

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Cirugía



**EFFECTO DEL PRECONDICIONAMIENTO CON  
SEVOFLUORANO SOBRE LA TRANSCRIPCIÓN DE  
MEDIADORES INFLAMATORIOS EN UN MODELO  
EXPERIMENTAL PORCINO DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN  
PULMONAR**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Beatriz Martín Piñeiro**

Bajo la dirección de los doctores

Elena Vara Ameigeiras  
Ignacio Garutti Martínez  
Carlos Simón Adiego

**Madrid, 2013**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Departamento de Cirugía**



**TESIS DOCTORAL**

**Efecto del preconditionamiento con  
Sevoflurano sobre la transcripción de  
mediadores inflamatorios en  
un modelo experimental porcino de isquemia-  
reperfusión pulmonar**

**Beatriz Martín Piñeiro**

**Madrid, Curso Académico 2012-2013**

**Directores: Dra. Elena Vara Ameigeiras**

**Dr. Ignacio Garutti Martínez**

**Dr. Carlos Simón Adiego**

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento,

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, por haber mostrado una paciencia infinita conmigo y por guiarme en el, hasta ahora desconocido para mí, mundo de la Investigación Bioquímica.

Al Dr. Ignacio Garutti Martínez, Médico Adjunto de Anestesiología y Reanimación del Hospital Gregorio Marañón, porque su afán investigador es un estímulo para todos los que alguna vez hemos tenido la suerte de trabajar a su lado.

Al Dr. Carlos Simón Adiego, Médico Adjunto de Cirugía Torácica del Hospital Gregorio Marañón, por su inagotable capacidad de trabajo, por la contagiosa ilusión con que impregnó esta investigación y por darme el empuje necesario para seguir cuando me faltaron las fuerzas.

A Javier Casanova y Ana Giráldez, mis compañeros de residencia y, por encima de todo, mis amigos. Habéis sido mi principal apoyo desde el inicio de este proyecto. Gracias por no dejarme abandonar en los momentos de flaqueza y por darme tantos y tan buenos ratos durante nuestras tardes en el Experimental.

A los residentes de Anestesia que continuaron el proyecto, porque su llegada supuso un impulso para continuar mejorando día a día.

Al resto de compañeros que en algún momento han participado en la elaboración de esta tesis: cirujanos Torácicos, estudiantes de Medicina y miembros del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III de la UCM, que han hecho posible con su esfuerzo desarrollar esta línea de trabajo.

A todo el personal del Centro Experimental del Hospital Universitario Gregorio Marañón, porque, con su dedicación y buen talante, hicieron nuestra tarea mucho más grata.

A Luis, por ser mi consejero en la elaboración de la Tesis y en tantos otros aspectos

de la vida.

A mis padres, por ser el pilar fundamental en toda mi educación, tanto académica, como de la vida. Nunca os agradeceré lo suficiente todo lo que habéis sacrificado para darnos la mejor educación posible.

Al resto de mi familia, en especial a mi sobrino, Iván, porque verle crecer día a día me sirve de estímulo para tratar de convertirme en alguien en quien pueda ver un ejemplo a seguir.

