

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA



EFFECTOS DEL PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO EN UN
MODELO EXPERIMENTAL DE AUTOTRASPLANTE PULMONAR EN
CERDOS

TESIS DOCTORAL DE:
ANA GIRÁLDEZ LÓPEZ

BAJO LA DIRECCIÓN DE:
CARLOS SIMÓN ADIEGO
IGNACIO GARUTTI MARTÍNEZ
ELENA VARA AMEIGEIRAS

Madrid, 2014

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA**

Departamento de Cirugía



TESIS DOCTORAL

***“Efectos del preconditionamiento
isquémico en un modelo
experimental de autotrasplante
pulmonar en cerdos.”***

Ana Giráldez López

MADRID, 2013

Directores: **Dr. Carlos Simón Adiego**

Dr. Ignacio Garutti Martínez

Dra. Elena Vara Ameigeiras

Dedicado a Onofre

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento ,

Al Dr. Carlos Simón Adiego, Médico adjunto de Cirugía Torácica del Hospital Gregorio Marañón, por su gran implicación en este trabajo y su incansable capacidad de trabajo y perfeccionismo, así como por comprenderme y ayudarme todo este tiempo con la paciencia y el cariño necesarios para ello. Este trabajo que aquí se presenta se lo debo en gran parte a él.

A la Dra. Elena Vara Ameigeiras, Catedrática del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, porque es parte fundamental del trabajo en un campo desconocido para mi hasta ahora, la investigación bioquímica. Sin ella, este proyecto no hubiese existido. Además, le agradezco profundamente el apoyarme y estimularme para continuar con este trabajo.

Al Dr. Ignacio Garutti Martínez, Médico Adjunto de Anestesiología y Reanimación del Hospital Gregorio Marañón, por haber contado conmigo para este proyecto hace ya algunos años, y por haber tenido la paciencia necesaria para obtener tantos y tan buenos resultados.

A mis grandes amigos la Dra. Beatriz Martín Piñeiro y el Dr. Javier Casanova Barea, compañeros desde los comienzos en el experimental. Gracias por estar conmigo y ayudarme siempre y a pesar de todo; haber visto como os convertíais en Doctores me ha servido de acicate para terminar este trabajo. Es para mí un auténtico orgullo haber compartido con vosotros esta aventura, y muchas otras.

A los residentes de Anestesiología, de Cirugía Torácica, estudiantes de Medicina y miembros del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III de la Facultad de Medicina de la Complutense, por su esfuerzo y trabajo desinteresado.

A mi primos Diego Álvarez y sobre todo a Teresa Giráldez, bioquímica e investigadora de prestigio internacional, sobre todo una gran mujer, que han contribuido de manera importantísima a que terminara esta tesis doctoral. Gracias por los consejos, por los ánimos y porque sin quererlo se ha convertido en un ejemplo a seguir en muchos aspectos de mi vida.

A mi hermano Joaquín, por ser mi soporte informático en muchas ocasiones y resolver todas mis dudas .Por ser mi hermano del alma. Al resto de mi familia, padres, Amparo (mi segunda madre) y cuñados por confiar en mi en todo lo que hago y ser un soporte fundamental en mi vida.

A todos y cada uno de mis amigos, que de alguna manera u otra están orgullosos de mi por haber realizado este trabajo y que han colaborado de una forma u otra con sus conocimientos.

Y por último, y no menos importante, sino al contrario, quiero expresar mi más profundo agradecimiento a Diego, el amor de mi vida. Sin él y su confianza, esta tesis no hubiese existido, por su capacidad de sacrificio, de comprenderme y facilitarme el tiempo necesario para el trabajo. Por ser el mejor compañero de vida que jamás hubiese imaginado y porque le quiero con toda mi alma. Este trabajo es tanto suyo como mío. A mis hijos, Manuela, Bruno y Simón, que son la alegría de mi vida y que han servido de estímulo para acabar el proyecto que comencé antes de que ellos nacieran; que el día de mañana puedan estar orgullosos de su madre. Ellos son los pilares de mi vida y a los que dedico todas y cada una de las cosas que hago. **GRACIAS.**

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

BAS: Momento basal

CAM: Concentración alveolar mínima

CAP: Catéter de arteria pulmonar o Swan-Ganz

CO: Monóxido de carbono

CON: Grupo control

eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial

FC: Frecuencia cardiaca

GC: Gasto cardiaco

HO: Hemoxigenasa

IC: Índice cardiaco

IL: Interleuquina

iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible

IR: Isquemia-reperfusión

IRVP: Índice de resistencia vascular pulmonar

IRVS: Índice de resistencia vascular sistémica

ITSVD: Índice de trabajo sistólico del ventrículo derecho

ITSVI: Índice de trabajo sistólico del ventrículo izquierdo

IVS: Índice de volumen sistólico

K+ATP: Canales de potasio ATP dependientes

LPO: Lipoperóxidos

MDA: Malondialdehido

MPO: Mieloperoxidasa

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

nNOS: Óxido nítrico sintasa neuronal

NO: Óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintasa

PAD: Presión arterial diastólica

PAM: Presión arterial media

PAP: Presión arteria pulmonar

PAPD: Presión arterial pulmonar diastólica

PAPM: Presión arterial pulmonar media

PAPS: Presión arterial pulmonar sistólica

PAS: Presión arterial sistólica

PCP: Presión capilar pulmonar

PEEP: Presión positiva tele-espiratoria

PMN: Polimorfonucleares

POST-RP: Momento post-reperusión

POST-RP 10: Momento tras 10 minutos de reperusión

POST-RP 30: Momento tras 30 minutos de reperusión

PRE-RP: Momento pre-reperusión

PVC: Presión venosa central

RLO: Radicales libres de oxígeno

RVP: Resistencia vascular pulmonares

SDRA: Síndrome del distrés respiratorio del adulto

SIR: Síndrome de isquemia-reperusión

TNF: Factor de necrosis tumoral

VPH: Vasoconstricción pulmonar hipóxica

VUP: Ventilación unipulmonar

XOR: Complejo xantina oxido-reductasa

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN

1.1	Síndrome de isquemia-reperfusión	21
1.2	Síndrome de isquemia-reperfusión pulmonar	24
1.2.1	Estrés oxidativo	28
1.2.2	Mediadores inflamatorios	34
1.2.3	Metabolismo y papel del óxido nítrico	40
1.3	Estrategias para modular el síndrome de isquemia-reperfusión	42
1.3.1	Disminución del estrés oxidativo	42
1.3.1.1	Controlando la producción de RLO	43
1.3.1.2	Inhibiendo la estimulación y migración de los neutrófilos	43
1.3.1.3	Atrapando los RLO del torrente sanguíneo	43
1.3.1.4	Aumentando la capacidad antioxidante del organismo	43
1.3.2	Soluciones de preservación	43
1.3.3	Precondicionamiento isquémico	44
1.3.4	Anestésicos halogenados	45
1.4	Precondicionamiento isquémico	
1.4.1	Tipos de precondicionamiento isquémico	45
1.4.1.1	PCI Clásico	46
1.4.1.2	PCI Remoto	48
1.4.2	Modelos experimentales de isquemia-reperfusión y precondicionamiento isquémico	49

1.5 Justificación del proyecto	50
--------------------------------	----

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis	56
2.1.1 Hipótesis principal	56
2.1.2 Hipótesis secundarias	56
2.2 Objetivos	57
2.2.1 Objetivo principal	57
2.2.2 Objetivos secundarios	57

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Descripción del material	60
3.1.1 Material biológico	60
3.1.2 Material fungible y aparataje	62
3.1.3 Quirófano e instalaciones	66
3.2 Descripción del procedimiento	67
3.3 Protocolo anestésico	67
3.4 Protocolo quirúrgico	69
3.5 Precondicionamiento isquémico pulmonar	73
3.6 Mediciones y recogida de muestras	73
3.7 Variables hemodinámicas	75
3.8 Variables gasométricas	75
3.9 Variables bioquímicas en sangre	76
3.10 Variables bioquímicas en tejido pulmonar	77
3.10.1 Cuantificación del edema pulmonar	77

3.10.2 Preparación de muestras de tejido pulmonar	78
3.10.3 Evaluación de estrés oxidativo	79
3.10.4 Determinación de mediadores inflamatorios	80
3.10.5 Análisis Western Blotting	80
3.11 Análisis estadístico	82

4. RESULTADOS

4.1 Datos demográficos y tiempos quirúrgicos	84
4.2 Resultados gasométricos	85
4.2.1 Gasometrías de sangre arterial periférica	85
4.2.2 Transferencia de gases en el pulmón reimplantado	87
4.3 Resultados hemodinámicos	92
4.4 Resultados bioquímicos	97
4.4.1 Edema pulmonar	98
4.4.2 Citoquinas	99
4.4.3 Estrés oxidativo	101
4.4.4 Activación leucocitaria	103
4.4.5 Metabolismo del óxido nítrico	104

5. DISCUSIÓN

5.1 Efectos del preconditionamiento isquémico sobre los parámetros hemodinámicos y gasométricos	113
5.2 Efectos del preconditionamiento isquémico sobre el edema pulmonar	115

5.3 Efectos del preconditionamiento isquémico sobre la respuesta inflamatoria	117
5.4 Efectos del preconditionamiento isquémico sobre el estrés oxidativo	119
5.5 Efectos del preconditionamiento isquémico sobre la activación leucocitaria	121
5.6 Efectos del preconditionamiento isquémico sobre el metabolismo del óxido nítrico	124
5.7 Limitaciones del estudio y aplicabilidad clínica	127
6. CONCLUSIONES	130
7. ANEXOS	133
8. BIBLIOGRAFÍA	141

RESUMEN

En el siguiente trabajo se pretende estudiar el efecto del preconditionamiento isquémico clásico sobre el síndrome de isquemia-reperfusión pulmonar, a través de un modelo experimental de autotrasplante pulmonar en cerdos. El síndrome de isquemia-reperfusión acontece cuando un órgano o sistema es privado de flujo sanguíneo durante un periodo de tiempo determinado y posteriormente es restablecido. Si bien es un fenómeno ampliamente analizado en distintos órganos y sistemas, no se ha descrito en tal profundidad cuando ocurre a nivel pulmonar.

La fisiopatología de este síndrome resulta muy compleja y no del todo conocida en el momento actual, aunque cada vez existen más estudios que intentan desentrañar los diferentes mecanismos implicados en el mismo. Se podría decir que la isquemia a nivel pulmonar produce una intrincada respuesta inflamatoria, en la que intervienen multitud de mediadores inflamatorios, y que provoca daño local importante. Además, a la hora de restablecerse el flujo sanguíneo, dichos mediadores inflamatorios alcanzan la circulación sistémica, de forma que la respuesta inflamatoria inicial se amplifica con la consiguiente repercusión sistémica.

El modelo experimental que se presenta en este trabajo consiste en la práctica de una neumonectomía pulmonar izquierda al sujeto de experimentación, tras el que se realiza una lobectomía inferior izquierda ex-situ y finalmente se reimplanta dicho lóbulo inferior izquierdo.

Se divide a los animales de experimentación en dos grupos: uno experimental, al que se le practica el preconditionamiento isquémico clásico justo antes de finalizar la neumonectomía izquierda, clampando la arteria pulmonar izquierda durante dos periodos de 5 minutos seguidos de 5 minutos de reperfusión cada uno y al que, posteriormente se le realiza el clampaje definitivo de la arteria pulmonar izquierda para llevar a cabo la neumonectomía izquierda; y otro grupo control, al que se le practica la cirugía sin preconditionamiento previo. Una vez realizada la neumonectomía se realiza una lobectomía craneal ex-situ y a continuación se reimplanta el lóbulo inferior izquierdo. La reperfusión del injerto se mantiene durante 30 minutos. Una vez finalizado el experimento se sacrifica al animal aumentando la profundidad anestésica y administrando cloruro potásico que produce la muerte por cardioplejia.

Tomamos muestras en cinco momentos diferentes en cada experimento:

1) Basal: se extraen muestras de sangre arterial, para analizar la gasometría arterial y se realiza un estudio hemodinámico treinta minutos tras la realización de la toracotomía.

2) Pre-neumonectomía: antes de completar la neumonectomía izquierda, se realiza un nuevo estudio hemodinámico, se extrae otra gasometría arterial y una biopsia de tejido pulmonar (del lóbulo craneal). En este momento el animal ya permanece bajo la ventilación unipulmonar.

3) Pre-reperusión: antes de reperfundir y ventilar el lóbulo caudal izquierdo, que ya ha sido reimplantado, se realiza otro estudio hemodinámico, se extrae una gasometría arterial y una muestra de tejido pulmonar.

4) 10 minutos post-reperusión: se realizan los mismos estudios 10 minutos después de reimplantar el lóbulo caudal.

5) 30 minutos post-reperusión: se realizan los estudios a los 30 minutos de la reperusión del lóbulo caudal izquierdo antes de finalizar el experimento.

Se consideran parámetros hemodinámicos (FC, PAM, PAP, PCP, PVC, IC), gasométricos (pO₂, pCO₂ y pH), diferentes parámetros bioquímicos (citoquinas, mediadores de estrés oxidativo, mediadores de activación leucocitaria y RLO) y el edema pulmonar. Los resultados se expresan como la media y la desviación estándar. Para comprobar la normalidad de las variables se aplica la prueba de “Kolmogorov-Smirnov”. Se emplearon test no paramétricos, dado que las variables no siguen la normalidad. El test de “U de Mann-Whitney” se utilizó para establecer diferencias entre los grupos analizados, que son muestras independientes. La significación estadística empleada fue $p < 0.05$ y se utilizó el programa informático SPSS 14.0 (SPSS Inc, Chicago, USA) para analizar los datos estadísticos.

Los resultados de nuestro experimento ponen de relieve lo siguiente: presentamos dos grupos de experimentación, control y PCI, homogéneos desde el punto de vista demográfico y de tiempos quirúrgicos. Además, no observamos diferencias significativas en cuanto a los parámetros hemodinámicos analizados así como en el edema pulmonar.

El resto de parámetros obtenidos apuntan a una menor respuesta inflamatoria, una menor alteración bioquímica y gasométrica en los sujetos a los que se les practica el preconditionamiento isquémico. Se obtienen diferencias estadísticamente significativas a favor del grupo preconditionamiento:

- Mejora el intercambio gaseoso del injerto (sangre venosa pulmonar).
- Disminuye los niveles de citoquinas pro-inflamatorias: IL-1 y TNF- α .
- Disminuye los niveles de lipoperóxidos , lo cual indica un menor daño celular.
- Disminuye los niveles de mieloperoxidasa, que refleja una menor activación leucocitaria.
- Disminuye los niveles de NO y NO sintetasa inducible, que están relacionados con los efectos deletéreos del mismo; mientras que aumenta los niveles de NO sintetasa endotelial y neuronal que están relacionados con los efectos beneficiosos del Nítrico.

Los efectos del preconditionamiento isquémico se ponen de manifiesto desde fases muy iniciales del síndrome de isquemia reperfusión (hasta 30 minutos post-reperfusión) y pueden estudiarse gracias a nuestro modelo experimental de autotrasplante pulmonar en el cerdo.

En conclusión podríamos afirmar que, según los resultados de nuestro estudio, el preconditionamiento isquémico clásico podría constituir una herramienta terapéutica eficaz a la hora de modular las alteraciones producidas como consecuencia del síndrome de isquemia reperfusión pulmonar.

The present study aims at analysing the effect of classic ischemic preconditioning on the ischemia-reperfusion syndrome throughout an experimental model of lung autotransplant in pigs. In order to clarify the terminology, let us specify that that this type of injury occurs when an organ or system is deprived of blood flow during a certain period of time after which it is subsequently restored. It is true that, regarding certain organs and systems, it is a widely studied phenomenon, but this is not the case when referring to the lungs.

Even though the pathophysiology of this syndrome is very complex and not entirely known up to now, the amount of research which intends to explain the different mechanisms that it involves is increasing. Therefore, in this sense, it could be stated both that lung ischemia triggers a complex proinflammatory response, including a high number of inflammatory mediators, and that it stimulates important local injury. In addition, when the blood flow is restored these inflammatory mediators reach systemic circulation, and amplify initial inflammatory response with the consequent systemic repercussions.

The experimental model presented in this study is on left lung pulmonary pneumonectomy, with later reimplantation of the left lower lobe of the lung in pigs. Concerning the procedure itself, first of all, the animals involved were divided in two different groups:

- the experimental group, in which classic ischemic preconditioning was carried out just before finishing the left pneumonectomy, by clamping the left pulmonary artery during two periods of 5 minutes each, followed by 5 minutes of reperfusion each of them. After that, definitive clamping of left pulmonary artery was performed.
- and the control group, in which no preconditioning was carried out before the surgery.

Once the pneumonectomy was done, a cranial lobectomy ex situ followed by the lower left lobe reimplantation was performed. The graft reperfusion was removed after 30 minutes. When the experiment was finished, the animal was killed by increasing anaesthetic depth and administering potassium chloride which causes death by cardioplegia.

Samples were collected in five different moments in each experiment:

1) Basal: artery blood for arterial gasometry was extracted and a hemodynamic study was carried out 30 minutes after the thoracotomy was performed.

2) Pre-pneumonectomy: before completing the left lung pneumonectomy procedure, we perform there was a new hemodynamic study, a new another arterial gasometry and a biopsy of a pulmonary tissue extraction (cranial lung lobe). In this momentomoment, the animal remains under unipulmonary ventilation.

3) Pre-reperfusion: before the left lower lobe reperfusion and ventilation, another hemodynamic study, arterial gasometry and lung biopsy were carried out.

4) 10 min. Post-reperfusion: the same procedure was repeated 10 minutes after graft reperfusion.

5) 30 min Post-reperfusion: the same procedure was performed after 30 minutes of graft reperfusion, just before finishing the clinical trial.

Hemodynamics, gasometrics and different biochemical parameters, together with lung oedema were analysed. Data are shown as the media and the standard deviation. In order to check the normality of the values the “Kolmogorov-Smirnov” test was performed. The reason for using a non parametric test was that the data were not distributed according to the normal. Furthermore, the “Mann-Whitney U” test was applied in order to find differences between the two groups. The statistical significance was $p < 0,05$ and SPSS 14.0 (SPSS Inc, Chicago, USA) was used so as to analyse the statistic values. Finally, the two experimentation groups presented neither differences from the demographic data and surgery time point of view, nor statistically significant differences regarding hemodynamics and lung oedema.

With respect to the results, it has to be noted that lower inflammatory response, and lower biochemical and gasometric alteration were found in the group of pigs that went under ischemic preconditioning than in the other one. In addition, the following important differences pro preconditioning group were also obtained:

- o Ischemic preconditioning improved graft oxygenation (venous pulmonary blood).
- o Ischemic preconditioning decreased proinflammatory cytokines: IL-1, TNF- α .
- o Ischemic preconditioning decreased levels of lipoperoxides, which implied less cellular injury.
- o Ischemic preconditioning decreased levels of mieloperoxidase, which entailed less leukocyte activation.
- o Ischemic preconditioning decreased levels of NO and NOS inducible, that are related to deleterious effects; and it also increased the levels of endothelial and neural NOS, that are related to the benefits of NO.

It has to be noted that this lower affectation is evidenced from the very early stages of the ischemic-reperfusion syndrome (up to 30 minutes postreperfusion) and it can be studied thanks to our experimental model of lung autologus transplantation in pigs.

In conclusion, it can be said that, according to the results of our study, classic ischemic preconditioning could constitute an effective therapeutic tool when modulating consequent alterations produced by lung ischemic reperfusion syndrome.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. SÍNDROME DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN

La privación de flujo sanguíneo a un determinado tejido (periodo de isquemia) y su posterior restablecimiento (periodo de reperfusión), origina una serie de alteraciones conocidas como síndrome de isquemia-reperfusión (SIR).

Cada tejido presenta una sensibilidad y resistencia frente a la isquemia. Así por ejemplo, el cerebro resiste pocos minutos, mientras las extremidades pueden soportar hasta horas de isquemia. Otro factor que influye en el desarrollo del SIR es la rapidez de instauración de la isquemia, es decir, si se produce de forma aguda o, por el contrario, se instaura de forma crónica. Además, la falta de flujo sanguíneo puede ser total o parcial.

En la práctica clínica existen numerosas situaciones en las que se puede desarrollar un SIR, siendo el caso de los trasplantes el más llamativo. Tras un trasplante, el SIR es una de las principales causas que intervienen en la pérdida del órgano trasplantado. Para evitarlo, se han desarrollado diferentes estrategias de preservación del injerto, mediante diferentes tipos de isquemia y soluciones de preservación. Además, el SIR puede desencadenarse tras infartos, síndrome de aplastamiento, incluso situaciones de bajo gasto cardiaco y choque.

El SIR presenta una fisiopatología compleja y no del todo conocida. En general, podemos hablar tanto de lesiones en la fase isquémica, como en la fase de reperfusión:

- Durante la fase de isquemia, se producen lesiones relacionadas con la falta de oxígeno. Se alteran los fenómenos respiratorios celulares, y el metabolismo aerobio se transforma en anaerobio. Además, aumenta el ácido láctico con la consiguiente acidosis metabólica. En este contexto, se produce una alteración del gradiente transmembrana, que genera un aumento del calcio citosólico. El incremento del calcio intracelular activa numerosos sistemas enzimáticos, entre los que se encuentran lipasas y proteasas que están implicadas en la respuesta inflamatoria. También se activa el sistema de la xantina oxidasa, implicada en la producción de radicales libres de oxígeno (RLO), de gran importancia etiopatogénica en el SIR (1).
- La reperfusión, implica la nueva entrada de sangre y oxígeno. Supone también el paso de sustancias tóxicas desde el tejido isquémico al resto del organismo. Los metabolitos tóxicos resultantes de la isquemia reaccionan con el oxígeno, produciéndose una multiplicación de mediadores inflamatorios. De hecho, la fase de reperfusión se ha relacionado con la mayor parte de las lesiones que se producen en el SIR. Hay que señalar que, al inicio de la reperfusión, aparecen una serie de lesiones diferentes a las que tienen lugar 4-6 horas después.

Todo lo anteriormente expuesto genera daño tanto a nivel local como a nivel sistémico. A nivel local, por ejemplo en el caso del pulmón, se produce aumento de la permeabilidad microvascular y acúmulo de neutrófilos, macrófagos y linfocitos, pudiéndose desarrollar edema pulmonar no cardiogénico (2) (distrés respiratorio).

A nivel sistémico se desarrolla acidosis metabólica hiperkaliémica, destrucción muscular con mioglobulinemia y mioglobinuria. El fracaso multiorgánico es la máxima expresión de una respuesta inflamatoria desmesurada provocada por el SIR. Se dañan órganos y sistemas que en principio no estaban afectados por el SIR (lesiones a distancia). El primer órgano afectado suele ser el pulmón, lo que puede provocar insuficiencia respiratoria en las primeras 24-72h post-reperfusión y que puede finalmente conducir a un distrés respiratorio. Posteriormente se suelen afectar el hígado, el riñón, el sistema gastrointestinal, el corazón (3) y, finalmente, el sistema nervioso central (4).

Se han descrito tres tipos de isquemia a la que se somete al injerto:

- 1) **Isquemia caliente:** se produce interrupción del flujo sanguíneo del injerto, pero la temperatura se mantiene al mismo nivel que la que tiene en condiciones fisiológicas.

- 2) **Isquemia fría:** se desarrolla con el injerto fuera del organismo, a baja temperatura (4°C) con el fin de disminuir los requerimientos metabólicos al máximo antes de la reimplantación. La hipotermia, además de disminuir la tasa metabólica, disminuye la destrucción de componentes celulares esenciales, pero, a su vez, provoca la activación de mediadores inflamatorios que son deletéreos para el injerto y que contribuyen a la fisiopatología del SIR pulmonar.

- 3) **Isquemia tibia:** el injerto se mantiene a una temperatura entre 12-14°C durante el menor tiempo posible, hasta que es posible implantarlo en el donante. Este tipo de isquemia se comienza a desarrollar con la mejora del manejo de donantes en asistolia, donde es fundamental la preservación de los órganos hasta que se puede hacer la explantación de los mismos.

1.2. SÍNDROME DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN PULMONAR

El SIR ha sido ampliamente estudiado en diferentes órganos y sistemas como corazón, hígado o riñón. Clásicamente se pensaba que el pulmón no se veía afectado por este síndrome, ya que estaría protegido por el oxígeno alveolar y la presencia de doble circulación sanguínea(5) (la procedente de la circulación pulmonar y la procedente de la circulación sistémica a través de las arterias bronquiales). Pero la realidad es que el pulmón es un órgano afecto por el SIR, que se pone de manifiesto en numerosas situaciones clínicas. En concreto, podemos hablar de SIR a nivel pulmonar en caso de:

- Trasplante pulmonar (último escalón terapéutico en múltiples patologías, como son la fibrosis quística y las bronquiectasias, la hipertensión pulmonar primaria, la fibrosis pulmonar idiopática y el enfisema pulmonar).
- Angioplastia de las arterias pulmonares.
- Resección de tumores pulmonares ex- situ.
- Situaciones de bajo gasto cardiaco y choque.
- Fracaso multiorgánico.
- Ventilación unipulmonar.

La importancia del SIR a nivel pulmonar radica, entre otras cosas, en que constituye la segunda causa más importante implicada en la pérdida del órgano trasplantado tras el rechazo inmunológico. Además, se considera la primera causa de disfunción primaria del injerto, aumenta el riesgo de rechazo agudo y, a medio y largo plazo, aumenta el riesgo de rechazo crónico por bronquiolitis obliterante (6). Por todo ello, el SIR pulmonar aumenta significativamente la morbi-mortalidad temprana tras un trasplante pulmonar. Puede afectar hasta al 25% de los pacientes que reciben un trasplante pulmonar y se ha asociado a la fase de isquemia caliente durante la implantación del órgano. Aparece a pesar de mejorar el manejo del donante, del órgano a trasplantar y del receptor.

El estudio de los fenómenos implicados en el SIR pulmonar es de gran importancia para desarrollar estrategias terapéuticas que ayuden a prevenirlo y tratarlo. La mayoría de las estrategias terapéuticas, van encaminadas a modular la respuesta inflamatoria a nivel post-transcripcional, es decir, una vez que se han sintetizado los mediadores (proteínas) inflamatorias. Pero cada vez hay más líneas de investigación dirigidas a inhibir la respuesta inflamatoria a nivel pre-transcripcional, es decir, antes de que se sinteticen las proteínas.

El SIR que tiene lugar tras un trasplante pulmonar, ocurre típicamente en las primeras 72h post-trasplante y se caracteriza por daño alveolar inespecífico, edema pulmonar (alveolar e intersticial) e hipoxemia, todo ello en grado variable (7). Clínica y radiológicamente, el SIR se caracteriza por la aparición de infiltrados pulmonares (desde un leve infiltrado radiológico hasta un cuadro de distrés respiratorio del adulto) e hipoxemia.

A nivel pulmonar, ya hemos visto que existe una característica especial que lo hace diferente frente a otros órganos, la presencia de oxígeno en los alveolos que protegería al órgano durante la fase de isquemia, manteniéndose el metabolismo aerobio y previniendo la hipoxia. Se trataría pues de ***“isquemia pulmonar no hipóxica”***. Hay que distinguir entre el estrés oxidativo que tiene lugar como consecuencia de la isquemia y el que se produce como consecuencia de la hipoxia-anoxia (5).

- Durante la hipoxia y finalmente la anoxia, se produce un descenso brusco del ATP, lo que resulta en un incremento de la hipoxantina. La hipoxantina, al reintroducirse el oxígeno durante la reperfusión, dará lugar a la aparición de radicales libres de oxígeno (RLO).

- Durante la isquemia, las células endoteliales detectan el descenso del flujo sanguíneo y se produce una despolarización de su membrana. Se activa entonces la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH oxidasa), el factor nuclear kB y la óxido nítrico sintetasa (NOS) dependiente de calcio/calmodulina. También se produce un aumento de integrinas, selectinas y endotelina 1. Todo ello está implicado en la síntesis de RLO y en la respuesta inflamatoria (8, 9). Los RLO producen peroxidación de las membranas lipídicas de las células y, finalmente, la lisis y muerte celular (figura 1).

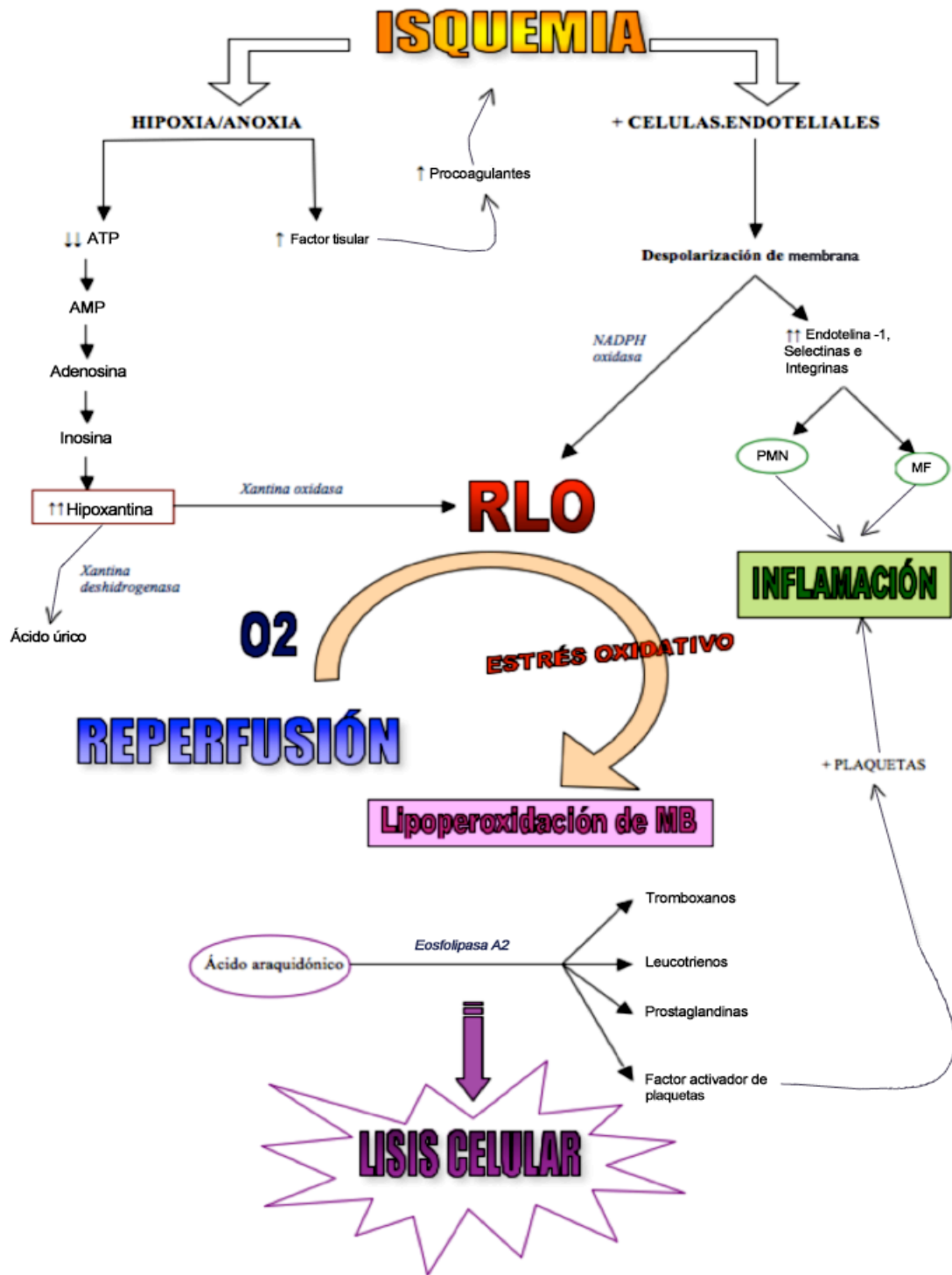


FIGURA 1. Esquema de del daño producido por la isquemia y la hipoxia-anoxia.

MB: membrana; RLO: radicales libres de oxígeno; PMN: polimorfonucleares neutrófilos; MF: macrófagos; ATP: adenosin trifosfato; AMP: adenosin monofosfato.

Existen diferentes mecanismos etiopatogénicos implicados en el SIR pulmonar:

1. Aumento del estrés oxidativo y síntesis de RLO.
2. Activación de la respuesta inflamatoria
3. El metabolismo del óxido nítrico.

Además, otros mecanismos implicados estarían relacionados con la alteración de la síntesis de fosfolípidos del surfactante pulmonar y con la hipotermia, que provoca inactivación de la bomba Na/K, aumento del calcio intracelular y aumento de los niveles de hierro (10).

1.2.1. Estrés oxidativo

Tiene un papel crucial en la fisiopatología del SIR. Consiste en la formación de RLO como son el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. Son sustancias muy inestables, sobre todo el radical hidroxilo, lo que quiere decir que reaccionan con facilidad con otras sustancias. Atacan los enlaces insaturados de los ácidos grasos libres de la membrana celular, alterando no sólo la bicapa lipídica sino numerosos sistemas enzimáticos y receptores celulares. Como consecuencia, se producen graves alteraciones estructurales en la célula, provocando la lisis celular. Todo este proceso recibe el nombre de “*lipoperoxidación de membrana*”, y durante la misma se generan aldehídos, entre ellos el malondialdehído (MDO) cuya determinación es útil para medir el grado de lipoperoxidación de forma indirecta (7).

La síntesis de RLO se produce fundamentalmente a través de dos vías:

- a) Acúmulo de hipoxantina. Sistema xantina oxido-reductasa.
- b) Vía NADPH.

a. Acúmulo de hipoxantina. Sistema Xantina oxido-reductasa:

La hipoxantina es un producto de degradación de las purinas, y es metabolizado por un sistema enzimático llamado “*Xantina oxido-reductasa*” (XOR). Este sistema cataboliza los dos últimos pasos del metabolismo de las purinas (figura 2).

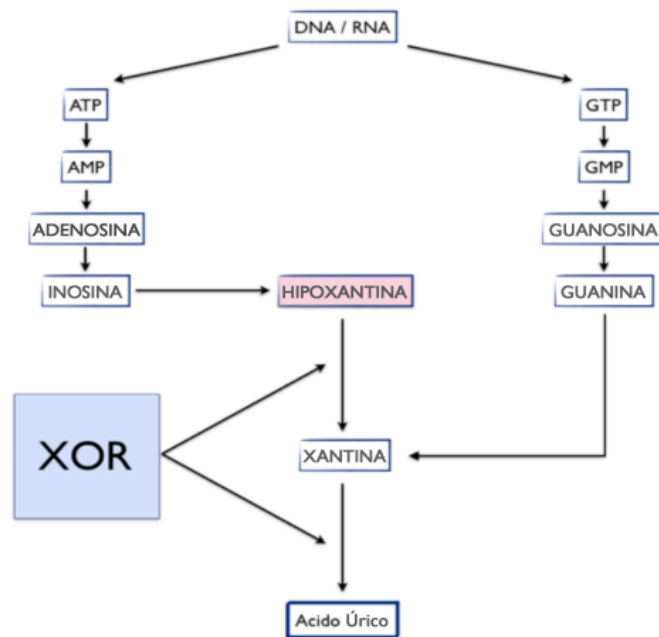


FIGURA 2. Metabolismo de las purinas.

