SR, Fogt F, Loscalzo J, Hossein Sadrzadeh SM, et al. Nitric oxide production in experimental alcoholic liver disease in the rat: Role in protection from injury. *Gastroenterology*. 1995 Sep;109(3):899–907.

196. Asehounne K, Strassheim D, Mitra S, Kim JY, Abraham E. Involvement of Reactive Oxygen Species in Toll-Like Receptor 4-Dependent Activation of NF- $\kappa$ B. *The Journal of Immunology*. 2004 Feb 15;172(4):2522–9.

197. Kaibori M, Okumura T, Sato K, Nishizawa M, Kon M. Inducible Nitric Oxide Synthase Expression in Liver Injury: Liver Protective Effects on Primary Rat Hepatocytes. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2015;14(2):77–83.

198. McKim SE, Gäbele E, Isayama F, Lambert JC, Tucker LM, Wheeler MD, et al. Inducible nitric oxide synthase is required in alcohol-induced liver injury: studies with knockout mice. *Gastroenterology*. 2003 Dec;125(6):1834–44.

199. Uzun H, Simsek G, Aydin S, Unal E, Karter Y, Yelmen NK, Vehid S, Curgunlu A, Kaya S. Potential effects of L-NAME on alcohol-induced oxidative stress. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 600–604.

200. Shiga M, Nishina K, Mikawa K, Obara H. The Effects of Lidocaine on Nitric Oxide Production from an Activated Murine Macrophage Cell Line. *Anesthesia & Analgesia*. 2001 Jan;92(1):128–33.

201. de Klaver MJM, Buckingham MG, Rich GF. Lidocaine Attenuates Cytokine-Induced Cell Injury in Endothelial and Vascular Smooth Muscle Cells: Anesthesia & Analgesia. 2003 Aug;97(2):465–70.
202. Takaishi K, Kitahata H, Kawahito S. Local anesthetics inhibit nitric oxide production and l-arginine uptake in cultured bovine aortic endothelial cells. *European Journal of Pharmacology*. 2013 Mar;704(1–3):58–63.
203. Hammermann R, Dreissig MD, Mossner J, et al. Nuclear factor- $\kappa$ B mediates simultaneous induction of inducible nitric oxide synthase and Up-regulation of the cationic amino acid transporter CAT-2B in rat alveolar macrophages. *Mol Pharmacol* 2000;58:1294–302.
204. Keel M, Ungethüm U, Steckholzer U, Niederer E, Hartung T, Trentz O, et al. Interleukin-10 Counterregulates Proinflammatory Cytokine-Induced Inhibition of Neutrophil Apoptosis During Severe Sepsis. *Blood*. 1997 Nov 1;90(9):3356–63.
205. Bostanoğlu A, Oruç T, Yıldız BD, Işık S, Zengin Nİ, Evren E, Saydam GS. Experimental study on the effects of massive bowel resection on liver function and hepatocyte apoptosis. *Turk J Gastroenterol*. 2014 Dec;25(6):674-7.
206. Van Den Berg JM, Weyer S, Weening JJ, Roos D, Kuijpers TW. Divergent effects of tumour necrosis factor- $\alpha$  on apoptosis of human neutrophils. *Transfusion Medicine*. Blackwell Science Ltd; 2001 Dec 25;10(4):330–1.
207. Kaczmarek DJ, Herzog C, Larmann J, Gillmann HJ, Hildebrand R, Schmitz M, Westermann A, Harendza T, Werdehausen R, Osthaus AW, Echtermeyer F, Hahnenkamp K, Wollert KC, Theilmeier G. Lidocaine protects from myocardial damage due to ischemia and reperfusion in mice by its antiapoptotic effects. *Anesthesiology*. 2009 May;110(5):1041-9.
208. Dabbagh A, Rajaei S. The Role of Anesthetic Drugs in Liver Apoptosis. *Hepatitis Monthly*. 2013 Aug 25;13(8).
209. Cao C, Yu M, Chai Y. Pathological alteration and therapeutic implications of sepsis-induced immune cell apoptosis. *Cell Death Dis*. 2019 Oct;10(10):782.
210. Yardeni IZ, Beilin B, Mayburd E, Levinson Y, Bessler H. The Effect of Perioperative Intravenous Lidocaine on Postoperative Pain and Immune Function. *Anesthesia & Analgesia*. 2009 Nov;109(5):1464–9.
211. Cassinello F, Prieto I, del Olmo M, Rivas S, Strichartz GR. Cancer surgery: how may anesthesia influence outcome? *Journal of Clinical Anesthesia*. 2015 May;27(3):262–72.
212. Zhang L, Hu R, Cheng Y, Wu X, Xi S, Sun Y, Jiang H. Lidocaine inhibits the proliferation of lung cancer by regulating the expression of GOLT1A. *Cell Prolif*. 2017 Oct;50(5):e12364.
213. Xing W, Chen DT, Pan JH, Chen YH, Yan Y, Li Q, Xue RF, Yuan YF, Zeng WA. Lidocaine Induces Apoptosis and Suppresses Tumor Growth in Human Hepatocellular Carcinoma Cells In Vitro and in a Xenograft Model In Vivo. *Anesthesiology*. 2017 May;126(5):868-881.
214. Zhang L, Hu R, Cheng Y, Wu X, Xi S, Sun Y, et al. Lidocaine inhibits the proliferation of lung cancer by regulating the expression of GOLT1A. *Cell Prolif*. 2017 Oct;50(5):e12364.