ADN: ácido desoxirribonucleico; RNA ácido ribonucleico; ATP: adenosin trifosfato; AMP: adenosin monofosfato; GTP: guanosin trifosfato; GMP: guanosin monofosfato; XOR: xantina oxido-reductasa.

Es un sistema enzimático presente en casi todas las especies, y en numerosas células de órganos como el intestino y el hígado.

Interviene en multitud de reacciones redox y tiene un papel determinante en la síntesis de RLO (10) (figura 3).

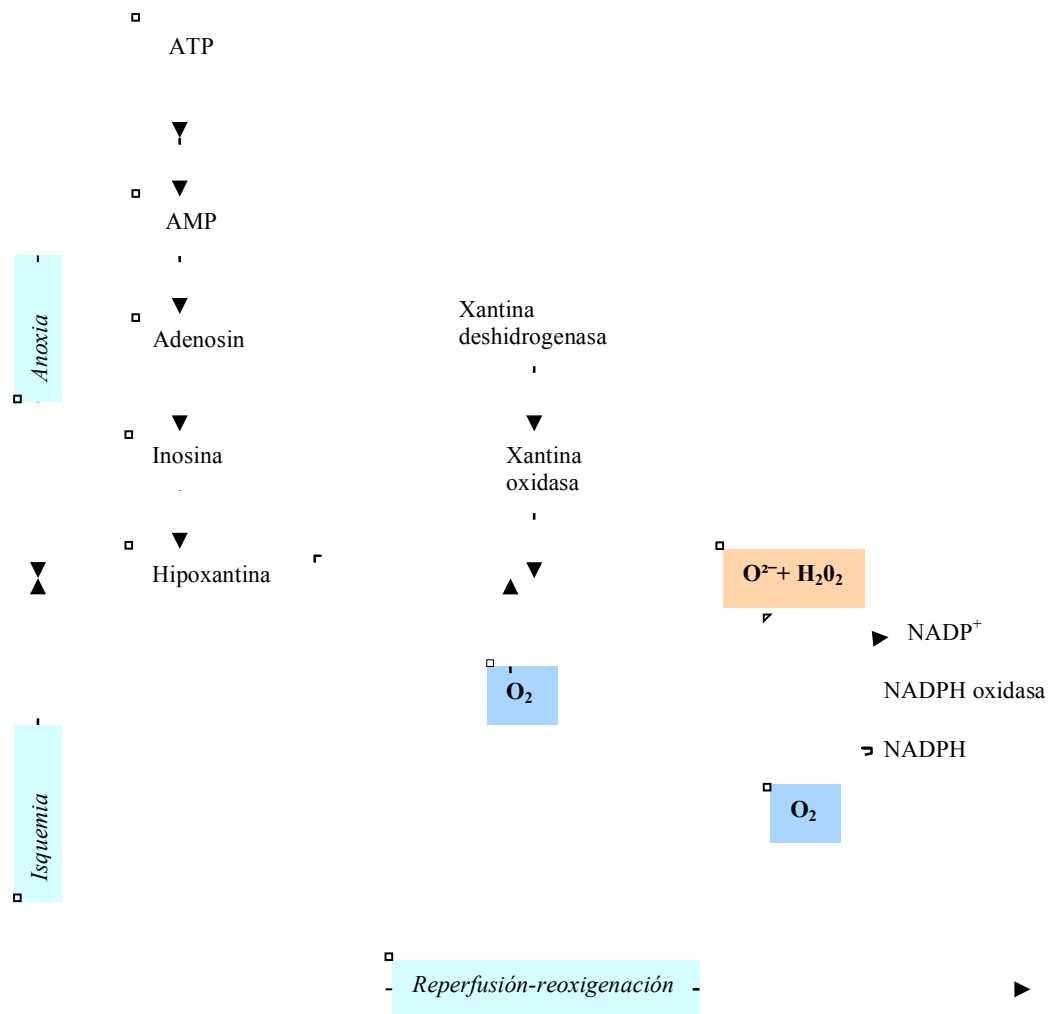


FIGURA 3. Esquema formación de RLO durante la reperfusión-reoxigenación.

La hipoxantina aumenta en condiciones de isquemia, en las que la depleción de oxígeno provoca un importante descenso en los niveles de ATP, que se va degradando a AMP, adenosina, inosina y finalmente a hipoxantina.

En condiciones normales, la enzima predominante es la Xantina deshidrogenasa (constituye hasta el 90% en el tejido sano), que metaboliza la hipoxantina para formar ácido úrico sin producir RLO.

Pero en condiciones de hipoxia, aumenta la actividad de la Xantina oxidasa, que necesita oxígeno para actuar, por eso, durante la reperfusión y la llegada de oxígeno, esta enzima degrada la hipoxantina generando RLO (6).

El aumento de la hipoxantina y de la xantina oxidasa tiene lugar cuando la tensión alveolar de oxígeno cae por debajo de los 7 mmHg durante la isquemia.

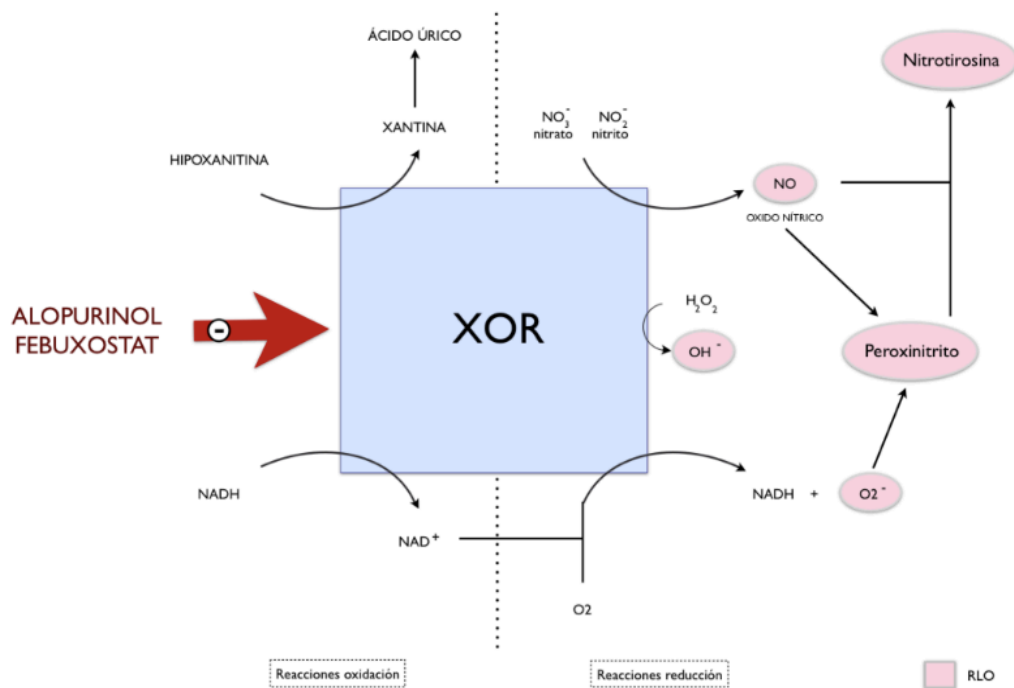


FIGURA 4. Reacciones en las que interviene el Sistema Xantina Oxidorreductasa.

XOR: complejo xantina óxido reductasa; NADH: nicotinamida_adenina dinucleotido fosfato.

El alopurinol bloquea la Xantina oxidasa, aunque sus resultados son discretos en cuanto a la prevención del SIR (11). Otro fármaco en estudio, el febuxostat parece tener resultados prometedores bloqueando el sistema enzimático (10).

Parece ser que la hipoxia aumenta la actividad enzimática del sistema XOR no sólo de forma precoz (se ha visto que aumenta la actividad a las 4 horas del daño

isquémico), sino que también aumentaría el mRNA del XOR tras días de estímulo.

El cómo produce el sistema XOR daño a nivel pulmonar, se debe a diferentes mecanismos patogénicos, en íntima relación, por supuesto, con la producción de RLO. Hay diferentes estímulos que aumentan la síntesis de XOR, entre ellos destacan (10):

- hipoxia
- citoquinas: $TNF\alpha$, $IL\ 1\beta$, γIFN
- estrés mecánico, en concreto la ventilación pulmonar con altos volúmenes tidal: aumenta la síntesis de MAP kinasas p38, ERK5, ERK $\frac{1}{2}$
- endotoxinas

Todo ello incrementa XOR y con ello la producción de RLO, que provocan daño pulmonar de las siguientes formas:

- aumentando el fluido proteináceo alveolar
- aumentando los polimorfonucleares neutrófilos (PMN)
- aumentando la permeabilidad vascular
- disminuyendo el surfactante, tanto en cantidad, como en calidad
- parece ser que podrían alterar el citoesqueleto celular

Por otro lado, cabe mencionar, que la isquemia disminuye la actividad de la bomba Na/K, lo que favorece la entrada masiva de calcio al interior de las células. Esto activa diferentes proteasas, que tienen la capacidad de aumentar la

forma xantina oxidasa y producir RLO. Existen numerosos estudios que han demostrado que la administración al donante de calcio antagonistas, como el verapamilo, diltiazem o nifedipino, disminuyen este efecto (12).

b. Vía de la NADPH (Nicotinamida-Adenina Dinucleotido Fosfato):

Este mecanismo se encuentra en la membrana de los neutrófilos y de los monocitos macrófagos. Cataliza la reducción de oxígeno molecular a peróxido de hidrógeno y anión superóxido (13). Entre las dos vías de producción de RLO existen interrelaciones, de tal manera que una vía puede estimular/inhibir a la otra (el peroxidonitrito y el nítrico inhiben la XOR y la NADPH oxidasa de los leucocitos, mientras que estas últimas estimulan la síntesis de los primeros). Parece ser que el anión superóxido que se genera por acción del sistema XOR a nivel endotelial, tiene la capacidad de estimular la expresión de moléculas de adhesión en los neutrófilos y con esto la migración de los mismos.

El hierro parece tener un papel significativo en el desarrollo del estrés oxidativo del SIR, ya que se trata de un elemento esencial, pero que en circunstancias de estrés puede resultar tóxico por su alto poder oxidante.

Se ha demostrado el aumento de daño tisular durante el SIR, si se aportaban suplementos de hierro. Además, parece ser que la desferroxamina, que es un quelante del hierro, ofrece protección a este respecto (14).

Los RLO además de presentar efectos nocivos para el pulmón, como hemos visto con anterioridad, tienen también efectos positivos que cabe mencionar.

Favorecen la homeostasis, intervienen en la mitosis y diferenciación celular, y sirven como mecanismos señalizadores (13).

El organismo tiene una serie de mecanismos fisiológicos que le permiten protegerse del estrés oxidativo. Entre ellos destacan los siguientes sistemas enzimáticos: la superóxido dismutasa (SOD), la GSH-peroxidasa y la hemoxigenasa (HO). El sistema HO es uno de los más importantes. Se encarga de metabolizar el grupo hemo y transformarlo en CO, biliverdina y hierro (11-13).

1.2.2. Mediadores inflamatorios

Como consecuencia de los fenómenos resultantes del estrés oxidativo que se han descrito con anterioridad, se desencadena en el pulmón dañado una compleja respuesta inflamatoria en la que participan diferentes células, así como diferentes mediadores inflamatorios.

De entre los mediadores inflamatorios, destacan las citoquinas, el sistema de complemento y las moléculas de adhesión celular. Estos mediadores pueden medirse en los tejidos dañados y sirven para cuantificar de alguna manera la respuesta inflamatoria.

a) **las citoquinas**: son glicoproteínas de bajo peso molecular (menos de 30kDa). Son secretadas fundamentalmente por los macrófagos y secundariamente por los linfocitos T.

Se unen a receptores específicos de membrana y activan cascadas de transducción intracelular. Alteran la expresión de determinados genes lo que finalmente produce una respuesta biológica concreta. La producción de citoquinas suele ser transitoria y limitada al lapso de tiempo que dura el estímulo. Dentro de las citoquinas se agrupan las interleuquinas, las quimioquinas, los interferones, factores estimulantes de colonias, factores de crecimiento y factores de necrosis tumoral (13, 15-24). De todos ellos, los más importantes son las interleuquinas y el factor de necrosis tumoral (TNF).

Las **interleuquinas** son un conjunto de proteínas solubles de bajo peso molecular. Son sintetizadas principalmente por los leucocitos, aunque también pueden producirlas las células endoteliales, o el estroma del timo y la médula ósea (15). Se conocen al menos 33 subtipos diferentes de interleucinas y difieren tanto desde el punto de vista bioquímico, como biológico. Así por ejemplo, las IL-4, IL-10, IL-11 presentan efectos beneficiosos para el organismo, mientras que las IL-1(α y β), IL-6 e IL-8 presentan efectos deletéreos a la par que su función defensiva (15, 16).

La **IL-1** fue históricamente una de las primeras interleuquinas descritas. Está codificada en el cromosoma 2. Es una interleuquina sintetizada fundamentalmente por el macrófago activado. Existen tres formas de esta interleuquina: *IL-1 α* que suele ejercer efectos paracrinós en las células colindantes; *IL-1 β* secretada al torrente sanguíneo y relacionada con los efectos clásicos de la IL-1; *IL-1RA* que actúa como antagonista bloqueando la unión de la IL-1 α y β con sus receptores correspondientes (17).

La IL-1 está implicada en fenómenos inflamatorios al provocar la liberación de histamina por parte de los mastocitos. Además, tiene efectos quimiotácticos sobre los granulocitos (18). Aumenta la liberación de mediadores inflamatorios como las prostaglandinas, leucotrienos e IL-8. Está relacionada con la síntesis de RLO en el SIR pulmonar (19) y es una de las principales interleuquinas implicadas en la etiopatogenia del SIR.

El **TNF- α** es una glicoproteína de 185 aminoácidos, que procede de un péptido mayor, de 212 aminoácidos. Es un mediador inflamatorio local y su principal papel consiste en mantener localizadas las infecciones. Pero a nivel sistémico sus efectos pueden tener consecuencias negativas para el sujeto y se ha implicado en el síndrome de choque séptico y la coagulación intravascular diseminada(20). Sus efectos se deben a su unión con dos receptores celulares diferentes que se localizan en neutrófilos, células endoteliales y fibroblastos. El TNF- α produce activación del endotelio a nivel local y liberación de óxido nítrico con vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular.

Como consecuencia, se reclutan células inflamatorias, inmunoglobulinas y complemento y se activan linfocitos T y B. Aumenta la activación y agregación plaquetaria que pueden producir oclusión microvascular (21, 22).

La IL-1 y el TNF- α se incrementan anormalmente en el tejido pulmonar a los 30 minutos de cesar la isquemia, y por tanto se han relacionado con la lesión pulmonar del SIR (23, 24).

Parece ser que estas citoquinas modulan el proceso de extravasación y migración leucocitaria (18). Son por tanto claves en la etiopatogenia del SIR.

- b) **Sistema de complemento:** forma parte de la cascada inflamatoria que acontece en el SIR pulmonar y se relaciona con daño vascular y tisular, así como con el reclutamiento y la activación leucocitaria (25). Está implicado en el SIR, activándose de forma precoz, localmente, durante la reperfusión, y constituye un potente estímulo inflamatorio (26-28).
- c) **Moléculas de adhesión:** En el endotelio pulmonar se van a sintetizar numerosas moléculas de membrana y factores quimiotácticos que tienen un papel determinante en el reclutamiento de células inflamatorias (29-31). Las **integrinas**, las **selectinas** y las **inmunoglobulinas** son algunas de ellas. Se sintetizan otras muchas como la proteína quimiotáctica del monocito-1 y la CINC (citoquina quimiotáctica del neutrófilo). Bloqueando algunas de estas moléculas se ha conseguido una disminución del daño provocado durante el SIR (31).

En resumen, la respuesta inflamatoria implica numerosos tipos celulares y mediadores moleculares que interrelacionan entre sí de forma compleja (figura 5). Además la evidencia clínica y experimental sugiere que esta interrelación tiene lugar de forma bifásica:

- En la fase temprana de la reperfusión, los macrófagos activados del donante mediarían el daño precoz.

- En una segunda fase, más tardía, el daño depende fundamentalmente de los linfocitos y neutrófilos del receptor que serían los responsables de la perpetuación del daño que acontece tras la reperfusión del órgano trasplantado (32-34). Se están estudiando terapias encaminadas a bloquear los linfocitos del donante para disminuir el daño del SIR (35).

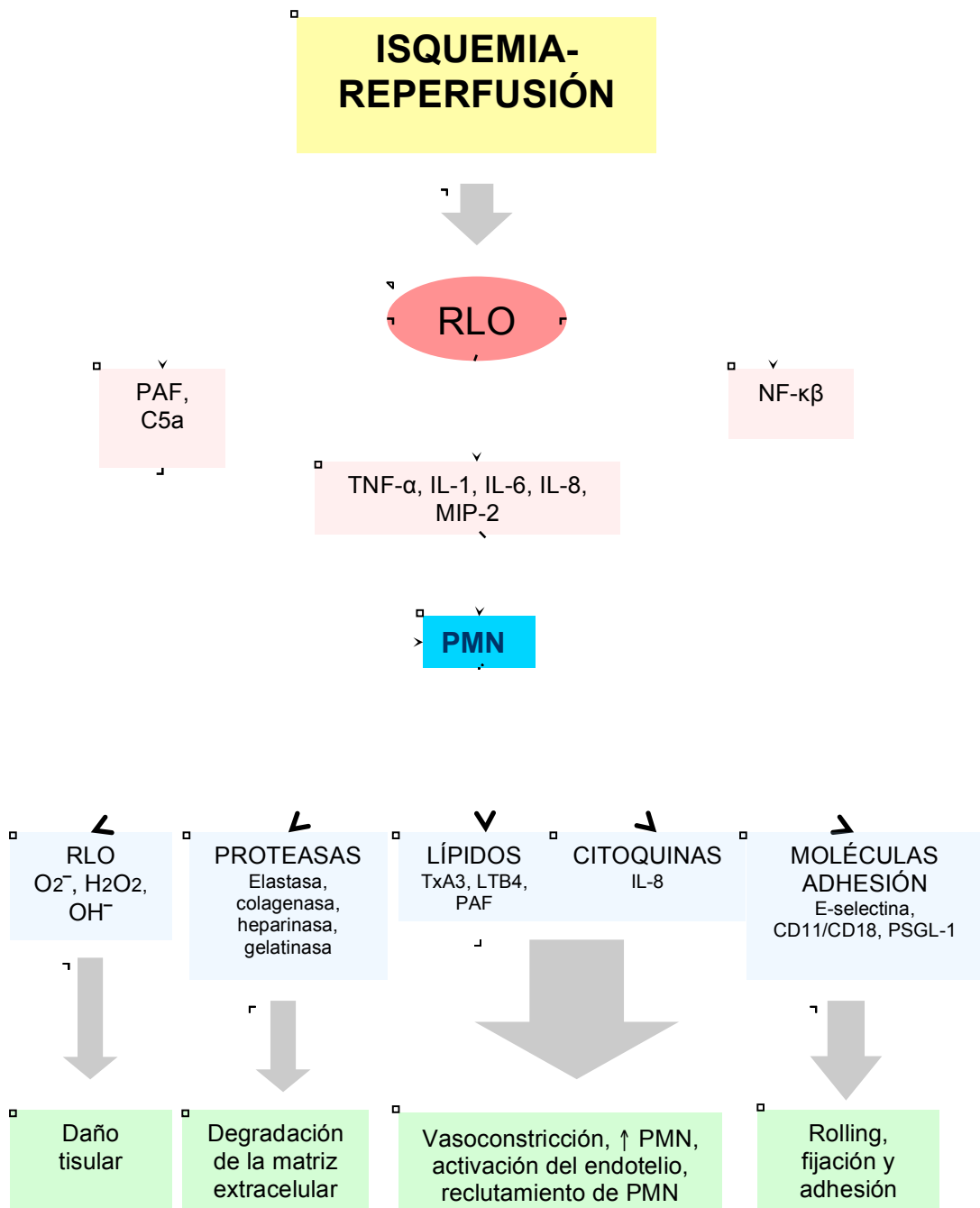


FIGURA 5. Esquema de respuesta inflamatoria

PAF: factor activador de plaquetas; NF- κ B: factor nuclear κ B; MIP-2: proteína inflamatoria del macrófago 2; RLO: radicales libres de oxígeno; TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa; IL: interleuquina; TxA3: tromboxano A3; LTB4: leucotrieno B4; PAF: factor activador de plaquetas; PSGL-1: glicoproteína P-selectina 1;

1.2.3 Metabolismo y papel del óxido nítrico (NO)

En 1980, en relación con unos estudios fisiológicos orientados a conocer la regulación de la presión sanguínea, se identificó el llamado “*factor relajante del endotelio*”, que participaba en el mantenimiento del tono muscular de los vasos sanguíneos. Años después se demostró que este factor era en realidad el NO. A partir de entonces, han sido numerosos los estudios cuyo objetivo ha sido conocer el papel del NO en diferentes situaciones, tanto fisiológicas como patológicas (36-39)

El NO es un gas incoloro a temperatura ambiente y 1 atmósfera de presión. Es una molécula apolar y su solubilidad máxima en agua es similar a la del O₂ (36). El NO se produce cuando el aminoácido L-arginina es metabolizado por la enzima NO sintetasa (NOS), para la obtención de L-citrulina (figura 6). En ese proceso se libera NO (38).

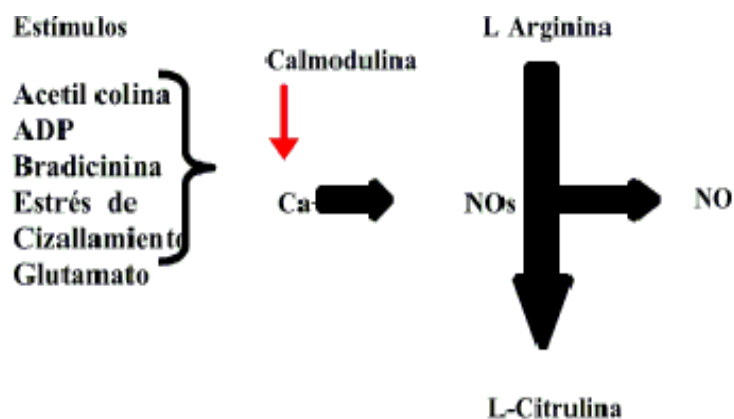


FIGURA 6: metabolismo del NO

Existen 3 formas de este enzima:

1) NOS I o neuronal (nNOS): es una de las formas constitutivas del enzima. Está presente en las neuronas tanto del sistema nervioso central como del autonómico. A este nivel, el NO actúa fundamentalmente como neurotransmisor (38).

2) NOS III o endotelial (eNOS): es la otra forma constitutiva del enzima. El NO presenta una serie de efectos beneficiosos cuando se origina gracias a este enzima y son los siguientes: vasodilatación, inhibe la agregación y adhesión plaquetaria e inhibe la migración leucocitaria. Para las dos formas constitutivas de la NOS, es necesaria la presencia de Calcio para funcionar. La síntesis de eNOS disminuye en condiciones de hipoxemia y acidosis (37).

3) NOS II o inducible (iNOS): es la forma enzimática que aparece en condiciones patológicas, como durante la respuesta inflamatoria del SIR.

Presente fundamentalmente en macrófagos. El NO sintetizado a partir de esta vía presenta por un lado efectos beneficiosos al actuar como antimicrobiano inhibiendo la síntesis de ADN y movilizándolo los depósitos de hierro de los tejidos (38). Sin embargo, en condiciones patológicas, como el SIR, el incremento de la actividad de la iNOS da lugar a un aumento excesivo de NO, facilitando la síntesis de nuevos RLO; el NO reacciona con el anión superóxido, dando lugar a peroxinitrito, un RLO capaz a su vez de reaccionar con el NO para producir nitrotirosina, considerada como un marcador de estrés oxidativo dependiente de NO (37, 40)(figura 4).

El NO inhalado, se utiliza con frecuencia en el trasplante pulmonar ya que disminuye los días de ventilación mecánica y la estancia en unidades de críticos, pero no parece disminuir el daño por reperfusión que surge como consecuencia del propio trasplante (39).

1.3 ESTRATEGIAS PARA MODULAR EL SÍNDROME DE ISQUEMIA REPERFUSIÓN

El objetivo fundamental a la hora de modular el SIR consiste de alguna manera en conseguir disminuir los efectos deletéreos de la respuesta inflamatoria que acontece y que hemos visto anteriormente, tanto a nivel local, como a nivel sistémico. En esta respuesta tienen un papel determinante los RLO. Así, al menos teóricamente, podríamos actuar sobre diferentes momentos del SIR:

1.3.1 Disminución del estrés oxidativo

1.3.1.1 Controlando la producción de RLO: El Alopurinol es un inhibidor de la Xantina oxido-reductasa, y su administración podría disminuir los RLO (40). El febuxostat es otro fármaco hipouricemiente capaz de inhibir la Xantina óxido-reductasa y disminuir así el acúmulo de hipoxantina necesario para la producción de RLO (41).

1.3.1.2 Inhibiendo la estimulación y la migración de los polimorfonucleares neutrófilos: a este nivel parecen tener un papel determinante la administración de corticoides antes del inicio de la isquemia. Sin embargo, los estudios clínicos en humanos no resultan tan prometedores (42).

1.3.1.3 Atrapando los RLO del torrente sanguíneo: se utilizan sustancias denominadas “*scavengers*”. Han de ser administrados rápidamente de tal forma que sean capaces de quelar los RLO antes de que difundan a los tejidos. Así se han empleado el manitol (43) y el dimetil sulfóxido (44).

1.3.1.4 Aumentando la capacidad antioxidante del organismo: Con esta finalidad se ha experimentado con resultados variables con las vitaminas E y C (45) y con enzimas como la superóxido dismutasa y las catalasas (46)

1.3.2 Soluciones de preservación

Entre las soluciones de preservación que han demostrado un importante papel protector en el trasplante de órganos destacan la **solución LPD-Glucosa** (Perfadex®) y la **solución de Wisconsin**. La primera se asocia a una tasa más baja de disfunción primaria del injerto y permite tiempos de isquemia fría de hasta 12 horas, pero tiene un elevado coste económico (47).

La **solución de Wisconsin** contiene ATP, glutatión, alopurinol e insulina, y no contiene glucosa; incorpora el lactobionato que actúa como estabilizador de membrana y captura RLO; como fuente nutritiva contiene resinoso; previene de la acidosis intracelular y del edema celular e intersticial; y no produce tanta depleción de ATP como otras soluciones (48).

1.3.3 Precondicionamiento isquémico

El concepto de precondicionamiento isquémico consiste en que, paradójicamente, periodos de isquemia controlada, parecen proteger a los órganos y tejidos del daño que supone una isquemia más prolongada. En los primeros estudios que se hicieron al respecto, consiguieron estos periodos de isquemia controlada mediante procedimientos mecánicos, es decir, pinzando las arterias correspondientes. Es el llamado precondicionamiento isquémico clásico. Posteriormente se ha descubierto que otras sustancias como los anestésicos halogenados, actuarían de forma similar al precondicionamiento isquémico clásico a la hora de proteger a los tejidos frente a la isquemia (*efecto*

preconditioning-like). Se trataría pues del llamado *precondicionamiento farmacológico*.

1.3.4 Anestésicos halogenados (precondicionamiento anestésico)

Varios estudios sugieren que los halogenados protegen a los tejidos de forma similar al *precondicionamiento isquémico precoz* por activación de canales de potasio dependientes de ATP. A nivel pulmonar existen estudios que muestran su capacidad protectora en el SIR (49-51).

1.3.5 Otras estrategias moduladoras

- Existen estudios que defienden el papel protector en el SIR de diferentes sustancias, entre los que cabría destacar los quelantes del hierro como la deferoxamina (52), inhibidores de las moléculas de adhesión como la pentoxifilina (53, 54), inhibidores del complemento (55), la administración de surfactante exógeno (24, 56-58), antagonistas del factor activador de plaquetas (59), prostaglandinas (60, 61) o el monóxido de carbono (62, 63).

1.4 PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO

1.4.1 Tipos de preconditionamiento isquémico

- Precondicionamiento isquémico clásico: impidiendo el flujo sanguíneo mediante estrategias físicas como pinzar los vasos sanguíneos.

Como principal inconveniente, presenta el estrés sobre el órgano diana y la posibilidad de alterar las estructuras vasculares. También se denomina preconditionamiento mecánico directo.

- Precondicionamiento isquémico remoto: es un concepto introducido recientemente, en el que la IR aplicada a un determinado órgano, confiere protección a otros órganos remotos (64). Es también conocido como preconditionamiento mecánico indirecto.

1.4.1.1 Precondicionamiento isquémico clásico

En 1986, Murry y colaboradores describieron un fenómeno al que denominaron “*precondicionamiento isquémico*”(PCI). En su trabajo, estudiaban el fenómeno de IR en el corazón de perros. Observaron que breves periodos de IR protegían del daño isquémico en el miocardio, disminuyendo hasta en un 25% el tamaño del infarto (65). Este fenómeno se confirmó después en otras especies animales y en otros órganos.

El preconditionamiento isquémico ha sido ampliamente estudiado en órganos como el corazón (65-67), hígado (68, 69), riñón (67) e incluso en extremidades (70), pero no así en el pulmón. Es posible que el PCI constituya una herramienta muy eficaz para modular el SIR a dicho nivel.

Existen multitud de mediadores implicados en el fenómeno, pero los más significativos son los siguientes: NO, canales de potasio dependientes de ATP, adenosina, RLO, el fosfatidilinositol-3-kinasa (PI3K) y la permeabilidad mitocondrial (1, 2, 8, 9). El efecto protector del PCI es bifásico (33) (figura 7):

- **Precoz o Temprano:** se pone de manifiesto en las primeras 2 horas tras el periodo de isquemia. Parece que está relacionado con la modificación de proteínas ya existentes. A nivel cardiaco por ejemplo, este efecto se ha visto que reduce el tamaño del infarto.
- **Tardío:** en este caso, el efecto aparece tras 12-24 horas y puede permanecer hasta 48-72 horas. Incluso hay estudios que defienden que los efectos pueden permanecer hasta 96 horas, incluso semanas. Es el efecto que más beneficio clínico presenta, e implica la síntesis de proteínas nuevas. A nivel cardiaco, no sólo protege del tamaño del infarto, sino que además protege la función ventricular.

Uno de los principales problemas del PCI clásico es la posibilidad de dañar las estructuras vasculares del órgano o tejido que se quiere proteger, con el consiguiente efecto deletéreo añadido a la isquemia posterior (65).

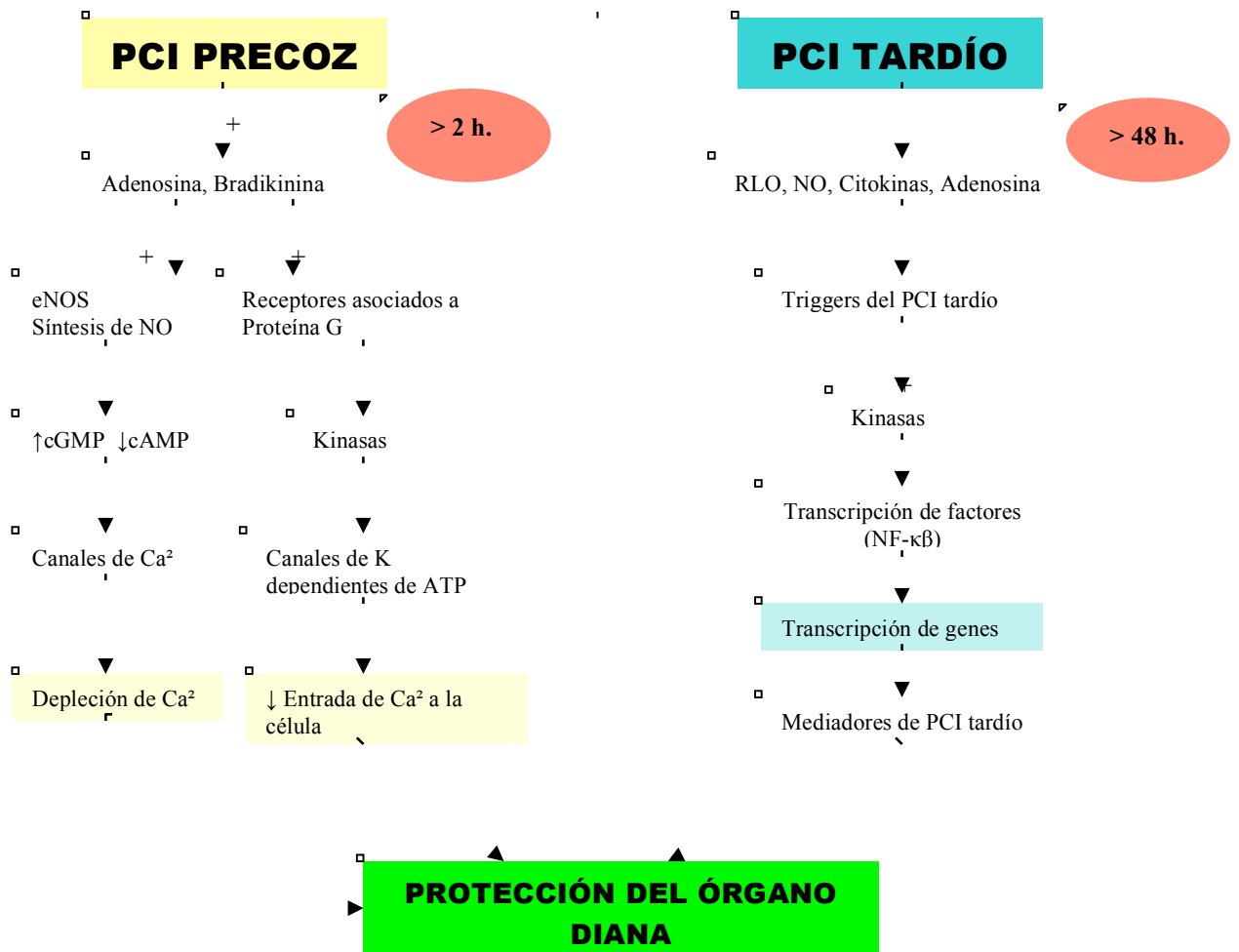


FIGURA 7. Fases del preconditionamiento

PCI: preconditionamiento isquémico; cGMP: guanosin monofosfato cíclico; cAMP: adenosin monofosfato cíclico; RLO: radicales libres de oxígeno; NO: óxido nítrico; NF- κβ: factor nuclear κβ.

1.4.1.2 Precondicionamiento isquémico remoto.

El preconditionamiento isquémico remoto es un concepto relativamente reciente y los mecanismos a través de los cuales el PCI remoto confiere protección son ahora objeto de numerosos estudios.

Parece ser que confiere protección mediante diferentes vías como la neural (por liberación de adenosina y bradikinas), humoral (mediada por adenosina y bradikina)(64).

Estudios recientes sugieren que la aplicación de estrategias de preconditionamiento a nivel pulmonar, pueden proteger a órganos distantes como el hígado de sufrir las consecuencias del SIR pulmonar (69).

1.4.2. Modelos experimentales de isquemia-reperfusión y preconditionamiento isquémico

La literatura médica es prolija en estudios clínicos y experimentales sobre los efectos del SIR, destacando las investigaciones sobre IR cardiaca, hepática y renal. A nivel pulmonar, la mayoría de estudios sobre IR se basan en modelos de trasplante pulmonar con preservación del injerto a baja temperatura (isquemia fría) (71). La mayoría de los estudios experimentales sobre isquemia caliente pulmonar se han realizado en pequeños roedores mediante técnicas de oclusión vascular (19, 72), siendo menos frecuentes aquellos que profundizan en los mecanismos de la IR normotérmica en grandes mamíferos (73, 74). Yamakazi y cols. Observaron que, en perros, el tiempo máximo de isquemia caliente tolerable para la reimplantación del pulmón no ventilado era de 120 minutos (75).

Si deseamos estudiar los efectos de la IR pulmonar normotérmica, en condiciones experimentales que se asemejen a situaciones clínicas como el trasplante lobar de donante vivo o angioplastias complejas de la arteria pulmonar con tiempos de isquemia prolongados, el autotrasplante pulmonar (de un pulmón o un lóbulo) en grandes mamíferos cumple en gran medida este objetivo. La técnica ha sido descrita y aplicada con diferentes fines en perros (75-80) ovejas (73) y cerdos (81, 82).

Para estudiar los efectos del PCI pulmonar se han diseñado diferentes modelos experimentales: oclusión del hilio pulmonar en ratas, conejos (83) y perros (76); oclusión selectiva de la arteria pulmonar en ratas (84); y modelos de pulmón aislado en ratas (85) o cobayas (86), realizado PCI mediante suspensión de la ventilación, de la perfusión o de ambos.

Al igual que ocurre en los modelos de PCI de otros órganos, la duración y el número de ciclos de isquemia a los que se ha sometido al pulmón para su preconditionamiento han sido variables y con resultados diversos. Varios trabajos demuestran que un solo episodio de 5 minutos (85) o de 10 minutos (87) de isquemia atenúa los efectos del SIR pulmonar.

1.5 Justificación del proyecto.

El SIR tiene una gran trascendencia clínica, y el conocimiento y manejo del mismo es de vital importancia para multitud de pacientes de nuestra práctica clínica. Así por ejemplo, el SIR es después del rechazo inmunológico, la primera causa de pérdida de los órganos trasplantados.

Para conseguir que el trasplante se lleve a cabo con éxito es necesaria una exquisita preservación del injerto, tanto antes, como durante y después de la extracción del mismo. Conocer y saber manejar el SIR es pues trascendental.

En la práctica clínica, el pulmón puede verse sometido a fenómenos de IR con el consiguiente riesgo de que el paciente desarrolle un cuadro de distrés respiratorio agudo post-reperusión, que es la principal manifestación clínica del SIR pulmonar. Entre estas situaciones clínicas destacan:

- Pacientes cuya función respiratoria impide realizar resecciones pulmonares amplias, ya que prima mantener todo el parénquima pulmonar posible. En estos casos se llevan a cabo **broncoangioplastias**, las cuales se acompañan de periodos de isquemia caliente variable. Están indicados en pacientes que presentan tumores que afectan al bronquio principal y a la arteria interlobar.
- Mención especial merece el **trasplante pulmonar de donante vivo**. Es una alternativa al trasplante de donante cadáver que surge ante el amplio desfase que existe entre la demanda de órganos para el trasplante y la

disponibilidad de dichos órganos procedentes de donante cadáver. Este tipo de trasplantes se contempla cuando la urgencia del trasplante no permite la espera, así como en casos de pacientes pediátricos, dado el escaso número de donantes cadáveres adecuados para este grupo. El trasplante pulmonar de donante vivo requiere tres intervenciones: una lobectomía a dos donantes vivos diferentes y una neumonectomía bilateral e implante lobar bilateral en el receptor. A uno de los donantes, se le realiza una lobectomía inferior izquierda y al otro donante, una lobectomía inferior derecha. Los lóbulos trasplantados sufren un periodo variable de isquemia más o menos prolongado desde que se interrumpe el flujo sanguíneo durante la lobectomía, hasta que se restablece el flujo sanguíneo en el receptor.

Aunque el tiempo de isquemia es sensiblemente inferior en este tipo de intervenciones respecto al trasplante de donante vivo, la IR puede provocar alteraciones pulmonares y sistémicas que conduzcan a un daño pulmonar agudo y fracaso multiorgánico. Un estudio revela que se detecta edema pulmonar postoperatorio hasta en un 20% de los pacientes (77). Parece ser que mediante esta técnica, se obtienen similares resultados en cuanto a supervivencia que en el trasplante bipulmonar convencional, habiéndose hallado menor FEV1 y capacidad vital forzada durante los primeros 6 meses, pero sin repercusión clínica (88, 89).

En la actualidad existen cuatro centros de referencia en el mundo con experiencia contrastada en la realización de trasplante pulmonar de donante vivo, tanto en adultos como en niños (ver figura 8).

Se han descrito además casos realizados en Austria (90), China (91), Brasil (92), Alemania (93) y Reino Unido (94).

EQUIPO INVESTIGADOR	LOCALIZACIÓN DEL ESTUDIO	PERIODO CONSIDERADO	NÚMERO DE PACIENTES
Bowdish et al.(2005)	California (USA)	1993-2002	79 Adultos
Starnes et al. (2004)	California (USA)	1993-2002	84 Adultos 39 Niños Pacientes comunes con la serie de Bowdish.
Date et al. (2004)	Okayama (Japón)	1998-2004	24 Adultos 6 Niños
Battafarano et al. (2000)	St. Louis (USA)	1994-2000	31 Niños
Kozower et al. (2006)	St. Louis (USA)	1991-2004	13 Niños (retrasplante) Pacientes comunes con la serie de Battafarano
Chen et al. (2012)	Kyoto (Japón)		33 en total Pacientes comunes con la serie de Date?

FIGURA 8: Series de pacientes de trasplante pulmonar de donante vivo.

- Pacientes en los que se plantea la reparación exsitu del pulmón con su posterior reimplantación, como por ejemplo en casos de hemorragias masivas, y que permitiría evitar la realización de neumonectomías de urgencia.
- En pacientes en los que se realiza autotrasplante pulmonar. Son pacientes que no toleran neumonectomías y que presentan tumores complejos, se plantea la posibilidad de realizar neumonectomía seguido de lobectomía exsitu y posterior reimplantación del lóbulo restante, con el consiguiente SIR en dicho lóbulo (7, 95).

Existen sólo 7 casos descritos en la literatura médica, pero puede constituir una nueva alternativa terapéutica para determinados pacientes seleccionados.

En nuestro estudio, se presenta un modelo de autotrasplante pulmonar. Es pues un modelo experimental donde el pulmón se ve sometido a fenómenos de IR, y dónde tratamos de modular la respuesta inflamatoria asociada mediante preconditionamiento clásico. Planteamos un modelo experimental que se fundamenta en la utilidad clínica del mismo, ya que podría aplicarse en la práctica clínica en los casos anteriormente expuestos.

2. HIPÓTESIS. OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESIS

2.1.1 HIPÓTESIS PRINCIPAL

La isquemia prolongada y la posterior reperfusión del pulmón parece ser que inducen fenómenos inflamatorios pulmonares y sistémicos que podrían ser modulados mediante la aplicación de ciclos cortos y repetidos de isquemia-reperfusión previos a la isquemia prolongada, es decir mediante preconditionamiento isquémico.

2.1.2 HIPÓTESIS SECUNDARIAS

1. El procedimiento experimental de autotrasplante lobar en cerdo puede constituir un modelo de IR pulmonar en el que sería posible estudiar el efecto modulador del preconditionamiento isquémico.
2. El preconditionamiento isquémico clásico podría modular la respuesta pulmonar y sistémica al daño por IR pulmonar.
3. El posible efecto modulador del preconditionamiento isquémico, podría observarse desde los primeros momentos de la reperfusión, en la respuesta hemodinámica sistémica y pulmonar.
4. El posible efecto modulador del preconditionamiento isquémico podría observarse, desde los primeros momentos de la reperfusión, en los valores de los parámetros gasométricos.

5. El posible efecto modulador del preconditionamiento isquémico podría observarse, desde los primeros momentos de la reperfusión, en la respuesta bioquímica en tejido pulmonar a nivel de mediadores de la inflamación, estrés oxidativo y del metabolismo del óxido nítrico.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Estudiar el posible papel modulador del preconditionamiento isquémico clásico sobre los efectos pulmonares y sistémicos que acontecen en fases muy precoces de la IR (a los 10 y 30 minutos de reperfusión) en un modelo porcino de autotrasplante pulmonar con isquemia tibia del injerto.

2.2.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS

1. Determinar el papel del preconditionamiento sobre la respuesta hemodinámica local y sistémica que acontece en fases muy precoces de la IR pulmonar en un modelo porcino de autotrasplante pulmonar.

2. Estudiar los cambios que el preconditionamiento isquémico provoca sobre el intercambio gaseoso durante fases muy precoces de la IR pulmonar, en un modelo porcino de autotrasplante pulmonar.
3. Analizar los efectos que en dicho modelo experimental, el preconditionamiento isquémico ejerce sobre el estrés oxidativo, en el tejido pulmonar sometido a isquemia-reperusión.
4. Estudiar los efectos que el preconditionamiento isquémico provoca sobre la activación leucocitaria en tejido pulmonar sometido a isquemia-reperusión.
5. Estudiar los efectos del preconditionamiento isquémico sobre la producción de citoquinas proinflamatorias en tejido pulmonar sometido a isquemia-reperusión.
6. Estudiar si, en dicho modelo experimental, el preconditionamiento isquémico altera el metabolismo del óxido nítrico en el tejido pulmonar sometido a isquemia-reperusión

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. DESCRIPCIÓN DEL MATERIAL

3.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Los experimentos descritos se llevaron a cabo en veinte cerdos de la raza Large White de ambos sexos, de edad aproximada de 3 meses y pesos comprendidos entre 35 y 45 kg.

La raza de cerdos Large White, o gran cerdo blanco inglés, es originaria del condado de Yorkshire, Inglaterra, donde fue registrada por la Asociación Nacional de Criadores de Cerdo en 1883. Es un cerdo uniformemente blanco, de orejas tiesas y patas largas, adaptado a la crianza al aire libre y en cautividad. Presenta una elevada fertilidad y un rápido crecimiento, siendo en la actualidad una de las razas porcinas más extendidas.

Los sujetos de experimentación proceden de la granja que posee el Instituto Tecnológico de Desarrollo Agrario (ITDA) de la Consejería de Medio Ambiente de la Comunidad de Madrid en el complejo agropecuario de Aranjuez (finca “La Chimenea”). El IDTA es un establecimiento autorizado inscrito con el número EX 013-C en el Registro Oficial de establecimientos de cría, suministradores y usuarios de animales para la experimentación y otros fines científicos de la Comunidad de Madrid, según la Orden de 4 de Agosto de 1989 (BOCM de 24 de Agosto.) Este centro cuenta con instalaciones construidas específicamente para ganado porcino, similares a las de una granja convencional.

El traslado del cerdo hasta las instalaciones de la Unidad de Medicina y Cirugía experimental del Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid se realiza 24 horas antes del procedimiento quirúrgico, en una jaula individual en la que permanece hasta el momento de la intervención. El animalario se encuentra a una temperatura entre 20-22°C y una humedad relativa del 55%.

El manejo de los animales de experimentación, se ha llevado a cabo siguiendo la normativa legal según el *Real Decreto 1201/2005 de 10 de Octubre* y *B.O.E de 21 Octubre de 2005 Animales, protección de los utilizados para experimentación y otros fines científicos* (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación) que incorpora las disposiciones legales reglamentarias y administrativas de los estados miembros de la CEE respecto a la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos de la *Directiva del Consejo 86/609/CEE* (Leg. CC.EE.4390) aprobada el 24 de Noviembre de 1996.

El proyecto de investigación se llevó a cabo en la Unidad de Medicina y Cirugía experimental del Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid, con nº de registro EX/017-U. Fue concedida la aprobación del Comité de Ética Experimentación Animal y del Comité de Investigación de la institución.

3.1.2 MATERIAL FUNGIBLE Y APARATAJE

- **Transductores de presión:** utilizamos transductores de presión desechables de Abbot IBP, para monitorizar los parámetros hemodinámicos del sujeto de experimentación. Es decir, para medir la presión arterial, la presión pulmonar y la presión venosa central.
- **Tubos endotraqueales :** utilizamos tubos endotraqueales del modelo Murphy con balón. Dependiendo del tamaño del cerdo, empleamos tubos anillados del nº 6,0. (figura 9).



FIGURA 9: Tubos endotraqueales

- **Catéteres vasculares:** con un catéter de 7,5 F canalizamos la arteria femoral, mientras que para canalizar la vena femoral empleamos un catéter de 9 F.



FIGURA 10: Catéteres vasculares.

- **Catéter de Swan-Ganz o catéter de la arteria pulmonar (CAP):** Es un catéter que nos permite monitorizar de forma continua la presión en la arteria pulmonar y la saturación venosa mixta (parámetro íntimamente relacionado con la situación respiratoria, la hemoglobina del sujeto y el gasto cardiaco). Los niveles normales varían entre 60-80%. Además, este dispositivo mide el gasto cardiaco mediante termodilución. Esto significa que, a través de la diferencia de temperatura que existe entre la porción proximal y la punta del catéter de un volumen de líquido que inyectamos, es capaz, mediante una fórmula matemática, de calcular el gasto cardiaco y el índice cardiaco. Por último, el catéter de Swan-Ganz nos permite medir la presión de enclavamiento pulmonar o presión capilar pulmonar (PCP), que es equivalente a la presión de la aurícula izquierda. Así pues, la PCP aporta información acerca de la precarga y la función ventricular del paciente, muy importante en el edema agudo de pulmón. El catéter de Swan-Ganz fue diseñado en la década de los setenta por William Ganz y Jeremi Swanz para el estudio y monitorización del infarto de miocardio. Posteriormente se ha extendido su uso clínico para diversas patologías.

En este estudio hemos utilizado un catéter de Swan-Ganz de 7.5F, cuya longitud es de 110 cm. Está fabricado en un material flexible que se hace más flexible aún por la temperatura sanguínea.

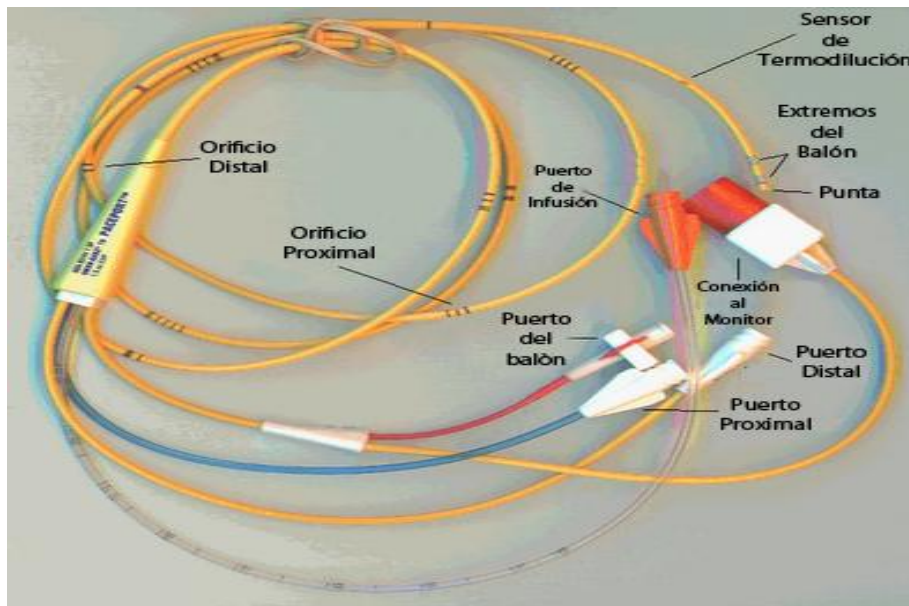


FIGURA 11: Componentes del catéter de la arteria pulmonar.

En su extremo distal tiene un balón de látex de 1,5 ml de aire de capacidad, cuyo inflado permite por un lado facilitar la progresión del catéter en sentido del torrente sanguíneo y por otra parte, reduce el riesgo de lesionar cavidades e inducir arritmias. Una vez colocado adecuadamente el catéter, al inflar el balón se obstruye el flujo sanguíneo en esa rama pulmonar y se pueden medir presiones distales a la obstrucción (figura 12).

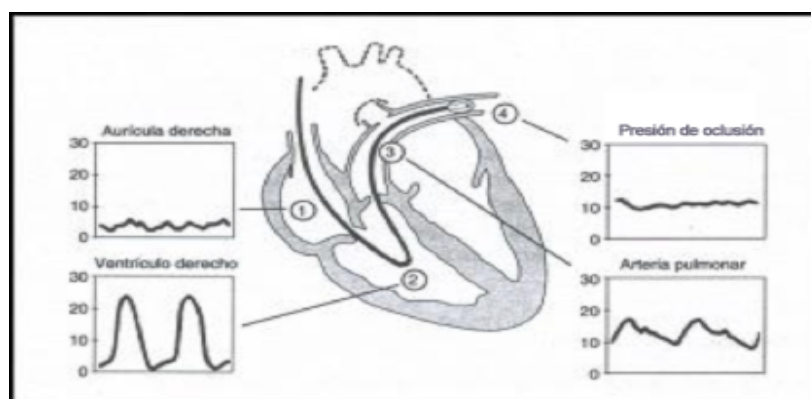


FIGURA 12: Diferentes ondas de presión medidas con el catéter de Swan-Ganz

El catéter consta de los siguientes conductos (figura 11):

- Conducto pequeño: sirve para el inflado y desinflado del balón, cuya capacidad es de 1,5 ml de aire. Una vez colocado el catéter, el balón que queda a nivel de la arteria pulmonar debe permanecer desinflado para no lesionar el vaso y provocar un infarto pulmonar, y se infla puntualmente para realizar la medición de la PCP.
- Conducto proximal: desemboca en la aurícula derecha a 30 cm del extremo distal del catéter. Sirve para determinar la presión auricular derecha y para inyectar suero en las determinaciones del volumen minuto cardíaco.
- Conducto distal: desemboca en una rama de la arteria pulmonar. Sirve para determinar las presiones sistólicas, diastólicas y media de la arteria pulmonar y también la PCP, una vez obstruido el flujo sanguíneo en la rama de la arteria pulmonar en la que está colocado.
- Conducto que contiene las guías eléctricas del termistor, desemboca a 4 cm del extremo distal del catéter; en su punta está el termistor. Este conducto se conecta a un computador de cálculo, para la determinación numérica del volumen minuto cardíaco por termodilución.
- **Material suplementario:** Además del material detallado anteriormente utilizamos un catéter introductor de diámetro 8.5-9 F para facilitar la entrada y recolocación del CAP; material como alargaderas, conexiones rígidas y transductores de presión conectados al monitor para poder medir las diferentes presiones;

monitores para el registro de las presiones y de la curva de termodilución y que gracias a un software integrado calcula directamente los parámetros hemodinámicos.

3.1.3 QUIRÓFANO E INSTALACIONES

El quirófano de la Unidad, incluye dos mesas quirúrgicas, cuatro lámparas quirúrgicas de alta intensidad y el equipo de instrumental quirúrgico estándar, así como material quirúrgico específico de cirugía torácica y microcirugía (figura 13).



FIGURA 13: Vista panorámica del quirófano

En cuanto a material anestésico el quirófano está dotado de un respirador modelo Dräger SA 1 (*Dräger Medical AG, Lübeck, Alemania*), capnógrafo Ohmeda 5250 RGM (*General Electric Health Care, USA*), analizador de gases GEM Premiere 5000, Monitor de Swanz-Ganz de gasto continuo (*Edwards, Irving, California, USA*) y desfibrilador con palas internas y externas life pulse (*HVE, Miami, Usa.*)

3.2 DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

Consisten en la realización bajo anestesia general, de autotrasplante ortotópico de pulmón izquierdo, realizando neumonectomía izquierda, seguida de cirugía ex situ consistente en lobectomía craneal izquierda y posterior reimplantación del lóbulo caudal izquierdo.

Dividimos a los sujetos de experimentación en dos grupos: grupo control (GC; n=10) y grupo experimental de preconditionamiento isquémico (PCI; n=10), en los que se lleva a cabo el PCI pinzando la arteria pulmonar dos ciclos de cinco minutos, separados por un ciclo de perfusión normal de cinco minutos.

3.3 PROTOCOLO ANESTÉSICO

Previa a la intervención permitimos que los animales beban agua hasta el momento de la intervención, pero no así con los alimentos sólidos, para los cuales, dejamos un ayuno de 18 horas antes de cada experimento.

Se premedica al animal con ketamina intramuscular (*Ketolar, Parker Davis*) a dosis de 10 mg/kg.

Posteriormente el cerdo es trasladado al quirófano, donde se monitoriza el ECG y la saturación periférica de oxígeno. Se canaliza un vía venosa periférica de 20 G a nivel de la vena dorsal de la oreja, a través de la cual, realizaremos la inducción anestésica.

La inducción anestésica se lleva a cabo mediante la administración de fentanilo 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (*Fentanest, Kern Pharma*) , propofol 4 mg/kg (*Diprivan, Fresenius K*) y atracurio 0,6 mg/kg (*Tracrium, Glaxo Smith Kline*). Tras lo cual se procede a la intubación orotraqueal del animal con un tubo endotraqueal anillado de 6 de diámetro interno.

La ventilación mecánica (controlada en nuestro caso por volumen) se lleva a cabo con un ventilador *Draguer SA I*, con los siguientes parámetros ventilatorios: volumen tidal 8 ml/kg , frecuencia respiratoria entre 12 y 15 rpm, relación inspiración/expiración 1:2. Con todo ello mantenemos una pCO_2 entre 35 y 40 mmHg . La FiO_2 empleada es de 1 durante todo el procedimiento.



FIGURA 14: Intubación orotraqueal



FIGURA 15: Respirador Dräger SA1

El mantenimiento anestésico se realiza mediante la administración en perfusión continua intravenosa de propofol al 2% a 8-10 mg/kg/h. Además se administran dosis suplementarias de fentanilo en función de las necesidades analgésicas del animal de experimentación, así como dosis suplementarias de atracurio cuando se requiere. Se mantiene una perfusión de cristaloides a 5-6 ml/kg/h y si es preciso, como en caso de hipotensión o sangrado, se perfunden soluciones de coloide (hidroxietilalmidón).

3.4 PROTOCOLO QUIRÚRGICO

Antes de comenzar la intervención quirúrgica, son necesarios unos pasos previos. A los animales de experimentación se les lava la piel con una solución de betadine previa a cualquier procedimiento invasivo, con el fin de conseguir la asepsia necesaria.

Se lleva a cabo una traqueostomía infraístmica, retiramos el tubo endotraqueal y colocamos a través de la traqueostomía un tubo de 6 mm anillado. De este modo podremos avanzar este tubo hasta el bronquio intermediario derecho y bloquear el pulmón izquierdo para hacer posible la cirugía. Este paso es necesario, ya que los tubos endotraqueales de los que disponemos no tienen longitud suficiente para bloquear el pulmón izquierdo desde la boca y conseguir así la ventilación unipulmonar que hace posible la cirugía.

Por otro lado canalizamos la vena femoral con el catéter 9 F e introducimos un catéter 7,5 F en la arteria pulmonar derecha (*Edwards Lifesciences*), lo cual confirmamos posteriormente intraoperatoriamente. Gracias a este catéter, podemos realizar estudios hemodinámicos en diferentes momentos del experimento, como se expone más adelante, y podremos extraer muestras sanguíneas durante la cirugía. Se canaliza también la arteria femoral con otro catéter 7,5 F, que utilizaremos para monitorizar de manera continua la presión arterial sistémica, así como para extraer y analizar muestras de sangre arterial.

Estos procedimientos se llevan a cabo de forma percutánea, pero en ocasiones es imposible y es necesario disecar quirúrgicamente el paquete vasculo-nervioso femoral, para poder canalizar los vasos sanguíneos (figura 16).

El cerdo es un animal que posee una uretra en forma de sacacorchos, que impide su canalización con una sonda urinaria convencional, por lo que es necesario realizar una cistostomía suprapúbica mediante minilaparotomía media.

Gracias a lo cual, podremos controlar la diuresis del animal a lo largo de la intervención.



FIGURA 16: Disección y cateterización del paquete vascular femoral izquierdo.

Tras estos procedimientos preliminares, se coloca al animal en decúbito lateral derecho. La intervención quirúrgica propiamente dicha comienza con la realización de toracotomía anterolateral izquierda a través del cuarto o quinto espacio intercostal, con costectomía inferior. Se lleva a cabo la neumonectomía izquierda disecando previamente la vena ázigos, que impide la visualización del hilio pulmonar. Continuamos con la disección de la vena pulmonar superior y la arteria pulmonar principal izquierda, hasta su origen en la bifurcación del tronco de la pulmonar. Seguidamente se secciona el ligamento pulmonar y se libera el bronquio del tejido adyacente. A continuación, se secciona el bronquio principal izquierdo. Hasta este momento se trabaja con ventilación de ambos pulmones, pero, a partir de este momento, el tubo endotraqueal se progresa hasta el bronquio derecho, comenzando pues la ventilación unipulmonar .

Se disminuye pues el volumen tidal a 6 ml/kg. Una vez seccionado el bronquio izquierdo se pinzan la arteria pulmonar y la vena pulmonar inferior y se liga la vena pulmonar superior. Tras ésto, se seccionan la arteria pulmonar (queda ocluida con una pinza vascular) y la vena pulmonar inferior (que se sutura), completando la neumonectomía. Justo después de completar la neumonectomía, se administra un bolo de heparina intravenosa de 300 UI/kg (*Mayne Pharma España, S.L*) que tiene como función prevenir la trombosis en la arteria pulmonar que permanece pinzada. La pieza de neumonectomía se traslada a una mesa adyacente donde tiene lugar la cirugía de banco. Se perfunde el injerto a través de arterias pulmonares (anterogradamente) y a través de las venas (retrógradamente) con 1 litro de *solución de la Universidad de Wisconsin* a 10-15 °C, mientras que a la vez se ventila el injerto con un ambú (FiO₂ 21%).

Se lleva a cabo la lobectomía craneal ex situ. El lóbulo caudal izquierdo es reimplantado posteriormente, realizando anastomosis bronquial, arterial y venoauricular. La reperfusión del injerto se realiza en primer lugar de forma retrógrada desclampando la aurícula izquierda. Se coloca de nuevo el tubo endotraqueal en su posición inicial, que permite la ventilación de ambos pulmones. A continuación, se despinza la arteria pulmonar y se mantiene la reperfusión durante 30 minutos.

Una vez finalizado el experimento, se sacrifica al animal aumentando la profundidad anestésica y administrando cloruro potásico que produce finalmente la muerte por cardioplejia.

3.5 PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO PULMONAR.

En el grupo experimental se lleva a cabo el PCI pinzando de forma periódica la arteria pulmonar izquierda durante dos periodos de cinco minutos, intercalando cinco minutos de reperfusión entre ellos. Estas maniobras se realizan antes del pinzamiento de la arteria pulmonar izquierda que precede a su sección. En el grupo control no se producen oclusiones previas al pinzamiento y sección de la arteria pulmonar.

3.6 MEDICIONES Y RECOGIDA DE MUESTRAS

Las mediciones y recogida de muestras se realizan en cinco momentos de cada experimento y son descritos a continuación (figura 17):

1) Basal: se extraen muestras de sangre arterial, para analizar la gasometría arterial y se realiza un estudio hemodinámico treinta minutos tras la realización de la toracotomía, momento en el cual, el animal es ventilado de forma convencional.

2) Pre-neumonectomía (Pre-neumo): antes de completar la neumonectomía izquierda, se realiza un nuevo estudio hemodinámico, se extrae otra gasometría arterial y se extrae una biopsia de tejido pulmonar (del lóbulo craneal). En este momento el animal ya permanece bajo la ventilación unipulmonar.

3) Pre-reperusión (Pre-rp): antes de reperfundir y ventilar el lóbulo caudal izquierdo, que ya ha sido reimplantado, se realiza otro estudio hemodinámico, se extrae una gasometría arterial y una muestra de tejido pulmonar.

4) 10 minutos Post-reperusión (Post-rp 10') : se realizan los mismos estudios 10 minutos después de reimplantar el lóbulo caudal.

5) 30 minutos Post-reperusión (Post-rp 30'): se realizan los estudios a los 30 minutos de la reperusión del lóbulo caudal izquierdo antes de finalizar el experimento.

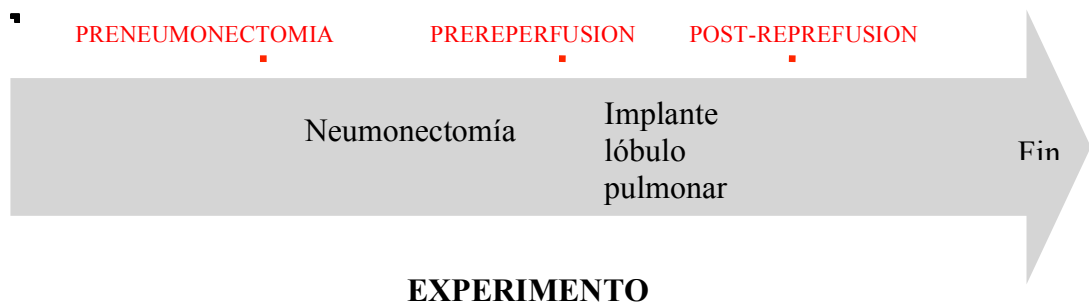


FIGURA 17: *Extracción de muestras y momentos del experimento*

3.7 VARIABLES HEMODINÁMICAS

Gracias al catéter en la arteria femoral, podemos analizar las siguientes variables: Presión arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) así como la presión arterial media (PAM).

A través del catéter en arteria pulmonar podemos medir la presión pulmonar sistólica (PAPS), la diastólica (PAPD) y la media (PAPM), así como la presión capilar pulmonar (PCP) y la presión venosa central (PVC).

Además, empleamos un monitor de gasto cardiaco (*Edwards Lifesciences*), que mediante el método de termodilución nos permite analizar el índice cardiaco (IC) y el volumen sistólico (VS). La termodilución consiste en la administración de diez ml de suero salino a 0°C a través del catéter venoso central, de tal manera que el monitor de gasto cardiaco analiza la diferencia de temperatura entre dos puntos y es capaz de calcular diferentes parámetros hemodinámicos. Se hacen tres mediciones y consideramos la media.

3.8. VARIABLES GASOMÉTRICAS

Analizamos las muestras de sangre arterial obtenidas en los diferentes momentos que hemos expuesto anteriormente, y obtenemos valores de presión arterial de oxígeno (PaO₂), así como de presión arterial de carbónico (PaCO₂) y pH sanguíneo.

Además obtenemos valores de sangre venosa procedentes de muestras obtenidas del catéter venoso femoral y de muestras obtenidas directamente de la vena pulmonar del lóbulo reimplantado puncionando la misma 10 y 30 minutos después de restablecer la perfusión del lóbulo implantado.

3.9 VARIABLES BIOQUÍMICAS EN SANGRE

Las muestras de sangre venosa femoral, las empleamos para diferentes determinaciones bioquímicas. Centrifugamos 10 ml de sangre durante diez minutos a 1000 x g. El suero sobrenadante lo congelamos a -40 °C en un tubo de polipropileno, para analizarlo con posteridad.

La concentración sérica de óxido nítrico (NO) fue medida gracias a la “*reacción de Griess*”: la concentración de NO₂ tras la reducción de NO₃ a NO₂. Rápidamente las muestras obtenidas se desproteinizan mediante la adición de ácido sulfosalicílico, se incuban durante 30 minutos a 48°C y posteriormente se centrifugan a 12000 g durante 20 minutos. Después de la incubación de los sobrenadantes con *Escherichia coli* NO₃ reductasa durante 30 minutos a 37°C, se añade reactivo de Griess. La reacción se lleva a cabo a 22 °C durante 20 minutos, y se midió la absorbancia a 546 nm utilizando la solución de NaNO₂ estándar. La señal medida se alinea desde 1 a 150 mM. ($r= 0,994$, $p< 0,001$, $n=5$). El umbral de detección era 2 μ M.

3.10 VARIABLES BIOQUÍMICAS EN TEJIDO PULMONAR

Durante los experimentos, se extrajeron biopsias de pulmón tanto para cuantificar el edema pulmonar, como para realizar el análisis de diferentes parámetros bioquímicos. Las dos primeras muestras, pre-neumonectomía y pre-reperusión, se extrajeron del lóbulo craneal del pulmón izquierdo. Mientras, las dos últimas muestras que fueron Post-reperusión a los 10 y a los 30 minutos, se extrajeron del lóbulo caudal del pulmón izquierdo, que es el que se reimplanta en todos los casos.

Cada una de las muestras de tejido es dividida en dos: una de ellas se emplea para cuantificar el edema pulmonar, y se congela en tubos de polipropileno a -40°C ; la otra se emplea para realizar el estudio bioquímico, para ello se introduce en un criotubo, se congela inmediatamente en nitrógeno líquido y es almacenada en un congelador a -80°C , hasta que es analizada.

3.10.1 Cuantificación del edema pulmonar

Para medir los “*wet-dry ratios*”, que es la medida que permite valorar el edema pulmonar, primeramente se pesan y miden las muestras. Posteriormente se incuban las muestras durante 24 horas a 60°C y se pesan con el fin de obtener los pesos secos. Después, se vuelven a pesar transcurridas 24 horas para verificar que efectivamente la deshidratación es completa.

Los datos que expondremos se calculan de la siguiente forma: peso húmedo- peso seco/ peso húmedo. A mayor valor, mayor edema pulmonar.

3.10.2 Preparación de las muestras de tejido pulmonar

El tejido se disecciona rápidamente y se congela en hielo seco. Las muestras congeladas se pesan y se introducen en unos tubos especiales de 50 ml de polipropileno (*Falcon; Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ*). Son unos tubos que contienen un llamado buffer de lisis a 4°C, a razón de 10 ml de buffer por cada gramo de tejido.

La composición de este buffer comprende 1mM de fenilmetilsulfonil fluorhídrico (*PMSF; Sigma Chemical Company*), 1 µg/ml de pepstatina A (*Sigma Chemical Company*) y aprotinina (*Sigma Chemical Company*) en una solución salina buffer con 1x fosfato que tiene un pH 7,2 (*Biofluids, Rockville, Md*) y que contiene un 0.05% de ácido sódico (*Sigma Chemical Company*).

Las muestras se homogenizan durante 30 segundos a la máxima velocidad en un homogeneizador eléctrico (*Polytron; Brinkmann Instruments, Westminister, NY*). El procedimiento se repite 3 veces, para un procesamiento óptimo. Inmediatamente después, los tubos se congelan en nitrógeno líquido.

Los homogenizados se descongelan posteriormente en agua a 37°C y centrifugados a 119,000 g durante 1 hora a 4°C, para poder separar las organelas celulares.

Los sobrenadantes se congelan a -80°C para permitir la formación de agregados macromoleculares. Al alcanzar los 4°C , los agregados se centrifugan a 3000 g y el volumen final, se mide con una pipeta graduada.

3.10.3 Evaluación del estrés oxidativo

Los niveles de lipoperóxidos (LPO) muestran el grado de degradación de la membrana lipídica de las células que ocurre como consecuencia de la oxidación. Se determina utilizando un kit especial que analiza los niveles de LPO en las muestras de tejido pulmonar (*K-assay LPO-CC, KamiyaBiochemical Company, USA*).

El malondialdehído (MDA) es un compuesto final de la peroxidación lipídica y un marcador de daño celular. Se analiza indirectamente cuantificando la formación de ácidos tiobarbitúricos en tejido pulmonar.

La actividad de la mieloperoxidasa (MPO) indica el acúmulo de polimorfonucleares neutrófilos. Para determinarla, se siguen los siguientes procedimientos: en primer lugar, se trocea la muestra finamente a unos 4°C , posteriormente se homogeniza mediante la adición de un buffer de fosfato potásico (pH 6.0) y se centrifuga el resultado durante 15 segundos a 20.000 g.

El sobrenadante resultante se desecha, y al precipitado se le añade buffer de fosfato potásico y 50 mmol/l de bromuro de hexadeciltrimetil amonio, con el fin de descartar la actividad de la pseudoperoxidasa y solubilizar la MPO que está ligada a las membranas celulares. La suspensión que tenemos ahora, se homogeniza de nuevo durante 30 segundos.

A continuación se desagrega durante 20 segundos. El resultado se congela primero, para descongelarlo a continuación. (El ciclo de desagregación + congelación + descongelación se repite 2 veces). Finalmente se mezclan 100 microlitros de sobrenadante con 2.9 ml de buffer fosfato potásico (50 mmol/l y pH 6.0) y 0.167 mg/ml de dihidroclorhidrato de O-dianisidina además de 0.0005% de peróxido de hidrógeno. Se introduce la mezcla en el espectrofotómetro de Beckman durante 2 minutos y se mide la absorbancia a 460 nm. La unidad de actividad de la MPO se define como la actividad necesaria para degradar 1 micromol de peróxido de hidrógeno por minuto a 25°C.

3.10.4 Determinación de mediadores inflamatorios

La sintetasa de óxido nítrico (NOS) en sus tres isoformas, tanto la endotelial (eNOS) como en la inducible (iNOS) como en la isoforma neuronal (nNOS) se analizan utilizando anticuerpos específicos en muestras de tejido pulmonar gracias a técnicas de Western blott.

3.10.5 Análisis Western blott

Este tipo de análisis se ha empleado en el presente estudio, para la determinación de las siguientes proteínas: eNOS, iNOS, nNOS.

Consiste en la utilización de anticuerpos específicos, que se unen a dichas proteínas y permiten a través de unos marcadores luminiscentes, cuantificarlas. Para ello, las muestras de tejido, de unos 50-60 mg se homogenizan con un buffer y rápidamente se llevan a un gel especial (0.100 M Tris-Cl; 4% SDS; 20% glicerol; 0.1% bromofenol azul) en proporción 1:1. Los extractos y la concentración de proteínas se mide mediante el método BCA. En total quedan 25 microgramos de proteína en cada muestra. Se separan mediante SDS-PAGE utilizando un gel de acrilamida. Después, mediante un sistema de transferencia semi-seco, se transfieren una membrana de nitrocelulosa que se coloca dentro de otra solución buffer (contiene un 5% leche desnatada en 20 mM Tris, pH 7.5, 150 mmol de NaCl y 0.01% de Tween-20.) Se deja reposar durante 1 hora a 37°C.

Se incuba posteriormente la membrana con anticuerpos monoclonales de ratoncito frente a iNOS y eNOS (1:1000) durante 2 horas a una temperatura de 25-27°C. Seguidamente se incuban con IgG de ratón y anticuerpos antiperoxidasa de rábano picante (1:2000). También se emplean antiHO1 y antiHO2 para determinar la hemoxigenasa (1:2000). Tras ello, se lavan las membranas con T-TBS y se vuelven a incubar con reactantes de detección ECL Plus (*Amersham Life Science Inc, Buckinghamshire, UK*).

Finalmente exponemos las membranas a rayos X. Se analiza el resultado con densitometría (*Biorad GS 800*) para determinar las densidades ópticas relativas. Para determinar el peso molecular se utilizan trazadores coloreados.

La reproductibilidad de los ensayos, fue evaluada en 3 experimentos diferentes independientes. En cada ensayo, se repitieron 3 veces las determinaciones. El coeficiente de variación intra-ensayo fue <5%. El coeficiente de variación entre ensayos fue < 6%.

3.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresan como la media y la desviación estándar. Para comprobar la normalidad de las variables se aplica la prueba de “*Kolmogorov-Smirnov*”. Se emplearon test no paramétricos, dado que las variables no siguen la normalidad. El test de “*U de Mann-Whitney*” se utilizó para establecer diferencias entre los grupos analizados, que son muestras independientes. Se realizó una comparación múltiple de las medias mediante el test ANOVA. La significación estadística empleada fue $p < 0.05$ y se utilizó el programa informático SPSS 14.0 (*SPSS Inc, Chicago, USA*) para analizar los datos estadísticos.

4. RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados como la media \pm error estándar de la media, obtenidos en nuestros experimentos. Se detalla la significación estadística cuando la $p < 0.05$.

4.1 DATOS DEMOGRÁFICOS Y TIEMPOS QUIRÚRGICOS

No se observaron diferencias entre los grupos Control y PCI ni en el peso de los animales, ni en el tiempo de isquemia pulmonar, ni en el tiempo total de la intervención (tabla 1).

Tabla 1. Variables demográficas y de tiempos quirúrgicos.

Variable	Grupo	Valor	P
Peso (kilogramos)	<i>Control</i>	47 \pm 14	>0,05
	<i>PCI</i>	38 \pm 14	
Tiempo de isquemia (minutos)	<i>Control</i>	100 \pm 17	>0,05
	<i>PCI</i>	108 \pm 10	
Tiempo total de intervención (minutos)	<i>Control</i>	287 \pm 35	>0,05
	<i>PCI</i>	308 \pm 38	

Los datos son expresados como media \pm error estándar de la media.

4.2 RESULTADOS GASOMÉTRICOS:

4.2.1 Gasometrías de sangre arterial periférica (arteria femoral)

A continuación se recoge la tabla con los diferentes resultados gasométricos obtenidos en nuestro estudio, de sangre arterial periférica, en los distintos momentos del experimento (tabla 2, figuras 18-20).

Tabla 2. Variables gasométricas en sangre periférica, extraída de arteria femoral

Variable	Grupo	Basal	Preneumo.	Pre-rp.	Post-rp. 10'	Post-rp. 30'
PaO₂ (mmHg)	<i>Control</i>	330 ± 55	321 ± 41	302 ± 47	249 ± 47	297 ± 48
	<i>PCI</i>	374 ± 50	380 ± 29	420 ± 31	332 ± 43	350 ± 44
PaCO₂ (mmHg)	<i>Control</i>	37 ± 2	40 ± 2	42 ± 2	44 ± 3	44 ± 5
	<i>PCI</i>	36 ± 3	37 ± 2	37 ± 2	41 ± 3	45 ± 6
pH	<i>Control</i>	7,52 ± 0,02	7,47 ± 0,02	7,45 ± 0,02	7,44 ± 0,02	7,45 ± 0,03
	<i>PCI</i>	7,53 ± 0,02	7,48 ± 0,02	7,48 ± 0,02	7,45 ± 0,02	7,46 ± 0,02

Los resultados se expresan como la media ± error estándar de la media. PaO₂: presión arterial de oxígeno; PaCO₂: presión arterial de anhídrido carbónico. Preneumo: pre-neumonectomía; Pre-rp: pre-reperusión; Post-rp 10': 10 minutos post-reperusión; Post-rp.30': 30 minutos post-reperusión.

No observamos diferencias significativas entre el grupo control y el PCI en los niveles de PaO₂ a lo largo del experimento en sangre periférica arterial. Las cifras se mantienen por encima de 200 mmHg en todo momento (figura 18).

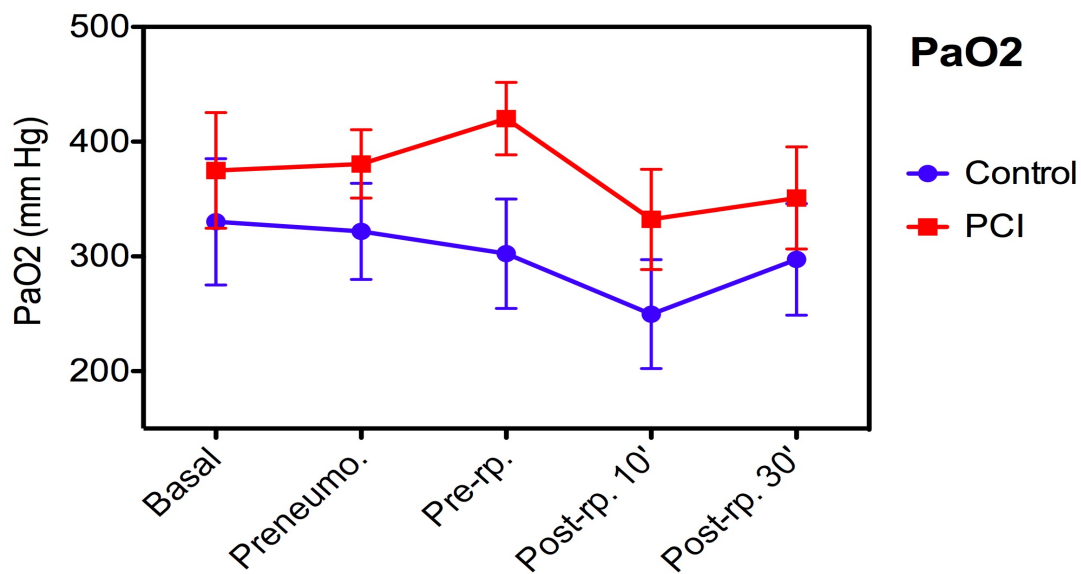


FIGURA 18: Variación de los niveles de PaO2

Tampoco evidenciamos diferencias en sangre arterial periférica en torno a los niveles de PaCO2 entre ambos grupos. Se mantienen valores fisiológicos durante todo el procedimiento (figura 19).

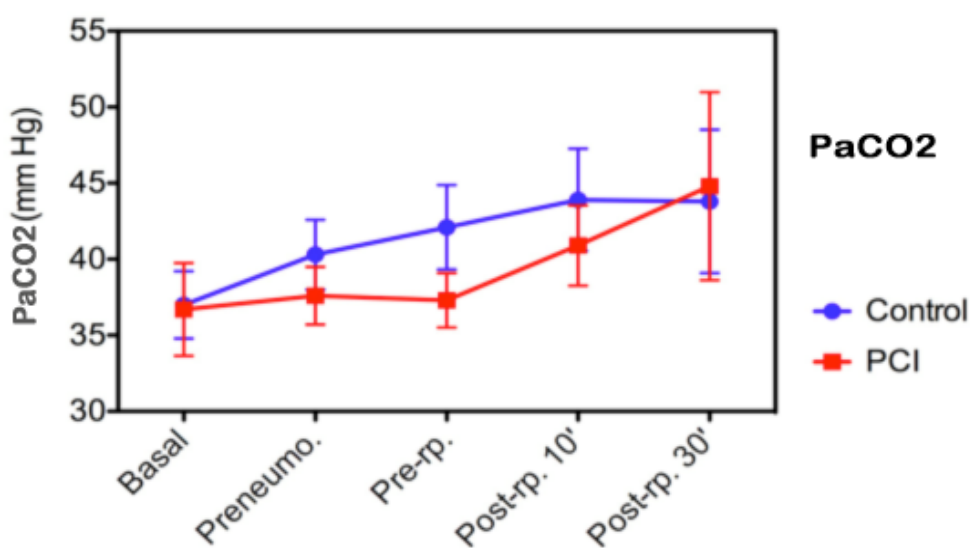


FIGURA 19: Valores de PaCO2

Del mismo modo, el pH de la sangre arterial periférica se mantiene en niveles fisiológicos a lo largo de todo el procedimiento y tampoco apreciamos diferencias entre ambos grupos experimentales (figura 20).

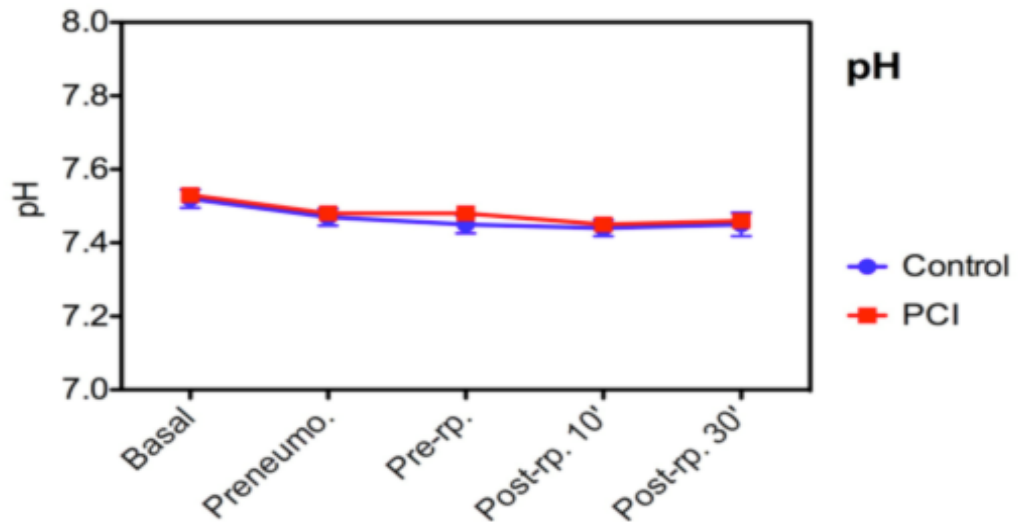


FIGURA 20: Valores del pH

4.2.2 Transferencia de gases en el pulmón reimplantado

Para estudiar el funcionamiento del lóbulo reimplantado, especialmente la capacidad de oxigenación de la sangre por el tejido pulmonar sometido a IR, realizamos gasometrías en muestras de sangre extraídas simultáneamente (tras 10 y 30 minutos de reperfusión) de la arteria pulmonar (a través del Swan-Ganz) y de la vena pulmonar del lóbulo reimplantado (por venopunción directa).

Cuando se realizó el estudio gasométrico de la sangre extraída de la vena pulmonar del lóbulo reimplantado, a los 10 minutos y a los 30 minutos de restablecer la perfusión del lóbulo, se observó una mayor presión de O₂ en la sangre de los animales en los que se había realizado PCI. No se observaron diferencias significativas en la presión de CO₂ ni en el pH sanguíneo (tabla 3, figuras 20-23). No se observaron diferencias, entre ambos grupos, en los parámetros gasométricos medidos en sangre extraída de la arteria pulmonar (tabla 4, figuras 24-26).

Tabla 3. Variables gasométricas en sangre extraída durante la reperfusión de la vena pulmonar del lóbulo implantado

Variable	Grupo	Post-rp. 10'	Post-rp. 30'
PaO₂ (mmHg)	<i>Control</i>	278 ± 52	262 ± 41
	<i>PCI</i>	228 ± 48	423 ± 48 *
PaCO₂ (mmHg)	<i>Control</i>	36 ± 4	36 ± 5
	<i>PCI</i>	37± 5	31 ± 4
pH	<i>Control</i>	7,54 ± 0,04	7,55 ± 0,05
	<i>PCI</i>	7,5 ± 0,05	7,52 ± 0,04

Los resultados se expresan como la media ± error estándar de la media. PaO₂: presión arterial de oxígeno; PaCO₂: presión arterial de anhídrido carbónico. Post- rp 10': 10 minutos post-reperfusión; Post-rp.30': 30 minutos post-reperfusión. .* p< 0,05 entre el grupo PCI y el control.

Tabla 4. Variables gasométricas en sangre extraída durante la reperusión de la arteria pulmonar

Variable	Grupo	Post-rp. 10'	Post-rp. 30'
PaO₂ (mmHg)	Control	37 ± 3	39 ± 4
	PCI	46 ± 11	37 ± 3
PaCO₂ (mmHg)	Control	54 ± 4	54 ± 5
	PCI	51 ± 2	51 ± 3
pH	Control	7,39 ± 0,03	7,39 ± 0,03
	PCI	7,39 ± 0,02	7,39 ± 0,01

Los resultados se expresan como la media ± error estándar de la media. PaO₂: presión arterial de oxígeno; PaCO₂: presión arterial de anhídrido carbónico. Post-rp 10': 10 minutos post-reperusión; Post-rp.30': 30 minutos post-reperusión.

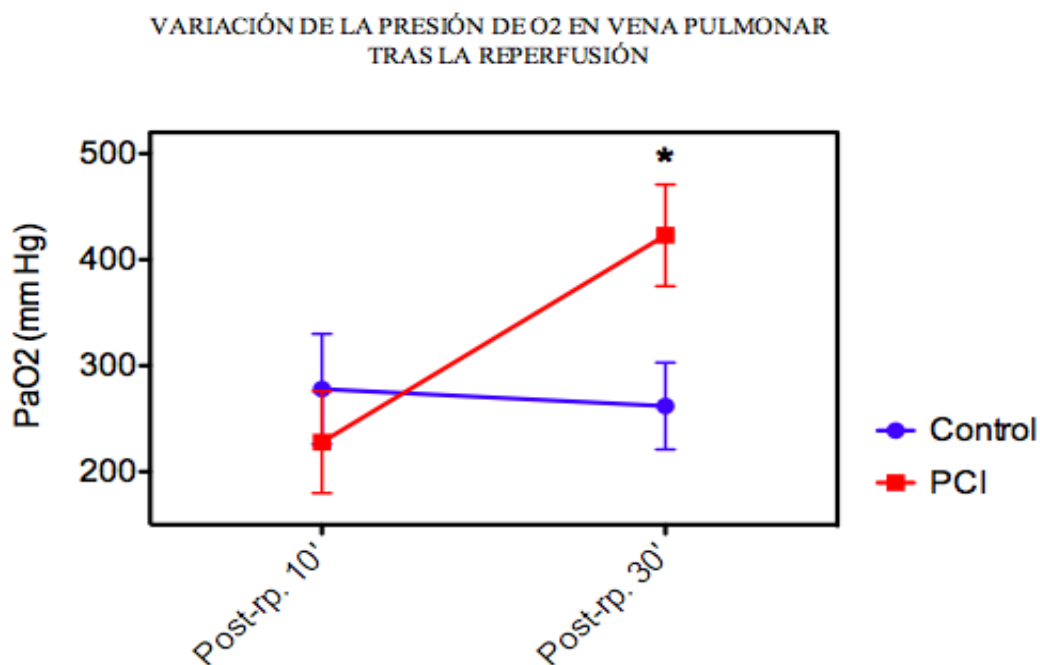


FIGURA 21: Variación de la presión de O₂ en vena pulmonar tras la reperusión.

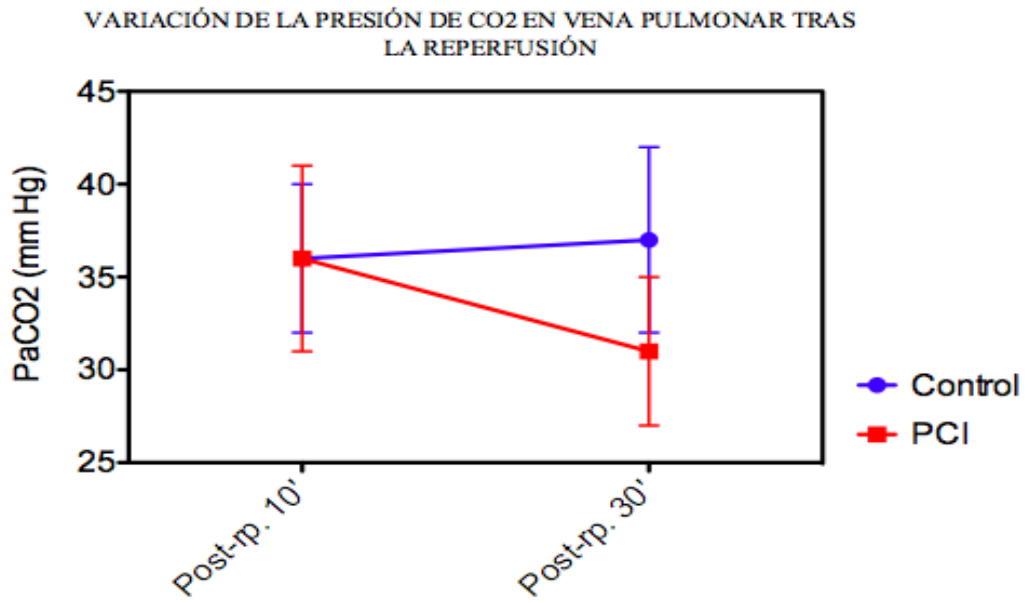


FIGURA 22: Variación de la presión de CO₂ en vena pulmonar tras la reperfusión.

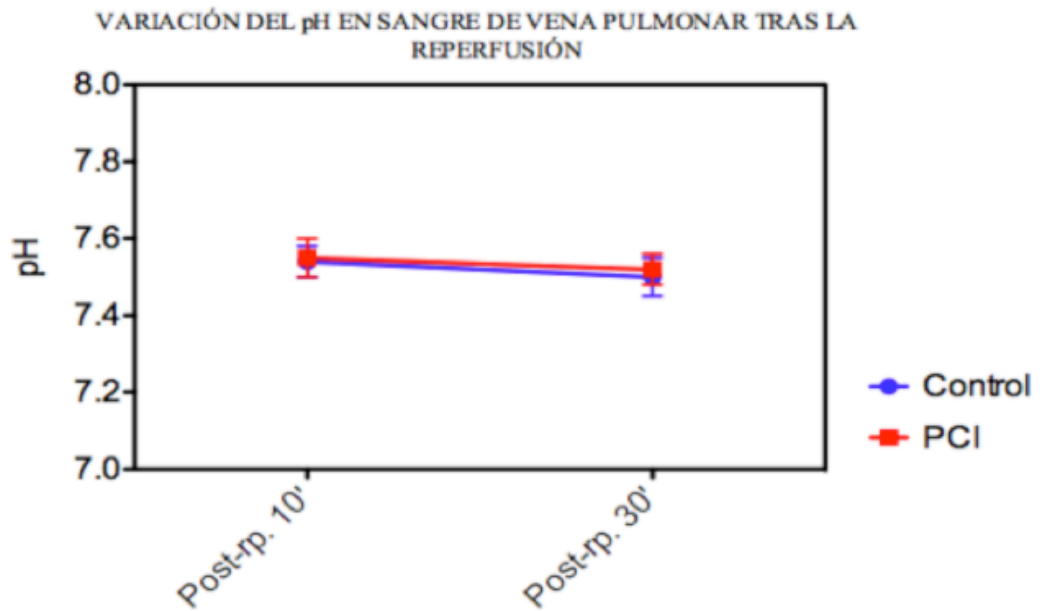


FIGURA 23: Variación del pH en sangre de vena pulmonar tras la reperfusión.

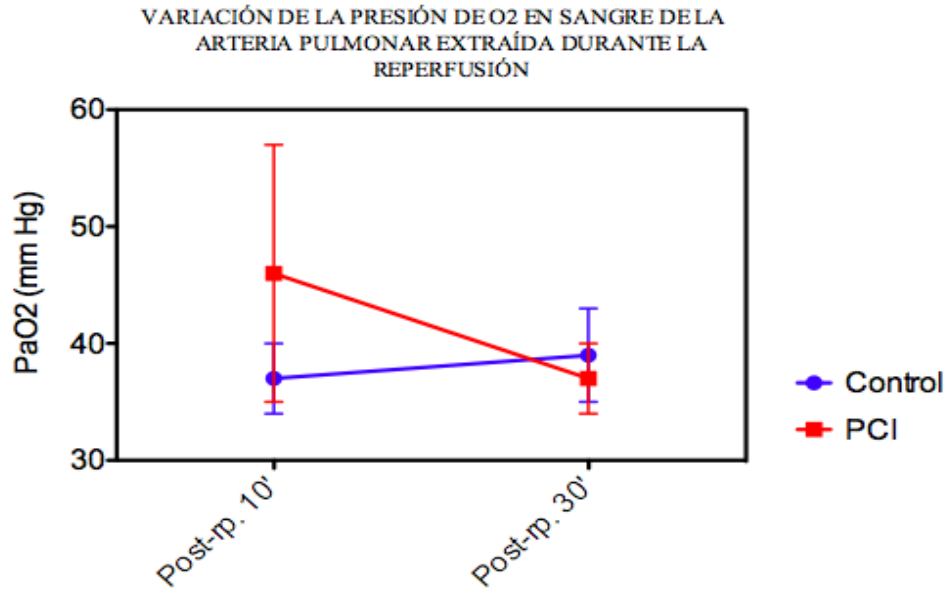


FIGURA 24: Variación de la presión de O₂ en sangre extraída durante la reperfusión de la arteria pulmonar.

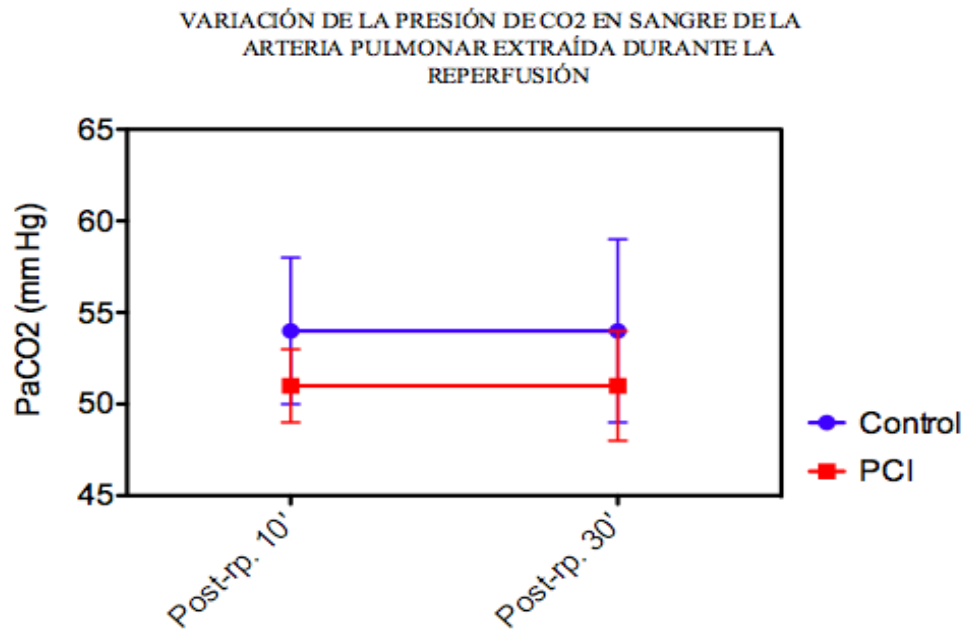


FIGURA 25: Variación de la presión de CO₂ en sangre extraída durante la reperfusión de la arteria pulmonar.

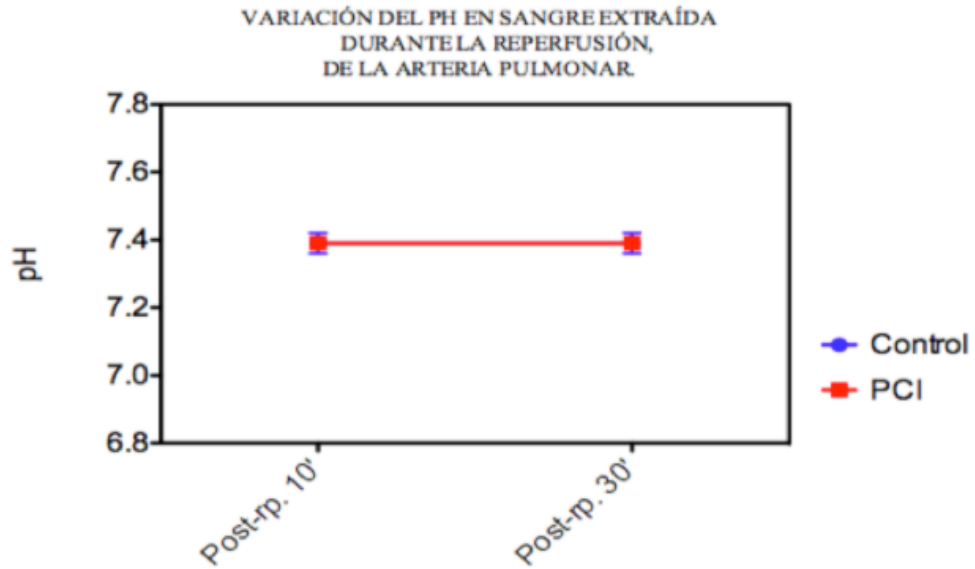


FIGURA 26: *Variación del pH en sangre extraída durante la reperfusion de la arteria pulmonar*

4.3 RESULTADOS HEMODINÁMICOS:

A continuación se recoge la tabla con los diferentes datos hemodinámicos referentes a la frecuencia cardiaca, la presión arterial media, presión en arteria pulmonar, presión venosa central e índice cardiaco obtenidos en nuestro estudio, en los distintos momentos del experimento (tabla 5, figuras 27-32).

Tabla 5. Variables hemodinámicas

Variable	Grupo	Basal	Preneumo.	Pre-rp.	Post-rp. 10´	Post-rp. 30´
FC (lpm)	<i>Control</i>	98,90 ± 6,45	110 ± 9,87	103,22 ± 9,36	95,30 ± 6,77	93,10 ± 7,68
	<i>PCI</i>	100,11 ± 5,83	100,90 ± 8,41	100 ± 9,94	106,77 ± 12,56	113,44 ± 12,71
PAM (mmHg)	<i>Control</i>	99,20 ± 3,80	102,44 ± 2,22	90,22 ± 4,33	86 ± 4,45	81,20 ± 5,18
	<i>PCI</i>	93,22 ± 2,15	103,44 ± 3,40	98,13 ± 4,53	84,67 ± 4,08	82,67 ± 6,40
PAPM (mmHg)	<i>Control</i>	26,30 ± 1,55	33,00 ± 3,50	27,11 ± 2,19	29 ± 2,82	29,2 ± 2,29
	<i>PCI</i>	19,89 ± 1,15**	26,56 ± 1,79	32,00 ± 5,55	29,22 ± 1,38	27,75 ± 2,17
PVC (mmHg)	<i>Control</i>	11,60 ± 0,80	13,89 ± 1,51	12 ± 1,09	11,1 ± 1,06	11,5 ± 0,82
	<i>PCI</i>	10,42 ± 0,78	10,22 ± 1,96 *	11,25 ± 1,53	10,11 ± 1,38	10,89 ± 1,30
PCP (mmHg)	<i>Control</i>	14,2 ± 1,0	18,22 ± 1,50	16,11 ± 1,11	17,0 ± 1,73	19,4 ± 1,66
	<i>PCI</i>	11,67 ± 1,0	14,44 ± 1,34	14,63 ± 1,07	16,89 ± 2,35	15,63 ± 1,61
IC	<i>Control</i>	5,44 ± 0,42	4,88 ± 0,30	4,41 ± 0,37	4,77 ± 0,52	5,55 ± 1,10
	<i>PCI</i>	6,48 ± 0,59	5,80 ± 0,41	5,30 ± 0,37	6,85 ± 1,82	7,02 ± 1,39

Los resultados se expresan como la media ± error estándar de la media. FC: frecuencia cardiaca; PAM: presión arterial media; PAPM: presión arteria pulmonar media; PVC: presión venosa central; PCP: presión capilar pulmonar; IC: índice cardiaco; lpm: latidos por minuto. Preneumo: pre-neumonectomía; Pre-rp: pre-reperusión; Post-rp 10´: 10 minutos post-reperusión; Post-rp.30´: 30 minutos post-reperusión. * $p < 0,05$ entre el grupo PCI y el control. ** $p < 0,01$ entre grupo PCI y control.

El análisis estadístico de los valores de **frecuencia cardiaca**, **no encuentra diferencias** estadísticamente significativas entre el grupo control y el PCI a lo largo de todo el experimento. Las cifras de frecuencia cardiaca se encuentran dentro de los límites de la normalidad en los animales de este estudio (tabla 5, figura 27).

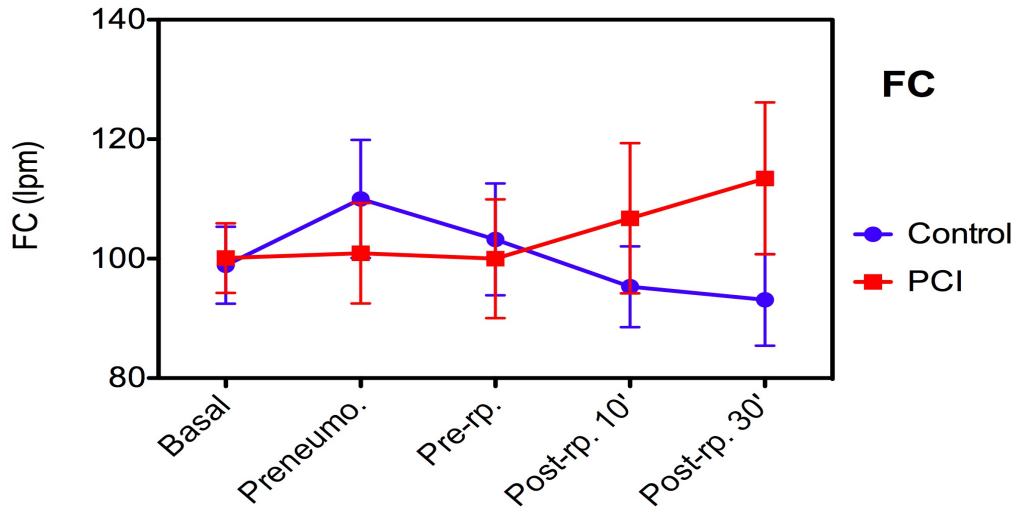


FIGURA 27: Valores de la frecuencia cardiaca

En cuanto a las cifras de **presión arterial media**, tampoco se observan **diferencias** estadísticamente significativas entre el grupo control y el grupo de PCI (tabla 5, figura 28).

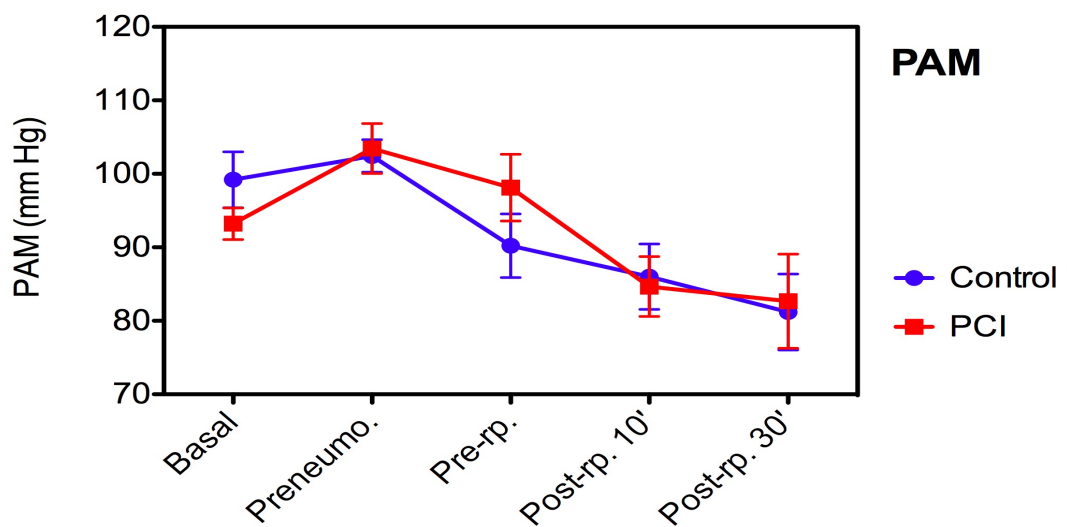


FIGURA 28: Valores de la Presión arterial media

Se mantienen PAM en rangos normales a lo largo del experimento. Así mismo, **tampoco** encontramos **diferencias** significativas entre ambos grupos a nivel de la **presión capilar pulmonar** (tabla5, figura 29) ni en cuanto al **índice cardiaco** (tabla 5, figura 30).

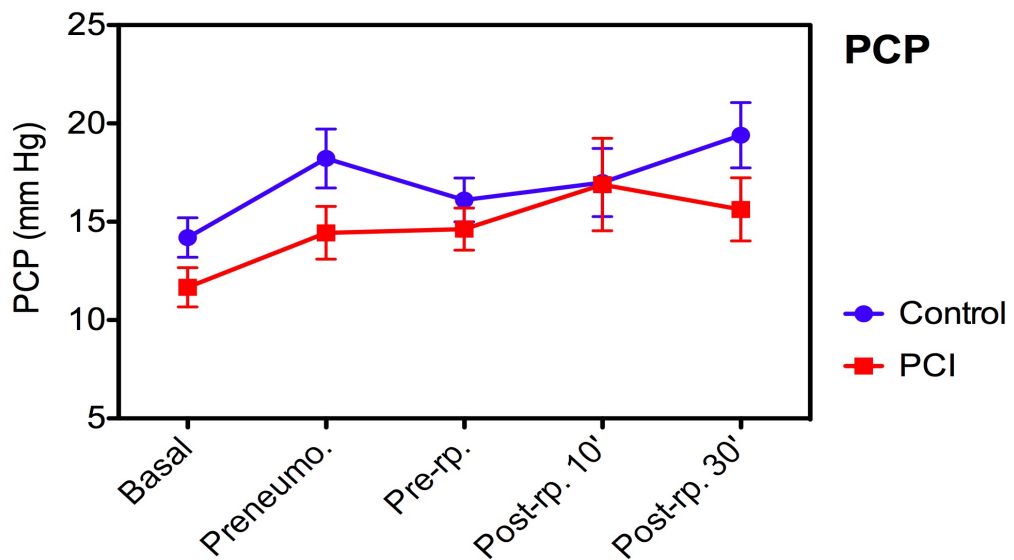


FIGURA 29: Valores de la presión capilar pulmonar

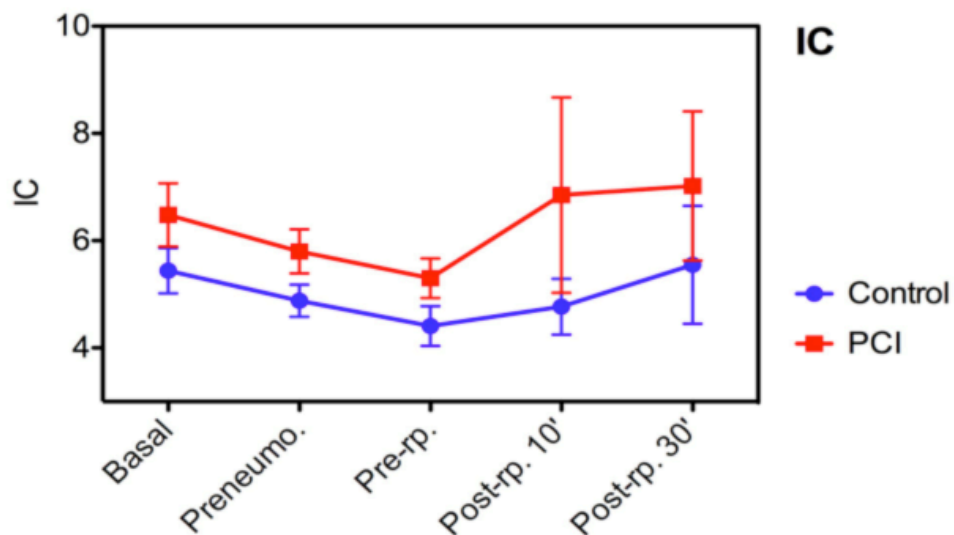


FIGURA 30: Valores del índice cardiaco.

En el análisis estadístico de la **presión arterial pulmonar media** se observa una **diferencia** significativa, con **una $p < 0.01$** , entre el grupo control y el PCI en el momento **basal** del experimento, no observándose diferencias estadísticamente significativas en el resto de los momentos del trabajo (tabla 5, figura 31).

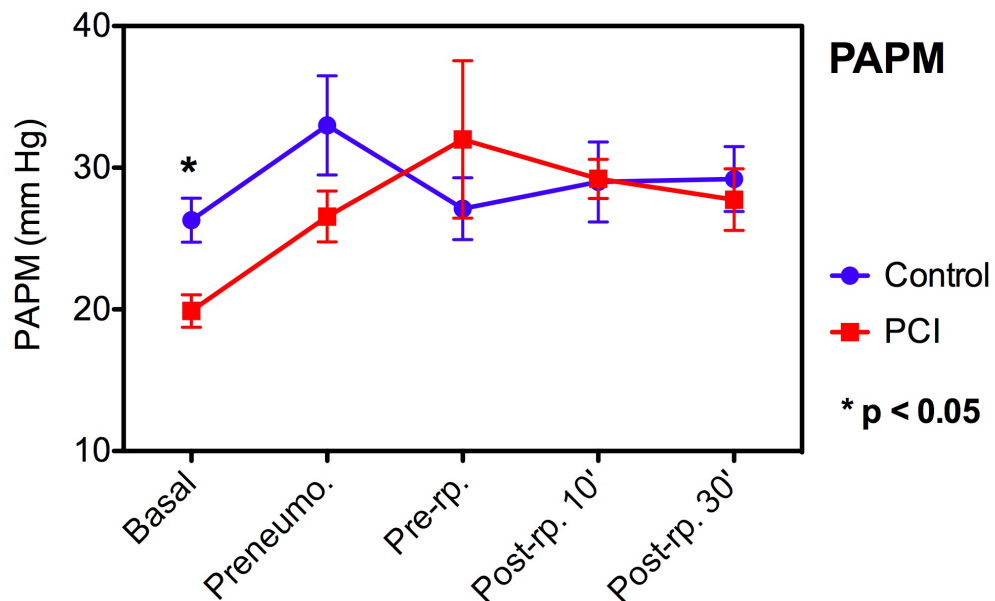


FIGURA 31: Valores de la presión media de la arteria pulmonar

Al analizar los valores de **presión venosa central**, se **observan diferencias** estadísticamente significativas entre ambos grupos, con **una $p < 0.05$** , en el momento **pre-neumonectomía**. No se encuentran diferencias significativas en el resto de momentos del experimento (tabla 5, figura 32).

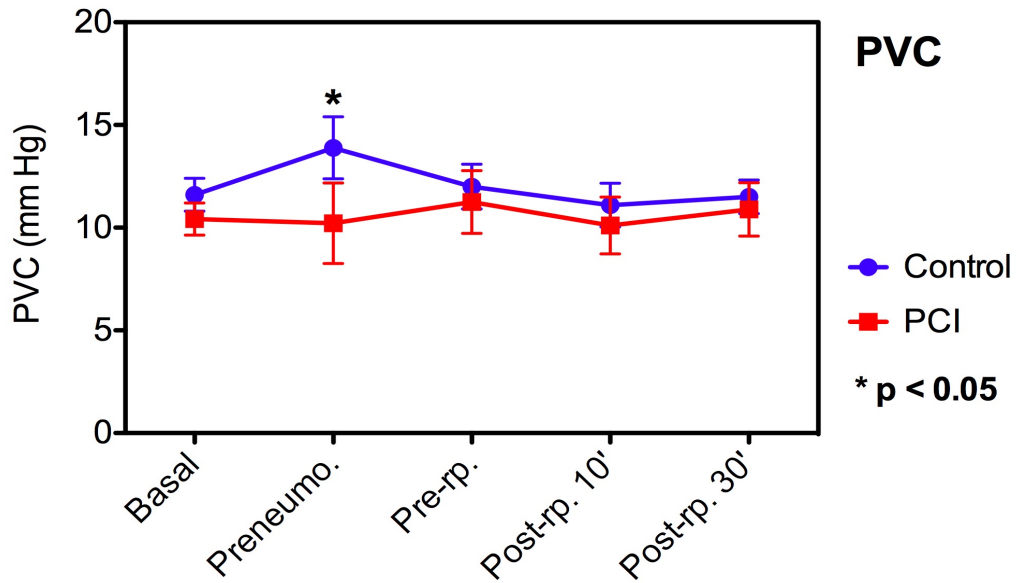


FIGURA 32: Valores de presión venosa central

4.4. RESULTADOS BIOQUÍMICOS:

A continuación se recoge la tabla con los diferentes datos bioquímicos, medidos en tejido pulmonar, referentes al edema pulmonar, al estrés oxidativo y a la activación leucocitaria obtenidos en nuestro estudio, en los distintos momentos del experimento (tabla 6, figuras 33-36).

Tabla 6. Variables bioquímicas relacionadas con edema pulmonar, el estrés oxidativo y la activación leucocitaria, medidas en el tejido pulmonar sometido a isquemia-reperfusión

Variable	Grupo	Preneumo.	Pre-rp.	Post-rp. 10'	Post-rp. 30'
Edema pulmonar	<i>Control</i>	4,82 ± 0,21	4,91 ± 0,48	4,82 ± 0,35	4,87 ± 0,01
	<i>PCI</i>	4,78 ± 0,26	4,30 ± 0,18	4,55 ± 0,29	4,15 ± 0,37
LPO (mmol/mg prot)	<i>Control</i>	2,61 ± 0,07	3,61 ± 0,05	3,64 ± 0,09	3,88 ± 0,06
	<i>PCI</i>	2,61 ± 0,05	2,81 ± 0,06 *	2,88 ± 0,03 *	3,10 ± 0,03 *
MDA (pmol/ mg prot)	<i>Control</i>	3,21 ± 0,13	3,87 ± 0,08	4,99 ± 0,09	5,35 ± 0,09
	<i>PCI</i>	3,43 ± 0,13	4,27 ± 0,05 *	4,35 ± 0,08	4,68 ± 0,07
MPO (UI/ mg prot)	<i>Control</i>	0,07 ± 0,003	0,10 ± 0,002	0,18 ± 0,003	0,23 ± 0,006
	<i>PCI</i>	0,06 ± 0,006	0,10 ± 0,007	0,11 ± 0,009 *	0,14 ± 0,006 *

Los resultados se expresan como la media ± error estándar de la media. PCI: grupo preconditionamiento. LPO: lipoperóxidos; MDA: malondialdehído; MPO: mieloperoxidasa; Preneumo: pre-neumonectomía; Pre-rp: pre-reperfusión; Post-rp 10': 10 minutos post-reperfusión; Post-rp.30': 30 minutos post-reperfusión. * $p < 0.05$ entre el grupo PCI y el control.

4.4.1 Edema pulmonar

El análisis estadístico de las cifras de **edema pulmonar** no revela diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en ningún momento del experimento, aunque como puede apreciarse en la figura 18, ya desde la pre-reperfusión, el edema pulmonar parece menor en el grupo PCI (tabla 6, figura 33).

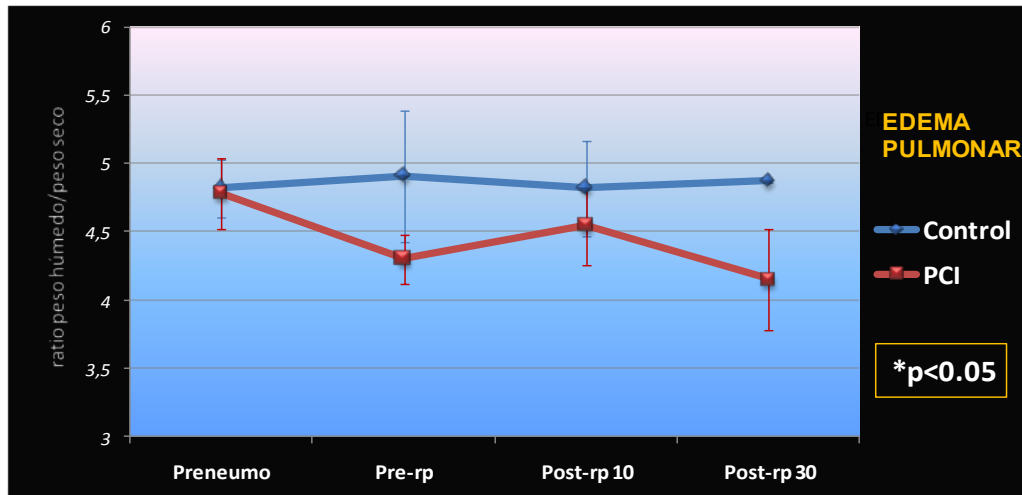


FIGURA 33: Variación de agua vascular extrapulmonar (ratio peso húmedo/peso seco.) * $p<0,05$.

4.4.2 Citoquinas

A continuación se presentan los resultados referentes a la expresión de las citoquinas proinflamatorias IL-1 y TNF- α medidas en tejido pulmonar mediante *Western blotting* a lo largo del experimento (tabla 7, figuras 37 y 38).

Tabla 7. Citoquinas proinflamatorias

Variable	Grupo	Preneumo.	Pre-rp	Post-rp. 10'	Post-rp. 30'
IL-1	Control	1,24 \pm 0,01	1,83 \pm 0,05	1,82 \pm 0,05	1,85 \pm 0,02
	PCI	1,42 \pm 0,02 *	1,47 \pm 0,06 *	1,39 \pm 0,09 *	1,43 \pm 0,03 *
TNF-α	Control	0,71 \pm 0,01	0,85 \pm 0,03	0,96 \pm 0,02	1,98 \pm 0,03
	PCI	0,74 \pm 0,03	0,71 \pm 0,02 *	0,69 \pm 0,02*	0,72 \pm 0,02*

Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media. IL-1: interleuquina 1; TNF- α : factor de necrosis tumoral α ; Preneumo: pre-neumonectomía; Pre-rp: pre-reperusión; Post-rp 10': 10 minutos post-reperusión; Post-rp.30': 30 minutos post-reperusión. * $p<0.05$ entre el grupo PCI y el control.

Interleuquina-1

El análisis estadístico de los valores de IL-1, revela diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en tres momentos: pre-reperusión, a los diez minutos tras la reperusión y a los 30 minutos tras la reperusión del injerto. Siendo menor las cifras de IL-1 en el grupo PCI con una significación estadística de $p < 0.05$. La diferencia se mantiene desde fases iniciales del experimento hasta la finalización del mismo (tabla 7, figura 37).

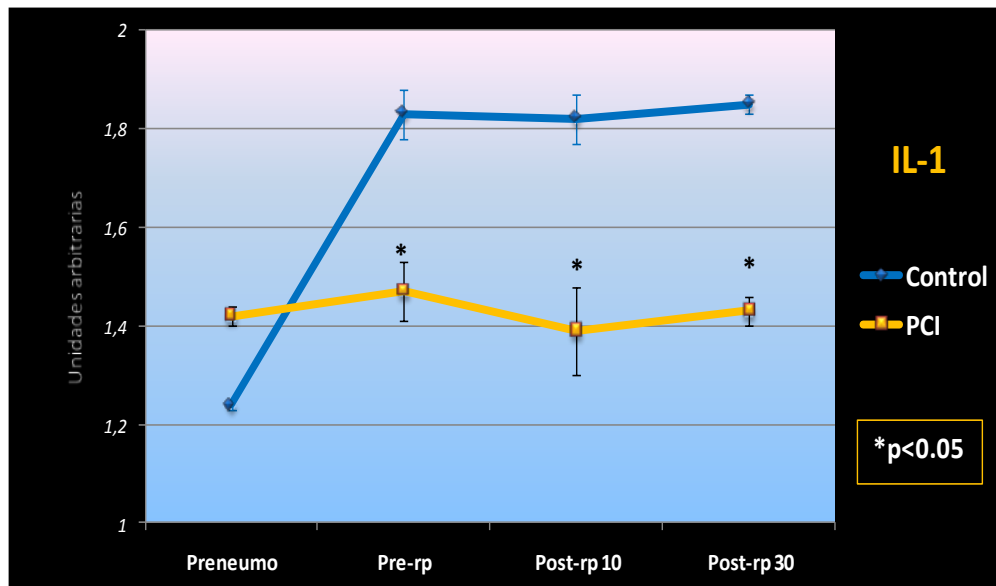


FIGURA 37: Variación de interleuquina-1 (unidades arbitrarias). * $p < 0,05$

Factor de Necrosis tumoral - α

El análisis estadístico del TNF- α también revela diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en tres momentos: pre-reperusión, a los diez minutos tras la reperusión y a los 30 minutos tras la reperusión del injerto.

Siendo menor las cifras de TNF- α en el grupo PCI con una significación de $p < 0.05$. La diferencia se hace máxima en la fase final del experimento, cuando han pasado 30 minutos de la reperfusión del injerto (tabla 7, figura 38).

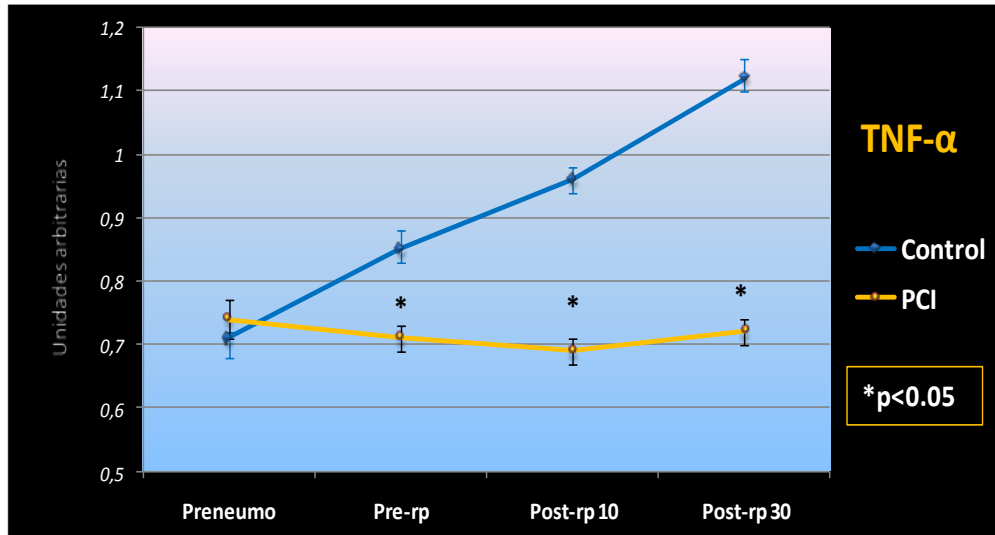


FIGURA 38: Variación de factor de necrosis tumoral (unidades arbitrarias).
* $p < 0,05$

4.4.3 Estrés oxidativo

Lipoperóxidos

El análisis estadístico de los valores de **LPO** encuentra diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el de PCI, con una $p < 0.05$ en tres momentos distintos: durante la pre-reperfusión, a los diez minutos post-reperfusión y a los treinta minutos de la reperfusión. Siendo la LPO significativamente menor en el grupo PCI. No se observan diferencias estadísticamente significativas en el resto del experimento (tabla 6, figura 34).

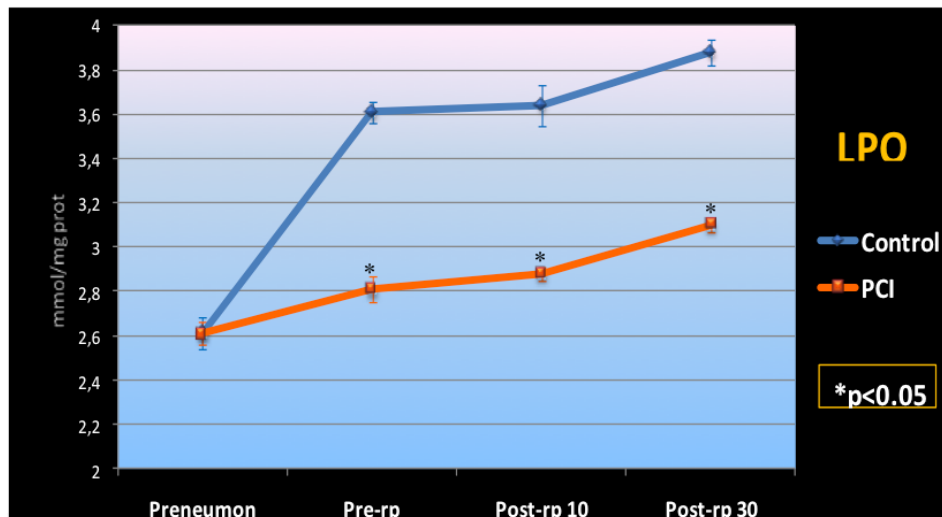


FIGURA 34: Variación de lipoperóxidos (mmol/mg prot). * $p < 0,05$

Malondialdehido

El análisis estadístico de las cifras de **MDA** revela diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el PCI, con una significación $p < 0.05$, durante la pre-reperfusión. Siendo significativamente mayor en el grupo PCI, aunque disminuye la diferencia respecto al grupo control a medida que avanza el experimento. No se observaron diferencias en los demás momentos del experimento (tabla 6, figura 35).

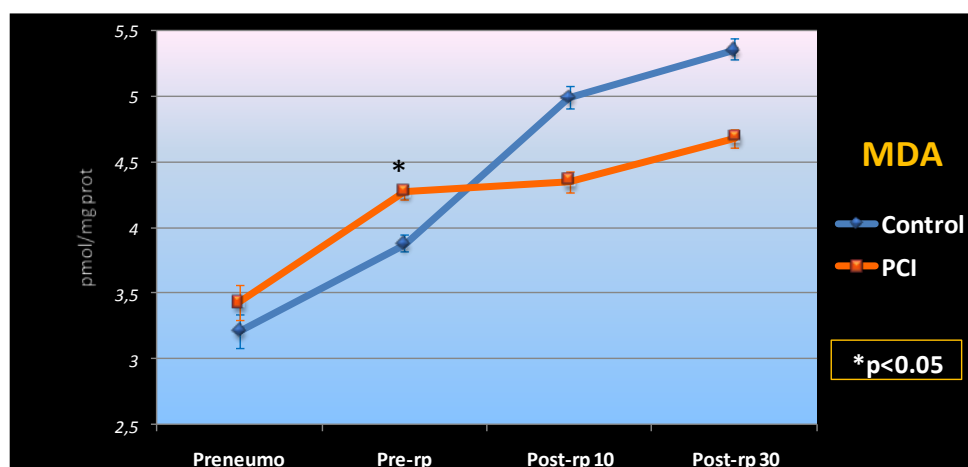


FIGURA 35: Variación de malondialdehído (UI/mg prot). * $p < 0,05$

4.4.4 Activación leucocitaria

El análisis estadístico de las cifras de **MPO** evidencia diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos durante la post-reperusión, tanto a los 10 minutos como a los 30 minutos. Siendo significativamente menor en el grupo PCI, con una significación estadística de $p < 0.05$ (tabla 6, figura 36)

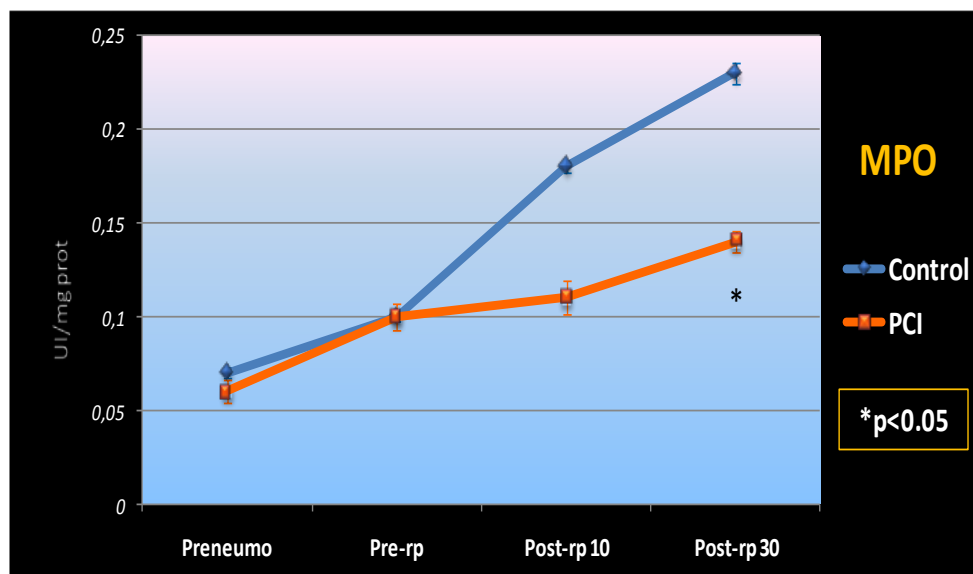


FIGURA 36: Variación de la mieloperoxidasa (UI/mg prot). * $p < 0,05$

4.4.5 Metabolismo del óxido nítrico

En la siguiente tabla aparecen los datos relacionados con el metabolismo del NO. La concentración de NO fue medida en suero de sangre venosa periférica. La actividad de las diferentes oxido nítrico sintetasas fue determinada en tejido pulmonar (tabla 8, figuras 39-42).

Tabla 8. Metabolismo del NO

Variable	Grupo	Preneumo.	Pre-rp.	Post-rp. 10'	Post-rp. 30'
NO (mmol/ml)	<i>Control</i>	43,2 ± 3,4	20 ± 1,7	26 ± 2,8	24,5 ± 2,2
	<i>PCI</i>	43 ± 3,4	35,6 ± 2,2 *	30 ± 3,4	37,2 ± 3,8
eNOS (U.A)	<i>Control</i>	1,66 ± 0,02	1,33 ± 0,02	1,39 ± 0,02	1,34 ± 0,01
	<i>PCI</i>	1,65 ± 0,02	1,45 ± 0,03 *	1,48 ± 0,04 *	1,49 ± 0,02 *
nNOS (U.A)	<i>Control</i>	1,40 ± 0,05	1,05 ± 0,05	1,24 ± 0,04	1,19 ± 0,04
	<i>PCI</i>	1,34 ± 0,06	1,23 ± 0,06 *	1,36 ± 0,04	1,34 ± 0,02
iNOS (U.A)	<i>Control</i>	1,74 ± 0,02	1,81 ± 0,06	1,98 ± 0,04	2,05 ± 0,03
	<i>PCI</i>	1,94 ± 0,06 *	1,97 ± 0,01 *	1,87 ± 0,06	1,88 ± 0,01

Los resultados se expresan como la media ± error estándar de la media. NO: óxido nítrico; eNOS: NO sintetasa endotelial; nNOS: NO sintetasa neuronal; iNOS: NO sintetasa inducible; Preneumo: pre-neumonecromía; Pre-rp: pre-reperusión; Post-rp 10': 10 minutos post-reperusión; Post-rp.30': 30 minutos post-reperusión. * $p < 0,05$ entre el grupo PCI y el control.

Óxido nítrico

Respecto a los valores de **NO**, medido en sangre periférica, encontramos diferencias estadísticamente significativas durante la pre-reperusión, siendo significativamente mayores las cifras en el grupo PCI con una significación de $p < 0,05$. No encontramos diferencias significativas en el resto de momentos del trabajo (tabla 8, figura 39).

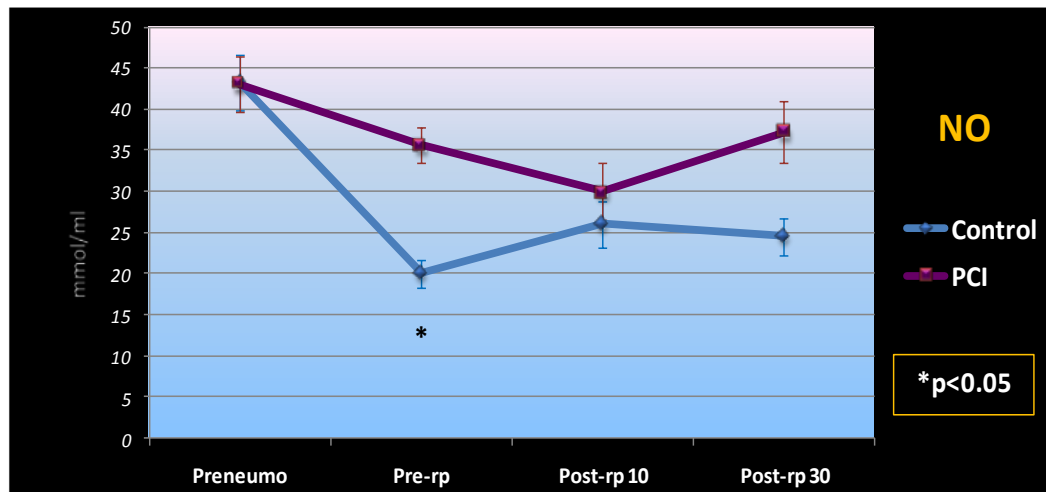


FIGURA 39: Variaciones del óxido nítrico (mmol/ml). *p<0,05

Óxido nítrico sintetasa endotelial

El análisis estadístico de las cifras de NO sintetasa endotelial refleja diferencias estadísticamente significativas en tres momentos del experimento: pre-reperusión, a los 10 minutos post-reperusión y a los 30 minutos post-reperusión. Siendo las cifras más elevadas en el grupo PCI, con una significancia de p<0.05 (tabla 8, figura 40).

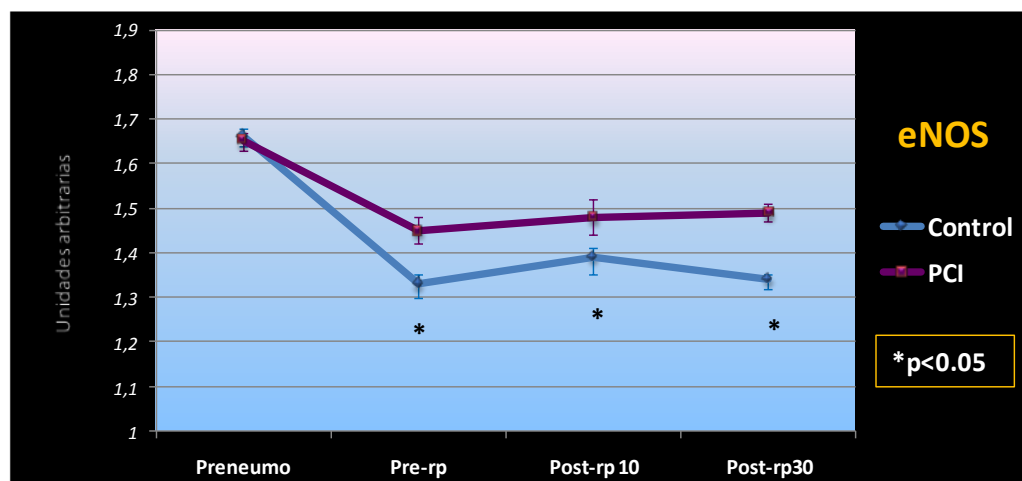


FIGURA 40: Variaciones en la NO sintetasa endotelial (Unidades arbitrarias.) *p<0,05

Óxido nítrico sintetasa neuronal

En cuanto a los niveles de **NOS neuronal**, encontramos diferencias estadísticamente significativas durante la pre-reperusión, siendo los valores más elevados en el grupo PCI, con una significación estadística de $p < 0.05$. Posteriormente, aunque los niveles de la enzima son mayores en el grupo PCI respecto al control, estas diferencias no alcanzan significación estadística (tabla 8, figura 41).

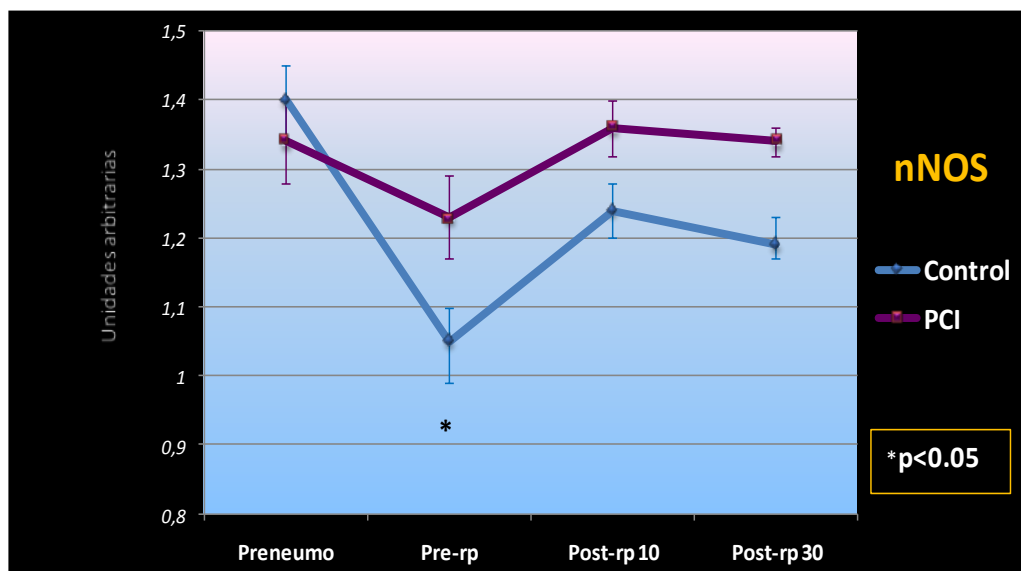


FIGURA 41: Variaciones en la NO sintetasa neuronal (Unidades arbitrarias.) * $p < 0,05$

Óxido nítrico sintetasa inducible

El análisis estadístico de los valores de **NOS inducible**, señala diferencias significativas entre ambos grupos tanto pre-neumonectomía como durante la pre-reperusión, siendo significativamente más altos los niveles en el grupo PCI, aunque posteriormente decrecen los niveles por debajo de los del grupo control. El grado de significación estadística es de $p < 0.05$ (tabla 8, figura 42).

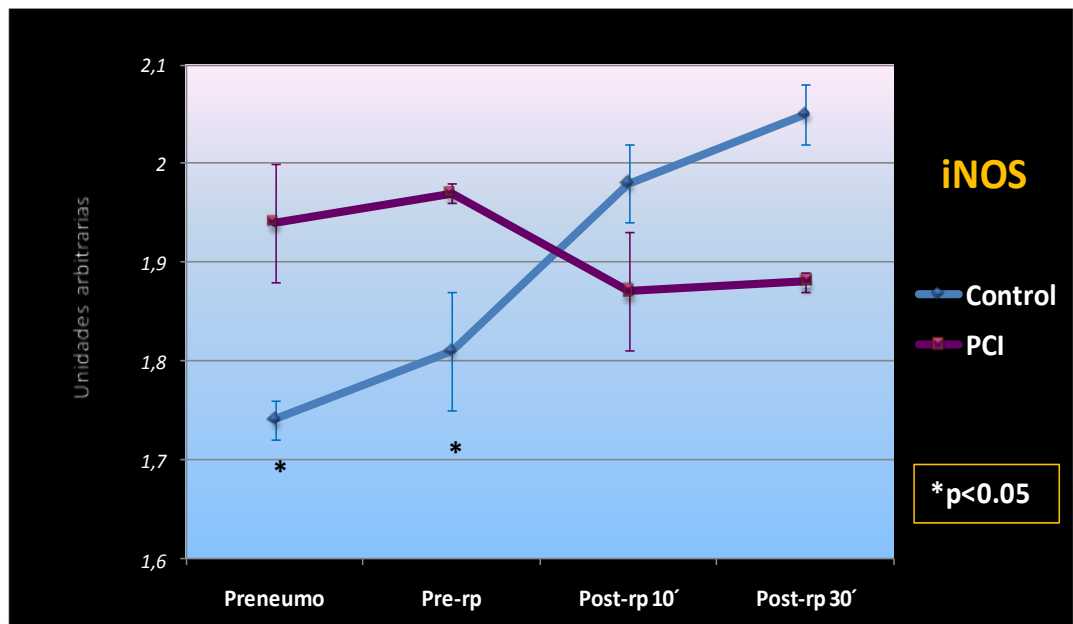


FIGURA 42: Variación de la NO sintetasa inducible (Unidades arbitrarias.) * $p < 0,05$.

5. DISCUSIÓN

La interrupción de la circulación pulmonar durante un tiempo prolongado (isquemia) y el posterior restablecimiento de la misma (reperfusión) activa procesos moleculares que conducen a daño pulmonar y respuesta inflamatoria sistémica con trascendencia en la práctica clínica (6, 7). El síndrome de isquemia reperfusión (SIR) pulmonar puede producirse en determinados procesos patológicos como el tromboembolismo pulmonar o tras resucitación cardiopulmonar, pero con frecuencia es fruto de una interrupción temporal de la circulación pulmonar en el contexto de un procedimiento quirúrgico técnicamente complejo. En cirugía torácica, el proceso terapéutico que clásicamente se relaciona con IR es el trasplante pulmonar, que conlleva isquemias muy prolongadas del órgano, pero en condiciones de hipotermia (47). Sin embargo, cada vez con mayor frecuencia, en los últimos años, se han desarrollado y extendido procedimientos técnicos en los que la isquemia pulmonar no se realiza en hipotermia, sino en normotermia (isquemia caliente), en isquemia tibia (manteniendo el órgano a 12-14° C de temperatura), o en una combinación de ambas, durante un periodo más o menos prolongado de tiempo. Este es el caso de las cirugías en las que se realiza reconstrucción de la arteria pulmonar (angioplastia) y del trasplante lobar de donante vivo. El modelo experimental en el que se basa esta tesis se asemeja mucho a estas situaciones clínicas: el pulmón es sometido a un proceso de isquemia caliente prolongada, durante un procedimiento de autotrasplante, en un mamífero de gran tamaño (cerdo) de comportamiento biológico muy parecido al del ser humano (96).

A partir de este modelo de IR pulmonar, el objetivo del presente estudio ha sido evaluar el papel del PCI como medida efectiva para minimizar la respuesta del organismo a la IR caliente pulmonar. Este modelo experimental de autotrasplante pulmonar no conlleva un enfriamiento progresivo del órgano a trasplantar, ni un enfriamiento de las soluciones de preservación, ni la necesidad de practicar circulación extracorpórea. Además, se aplica un procedimiento de oclusión temporal de la arteria pulmonar izquierda, en ciclos breves y repetidos, como mecanismo de acondicionamiento isquémico del pulmón sobre el que se va a realizar el procedimiento de autotrasplante(97). Por tanto, con este modelo experimental pretendemos conocer, en un contexto preclínico, y mediante análisis de parámetros hemodinámicos, gasométricos y moleculares, si el PCI podría aplicarse para disminuir el SIR que puede presentarse en la práctica clínica, en cirugías con angioplastia de la arteria pulmonar o en procedimientos de trasplante lobar de donante vivo. La importancia del estudio radica en que son pocos los estudios que profundizan en la respuesta a la IR normotérmica pulmonar(19, 33, 72-74, 76, 81, 82) y menos aún los que analizan el efecto del PCI pulmonar en un modelo experimental con grandes mamíferos(83, 98).

El PCI fue una de las primeras estrategias para intentar modular la respuesta al SIR. Los pioneros en el estudio del acondicionamiento fueron Murry y sus colaboradores en 1986. Fueron ellos los que acuñaron el término de “acondicionamiento isquémico” al estudiar el fenómeno de IR en el miocardio de un modelo experimental canino.

En su trabajo comparaban un grupo control en el que se ocluía una arteria coronaria durante 40 minutos, mientras que en el otro grupo se llevaban a cabo 4 periodos de 5 minutos de oclusión de la arteria coronaria, seguidos de 5 minutos de perfusión cada uno. Al comparar el tamaño de los infartos en ambos grupos, observaron que en el grupo en el que se habían realizado oclusiones secuenciales seguidas de periodos de perfusión, el tamaño de los infartos era significativamente menor (hasta un 25% menor). A este mecanismo protector frente al SIR se le llamó precisamente preconditionamiento isquémico(65).

A partir de ese momento se abre una nueva corriente investigadora que comienza a considerar la paradoja de que la isquemia puede actuar como mecanismo protector frente a la propia isquemia. El PCI ha sido desde entonces ampliamente estudiado en numerosos órganos y sistemas, fundamentalmente a nivel cardíaco (64, 66), también a nivel hepático (68), renal (67) y a nivel de extremidades (70).

El protocolo de PCI realizado en nuestro modelo experimental, dos ciclos de 5 minutos de oclusión de la arteria pulmonar izquierda con 5 minutos de perfusión pulmonar tras cada ciclo de oclusión, se asemeja al realizado por Featherstone y cols (99) en pulmón aislado de rata y al realizado por Yhang y cols en pacientes sometidos a resección pulmonar mayor(100).

De acuerdo con estos estudios y los de otros investigadores (98, 101), ciclos repetidos breves de PCI parecen ejercer una mayor protección sobre función pulmonar y atenúan con más eficacia la respuesta inflamatoria y apoptótica pulmonar ante la IR prolongada.

A la vista de los resultados gasométricos y bioquímicos en nuestro modelo experimental, este protocolo de PCI también parece eficaz en modelos porcinos.

5.1 EFECTOS SOBRE PARÁMETROS HEMODINÁMICOS Y GASOMÉTRICOS

En este trabajo se han analizado numerosos parámetros hemodinámicos y gasométricos durante un procedimiento de autotrasplante pulmonar en cerdos. Van Raemdonck et al observaron que la tolerancia a la isquemia caliente del pulmón de conejo no ventilado era de 1 hora(102). Yamakazi et al en un modelo canino de autotrasplante pulmonar, establecieron en 120 minutos el tiempo máximo para que el pulmón permaneciese viable y el animal sobreviviera(75). En nuestro estudio el tiempo medio de isquemia de todos los procedimientos fue de 104 minutos, tiempo suficiente para desarrollar un daño pulmonar no letal, pero con suficientes alteraciones fisiopatológicas que permitan analizar potenciales tratamientos.

En estudios experimentales de IR normotérmica, el daño pulmonar agudo se manifiesta clínicamente con un aumento de la resistencia vascular pulmonar, edema pulmonar y deterioro en el intercambio gaseoso.

En la mayoría de los estudios la isquemia se mantiene de forma más prolongada que en nuestro trabajo, entre 2 y 3 horas y las alteraciones antes descritas se ponen de manifiesto tras varias horas de reperfusión(77, 83, 103).

Nuestro modelo está diseñado para el estudio de la respuesta precoz al SIR. Las diferentes variables hemodinámicas permanecieron relativamente estables a lo largo de todo el experimento lo que creemos confiere mayor validez al resto de hallazgos encontrados.

No se observan diferencias estadísticamente significativas en la mayoría de las variables hemodinámicas y gasométricas entre los dos grupos a lo largo de todo el experimento. Sin embargo, es destacable el hecho de que la capacidad de oxigenación de la sangre por parte del pulmón sometido a isquemia, y reimplantado, es significativamente mayor al final del experimento en el grupo que fue sometido a PCI. Es un dato que nos muestra directamente la respuesta funcional del tejido pulmonar tras ser sometido a una isquemia prolongada. La ausencia de diferencias significativas en la concentración de CO₂ o en el pH sanguíneo, tanto sistémicos como en arteria y vena pulmonar, nos indica que esta diferencia en la oxigenación de la sangre no es consecuencia de alteraciones en la ventilación pulmonar, si no más probablemente de un mejor funcionamiento del intercambio gaseoso o de la microcirculación. Es sin duda el parámetro clínico más llamativo del estudio y sugiere un efecto beneficioso del PCI sobre el funcionamiento del tejido pulmonar sometido a isquemia y reperfusión.

Otros autores, además de observar mejor oxigenación pulmonar, sí observan mejoría en parámetros hemodinámicos tras PCI.

Yildiz y colaboradores demostraron que, en pulmón aislado de rata, un ciclo de 5 minutos de isquemia, seguido de 5 minutos de reperfusión, atenuaba la disminución de la respuesta vasoconstrictora pulmonar inducida por 2 horas de isquemia caliente(85); este efecto era ya patente tras 30 minutos de reperfusión y parecía mediado por la activación de receptores de adenosina. Los resultados de Yildiz confirman que los efectos beneficiosos del PCI se observan poco tiempo después de la reperfusión. En nuestro trabajo, no medimos esta respuesta vasoconstrictora, pero demostramos que los efectos del PCI son evidentes, en cuanto a la capacidad de oxigenación del pulmón, a los 30 minutos de la reperfusión, y, a nivel bioquímico, incluso 10 minutos después de la reperfusión. Gasparri y colaboradores, también observan mejoría de la capacidad de oxigenación del pulmón de conejo, sometido a oclusión hiliar *in situ* durante dos horas, desde los 30 minutos de la reperfusión (83); sin embargo, estos autores consideran que el tiempo acumulado necesario de periodos de isquemia en el PCI debe alcanzar los 15 minutos, mientras que en nuestro experimento dos ciclos de 5 minutos de isquemia demuestran ser suficientes para observar un efecto beneficioso del PCI.

En resumen, en concordancia con otros estudios, en el nuestro modelo experimental, el PCI mejora la capacidad de oxigenación del pulmón sometido a IR normotérmica prolongada.

5.2 EFECTOS DEL PCI SOBRE EL EDEMA PULMONAR

El SIR desencadena una respuesta inflamatoria que provoca daño microvascular con formación de microagregados y lesión de la membrana alveolo-capilar. Se produce a continuación extravasación de líquido del torrente sanguíneo al espacio alveolar y edema pulmonar (101) (medido a través del agua extravascular pulmonar).

Hay determinados trabajos que relacionan el edema pulmonar con diferentes volúmenes tidal durante la ventilación mecánica, asociando un mayor edema con mayores volúmenes tidal (104). En nuestro experimento todos los sujetos de experimentación fueron ventilados con el mismo volumen tidal, por lo que creemos que no ha producido diferencias al respecto.

Varios autores han publicado trabajos en los que el PCI disminuye el edema pulmonar inducido por IR. Featherstone y colaboradores observan este efecto en pulmón aislado de rata, sometido a 6 horas de isquemia fría y tras 40 minutos de reperfusión, cuando se realizaron dos ciclos de 5 minutos de isquemia durante el PCI. Este mismo efecto publican Gasparri y colaboradores en un modelo de IR caliente pulmonar en conejo (83), y Yildiz y colaboradores en pulmón aislado de rata con perfusión normotérmica (85).

Nosotros no encontramos diferencias estadísticamente significativas en cuanto al edema pulmonar en ambos grupos a lo largo de todo el experimento, aunque tal y como se representa en la figura 18, el edema es menor en el grupo PCI sobre todo desde la pre-reperusión. Esto podría deberse al efecto protector del PCI que al disminuir la respuesta inflamatoria del SIR, reduce también el edema pulmonar resultante, aunque es probable que sea necesario investigar este aspecto tras un periodo post-reperusión mayor, cuando el edema esté claramente instaurado. Tal vez entonces se pongan de manifiesto diferencias más relevantes entre ambos grupos. Por otra parte, es posible que el menor edema pulmonar observado en el grupo PCI, aunque no significativo, contribuya a la significativa mejoría del intercambio gaseoso anteriormente descrita.

En resumen, en este estudio aunque se observa un menor edema en el pulmón de los animales sometido a PCI antes de la IR prolongada, las diferencias con el grupo no tratado no fueron significativas.

5.3 EFECTOS DEL PCI SOBRE LA RESPUESTA INFLAMATORIA

Nuestro modelo experimental consiste en el estudio de la respuesta del organismo al SIR pulmonar desde fases muy precoces del mismo (los primeros 30 minutos). En las fases tan precoces del SIR son de vital importancia los macrófagos tisulares, que se activan como consecuencia de la síntesis de RLO y que liberan diferentes citoquinas (60, 105).

De entre ellas, en nuestro estudio hemos analizado tanto el TNF- α (21, 22), como la IL-1(18, 19), cuyo papel en las fases precoces del SIR ha sido ampliamente descrito (23, 25, 26, 30).

Tanto el TNF- α como la IL-1 se elevan de forma significativa en tejido pulmonar, desde fases iniciales del experimento, en el grupo control y estos niveles no descienden durante el procedimiento. En el grupo PCI, sin embargo, se mantienen niveles más o menos similares a lo largo del estudio, muy por debajo del grupo control. Sabiendo que se trata de citoquinas proinflamatorias, con un papel importante en la etiopatogenia del SIR podemos deducir que niveles más bajos de estas sustancias implicarían una menor respuesta inflamatoria y, por ende, menor daño sistémico y pulmonar. Pero la respuesta al SIR es mucho más compleja e intervienen más mediadores, algunos de los cuales analizamos en este trabajo.

Nuestros datos están en consonancia otros trabajos publicados. Krishnadasan y colaboradores observaron un aumento de IL-1 y TNF- α en tejido pulmonar a los 60 minutos de aplicar 90 minutos de isquemia caliente en un modelo experimental murino(19). Friedrich(98) y colaboradores demostraron, en un modelo de IR pulmonar caliente en perros, que los animales sometidos a PCI presentaban niveles menores de IL-6 y TNF α y niveles mayores de IL-10 que los no preconditionados. Por su parte, Jun y colaboradores demostraron una modificación de la expresión génica por el PCI, con disminución de la expresión de la mayoría de citoquinas proinflamatorias como IL-1, IL-2, IL-3, IL-6 IL-15, IF γ y TNF α en las primeras 6h tras reperusión, en un modelo de trasplante pulmonar izquierdo en rata, con isquemia fría del implante durante 2 horas(106).

Con sus importantes diferencias de modelo animal y metodológicas, la mayoría de los autores demuestran que el PCI atenúa la expresión en pulmón de citoquinas proinflamatorias inducida por el SIR pulmonar. En estos estudios, esta expresión de citoquinas se estudia tras 1-8 horas de reperfusión pulmonar. En nuestro experimento, mostramos que estos cambios son evidentes incluso antes de la reperfusión, poniendo de manifiesto la importancia del papel de la producción de citoquinas proinflamatorias por los macrófagos del pulmón donante en el desarrollo de SIR en el receptor.

En resumen, las citoquinas proinflamatorias IL-1 y TNF- α , cruciales en la activación y potenciación de la respuesta inflamatoria en el SIR, experimentan una atenuación en su expresión cuando se aplica PCI antes de la IR prolongada.

5.4 EFECTOS DEL PCI SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO

El aumento del estrés oxidativo es una consecuencia precoz en el SIR pulmonar, como se ha observado mediante la oclusión in situ de la arteria pulmonar en perros (107) y tras la isquemia normotérmica en pulmón aislado de rata(108).

Durante la IR pulmonar, las células endoteliales, los neumocitos II, las células claras, las células epiteliales y los macrófagos alveolares del parénquima pulmonar, generan radicales libres de oxígeno (ROS) como el anión superóxido (O⁻), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y radical hidroxilo (OH), que son moléculas altamente inestables que reaccionan con los enlaces insaturados de los ácidos grasos libres de la membrana celular, produciendo peroxidación lipídica y alterando la permeabilidad de la membrana; el resultado final es daño celular irreversible y lisis celular (103). En estas reacciones se generan hidroperóxidos de lípidos (LPO) y aldehídos, como el malondialdehído (MDA), que se utilizan como indicadores del grado de peroxidación lipídica (109-111).

En este trabajo, los niveles de LPO y MDA aumentan progresivamente en el tejido pulmonar de ambos grupos experimentales, lo que demuestra un incremento progresivo del estrés oxidativo durante el experimento. Sin embargo, este aumento del estrés oxidativo es significativamente menor en el grupo de animales a los que se realizó PCI. Otros autores también han demostrado una atenuación del estrés oxidativo en el SIR pulmonar tras realizar PCI pulmonar (85-87). Li y cols observaron en un modelo canino de trasplante pulmonar izquierdo, con isquemia fría de 2 horas y media, el grupo tratado con PCI (10 minutos de isquemia y 15 minutos de reperfusión) presentó en tejido pulmonar, tras una hora de reperfusión, niveles de MDA significativamente menores que el grupo en el que no se realizó PCI(87). También Yildiz y colaboradores demostraron que, en pulmón aislado de rata, el PCI (5 minutos de isquemia y 5 minutos de reperfusión) atenuaba la elevación de MDA inducida por 2 horas de isquemia caliente (85).

En el trabajo de Soncul y colaboradores, que someten a 3 horas de isquemia normotérmica y 30 minutos de reperfusión a pulmones aislados de cobaya, se observa un menor nivel de MDA, tanto en tejido pulmonar como en el líquido de perfusión, en los casos en que se aplicó PCI (dos ciclos de 5 minutos de isquemia)(86). Du y colaboradores y Pilla y colaboradores llegan a las mismas conclusiones midiendo, como marcador de peroxidación lipídica, sustancias reactivas al ácido barbitúrico(84, 112).

En el grupo de animales en los que se realizó PCI, antes de la reperfusión observamos un incremento de MDA más acusado que en el grupo Control. Parece evidente que el PCI debe activar mecanismos moleculares que incrementen la producción de RLO y, consecuentemente, la peroxidación lipídica. Sin embargo, el hecho de que, tras la reperfusión, el grupo PCI no presente el significativo aumento del estrés oxidativo que se ve en grupo Control, apunta hacia el papel que puede desempeñar un estrés oxidativo subletal en la adaptación celular a periodos de isquemia prolongados (113).

A nivel del descenso de MDA podría intervenir no sólo el PCI sino también la administración de propofol, que parece tener capacidad antioxidante por sí mismo según algunos estudios (114-116). En nuestro trabajo esto no supondría un factor diferenciador puesto que el propofol es administrado en los dos grupos por igual.

En resumen, en nuestro modelo, parece que el PCI es capaz de atenuar el estrés oxidativo inducido por la IR, y nuestros resultados sugieren que una breve y moderada elevación del estrés oxidativo, como efecto del PCI, podría estar involucrada en este fenómeno adaptativo.

5.5 EFECTOS DEL PCI SOBRE LA ACTIVACIÓN LEUCOCITARIA.

Los resultados de nuestros experimentos muestran que la actividad de la MPO en el tejido pulmonar sometido a IR, experimenta un incremento progresivo durante la reperfusión. La MPO es la proteína más abundante de los neutrófilos y cataliza la conversión del peróxido de hidrógeno y el cloruro a ácido hipocloroso, un potente agente oxidante. Es sabido que el aumento de actividad MPO es proporcional al número de neutrófilos que infiltran el tejido y es utilizada como índice de migración leucocitaria y de estrés oxidativo.

Aunque la actividad MPO pulmonar también se elevó en los pulmones sometidos a PCI, esta fue significativamente menor que en los pulmones de los animales del grupo Control, evidenciando que la atenuación de la activación leucocitaria también participa en el mecanismo protector del PCI sobre el SIR pulmonar.

El daño por IR es un proceso bifásico en el que existe una fase precoz mediada por macrófagos, seguida por una fase tardía en la que se produce reclutamiento y activación de neutrófilos(117).

En los modelos de trasplante pulmonar, los macrófagos alveolares del pulmón donante son activados en las fases tempranas del SIR e inician la cascada de eventos que dan lugar a la activación del sistema inflamatorio, amplificada en el receptor durante la reperfusión, al favorecer la agregación intravascular de leucocitos del receptor en el pulmón implantado, y su migración desde los capilares pulmonares al espacio extravascular(118, 119). Cuando los neutrófilos activados alcanzan el espacio extravascular, liberan ROS, citoquinas, proteasas y peroxidasas (destacando la MPO) que producen un aumento de la permeabilidad microvascular, trombosis y daño del parénquima pulmonar (4). Además, la infiltración del parénquima pulmonar por neutrófilos se relaciona con una PaO₂ baja, presiones vasculares pulmonares altas así como resistencias vasculares pulmonares elevadas (118).

Una interpretación global de los resultados de nuestro estudio, permite intuir una correlación entre el aumento observado de citoquinas proinflamatorias, el estrés oxidativo, la activación leucocitaria y la capacidad de oxigenación pulmonar en el SIR de este modelo experimental. En consonancia con los estudios mencionados, el aumento de actividad de TNF e IL-1, así como el estrés oxidativo, es patente en el tejido pulmonar antes de la reperfusión y solo tras esta es evidente el incremento de la activación leucocitaria. Eppinger y colaboradores, en un modelo experimental de IR caliente en ratas, demostraron que las alteraciones observadas durante los primeros 30 minutos de reperfusión eran independientes de la activación leucocitaria, cuyos efectos empezaban a ser patentes trascurridas 4 horas de reperfusión (120).

Con los datos de los que disponemos es difícil saber si en nuestro modelo la activación leucocitaria empieza a ejercer sus efectos más precozmente, pero es evidente que el fenómeno de activación está ya presente en el pulmón implantado tan solo 10 minutos después de iniciar la reperfusión y que el PCI es capaz de disminuirla.

En resumen, hemos observado que en este modelo de autotrasplante pulmonar, la IR induce un aumento de la activación leucocitaria pulmonar, medida por la actividad MPO, y que el PCI puede atenuar este efecto.

5.6 EFECTOS DEL PCI SOBRE EL METABOLISMO DEL NO

Puesto que el NO ha sido implicado como modulador, protector y efector en la IR, medimos los niveles de NO en sangre periférica y de la actividad, en tejido pulmonar, de las diferentes isoformas de la enzima que interviene en su síntesis, la óxido nítrico sintasa (NOS).

El metabolismo del NO ha sido ampliamente estudiado en diferentes modelos de IR, pero con conclusiones muchas veces contradictorias. Esto es debido al papel polivalente del NO (36-39, 121). El NO en pequeñas concentraciones es un factor relajante del endotelio, un agente antitrombótico y un potente agente antiinflamatorio, que disminuye el reclutamiento leucocitario y la consecuente liberación de citoquinas y mediadores inflamatorios (36, 38, 122).

A pesar de sus efectos beneficiosos, también posee efectos deletéreos cuando se encuentra en altas concentraciones, ya que reacciona con ROS en presencia de oxígeno para formar especies de nitrógeno reactivas como peroxinitritos, que son poderosos agentes oxidantes y nitrantes. El peroxinitrito es una potente citotoxina con importantes efectos deletéreos, ya que produce lipoperoxidación de la membrana, inhibe irreversiblemente los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria mitocondrial e induce daño en el DNA celular activando la enzima Poli-ADP-ribosa sintetasa. Además, el peroxinitrito reacciona con el glutatión inhabilitando sus efectos antioxidantes(123, 124). Todo esto es especialmente importante en el SIR pulmonar, ya que durante la isquemia sigue existiendo alta tensión de oxígeno en los alveolos (124).

En el presente experimento, en los dos grupos experimentales existe un descenso de las cifras de NO a lo largo de todo el procedimiento, siendo significativamente menores las cifras en el grupo control, sobre todo durante la pre-reperusión. El papel que esto supone a la hora de modificar la fisiopatología del SIR pulmonar queda lejos de estar resuelto en la literatura y, a la vista de nuestros resultados, solo podríamos conjeturar que en fases muy precoces del SIR pulmonar, este menor descenso del NO podría relacionarse con el efecto protector del PCI durante la reperusión.

En cuanto a las isoformas conocidas de NOS, hemos estudiado la actividad de las formas constitutivas eNOS y nNOS neuronal, y de la forma inducible, iNOS.

Aunque la función de nNOS en pulmón no está bien definida, se ha atribuido a la eNOS funciones en este órgano de vasodilatación, inhibición de la agregación y adhesión plaquetaria e inhibición de la migración y adhesión leucocitaria (118). La eNOS se sobreexpresa en SIR pulmonar, lo que parece limitar la respuesta inflamatoria local e infiltración leucocitaria por supresión de la expresión endotelial de VCAM(125). Sin embargo, la iNOS, única isoforma no constitutiva, se expresa ante estímulos como la ausencia de flujo sanguíneo y ha sido relacionada con la liberación local de altas concentraciones de NO. Esta sobreexpresión y sobreproducción de NO en pulmón daría lugar a una importante secuencia de reacciones responsable de daño por IR (36, 38).

En nuestro estudio, la actividad de la eNOS y nNOS en tejido pulmonar disminuye respecto a los valores pre-isquemia en ambos grupos, pero en el grupo PCI disminuye en menor medida que en el grupo control. Estos resultados estarían en concordancia con los resultados de NO: mayor actividad de estas enzimas en el grupo PCI, mayor síntesis de NO y de sus efectos positivos. No obstante, son necesarios más estudios para determinar esta afirmación, ya que el papel de estas enzimas y su relación con el SIR está aún por esclarecerse.

En cuanto a la actividad de la iNOS, presenta una elevación progresiva de sus niveles en el grupo control a lo largo de todo el procedimiento. Curiosamente, los niveles pre-reperusión son significativamente mayores en el grupo PCI y luego disminuyen a lo largo de la reperusión, situándose por debajo de las cifras de los controles.

Podríamos especular, que una elevación inicial, breve y de menor intensidad, de la síntesis de NO dependiente de iNOS, inducida por el PCI, podría activar mecanismos adaptativos de respuesta a una agresión mayor como la isquemia prolongada.

En resumen, en este modelo de SIR pulmonar el PCI parece modular el metabolismo del NO impidiendo una depleción acusada del NO durante las fases más precoces y evitando más tarde un exceso de expresión del mismo. La modulación de la actividad de las isoformas constitutivas e inducible de la NOS participa en este proceso.

5.7 LIMITACIONES DEL ESTUDIO Y APLICABILIDAD CLÍNICA

La primera limitación del modelo experimental es su complejidad, tanto por el modelo animal como por el procedimiento quirúrgico.

En este trabajo, la homogeneidad del grupo de animales tratado no es igual que la que se pueda conseguir en un grupo de pequeños mamíferos como ratas y ratones. La experimentación con roedores se puede realizar con camadas genéticamente y fenotípicamente idénticas pero con grandes mamíferos el coste de estos proyectos sería en la actualidad exorbitado. Sin embargo, la situación es asimilable a la de los estudios clínicos, en los que la singularidad del paciente es la norma.

Por otra parte, el procedimiento quirúrgico es largo y técnicamente complejo. Tratándose de un ámbito experimental, es posible controlar muchas variables que en la clínica humana escapan de control. A lo largo del estudio se mantiene el personal anestésico, quirúrgico y bioquímico; el experimento y los análisis se realizan en los mismos centros, lo que supone homogeneidad de las condiciones del estudio; y los protocolos anestésico, quirúrgico y de tratamiento de las muestras están bien definidos. No obstante, los tiempos quirúrgicos, modalidad ventilatoria e incidencias técnicas (sangrado, reposición de volemia, calibre de anastomosis vasculares y bronquial, etc.) oscilan de forma inevitable. Algunos de estos parámetros no presentan diferencias significativas cuando lo estudiamos como variables, pero, en conjunto, creemos que la homogeneidad final de los dos grupos, en cuanto a las variables hemodinámicas y gasométricas, confiere la suficiente seguridad al modelo experimental como para sacar conclusiones de las diferencias observadas en los resultados bioquímicos.

Otra limitación del estudio es la brevedad del tiempo de reperfusión. Evidentemente, cuanto más tiempo de reperfusión mayor posibilidad de detectar cambios fisiológicos atribuibles a los resultados bioquímicos. Sin embargo, esto es lo que hasta el momento ha predominado en la literatura estableciendo muchos de los fundamentos que se han presentado a lo largo de la tesis.

En cuanto a la aplicabilidad clínica del experimento, el PCI demuestra, en consonancia con los estudios experimentales comentados, que, tras IR pulmonar normotémica, es capaz de: atenuar la activación de citoquinas proinflamatorias, la activación leucocitaria y el aumento del estrés oxidativo.

Es capaz también de modular el metabolismo del NO; y de mejorar la capacidad de oxigenación del pulmón sometido a IR. Pensamos que hay evidencia suficiente para considerar el PCI como un arma terapéutica eficaz para prevenir el SIR en procedimientos clínicos que requieran mantener un tiempo prolongado de isquemia pulmonar, como en las cirugías de reconstrucción de la arteria pulmonar y en el trasplante lobar de donante vivo. Queda, sin embargo, por determinar cual sería el protocolo clínico ideal de PCI, número y duración de los ciclos de isquemia y reperfusión durante el PCI. Por el momento, el protocolo que proponemos en esta tesis parece ser constantemente eficaz en otros modelos experimentales de IR pulmonar, e incluso ha sido aplicado puntualmente, sin complicaciones, en pacientes que iban a ser intervenidos de resección pulmonar mayor (100).

En resumen, se presenta un modelo experimental de autotrasplante pulmonar en cerdo para el estudio de las fases más precoces del SIR pulmonar en grandes mamíferos, y por ende en humanos. Se describen en profundidad los cambios hemodinámicos, gasométricos y bioquímicos que pueden servir de parámetros de control en el estudio de nuevas terapias moduladoras del daño pulmonar agudo por IR, así como el papel del PCI clásico como herramienta terapéutica útil para minimizar la lesión del SIR pulmonar.

Este modelo, presenta además gran similitud con procedimientos quirúrgicos como la angioplastia pulmonar o el trasplante lobar de donante vivo y podría servir como paso previo al desarrollo de técnicas de autotrasplante pulmonar que, en un futuro, ofrezcan una esperanza real de tratamiento quirúrgico a pacientes con cáncer de pulmón y baja reserva funcional respiratoria. El preconditionamiento isquémico ha demostrado en nuestro estudio que puede perfilarse como una estrategia terapéutica eficaz a la hora de minimizar el daño producido por el SIR pulmonar.

6. CONCLUSIONES

1. El preconditionamiento isquémico clásico proporciona protección frente a las lesiones originadas en el síndrome de isquemia-reperfusión pulmonar ya desde fases muy tempranas (desde 10 minutos después del inicio de la reperfusión, hasta 30 minutos) y que pueden estudiarse en nuestro modelo experimental de autotrasplante pulmonar en el cerdo con isquemia tibia del injerto.

2. El preconditionamiento isquémico clásico no parece modificar la respuesta hemodinámica frente al síndrome de isquemia-reperfusión.

3. El preconditionamiento isquémico parece disminuir la alteración del intercambio gaseoso del tejido pulmonar sometido a isquemia-reperfusión.

4. El preconditionamiento isquémico disminuye los parámetros de estrés oxidativo que intervienen en la fisiopatología del síndrome de isquemia-reperfusión pulmonar.

5. El preconditionamiento isquémico disminuye la activación leucocitaria, lo cual también está relacionado con el efecto protector del mismo a nivel pulmonar.

6. Así mismo, el preconditionamiento isquémico disminuye la liberación de citoquinas proinflamatorias, en concreto la IL-1 y el TNF- α , que intervienen en la fisiopatología de la isquemia-reperfusión pulmonar.

7. Los efectos beneficiosos del preconditionamiento isquémico también podrían estar relacionados con su influencia sobre el metabolismo del óxido nítrico. Ya desde fases precoces del síndrome se produce una elevación de enzimas relacionadas con los efectos beneficiosos del óxido nítrico (la NO sintetasa endotelial y neuronal), así como una disminución de la NO sintetasa inducible que se relaciona con los efectos deletéreos del mismo.

7. ANEXOS



Original

Procedimiento de autotrasplante pulmonar en el cerdo como modelo experimental para el estudio del síndrome de isquemia-reperfusión

Carlos Simón Adiego^{a,*}, Guillermo González-Casaurrán^a, Leire Azcárate Perea^a, Jesús Isea Viña^a, Elena Vara Ameigeiras^b, Cruz García Martín^b, Ignacio Garutti Martínez^c, Javier Casanova Barea^c, Ana Giráldez López^c, Beatriz Martín Piñeiro^c y Federico González-Aragoneses^a

^a Servicio de Cirugía Torácica, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, España

^b Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España

^c Servicio de Anestesiología y Reanimación, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 5 de diciembre de 2010

Aceptado el 19 de febrero de 2011

On-line el 12 de abril de 2011

Palabras clave:

Daño pulmonar agudo
Isquemia caliente
Daño por reperfusión
Modelo experimental
Autotrasplante
Mediadores inflamatorios

RESUMEN

Introducción: El daño pulmonar agudo por isquemia-reperfusión (IR) ha sido estudiado fundamentalmente en modelos experimentales y clínicos con IR fría. Son limitados los estudios que profundizan en las alteraciones bioquímicas durante la IR normotérmica (caliente). El objetivo del este trabajo es presentar un modelo de autotrasplante pulmonar en cerdo para el estudio de las fases más precoces del síndrome de IR normotérmica pulmonar.

Animales y métodos: Seis cerdos de la raza Large-White fueron sometidos a neumonectomía izquierda, lobectomía craneal *ex situ*, reimplantación del lóbulo caudal y reperfusión del mismo durante 30 min. Durante el procedimiento se analizaron diferentes parámetros para identificar cambios hemodinámicos, gasométricos y bioquímicos en el modelo. El estudio estadístico se realizó con pruebas no paramétricas.

Resultados: Tras la isquemia, se observó en tejido pulmonar un aumento significativo ($p < 0,05$) de metabolitos de peroxidación lipídica, de citoquinas y quemoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β y MCP-1), de actividad leucocitaria (mieloperoxidasa o MPO), de actividad óxido nítrico sintasa inducible y de la proteína quinasa MAPKp38, mientras que se observó un descenso de actividad tisular de las formas constitutivas de NOS y de monóxido de carbono sérico. Estas alteraciones se mantuvieron o acentuaron durante la reperfusión, donde se observó también una mayor actividad tisular hemo-oxigenasa constitutiva.

Conclusiones: Se presenta un procedimiento experimental de IR normotérmica pulmonar describiendo en profundidad cambios hemodinámicos, gasométricos y bioquímicos. Tanto el modelo como los parámetros analizados podrían ser útiles en el estudio de nuevas terapias moduladoras del daño pulmonar agudo en situaciones clínicas de IR normotérmica.

© 2010 SEPAR. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Experimental Swine Lung Autotransplant Model to Study Lung Ischemia-Reperfusion Injury

ABSTRACT

Keywords:

Acute lung injury
Warm ischemia
Reperfusion injury
Experimental models
Autotransplant
Inflammatory mediators

Introduction: Ischemia-reperfusion (IR) lung injury has been investigated extensively on clinical and experimental models of cold ischemia. However, relatively few studies examine the detailed biochemical changes occurring during normothermic (warm) IR.

The objective of this work was to establish an experimental lung autotransplant model to be carried out on pigs in order to study the early stages of normothermic lung IR.

Animals and methods: Six Large-White pigs underwent a lung autotransplant which entailed left pneumonectomy, *ex situ* cranial lobectomy, caudal lobe reimplantation and its reperfusion for 30 min. Throughout the procedure, several parameters were measured in order to identify hemodynamic, gasometric and biochemical changes. Non-parametric statistical analyses were used to compare differences between periods.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: carlosmsa@telefonica.net (C. Simón Adiego).

Results: After ischemia, a significant increase ($P < 0.05$) in lipid peroxidation metabolites, proinflammatory cytokines and chemokines (TNF- α , IL-1 β y MCP-1), neutrophil activation, inducible nitric oxide synthase activity and protein-kinase MAPK p38 levels were observed in lung tissue. However, constitutive nitric oxide synthase activity in lung tissue and carbon monoxide plasma levels were decrease. The same held true throughout the reperfusion period, when an increase in the constitutive heme-oxygenase activity was also shown.

Conclusions: An experimental model of normothermic lung IR injury is presented and detailed changes in hemodynamic, gasometric and biochemical parameters are shown. Both the model and the studied parameters may be clinically useful in future investigations testing new therapies to prevent normothermic IR induced lung injury.

© 2010 SEPAR. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

Diversas situaciones clínicas obligan a someter al tejido pulmonar a periodos de isquemia más o menos prolongados, con el consiguiente riesgo de daño pulmonar agudo tras la reperfusión. La mayoría de los estudios para preservar el tejido pulmonar de los efectos de la isquemia reperfusión (IR) se realizan en modelos experimentales o clínicos de trasplante pulmonar con isquemia fría¹. Sin embargo, existen situaciones clínicas en las que no es posible el enfriamiento progresivo del pulmón, ni perfundirlo con una solución de preservación antes de interrumpir la circulación sanguínea. Entre estas situaciones destacan las resecciones pulmonares con angioplastia de la arteria pulmonar²⁻⁴ y los trasplantes de lóbulo pulmonar de donante vivo. Situaciones menos frecuentes, casi anecdóticas, son las resecciones pulmonares *ex situ* de tumores centrales con reimplantación del lóbulo o lóbulos pulmonares viables⁵. En estos casos, parte del tejido pulmonar sufre un periodo más o menos prolongado de isquemia caliente (normotérmica) y son frecuentes el edema de reperfusión y la necesidad de ventilación prolongada en el postoperatorio⁶.

En este contexto, el estudio del daño pulmonar por IR, y de potenciales terapias moduladoras del mismo, requiere modelos experimentales en los que la isquemia se inicie sin enfriamiento ni preservación previa del pulmón. Un modelo experimental que reproduce esta situación es el autotrasplante pulmonar en animales. El objetivo del presente trabajo es presentar un modelo de autotrasplante pulmonar en cerdo para el estudio de las fases más precoces del síndrome de IR pulmonar y analizar los cambios hemodinámicos, gasométricos y bioquímicos que tienen lugar durante este periodo.

Animales y métodos

El estudio se realizó con la aprobación del Comité de Investigación y Experimentación Animal de la institución, siguiéndose en todo momento la normativa europea y española respecto a la manipulación y cuidado de animales de experimentación.

En seis cerdos de la raza Large-White se realizó un procedimiento de autotrasplante pulmonar ortotópico. El peso medio de los animales fue 42,8 kg. La intervención consistió en una neumonectomía izquierda con lobectomía craneal *ex situ*, reimplantación del lóbulo caudal y reperfusión del mismo durante 30 min. El tiempo medio del procedimiento fue de 289 min (rango: 232-325 min) y el tiempo medio de isquemia pulmonar fue de 90 min (rango: 84-97 min). Al principio del procedimiento y durante los periodos de isquemia y reperfusión, se analizaron diferentes parámetros para identificar cambios hemodinámicos, gasométricos y bioquímicos en el modelo.

Procedimiento quirúrgico

Se mantuvo a los animales en ayunas para alimentos sólidos durante 18 h antes del procedimiento, disponiendo de agua

ad libitum. La premedicación se realizó con ketamina intramuscular a 10 mg/kg de peso. Una vez en quirófano, se canalizó una vía periférica, se instauró una oxigenación previa 100% y se estableció una monitorización con electrocardiograma (ECG) y pulsioximetría. La inducción anestésica se realizó con propofol (4 mg/kg; Diprivan®, Fresenius K), fentanilo (3 μ g/kg; Fentanest®, Kern Pharma) y atracurio (0,6 mg/kg; Tracrium®, Glaxo Smith Kline) a través de una vena dorsal de la oreja. La intubación se realizó con un tubo orotraqueal de 6-7 mm de diámetro interno. La asistencia respiratoria se llevó a cabo con un ventilador modelo Drager SA 1. La ventilación se controló por volumen (volumen corriente de 8 ml/kg, 12-15 respiraciones/min, relación entre inspiración y espiración de 1:2) y se ajustó durante la cirugía para mantener en sangre arterial entre 35 y 40 mmHg de anhídrido carbónico; la fracción inspirada de oxígeno (FiO₂) se mantuvo en 1 durante todo el procedimiento. Se realizó una traqueotomía quirúrgica y, tras retirar el tubo orotraqueal, se introdujo un tubo anillado de 6 mm, lo que permitió con más facilidad la intubación selectiva del bronquio derecho durante la cirugía. La anestesia se mantuvo con propofol en perfusión continua (8-10 mg/kg/h), con fentanilo y el atracurio en bolos, según necesidades. Se mantuvo una perfusión intravenosa de ringer lactato a 5-6 ml/kg/h, y de una sustancia coloidal, hidroxietil almidón, según requerimientos. Durante la intervención, la monitorización se realizó con ECG de 3 derivaciones, pulsioximetría, capnografía, presión arterial invasiva y presión venosa central, para lo que se cateterizaron la arteria y vena femorales. A través de la vena femoral se introdujo un catéter de arteria pulmonar (catéter de termodilución 7,5-F, Edwards, Irving, California, EE.UU.). Para controlar la diuresis se realizó una cistostomía suprapúbica.

Tras estos procedimientos preliminares, el animal fue situado en decúbito lateral derecho y se practicó una toracotomía izquierda con resección del cuarto o quinto arco costal. Para realizar la neumonectomía se disecaron sucesivamente la arteria pulmonar, la vena pulmonar craneal, la vena pulmonar caudal y el bronquio izquierdo. Entonces, se seccionó el bronquio izquierdo y se progresó, bajo visión directa, el tubo orotraqueal hacia el bronquio derecho, iniciando el periodo de ventilación unipulmonar. La arteria pulmonar izquierda se ocluyó con una pinza protegida cerca de la bifurcación de la arteria pulmonar principal y se seccionó distalmente dejando un margen de 5 a 10 mm para poder realizar la anastomosis arterial en el reimplante. La vena pulmonar craneal fue ligada cerca de la aurícula y seccionada. Para completar la neumonectomía, la vena pulmonar del lóbulo caudal se pinzó cerca de la desembocadura de la vena del lóbulo mediastínico, se seccionó a 1 o 2 mm de la pinza y fue suturada con punto continuo de prolene 6/0. Con esta maniobra se pudo conservar una longitud suficiente de vena del lóbulo caudal para la anastomosis venoauricular del reimplante. Para prevenir una trombosis de la arteria pulmonar, que se mantenía pinzada durante la cirugía de banco y el reimplante, se procedió, en el momento de su oclusión, a la heparinización con 300 UI/kg en bolo.

Se prosiguió con la cirugía de banco, realizando una lobectomía craneal. El pulmón izquierdo fue perfundido de forma anterógrada

y retrógrada con solución de la Universidad de Wisconsin a 10-15 °C, mientras se ventilaba con ambú (FiO₂: 0,21), hasta conseguir un efluente claro por la arteria y venas pulmonares. Se disecó el pedículo del lóbulo caudal que iba a ser reimplantado: la arteria pulmonar izquierda (tras ligadura y sección de las ramas craneales), la vena pulmonar caudal (liberada de adherencias pleurales hasta las ramas segmentarias) y el bronquio principal izquierdo (tras sección y sutura del bronquio craneal).

Finalmente, el lóbulo caudal se reimplantó mediante anastomosis bronquial con sutura continua de prolene 4/0, sutura arterial continua con prolene 5/0 y sutura venoauricular continua con prolene 6/0. Entonces, el tubo anillado se retiró hacia la tráquea permitiendo la ventilación del implante. La reperfusión se realizó primero de forma retrógrada, despinzando la aurícula izquierda, y después anterógrada, despinzando la arteria pulmonar. La perfusión del lóbulo reimplantado se mantuvo durante 30 min, tras los cuales se procedió a la eutanasia del animal con profundización anestésica e inducción de cardioplejia con cloruro potásico.

Parámetros de estudio

Se registraron: el peso del animal, los tiempos de isquemia y la duración total del procedimiento y el tiempo de ventilación unipulmonar durante la intervención.

Momentos de la medición de variables y recogida de muestras

Como estudio basal, se realizaron estudios hemodinámicos y gasometría arterial sistémica a los 30 min de comenzar la toracotomía, antes de iniciar la ventilación unipulmonar. Los mismos estudios hemodinámicos y gasométricos, junto con biopsias pulmonares y extracción de sangre venosa femoral para estudios bioquímicos, se realizaron en otros cuatro momentos: pre-neumectomía (PreN) –antes de completar la neumectomía, ya iniciada la ventilación unipulmonar–; pre-reperfusión (PreR) –antes de la reperfusión y ventilación del lóbulo reimplantado–; 10 min postreperfusión –tras 10 min de reperfusión del lóbulo reimplantado–; y 30 min postreperfusión –tras 30 min de reperfusión del lóbulo reimplantado–. Se extrajeron biopsias de pulmón tanto para cuantificar el edema pulmonar como para medir parámetros bioquímicos. Las dos primeras muestras, PreN y PreR, se extrajeron del lóbulo craneal del pulmón izquierdo; las dos últimas muestras, Rep-10' y Rep-30', se extrajeron del lóbulo caudal del pulmón izquierdo. Cada muestra de tejido fue dividida en dos: una, para cuantificar el edema pulmonar, se congeló en tubos de polipropileno a -40 °C; la otra se empleó para realizar el estudio bioquímico, siendo congelada inmediatamente con nitrógeno líquido en criotubo y almacenada a -80 °C hasta su análisis. Las muestras de sangre venosa femoral fueron centrifugadas durante 10 min a 1.000 xg y el suero sobrenadante congelado a -40 °C hasta su análisis.

Estudios hemodinámicos

La frecuencia cardiaca fue monitorizada mediante ECG. Se utilizó el catéter arterial para medir la presión arterial media. El catéter de arteria pulmonar permitió la medición y el cálculo de los siguientes parámetros: presión arterial pulmonar media, presión capilar pulmonar, presión venosa central, índice cardiaco y volumen sistólico.

Estudios gasométricos

En los momentos mencionados, en sangre arterial sistémica se midió la presión parcial de oxígeno (PO₂) y de dióxido de carbono (PCO₂), y el pH. Además, a los 10 y a los 30 min de la reperfusión del lóbulo reimplantado se extrajo por punción una muestra de sangre de la vena pulmonar para estudiar la capacidad de intercambio de gases del injerto, midiéndose en dichas muestras PO₂, PCO₂ y pH.

Determinaciones bioquímicas en plasma

- Óxido nítrico (NO): la concentración sérica de NO se basó en la reacción de Griess⁷.
- Monóxido de carbono (CO): para cuantificar la cantidad de CO formado, se añadió a todas las muestras hemoglobina y se determinó la proporción de carboxi-hemoglobina (CO-Hb) espectrofotométricamente según el método de Omura y Sato⁸.

Cuantificación del edema pulmonar

Se expresa mediante la relación peso húmedo/seco. Se calcula mediante la fórmula peso húmedo-peso seco/peso húmedo, midiendo el peso seco tras incubar las muestras durante 24 h a 60 °C.

Estudio del estrés oxidativo y activación leucocitaria en tejido pulmonar

Los niveles de lipoperoxidasa (LPO) muestran el grado de degradación de la membrana lipídica de las células que ocurre como consecuencia de la oxidación. Se determinan utilizando un kit espectrofotométrico específico (K-assay LPO-CC, Kamiya Biochemical Company, EE. UU.). El malondialdehído (MDA) es un compuesto final de la peroxidación lipídica y un marcador de daño celular. Se analiza indirectamente cuantificando la formación de ácidos tiobarbitúricos⁹ en tejido pulmonar. La actividad de la mieloperoxidasa (MPO) indica el acúmulo de polimorfonucleares neutrófilos y se determina mediante el método de Bradley¹⁰ modificado.

Mediadores inflamatorios en tejido pulmonar: Expresión de citoquinas (TNF- α , IL-1 β), óxido nítrico sintasas (endotelial-NOSe, neuronal-NOSn e inducible-NOSi) y hemoxigenasas (HO-1, HO-2)

Se realizan por Western blot utilizando anticuerpos específicos anti TNF- α (Endogen), anti-IL-1 β (Bio Génesis), anti-nitric oxide Synthase I, anti-nitric oxide Synthase II y anti-nitric oxide Synthase III (Chemicon International, Inc.), anti-Heme Oxigenase I y anti-Heme Oxigenase II (Chemicon International, Inc.). Se expresan como unidades arbitrarias.

Proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1; Monocyte chemoattractant protein-1)

Se midió en tejido pulmonar por ELISA utilizando kits comerciales específicos (Biosource International).

Proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK): MAPK p38, JNK y ERK

Se determinaron en tejido pulmonar por ELISA utilizando Kits comerciales específicos (Oncogene).

Análisis estadístico

Los datos se expresan mediante la media y el error típico de la media. El estudio estadístico se realizó utilizando el paquete estadístico SPSS 14.0 (SPSS Inc., Chicago, EE. UU.). Se empleó el test de Wilcoxon para muestras apareadas para detectar diferencias en la evolución de las variables entre los diferentes momentos del procedimiento experimental. Las diferencias se consideraron significativas estadísticamente para un valor de $p < 0,05$.

Resultados

Hemodinámicos

La mayoría de las constantes hemodinámicas medidas se mantuvieron estables a lo largo del procedimiento. Sin embargo, se registró un significativo incremento de la presión capilar pulmonar durante la reperfusión del lóbulo reimplantado (tabla 1).

Tabla 1
Parámetros hemodinámicos

Parámetro	B	PreN	PreR	Rep-10'	Rep-30'
PAM (mmHg)	99 ± 6	102 ± 5	90 ± 6	88 ± 5	87 ± 5
PAPM (mmHg)	28 ± 2	27 ± 5	26 ± 3	31 ± 4	31 ± 3
FC (latido/min)	107 ± 8	94 ± 10	101 ± 10	99 ± 9	95 ± 10
PVC (mmHg)	13 ± 1	12 ± 1	12 ± 1	13 ± 1	13 ± 1
PCP (mmHg)	15 ± 1	16 ± 1	17 ± 1	20 ± 2*†	20 ± 3*
IRVS (dinas. seg/cm ⁵ .m ²)	1.287 ± 138	1.500 ± 111	1.476 ± 219	1.368 ± 246	1.280 ± 256
IRVP (dinas. seg/cm ⁵ .m ²)	178 ± 11	205 ± 54	196 ± 48	179 ± 37	139 ± 23
IVS (ml/latido/m ²)	51 ± 6	56 ± 8	45 ± 4	51 ± 6	69 ± 22
IC (l/min/m ²)	5,6 ± 0,6	4,8 ± 0,4	4,5 ± 0,6	5 ± 0,9	6,2 ± 1,8

Los datos se expresan como media ± error típico de la media.

*p < 0,05 vs B; †p < 0,05 vs PreN.

B: basal; FC: frecuencia cardiaca; IC: índice cardiaco; IRVP: índice de resistencia vascular pulmonar; IRVS: índice de resistencia vascular sistémica; IVS: índice del volumen sistólico; PAM: presión arterial media; PAPM: presión arterial pulmonar media; PCP: presión capilar pulmonar; PreN: preneumectomía; PreR: pre-reperusión; PVC: presión venosa central; Rep-10': 10 min postreperusión; Rep-30': 30 min postreperusión.

Gasometrías

Los resultados de los estudios gasométricos en sangre arterial sistémica y en sangre venosa pulmonar procedente del lóbulo reimplantado se muestran en la tabla 2. Se observó un descenso de la PO₂ arterial (p < 0,05) en las muestras extraídas antes de completar la neumonectomía y a los 10 min de reperfusión del pulmón implantado. La capacidad de oxigenación pulmonar mejoró significativamente tras 30 min de reperfusión.

Estudio del estrés oxidativo

Las determinaciones de productos de peroxidación lipídica (LPO y MDA) en tejido pulmonar mostraron un aumento progresivo de los mismos en tejido pulmonar durante los periodos de isquemia y de reperfusión (tabla 3).

Activación leucocitaria

La actividad de la enzima MPO medida en el tejido pulmonar se incrementó durante el procedimiento, observándose aumentos significativos durante la reperfusión del implante (tabla 3).

Sistema hemo-oxigenasa/monóxido de carbono (HO/CO)

Durante la reperfusión, se observó un incremento de actividad de la isoforma constitutiva HO-2 en tejido pulmonar, mientras que los niveles sanguíneos de CO descendieron respecto de los basales tanto en la isquemia como en la reperfusión (tabla 3).

Citoquinas proinflamatorias

Los estudios con técnicas Western blot mostraron un incremento progresivo de las citoquinas TNF-α e IL-1β en el tejido pulmonar durante la isquemia y la reperfusión del mismo, como se refleja en la tabla 3.

Tabla 2
Parámetros gasométricos

		B	PreN	PreR	Rep-10'	Rep-30'
Sangre arterial sistémica	PO ₂ (mmHg)	359 ± 74	231 ± 56*	315 ± 65	243 ± 64*†	302 ± 66†‡
	PCO ₂ (mmHg)	39 ± 3	46 ± 2*	45 ± 4	48 ± 4	50 ± 6
	pH	7,48 ± 0,02	7,42 ± 0,02*	7,41 ± 0,02	7,4 ± 0,03*	7,41 ± 0,04
Vena pulmonar (lóbulo caudal izquierdo reimplantado)	PO ₂ (mmHg)	-	-	-	260 ± 55	295 ± 46
	PCO ₂ (mmHg)	-	-	-	37 ± 6	42 ± 8
	pH	-	-	-	7,56 ± 0,05	7,51 ± 0,07

Los datos se expresan como media ± error típico de la media.

*p < 0,05 vs B; †p < 0,05 vs PreN; ‡p < 0,05 vs PreR; † p < 0,05 vs Rep-10'.

B: basal; PO₂: presión parcial de oxígeno; PCO₂: presión parcial de dióxido de carbono; PreN: preneumectomía; PreR: pre-reperusión; Rep-10': 10 min postreperusión; Rep-30': 30 min postreperusión.

Proteína quimiotáctica de monocitos-1

La concentración tisular de MCP-1 en las biopsias pulmonares durante la isquemia y la reperfusión aumentó respecto de las mediciones basales, destacando este aumento tras el periodo de isquemia (tabla 3).

Metabolismo del óxido nítrico

Durante el procedimiento se detectó un importante descenso de los niveles plasmáticos de NO. En el tejido pulmonar sometido a IR se observó una disminución de la actividad del las formas constitutivas de la óxido nítrico sintasa, mientras que se midió un incremento de actividad de la forma inducible (tabla 3).

Vía de señalización intracelular de las MAPK

De las diferentes rutas de señalización, se observó un incremento significativo de actividad de la MAPK p38, que presentó un pico de concentración tras la isquemia y mantuvo niveles elevados durante el tiempo de reperfusión (tabla 3).

Discusión

Los modelos experimentales habituales que estudian la IR pulmonar suelen asociarse a enfriamiento progresivo del órgano, perfusión con soluciones de preservación o a circulación extracorpórea, por lo que no son idóneos para el estudio de situaciones como la reconstrucción de la arteria pulmonar o el trasplante lobular de donante vivo, en las que el órgano es sometido repentinamente a isquemia normotérmica o caliente. Es necesario el desarrollo y estudio de modelos experimentales que permitan el estudio de terapias que reduzcan el riesgo de lesión pulmonar aguda en estos pacientes. La mayoría de las investigaciones sobre isquemia caliente pulmonar se realiza en pequeños roedores mediante técnicas de oclusión vascular^{11,12}, siendo menos frecuentes procedimientos

Tabla 3
Determinaciones bioquímicas

	PreN	PreR	Rep-10'	Rep-30'
Edema pulmonar	4,96 ± 0,22	5,25 ± 0,59	5,25 ± 0,28	4,9 ± 0,1
LPO mmol/mg proteína	2,51 ± 0,23	3,65 ± 0,44 †	3,76 ± 0,1 †	3,88 ± 0,13 †
MDA (pmol/mg proteína)	3,25 ± 0,1	3,95 ± 0,03 †	4,91 ± 0,11 ††	5,38 ± 0,1 ††
MPO (U/mg proteína)	0,06 ± 0,006	0,1 ± 0,006	0,19 ± 0,005 †	0,23 ± 0,008 †
CO (pmol/ml)	2,513 ± 0,11	2,34 ± 0,05 †	2,47 ± 0,12 †	2,46 ± 0,08
HO-1 (unidades arbitrarias)	0,67 ± 0,03	0,647 ± 0,07	0,76 ± 0,07	0,79 ± 0,04
HO-2 (unidades arbitrarias)	0,667 ± 0,2	0,819 ± 0,22	0,908 ± 0,21 †	0,872 ± 0,04 †
IL-1β (unidades arbitrarias)	1,25 ± 0,01	1,87 ± 0,05 †	1,83 ± 0,05 †	1,87 ± 0,03 †
TNF-α (unidades arbitrarias)	0,71 ± 0,02	0,89 ± 0,03 †	0,95 ± 0,03 ††	1,27 ± 0,03 †††
MCP-1 (pg/mg proteína)	0,339 ± 0,2	0,67 ± 0,14 †	0,43 ± 0,1 †	0,565 ± 0,02 ††
NO (nmol/ml)	40,04 ± 7,2	24,4 ± 3,3 †	25,38 ± 6,0 †	26,09 ± 4,5 †
NOSe (unidades arbitrarias)	1,66 ± 0,01	1,29 ± 0,02 †	1,41 ± 0,04 †	1,34 ± 0,02 †
NOSn (unidades arbitrarias)	1,48 ± 0,01	0,97 ± 0,04 †	1,2 ± 0,05 ††	1,24 ± 0,04 †
NOSi (unidades arbitrarias)	1,76 ± 0,01	1,81 ± 0,05 †	1,96 ± 0,02 ††	2,06 ± 0,04 ††
MAPK p38 (ng/mg proteína)	4,985 ± 0,3	9,51 ± 1,6 †	5,86 ± 0,9 †	5,57 ± 1,01 †
JNK (ng/mg proteína)	2,381 ± 0,3	2,62 ± 0,2	2,08 ± 0,1	1,97 ± 0,2 †
ERK (ng/mg proteína)	4,11 ± 0,4	4,23 ± 0,3	4,823 ± 0,6	4,02 ± 0,4

Los datos se expresan como media ± error típico de la media. El edema pulmonar se expresa por la relación: peso húmedo-peso seco/peso húmedo. B: basal; CO: monóxido de carbono; ERK: quinasa regulada por señal extracelular; HO-1, HO-2: hemoxygenasa 1,2; IL-1β: interleuquina-1β; JNK: quinasa c-Jun N-terminal; LPO: hidroperóxido de lípidos; MCP-1: proteína quimiotáctica de monocitos-1; MDA: malondialdehído; MPO: mieloperoxidasa; NO: óxido nítrico; NOSe: óxido nítrico sintasa endotelial; NOSi: óxido nítrico sintasa inducible; NOSn: óxido nítrico sintasa neuronal; MAPK p38: proteína quinasa activada por mitógeno p38; PreN: preneumotomía; PreR: Pre-reperusión; Rep-10': 10 min postreperusión; Rep-30': 30 min postreperusión. TNF-α: factor de necrosis tumoral-α. †p < 0,05 vs PreN; ††p < 0,05 vs PreR; †††p < 0,05 vs Rep-10'.

quirúrgicos más parecidos a los realizados en humanos. El autotrasplante pulmonar en grandes mamíferos cumple en gran medida este objetivo; ha sido descrito en perros¹³⁻¹⁷, ovejas¹⁸ y cerdos¹⁹, pero pocos de estos trabajos profundizan en los mediadores inflamatorios durante la IR normotérmica²⁰.

En el presente trabajo se investigaron cambios hemodinámicos, gasométricos y bioquímicos durante un procedimiento de autotrasplante pulmonar en cerdos. Van Raemdonck et al observaron que la tolerancia a isquemia caliente del pulmón de conejo no ventilado era de 1 h²¹ y Yamazaki et al, en un modelo canino de autotrasplante pulmonar, establecieron en 120 min el tiempo máximo tolerable de isquemia caliente para que el pulmón fuera viable y el animal sobreviviera²². El tiempo medio de isquemia pulmonar en nuestro estudio, 90 min, hace previsible el desarrollo de un daño pulmonar no letal pero con manifestaciones fisiopatológicas que permitan analizar el efecto de potenciales tratamientos.

En estudios experimentales de IR normotérmica, el daño pulmonar agudo se manifiesta clínicamente con aumento de la resistencia vascular pulmonar, edema pulmonar y deterioro de la capacidad de intercambio gaseoso. En la mayoría de estos estudios la isquemia se mantiene entre 2 y 3 h y estas alteraciones son patentes tras varias horas de reperusión^{15,23,24}. En nuestro modelo, diseñado para el estudio de la respuesta inflamatoria precoz, las diferentes variables hemodinámicas se mantuvieron relativamente estables a lo largo del procedimiento. Observamos un incremento significativo de la presión capilar pulmonar durante la reperusión y alteraciones gasométricas tras el inicio de la ventilación unipulmonar y a los 10 min del inicio de la reperusión. Consideramos que esta estabilidad clínica confiere mayor fiabilidad a los hallazgos bioquímicos observados.

En cuanto a los mecanismos bioquímicos implicados en el daño por IR de cualquier órgano, numerosos estudios señalan a la producción de radicales libres de oxígeno (RLO), la activación de leucocitos polimorfonucleares y la producción de citoquinas proinflamatorias, como importantes mediadores de la respuesta inflamatoria.

Durante la IR se generan RLO que provocan lisis celular por lipoperoxidación de los ácidos grasos libres de las membranas²⁵. El grado de lipoperoxidación, e indirectamente la presencia de RLO, puede medirse por la presencia de lipoperóxidos (LPO) y de MDA tisular. En el presente modelo se observa un aumento progresivo de MDA y LPO en tejido pulmonar, desde la fase final de la isquemia hasta 30 min después de la reperusión, lo que indica claramente

que el aumento del estrés oxidativo tisular es una consecuencia precoz de la IR. Resultados similares, tras isquemia normotérmica, se han observado en pulmón aislado de rata²⁶ y mediante oclusión *in situ* de la arteria pulmonar en perros²⁷.

En nuestro experimento observamos un aumento significativo de MPO tisular durante la reperusión, indicando un reclutamiento y activación progresiva de leucocitos en el tejido pulmonar. Hoy en día se sabe que el papel de los neutrófilos es importante en la fase tardía del la IR, pero durante las fases más precoces predomina el papel de macrófagos y linfocitos²⁵. Eppinger et al, en un modelo de IR pulmonar caliente en ratas, demostraron que las alteraciones observadas durante los primeros 30 min de reperusión eran independientes de la activación leucocitaria, cuyos efectos empezaban a ser patentes tras 4 h de reperusión²⁸. Nuestros datos muestran que esta infiltración/activación leucocitaria es un fenómeno que comienza a los pocos minutos de la reperusión del órgano.

Una de las consecuencias del incremento tisular de RLO es la activación del sistema HO/CO. La HO es una enzima microsomal que cataliza el paso limitante de la degradación del grupo hemo, convirtiéndolo en biliverdina, CO y Fe³⁺. Existe una creciente evidencia del papel protector de esta enzima y sus metabolitos frente a la lesión por IR²⁹. La isoforma constitutiva, HO-2, se expresa en condiciones basales en numerosos tejidos, mientras que la isoforma inducible, HO-1, también llamada proteína de choque térmico 32, se eleva ante situaciones de estrés como la IR. Por otra parte, el CO se presenta como una potente molécula antiinflamatoria y antiapoptótica, y su efecto parece mediado por la activación de la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK)³⁰. En línea con estos trabajos, en nuestro estudio observamos un aumento de actividad tisular de HO durante la reperusión, lo que indirectamente implica un aumento local de CO, mientras que el descenso de niveles de CO en sangre podría deberse a su consumo periférico al reaccionar con RLO y NO. Algunos autores han descrito resultados semejantes en ratas durante IR caliente hepática³¹ y pulmonar³⁰.

Además de la activación del sistema HO/CO, se ha descrito que los RLO estimulan la síntesis y liberación de diferentes citoquinas y quemoquinas por parte de los macrófagos tisulares. Esta activación de los macrófagos se ha relacionado con la fase precoz de la respuesta inflamatoria a la IR^{25,32}. La IL-1β y el TNF-α son citoquinas proinflamatorias cuya implicación en las primeras etapas de la respuesta inflamatoria a la IR es bien conocida, pero recientemente se ha atribuido un papel crucial en este proceso a la MCP-1, una

quemoquina que regula la migración y activación de monocitos y macrófagos, aunque su función protectora o deletérea aún no ha sido bien definida^{32,33}. En nuestro experimento, estas tres moléculas se elevan significativamente en el tejido pulmonar durante la isquemia, manteniéndose niveles elevados tras 10 y 30 min de reperfusión. Destaca el aumento progresivo del TNF- α , lo que respaldaría los resultados de otros autores que señalan a esta citoquina como un mediador inflamatorio crucial tanto en la fase inicial como tardía de la IR³⁴. Nuestros datos podrían relacionarse con un estudio de Krishnadasan et al, realizado en ratones, en el que se observa un aumento de IL-1 β y el TNF- α en tejido pulmonar a los 60 min de su reperfusión, tras un periodo de 90 min de isquemia caliente¹¹. Sin embargo, en el mismo modelo experimental, la MCP-1 sólo es detectada tras 4 h de reperfusión pulmonar³⁵, discrepancia que podría deberse a las diferencias en el modelo experimental o a la sensibilidad de la técnica de medición.

La alteración del metabolismo del NO ha sido ampliamente estudiada en diferentes modelos de IR, pero con conclusiones frecuentemente contradictorias debido al efecto polivalente del NO²⁵. El NO producido por las isoformas constitutivas de la enzima óxido nítrico sintasa, NOSe y NOSn, sería responsable de efectos fisiológicos beneficiosos como el control del tono vascular o de la agregación de neutrófilos y plaquetas, mientras que el NO sintetizado por la isoforma inducible, NOSi, estaría implicado en procesos fisiopatológicos como el síndrome de IR³⁶. Observamos en nuestro experimento un marcado descenso del NO sanguíneo y una menor actividad NOSe y NOSn en tejido pulmonar, tanto tras la isquemia como durante la reperfusión. Sin embargo, se produjo un significativo aumento de la actividad NOSi. En qué medida estos cambios, y su posible modificación terapéutica, afectan positiva o negativamente al daño por IR no ha sido aún aclarado y tendrá que ser objeto de ulteriores estudios.

Para profundizar en el perfil biomolecular de la respuesta inflamatoria de este modelo, estudiamos la activación de las MAPK. Recientes estudios implican a las MAPK como mediadores intracelulares de la respuesta inflamatoria a la IR, de forma que los componentes finales de esta vía de señalización se trasladan al núcleo y activan factores de transcripción y la expresión de determinados genes. Las MAPK incluyen diferentes familias de enzimas y rutas de activación, destacando las de la MAPK p38, la JNK y la ERK, pero el papel específico de cada una de ellas es aún discutido³⁷. Las dos primeras son activadas por citoquinas proinflamatorias como la IL-1 β y el TNF- α , y también por los RLO³⁸. También se ha observado que la MCP-1 es capaz de activar las tres rutas de señalización³⁹. Además, estudios *in vitro* (con células de endotelio pulmonar) e *in vivo* (IR caliente pulmonar en ratas) demuestra que el CO tiene un efecto anti-apoptótico durante la IR y que este efecto es mediado por la MAPK p38³⁰. El aumento significativo de actividad MAPK p38 que detectamos en el pulmón isquémico sugieren la activación de esta vía de señalización intracelular en respuesta a diferentes mediadores como la IL-1 β , TNF- α , MCP-1 o el CO que también encontramos elevados al final del periodo de isquemia. Igualmente, la generación de RLO, evidente por los productos de peroxidación lipídica, podría estar implicada en esta activación de la vía de las MAPK. Futuras investigaciones deberán esclarecer en qué grado esta vía amplifica y perpetúa la respuesta inflamatoria o, por el contrario, desempeña un papel protector frente a la IR.

En resumen, se presenta un procedimiento experimental de autotrasplante pulmonar en cerdo como modelo de estudio del síndrome de IR pulmonar en grandes mamíferos, y por ende en humanos. Se describen en profundidad cambios hemodinámicos, gasométricos y bioquímicos que pueden servir de parámetros de control en el estudio de nuevas terapias moduladoras del daño pulmonar agudo por IR. El modelo, además de presentar gran similitud con procedimientos quirúrgicos como la angioplastia pulmonar o el trasplante lobular de donante vivo, podría servir como paso

previo al desarrollo de técnicas de autotrasplante pulmonar que, en un futuro, ofrezcan una esperanza real de tratamiento quirúrgico a pacientes con cáncer de pulmón y baja reserva funcional respiratoria. La asociación de novedosos procedimientos como la perfusión pulmonar *ex vivo*⁴⁰ podría ampliar aún más el campo de investigación de este modelo.

Financiación

El estudio ha contado con la financiación del Fondo de Investigación Sanitaria (FIS PI070840 y FIS PI070481) y de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR 2006/121).

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

Bibliografía

- Christie JD, Bavaria JE, Palevsky HI, Litzky L, Blumenthal NP, Kaiser LR, et al. Primary graft failure following lung transplantation. *Chest* 1998;114:51-60.
- Christie JD, Edwards LB, Aurora P, Dobbels F, Kirk R, Rahmel AO, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Twenty-sixth Official Adult Lung and Heart-Lung Transplantation Report—2009. *J heart lung transplant*. 2009;28:1031-49.
- Read RC, Ziomek S, Ranval TJ, Eidt JF, Gocio JC, Schaefer RF. Pulmonary artery sleeve resection for abutting left upper lobe lesions. *Ann Thorac Surg*. 1993;55:850-4.
- Lausberg HF, Graeter TP, Wendler O, Demertzis S, Ukena D, Schafers HJ. Bronchial and bronchovascular sleeve resection for treatment of central lung tumors. *Ann Thorac Surg*. 2000;70:367-71.
- Hendrix H, Schmitt J, Aebert H. Ex situ sleeve resection and autotransplantation of the left lower pulmonary lobe after extended pneumonectomy. *Chirurg*. 2000;71:820-3.
- van der Kaaij NP, Kluijn J, Haitsma JJ, den Bakker MA, Lambrecht BN, Lachmann B, et al. Ischemia of the lung causes extensive long-term pulmonary injury: an experimental study. *Resp Res*. 2008;9:28.
- Ba B. A Rapid assay of urine nitrate using the nitrate reductase enzyme of *E. Colli*. *Food Chem Toxicol*. 1984;22:541-3.
- Omura T, Sato R, Cooper DY, Rosenthal O, Estabrook RW. Function of cytochrome P-450 of microsomes. *Fed Proc*. 1965;24:1181-9.
- Draper HH, Squires EJ, Mahmoodi H, Wu J, Agarwal S, Hadley M. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. *Free Radic Biol Med*. 1993;15:353-63.
- Bradley PP, Priebe DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol*. 1982;78:206-9.
- Krishnadasan B, Naidu BV, Byrne K, Fraga C, Verrier ED, Mulligan MS. The role of proinflammatory cytokines in lung ischemia-reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2003;125:261-72.
- Khimenko PL, Bagby GJ, Fuseler J, Taylor AE. Tumor necrosis factor-alpha in ischemia and reperfusion injury in rat lungs. *J Appl Physiol*. 1998;85:2005-11.
- Huggins CE. Reimplantation of lobes of the lung. An experimental technique. *Lancet*. 1959;2:1059-62.
- Perelman MI, Rabinowitch JJ. Method and technique of experimental autotransplantation of a lung and a lung lobe. *Zentralbl Chir*. 1976;101:916-31.
- Date H. Experimental studies on reimplantation response after lung transplantation. *Nippon Kyobu Geka Gakkai Zasshi*. 1989;37:510-21.
- Nagao RK, Cataneo AJ. Autologous lobar lung implant after pneumonectomy: experimental model in dogs. *Acta Cir Bras*. 2005;20:311-6.
- Cataneo AJ, Cataneo DC. Compensatory lung growth in autologous lobar implant: experimental study in dogs. *Transplant Proc*. 2006;38:958-62.
- Davies LG, Rosser TH, West LR. Autotransplantation of the lung in sheep. *Thorax*. 1965;20:481-94.
- McGahren ED, Teague WC, Flanagan TL, White BJ, Barone GW, Johnson AM, et al. Airway obstruction after autologous reimplantation of the porcine lobe. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1989;97:587-92.
- Matsumoto I, Oda M, Tsunozuka Y, Tamura M, Kawakami K, Watanabe G. Experimental study of extracorporeal lung resection in dogs: ex situ sleeve resection and autotransplantation of the pulmonary lobe after extended pneumonectomy for central lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2004;127:1343-9.
- Van Raemdonck DE, Jannis NC, De Leyn PR, Flameng WJ, Lerut TE. Warm ischemic tolerance in collapsed pulmonary grafts is limited to 1 hour. *Ann Surg*. 1998;228:788-96.
- Yamazaki F, Wada H, Aoki M, Inui K, Hitomi S. An evaluation of the tolerance of the autotransplanted canine lung against warm ischemia. *Jpn J Surg*. 1989;19:326-33.
- Gasparri RI, Jannis NC, Flameng WJ, Lerut TE, Van Raemdonck DE. Ischemic preconditioning enhances donor lung preservation in the rabbit. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1999;16:639-46.

24. Friedrich I, Spillner J, Lu EX, Bartling B, Barnscheid M, Sablotzki A, et al. Ischemic pre-conditioning of 5 minutes but not of 10 minutes improves lung function after warm ischemia in a canine model. *J Heart Lung Transplant.* 2001;20:985-95.
25. De Perrot M, Liu M, Waddell T. Ischemia-reperfusion-induced lung injury. *Am Resp J Crit Care Med.* 2003;167:490-511.
26. Lin X, Li M, Zhou R, Yu H, Zhou L, Li Q, et al. Cariporide pretreatment attenuated warm ischemia/reperfusion injury in an isolated rat lung: a study on antioxidative mechanism. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi.* 2010;27:132-7.
27. Akao T, Takeyoshi I, Totsuka O, Arakawa K, Muraoka M, Kobayashi K, et al. Effect of the free radical scavenger MCI-186 on pulmonary ischemia-reperfusion injury in dogs. *J Heart Lung Transplant.* 2006;25:965-71.
28. Eppinger MJ, Jones ML, Deeb GM, Bolling SF, Ward PA. Pattern of injury and the role of neutrophils in reperfusion injury of rat lung. *J Surg Res.* 1995;58:713-8.
29. Morse D, Lin L, Choi AM, Ryter SW. Heme oxygenase-1, a critical arbitrator of cell death pathways in lung injury and disease. *Free Radic Biol Med.* 2009;47:1-12.
30. Zhang X, Shan P, Otterbein LE, Alam J, Flavell RA, Davis RJ, et al. Carbon monoxide inhibition of apoptosis during ischemia-reperfusion lung injury is dependent on the p38 mitogen-activated protein kinase pathway and involves caspase 3. *J Biol Chem.* 2003;278:1248-58.
31. Ke B, Shen XD, Gao F, Qiao B, Ji H, Busuttill RW, et al. Small interfering RNA targeting heme oxygenase-1 (HO-1) reinforces liver apoptosis induced by ischemia-reperfusion injury in mice: HO-1 is necessary for cytoprotection. *Hum Gene Ther.* 2009;20:1133-42.
32. Zhao M, Fernandez LG, Doctor A, Sharma AK, Zarbock A, Tribble CG, et al. Alveolar macrophage activation is a key initiation signal for acute lung ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006;291:L1018-26.
33. Morimoto H, Hirose M, Takahashi M, Kawaguchi M, Ise H, Kolattukudy PE, et al. MCP-1 induces cardioprotection against ischaemia/reperfusion injury: role of reactive oxygen species. *Cardiovasc Res.* 2008;78:554-62.
34. Eppinger MJ, Deeb GM, Bolling SF, Ward PA. Mediators of ischemia-reperfusion injury of rat lung. *Am J Pathol.* 1997;150:1773-84.
35. Krishnadasan B, Farivar AS, Naidu BV, Woolley SM, Byrne K, Fraga CH, et al. Beta-chemokine function in experimental lung ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg.* 2004;77:1056-62.
36. Liu M, Tremblay L, Cassivi SD, Bai XH, Mourgeon E, Pierre AF, et al. Alterations of nitric oxide synthase expression and activity during rat lung transplantation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000;278:L1071-81.
37. Kim EK, Choi EJ. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1802:396-405.
38. Nagai H, Noguchi T, Takeda K, Ichijo H. Pathophysiological roles of ASK1-MAP kinase signaling pathways. *J Biochem Mol Biol.* 2007;40:1-6.
39. Wain JH, Kirby JA, Ali S. Leucocyte chemotaxis: Examination of mitogen-activated protein kinase and phosphoinositide 3-kinase activation by Monocyte Chemoattractant Proteins-1, -2, -3 and -4. *Clin Exp Immunol.* 2002;127:436-44.
40. Moradiellos Díez FJ, Varela de Ugarte A. Perfusión *ex vivo*: evaluar, recuperar y optimizar pulmones humanos para trasplante. *Arch Bronconeumol.* 2010;46:213-4.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Kaszaki J WA, Szalay L, Boros M. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury . *Transplant Proc.* 2006 apr;38(3):826-8.
2. Di Napoli P TA, De Caterina R, Barsotti A.3 Suppl 4:24S-8S. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury: experimental data. *Ital Heart J.* 2002 Jun;3 Suppl 4:24S-8S. *Ital heart J.* 2002 Jun;3(4):24S-8S.
3. De Oliveira NC OS, Maloney JD, Meyer KC, Kohmoto T, D'Alessandro AM, et al. . Lung transplantation with donation after cardiac death donors: long-term follow-up in a single center. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2010 May;;139(5):1306-15.
4. Collard CD GS. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. . *Anesthesiology.* 2001 Jun;94(6):1133-8.
5. Deffebach ME CN, Lakshminarayan S, Butler J. The bronchial circulation. Small, but a vital attribute of the lung. . *Am Rev Respir Dis.* 1987 Feb;135(2):463-81.
6. Padilla AM PJ. [Lung preservation: current practices]. *Arch Bronconeumol.* 2004 Feb;40(2):86-93.
7. King RC BO RF, Kanithanon RC, Daniel TM, Spotnitz WD, Tribble CG, Kron IL. . Reperfusion injury significantly impacts clinical outcome after pulmonary transplantation. . *Thorac Surg* 2000;69:1681-5.
8. Al-Mehdi AB ZG, Dodia C, Tozawa K, Costa K, Muzykantov V, et al. Endothelial NADPH oxidase as the source os oxidants in lung exposed to ischemia. . *Circ Res.* 1998;83:730-7.
9. Al-Mehdi AB SH, Fisher AB. . Intracellular generation of reactive oxygen species during nonhypoxic lung ischemia. . *Am J Physiol.* 1997 Feb;272(2 Pt 1):L294-300.
10. Balibrea JL G-BB, Garcia-Barreno P, Municio AM. . Pulmonary lung and surfactant lipid biosynthesis in dogs under septic and hypovolemic shock syndromes. *Int J Biochem.* 1979;10(1):91-6.
11. YY. P. Ischemia/reperfusion Lung Injury Increases Serum Ferritin and Heme Oxygenase-1 in Rats. . *Korean J Physiol Pharmacol* 2009 Jun;13(3):181-7.
12. McCoubrey WK J, Ewing JF, Maines MD. . Human heme oxygenase-2: characterization and expression of a full-length cDNA and evidence suggesting that the two HO-2 transcripts may differ by choice of polyadenylation signal. . *Arch Biochem Biophys.* 1992 May 15;295(1):13-20.
13. Wunder C PR. The heme oxygenase system: its role in liver inflammation. . *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord.* 2003 Sep;;3(3):199-208.
14. Qayumi AK JW, Poostizadeh A, Germann E, Gillespie KD. . Comparison of new iron chelating agents in the prevention of ischemia/reperfusion injury: a swine model of heart-lung transplantation. . *J Invest Surg.* 1992 Apr-Jun;5(2):115-27.
15. C. P. Cytokine flow cytometry: understanding cytokine biology at the single-cell level. *J Clin Immunol* 1997 May;17(3):195-204.
16. Vilcek J FM. Historical review: Cytokines as therapeutics and targets of therapeutics. *Trends Pharmacol Sci.* 2004 Apr;25(4):201-9.
17. Miller MD KM-. Biology and biochemistry of the chemokines: a family of chemotactic and inflammatory cytokines. *Crit Rev Immunol.* 1992;;12(1-2):17-46.
18. Chang DM HK, Ding YA, Chiang CH. . Interleukin-1 in ischemia-reperfusion acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997 Oct;;156(4 Pt 1):1230-4.
19. Krishnadasan B NB, Byrne K, Fraga C, Verrier ED, Mulligan MS. . The role of proinflammatory cytokines in lung ischemia-reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003 Feb;125(2):261-72.

20. SJ. T. Tumour necrosis factor and cancer treatment: a historical review and perspectives. . *Rocz Akad Med Bialymst.* . 2001;46:5-18.
21. Scheringa M MR. TNF: a brief review with emphasis on its antitumor activity. *Biotherapy.* . 1990;2(3):275-81.
22. B. B. The complex regulation and biology of TNF (cachectin). *Crit Rev Oncog* 1990;2(1):9-18.
23. TR. M. Cytokines and lung injury: searching for useful biomarkers. . *Crit Care Med.* 2005 Jan;33(1):230-2.
24. Arias-Diaz J VE, Garcia C, Gomez M, Balibrea JL. . Tumour necrosis factor-alpha inhibits synthesis of surfactant by isolated human type II pneumocytes.;. *Eur J Surg* 1993 Oct;159(10):541-9.
25. De perrot M SY, Fischer S, Waddell TK, Mc Rae K, Liu M, et al. Interleukin-8 release during early reperfusion predicts graft function in human lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002 Jan 15;19:909-31.
26. Hosepund JD BL, Keck B, Boucet M, Novick JR. T. he registry of the International Society for Heart and Lung transplantation: seventeenth official report: 2000. *J Heart Lung Transplant.* 2000 19:909-31.
27. Diepenhorst GM vGT, Hack CE. . Complement-mediated ischemia-reperfusion injury: lessons learned from animal and clinical studies. *Ann Surg.* 2009 Jun;249(6):889-99.
28. SM. T. argeting of the fifth complement (C5) component to fight graft impairment after ischemia-reperfusion injury. . *Transplantation.* 2008 Nov 27;86(10):1351.
29. Arumugam TV MT, Woodruff TM, Proctor LM, Shiels IA, Taylor SM. . Complement mediators in ischemia-reperfusion injury. *Clin Chim Acta.* 2006 Dec;374(1-2):33- 45.
30. PA W. Role of complement, chemokines, and regulatory cytokines in acute lung injury. *Ann N Y Acad Sci.* 1996 Oct 31;796:104-12.
31. Chunsheng L PG, Xinhua H. . Expression of intercellular adhesion molecule in lung tissues of experimental acute lung injury and the affect of Rhubarb on it. . *Chin Med Sci J.* 2000 Jun;15(2):93-7.
32. Calfee CS EM, Parsons PE, Thompson BT, Conner ER, Jr., Matthay MA, et al. Soluble intercellular adhesion molecule-1 and clinical outcomes in patients with RTT.
33. Fiser SM TC, Long SM, Kaza AK, Cope JT, Laubach VE, et al. Lung transplant reperfusion injury involves pulmonary macrophages and circulating leukocytes in a biphasic response. *J Thorac Cardiovasc Surg.* . 2001 Jun;121(6):1069-75.
34. Geudens N VB, Neyrinck AP, Van De Wauwer C, Vos R, Verleden GM, et al. The importance of lymphocytes in lung ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc.* 2007 Oct;39(8):2659-62.
35. Naka Y TK, Kayano K, Oz MC, Pinsky JD. Failure to express the P-selectine gene or P-selectine blockade confers early pulmonary protection after lung ischemia or transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94:757-61.
36. Bredt DS SS. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem* 1994;;63:175-95.
37. Forstermann U PJ, Schmidt HH, Heller M, Murad F. Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Mar 1;88(5):1788-92.
38. Gross SS WM. Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annu Rev Physiol.* 1995;57:737-69.

39. Meade MO GJ, Matte-Martyn A, McRae K, Weaver B, Cripps P, et al. . A randomized trial of inhaled nitric oxide to prevent ischemia-reperfusion injury after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003 Jun 1;167(11):1483-9.
40. Adkins WK TA. Role of xanthine oxidase and neutrophils in ischemia-reperfusion injury in rabbit lung. . *J Appl Physiol.* 1990 Dec;;69(6):2012-8.
41. Malik UZ HN, Romero G, Radi R, Freeman BA, Tarpey MM, et al. . Febuxostat inhibition of endothelial-bound XO: implications for targeting vascular ROS production. *Free Radic Biol Med.* 2011 Jul 1;51(1):179-84.
42. Del Rio F ED, De La Calle B, Vidal FG, Paredes MV, Nunez JR. [Evaluation and maintenance of the lung donor]. *Med Intensiva.* 2009 Jan-Feb;33(1):40-9.
43. Teke Z AF, Kelten EC, Enli Y, Sackan KG, Karaman K, et al. . Mannitol attenuates acute lung injury induced by infrarenal aortic occlusion-reperfusion in rats. . *Surg Today.* 2011 Jul;41(7):955-65.
44. BH. A. Dimethyl sulfoxide: recent pharmacological and toxicological research. *Vet Hum Toxicol.* 2001 Aug;43(4):228-31.
45. Alvarez-Ayuso L G-HS, Jorge E, Guardiola JM, Torralba A, Granado F, et al. . Vitamin E action on oxidative state, endothelial function and morphology in long-term myocardial preservation. *Histol Histopathol.* 2010 May;;25(5):577-87.
46. Yeginsu A EM. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in cold ischemic lung preservation. *Exp Clin Transplant* 2009 Jun;;7(2):94-8.
47. Lynch JP TaF. Lung preservation techniques. Primary graft dysfunction Lung and Heart-Lung transplantation. 2006;chapter 15:325-47.
48. Hausen B BM, Schroeder F, Poets CF, Hewitt C, DelRossi AJ, et al. In vivo measurement of lung preservation solution efficacy: comparison of LPD, UW, EC and low K+- EC following short and extended ischemia. *Eur J Cardiothorac Surg* 1997 Nov;12(5):771-9; discussion 9-80.
49. Liu R. IY, Ueda M. . Isoflurane–Sevoflurane Administration before Ischemia Attenuates Ischemia–Reperfusion-induced Injury in Isolated Rat Lungs. . *Anesthesiology.* 2000;92:833–40.
50. Zheng SaZZ. Isoflurane preconditioning induces neuroprotection against ischemia via activation of P38 mitogen-activated protein kinases. *Mol Pharmacol.* 2004;65(5):1172-80. .
51. Bickler PE, X. Zhan, and C.S. Fahlman. Isoflurane preconditions hippocampal neurons against oxygen-glucose deprivation: role of intracellular Ca²⁺ and mitogen-activated protein kinase signaling. *Anesthesiology,* . 2005;103(3):532-9. .
52. Kalimeris K NC, Papoutsidakis N, Xanthopoulou MN, Deftereos G, Tympa A, et al. . Iron chelation prevents lung injury after major hepatectomy. *Hepatol Res.* 2010 Aug;40(8):841-50.
53. Zhang XD HJ, Qin XJ, Li WL, Chen HL, Liu R, et al. Pentoxifylline inhibits intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and lung injury in experimental phosgene-exposure rats. *Inhal Toxicol.* 2010 Sep;;22(11):889-95.
54. Balibrea-Cantero JL A-DJ, Garcia C, Torres-Melero J, Simon C, Rodriguez JM, et al. Effect of pentoxifylline on the inhibition of surfactant synthesis induced by TNF-alpha in human type II pneumocytes. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994 Mar;149(3 Pt 1):699-706.
55. Keshavjee S DR, Zamora MR, de Perrot M, Patterson GA. . ;129(2):. A randomized, placebo-controlled trial of complement inhibition in ischemia-reperfusion injury after lung transplantation in human beings. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2005 Feb;129(2):423-8.

56. Balibrea JL G-BB, García- Barreno P, Municio AM. . Pulmonary lung and surfactant lipid biosynthesis in dogs under septic and hypovolemic shock síndrome. . *Int J Biochem.* 1979;10(1):91-6.
57. Muhlfield C SI, Becker L, Bussinger C, Vollroth M, Bosch A, et al. . Pre- ischaemic exogenous surfactant reduces pulmonary injury in rat ischaemia/reperfusion. *Eur Respir J.* 2009 Mar;33(3):625-33.
58. Van der Kaaij NP HJ, Kluin J, Lambrecht BN, Lachmann B, de Bruin RW, et al. . Surfactant pretreatment ameliorates ischemia-reperfusion injury of the lung. . *Eur J Cardiothorac Surg.* 2005 May;27(5):774-82.
59. Torras J BJ, Seron D, Moliner R, Carrera M, Valles J, Martinez-Castelao A, Alsina J, Griño JM. . Protective effect of the PAF antagonist BN 52021 in an experimental renal warm ischemia model. *Transpl Int.* 1993;6(4):236-8.
60. De Perrot M FS, Liu M, Jin R, Bai XH, Waddell TK, Keshavjee S. . Prostaglandin E1 protects lung transplants from ischemia-reperfusion injury: a shift from pro- to anti-inflammatory cytokines. *Transplantation.* 2001 Nov 15;72(9):1505-12.
61. Aoe M TG, Okabayashi K, Manchester JK, Lowry OH, Cooper JD, Patterson GA. . Administration of prostaglandin E1 after lung transplantation improves early graft function. *Ann Thorac Surg.* 1994 Sep;58(3):655-61.
62. Kohmoto J NA, Kaizu T, Tsung A, Ikeda A, Tomiyama K, Billiar TR, Choi AM, Murase N, McCurry KR. . Low-dose carbon monoxide inhalation prevents ischemia/reperfusion injury of transplanted rat lung grafts. *Surgery.* 2006;140:179–85.
63. Mishra S FT, Lama VN, Nam D, Liao H, Okada M, Minamoto K, Yoshikawa Y, Harada H, Pinsky DJ. 2006; . Carbon monoxide rescues ischemic lungs by interrupting MAPK-driven expression of early growth response 1 gene and its downstream target genes. . *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:5191–6.
64. Tapunia N KY, Habib M.M, Amara M.A, Seifalian A.M, Davidson B. . Remote ischemic preconditioning: a novel protective method from ischemia-reperfusion injury. A review. . *J Surgical Research.* 2008;;150:304-30.
65. Murry CE JR, Reimer KA. . Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986 Nov;;74(5):1124-36.
66. Reimer KA LJ, Rasmussen MM, Jennings RB. . The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation.* 1977;56:786-94.
67. Ali ZA CC, Lim E, Ali AA, Nouraei SA, Akthar AM et al. . Remote ischemic preconditioning reduces myocardial and renal injury after elective abdominal aortic aneurysm repair: a randomized controlled trial. *Circulation.* 2007;116(Suppl):198-1105.
68. Gurusamy KS KY, Sharma D, Davidson BR. 2009;. Ischaemic preconditioning for liver transplantation (Review),. *The Cochrane Library* 2009(1).
69. L. Huerta LR, C. Simón, J. Isea, E. Vidaurre, E. Vara, I. Garutti, F. González-Aragoneses. Ischaemic preconditioning prevents the liver inflammatory response to lung ischaemia/reperfusion in a swine lung autotransplant model. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2012:1-8.
70. Sullivan PJ SK, Hirpara KM, Malone CB, Curtin W, Kerin MJ. Cyclical ischaemic preconditioning modulates the adaptative immune response in human limb ischaemia-reperfusion injury. *British Journal of Surgery.* 2009;96:381-90.
71. Christie JD, et al. Primary graft failure following lung transplantation. *Chest.* 1998;114(1): 51-60.
72. Khimenko PL BG, Fuseler J, Taylor AE. Tumor necrosis factor-alpha in ischemia and reperfusion injury in rat lungs. *J Appl Physiol.* 1998 Dec;85(6):2005-11.

73. Davies LG RT, West LR. . Autotransplantation of the lung in sheep. *Thorax*. 1965 Nov;;20(6):481-94.
74. Matsumoto I OM, Tsunozuka Y, Tamura M, Kawakami K, Watanabe G. . Experimental study of extracorporeal lung resection in dogs: ex situ sleeve resection and autotransplantation of the pulmonary lobe after extended pneumonectomy for central lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004 May;127(5):1343-9.
75. Yamakazi F WH, Aoki M, Inui K, Hitomi S. An evaluation of the tolerance of the autotransplanted canine lung against warm ischemia. *Jpn J Surg*. 1989;16:326-33.
76. Nagao RK CA. Autologous lobar lung implant after pneumonectomy: experimental model in dogs. *Acta Cir Bras*. 2005 Jul-Aug. Epub 2005 Jul 18.;20(4):311-6.
77. Date H AM, Sano Y et al. Improved survival after living-donor lobar lung transplantation. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2004;128(6):933-40..
78. CE. H. Reimplantation of lobes of the lung. An experimental technique. *Lancet*.1959(2):1059-62.
79. Perelman MI RJ. Method and technique of experimental autotransplantation of a lung and a lung lobe. *Zentralbl Chir*. 1976;101:916-31.
80. Cataneo AJ CD. Compensatory lung growth in autologous lobar implant: experimental study in dogs. *Transplant Proc*. . 2006;38:958-62.
81. Waldow T AK, Witt W, Wagner FM, Gulielmos V, Matschke K, et al. . Attenuation of reperfusion-induced systemic inflammation by preconditioning with nitric oxide in an in situ porcine model of normothermic lung ischemia. *Chest*. 2004 Jun;125(6):2253-9.
82. McGahren ED TW, Flanagan TL, White BJ, Barone GW, Johnson AM, et al Airway obstruction after autologous reimplantation of the porcine lobe. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1989 Apr;97(4):587-92.
83. Gasparri RI JN, Flameng WJ, Lerut TE, Van Raemdonck DE. . Ischemic preconditioning enhances donor lung preservation in the rabbit. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1999;16:639-46.
84. Pilla. Ischemic preconditioning by selective occlusion of the pulmonary artery in rats. . *J Bras Pneumol*. 2008;34:583-9.
85. Yildiz. Ischemic preconditioning modulates ischemia-reperfusion injury in the rat lung: role of adenosine receptors. *Eur J Pharmacol*. 2007;556:144-50.
86. Soncul. Role of ischemic preconditioning on ischemia-reperfusion injury of the lung. *Chest*. 1999;115:1672-7.
87. Li. Protective effects of ischemic preconditioning on donor lung in canine lung transplantation. . *Chest*. 1998;113:1356-9.
88. Bowdish ME BMLJeNYTaF. Living lobar lung transplantation. *Lung and Heart-Lung transplantation*. 2006:255-67.
89. Starnes VA BM, Woo MS, et al. . A decade of living lobar lung transplantation: Recipient outcomes. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2004;127(1):114-22.
90. Czebe K CE, Lang G, Jaksch P, Klepetko W. . The first 12 years of Hungarian lung transplantation. *Orv Hetil* 2008 Aug 31;149(35):1635-44.
91. Chen QK JG, Ding JA, Gao W, Chen C, Zhou X. . First successful bilateral living-donor lobar lung transplantation in China. *Chin Med J (Engl)*. 2010;123:1477-8.
92. Machuca TN SFL, Schio SM, Camargo SM, Felicetti JC, Camargo JJ. . Twelve-year survival of the first living-donor pediatric lung transplantation in Brazil. *J Pediatr (Rio J)*. 2012;88:413-6.
93. W Sommer IT, C Kühn , M Avsar , N Schwerk , C Müller , S Cebotari , K Seidemann , T Jack , C Gras , M Krüger , A Haverich , G Warnecke. 2013; . Living-

donor lobar lung transplantation in a 11-year old child on ECMO and mechanical ventilation - a case report. *Thorac cardiovasc Surg.* 2013;61.

94. Prashant N Mohite AFP, Magdi H Yacoub and Andre R Simon. . Live related donor lobar lung transplantation recipients surviving well over a decade: still an option in times of advanced donor management. *Journal of Cardiothoracic Surgery.* 2013;8(37).

95. Tang YJ WC, Dong YZ, Wang CD. . Lung autotransplantation for treating bronchus neoplasms. *Chin Med J (Engl).* 2007 Dec 20;120(24):2325-6.

96. Simón Adiego C G-CG, Azcárate Perea L, Isea Viña J, Vara Ameigeiras E, García Martín C, Garutti Martínez I, Casanova Barea J, Giráldez López A, Martín Piñeiro B, González-Aragoneses F. . Procedimiento de autotrasplante pulmonar en el cerdo como modelo experimental para el estudio del síndrome de isquemia-reperusión. *Arch Bronconeumol.* 2011;47(6):283-9.

97. Simón C VE, Garutti I, González-Casaurrán G, Azcárate L, Isea J et al. . Modulation of monocyte chemoattractant protein-1 expression by ischaemic preconditioning in a lung autotransplant model. *Eur J Cardiothorac Surg* 2012;41:933-9.

98. Friedrich I SJ, Lu EX, Bartling B, Barscheid M, Sablotzki A, et al. . Ischemic pre-conditioning of 5 minutes but not of 10 minutes improves lung function after warm ischemia in a canine model. *J Heart Lung Transplant.* 2001;20:985-95.

99. Featherstone RL CD, Kelly FJ. . Ischemic preconditioning enhances recovery of isolated rat lungs after hypothermic preservation. *Ann Thorac Surg.* 2000;69: 237-42.

100. Yang Y, Chen, S., & Zhang, W. . Effect of ischemic preconditioning on human lung cell apoptosis in vivo and the expression of regulating gene bcl-2. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2002;27(1):43-5.

101. Pezzulo A CI, Trejo H, Urich D, Caraballo J, Gutierrez J, et al. Vasoconstriction is required for edema of contralateral lung after reperfusion injury of one lung. *Invest Clin.* 2010 Mar;;51(1):53-63.

102. Van Raemdonck DE JN, De Leyn PR, Flameng WJ, Lerut TE. . Warm ischemic tolerance in collapsed pulmonary grafts is limited to 1 hour. *Ann Surg.* 1998;228:788-96.

103. De Perrot M LM, Waddell T. Ischemia-reperfusion-induced lung injury. *Am Resp J Crit Care Med.* 2003;167:490-511.

104. Matsuyama H AF, Hashimoto S, Ueno H, Beppu S, Mizuta M, et al. Acute lung inflammation and ventilator-induced lung injury caused by ATP via the P2Y receptors: an experimental study. *Respir Res.* 2008;9:79.

105. Zhao M FL, Doctor A, Sharma AK, Zarbock A, Tribble CG, et al. . Alveolar macrophage activation is a key initiation signal for acute lung ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;291:L1018-26.

106. Jun PN, Ke, M. J., Gang, P. C., Lin, M. C., Jinsong, M. L., & Jianjun, M. W. . The Protective Effect of Ischemic Preconditioning Associated with Altered Gene Expression Profiles in Rat Lung after Reperfusion. *YJSRE.* 2011;168(2):281-93.

107. Akao T TI, Totsuka O, Arakawa K, Muraoka M, Kobayashi K, et al. Effect of the free radical scavenger MCI-186 on pulmonary ischemia-reperfusion injury in dogs. *J Heart Lung Transplant* 2006 Aug;25(8):965-71.

108. Lin X LM, Zhou R, Yu H, Zhou L, Li Q et al. . Caripode pretreatment attenuated warm ischaemia/reperfusion injury in an isolated rat lung: an study on antioxidative mechanism. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi.* .2010;27:132-7.

109. JM. M. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med.* 1985 Jan 17;312(3):159-63.

110. Al-Mehdi AB SH, Fisher AB. . Intracellular generation of reactive oxygen species during nonhypoxic lung ischemia. . *Am J Physiol* 1997 Feb;;272((2 Pt 1):):L294-300.
111. S. T. Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathol Int.* 1999 Feb;49(2):91-102.
112. Du. Ischemic preconditioning enhances donor lung preservation in the rat. . *J Heart Lung Transplant.* 1996;15:1258-67.
113. Ucar G TE, Kandilci HB, Gümüşel B. . Effect of ischemic preconditioning on reactive oxygen species-mediated ischemia–reperfusion injury in the isolated perfused rat lung. . *Clin Biochem.* 2005;38:681-4.
114. Alvarez-Ayuso L CP, Granado F, Jorge E, Herrero C, Torralba A, et al. . Antioxidant effect of gamma-tocopherol supplied by propofol preparations (Diprivan) during ischemia-reperfusion in experimental lung transplantation. . *Transpl Int.* 2004 Feb;17(2):71-7.
115. Balyasnikova IV VD, Gunnerson HB, Paisansathan C, Baughman VL, Minshall RD, et al. . Propofol attenuates lung endothelial injury induced by ischemia-reperfusion and oxidative stress. . *Anesth Analg.* 2005 Apr;100(4):929-36.
116. Murphy PG BJ, Myers DS, Davies MJ, Jones JG. . The effect of propofol anaesthesia on free radical-induced lipid peroxidation in rat liver microsomes. . *Eur J Anaesthesiol.* 1993 Jul;10(4):261-6.
117. Sharma AK, Fernandez, L. G., Awad, A. S., Kron, I. L., & Laubach, V. E. . Proinflammatory response of alveolar epithelial cells is enhanced by alveolar macrophage-produced TNF- during pulmonary ischemia-reperfusion injury. . *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology.* 2007;293(1):105-13.
118. Hengst d, W. A., Gielis, J. F., Lin, J. Y., Van Schil, P. E., De Windt, L. J., & Moens, A. L. . Lung ischemia-reperfusion injury: a molecular and clinical view on a complex pathophysiological process. *AJP: Heart and Circulatory Physiology.* 2010;299(5): H1283–H99.
119. Novick RJ GK, Ali IS, Lee J. . Lung preservation: the importance of endothelial and alveolar type II cell integrity. *Ann Thorac Surg.* 1996;62:302–14.
120. Eppinger MJ JM, Deeb GM, Bolling SF, Ward PA. . Pattern of injury and the role of neutrophils in reperfusion injury of rat lung. *J Surg Res.* 1995(58):713-8.
121. Tripatara P SAPN, Web A, Rathod K, Lecomte F et al. . Nitrite-derived nitric oxide protects the rat kidney against ischemia/reperfusion injury in vivo:role for xanthine oxidoreductase. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18:570-80.
122. Finocchietto PV, Franco, M. C., Holod, S., Gonzalez, A. S., Converso, D. P., Arciuch, V. G. A., Serra, M. P., et al. . Mitochondrial Nitric Oxide Synthase: A Masterpiece of Metabolic Adaptation, Cell Growth, Transformation, and Death. *Experimental Biology and Medicine.* 2009;234(9):1020–8.
123. Naidu BV, Fraga, C., Salzman, A. L., Szabo, C., Verrier, E. D., & Mulligan, M. S. . Critical role of reactive nitrogen species in lung ischemia-reperfusion injury. *The Journal of heart and lung transplantation,*. 2003;22(7):784–93.
124. Ovechkin AV, Lominadze, D., Sedoris, K. C., Robinson, T. W., Tyagi, S. C., & Roberts, A. M. . Lung ischemia–reperfusion injury: implications of oxidative stress and platelet–arteriolar wall interactions. *Archives Of Physiology And Biochemistry,* . 2007;113(1):1-12.
125. Kaminski A, Pohl, C. B., Sponholz, C., Ma, N., Stamm, C., Vollmar, B., & Steinhoff, G. Up-regulation of endothelial nitric oxide synthase inhibits pulmonary leukocyte migration following lung ischemia-reperfusion in mice. *The American journal of pathology,*. 2004;164(6):2241–9.