## Lista de abreviaturas

---

**ALI:** Daño pulmonar agudo (del inglés *acute lung injury*).

**ATP:** Adenosina-trifosfato.

**CO<sub>2</sub>:** Dióxido de carbono.

**ADN:** Acido desoxirribonucleico

**ERK:** Quinasa regulada por señales extracelulares.

**Grupo SEVO:** Grupo tratado con Sevofluorano.

**Grupo CON:** Grupo Control.

**IC:** Índice cardíaco.

**IL-1:** Interleuquina 1.

**IR:** Isquemia – Reperusión.

**JNK:** Proteína quinasa activada por mitógenos.

**LPIR:** Lesión pulmonar por Iquemia - Reperusión.

**MAPK:** Proteína quinasa activada por mitógeno

**MCP-1:** Proteína quimiotáctica de monocitos-1.

**NADPH:** Nicotinamida- Adenosina Dinucleotido fosfato.

**NFK- $\beta$ :** Factor de transcripción nuclear  $\beta$ .

**NLS:** Señal de localización nuclear.

**OLV:** Ventilación unipulmonar.

**PAD:** Presión arterial diastólica.

**PAM:** Presión arterial media.

**PAS:** Presión arterial sistólica.

**PAPD:** Presión arteria pulmonar diastólica.

**PAPM:** Presión arteria pulmonar media.

**PAPS:** Presión arteria pulmonar sistólica.

**PaO<sub>2</sub>**: Presión arterial de Oxígeno.

**pCO<sub>2</sub>**: Presión arterial de dióxido de carbono.

**PCP**: Presión capilar pulmonar.

**PRENEUMO**: Preneumonectomía.

**PREREPERF**: Prerreperfusion

**POSTREPERF 10**: 10 minutos después de la reperfusión.

**POSTREPERF 30**: 30 minutos después de la reperfusión.

**PVC**: Presión venosa central.

**RT- PCR**: Transcripción inversa- Reacción en cadena de la polimerasa.

**SAPK**: Quinasa activada por estrés.

**SIRS**: Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica.

**SDRA**: Síndrome de distrés respiratorio agudo.

**TNF- $\alpha$** : Factor de necrosis tisular  $\alpha$ .

**VPH**: Vasoconstricción pulmonar hipóxica.

**VS**: Volumen sistólico.

**XDH**: Xantina deshidrogenasa.

**XOD**: Xantina oxidasa.

# INDICE

---

- **FUNDAMENTOS**

- 1. Síndrome de isquemia reperfusión.**

- 1. 1. Definición e importancia.
    - 1. 2. Efectos sistémicos del síndrome de isquemia reperfusión.
    - 1. 3. Efectos moleculares del síndrome de isquemia reperfusión.
      - 1.3.a) *Estrés oxidativo*
      - 1.3.b) *Activación leucocitaria*
      - 1.3.c) *Expresión de moléculas en las membranas celulares*
      - 1.3.d) *Expresión de mediadores proinflamatorios*
      - 1.3.e) *Factor de transcripción nuclear (NFκB)*
      - 1.3.f) *Apoptosis*
    - 1. 4. Modelos clínicos y experimentales de isquemia-reperfusión pulmonar.

- 2. Modulación del síndrome de isquemia reperfusión. Sevoflurano.**

- 2. 1. Farmacodinamia del sevoflurano
    - 2. 2. Efecto citoprotector del Sevoflurano.

- **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

- **MATERIAL Y MÉTODOS**

- 1. Materiales**

- 1. 1. Material biológico: animales.

1. 2. Material fungible y sistemas de monitorización
1. 3. Quirófano e instalaciones

## **2. Métodos**

2. 1. Procedimiento anestésico
2. 2. Procedimiento quirúrgico
2. 3. Momentos de recogidas de muestras
2. 4. Preparación de las muestras
2. 5. Variables estudiadas
2. 6. Estadística

- **RESULTADOS**

- **DISCUSIÓN**

### **1. Efecto citoprotector del preconditionamiento con sevoflurano en un modelo de isquemia reperusión pulmonar. Efecto de la ventilación unipulmonar.**

1. 1. Efecto del Sevoflurano sobre las citoquinas proinflamatorias
1. 2. Efecto del Sevoflurano sobre las MAP- Kinasas
1. 3. . Efecto del Sevoflurano sobre la activación de los leucocitos.

## **2. Conclusiones**

- **BIBLIOGRAFÍA**

- **ANEXOS**

# FUNDAMENTOS

---

## 1. SÍNDROME DE ISQUEMIA REPERFUSIÓN.

### 1.1 Definición e importancia

La lesión por isquemia reperfusión (IR) es una entidad producida por la privación de flujo sanguíneo a un órgano (isquemia) y su posterior restablecimiento (reperfusión). Esto desencadena una serie de respuestas moleculares (respuesta leucocitaria, liberación de mediadores inflamatorios y de estrés oxidativo) que pueden llegar a ocasionar daño celular tanto en el órgano afectado como a nivel sistémico.

Existen numerosas situaciones fisiopatológicas en la actividad clínica en las que diversos órganos se someten a una situación de isquemia transitoria, total o parcial, tales como el trasplante de órganos, la cirugía de revascularización (bypass aorto-bifemoral, bypass aorto-coronario), enfermedad vascular cerebral, etc. En todos estos casos el daño producido es consecuencia no solo del periodo de isquemia sino también del de reperfusión.

Por tanto, es importante investigar, utilizando modelos experimentales, los mecanismos que están implicados en la producción de este síndrome, así como el efecto potencialmente beneficioso que puedan tener sobre el mismo diferentes fármacos que interfieren en sus mecanismos de producción.

## **1.2 Efectos sistémicos del síndrome de isquemia reperfusión.**

El síndrome de isquemia-reperfusión (IR) engloba un conjunto de alteraciones bioquímicas, celulares y hemodinámicas que tienen lugar en los diferentes órganos en respuesta a un periodo más o menos prolongado, pero limitado, de isquemia. Cada órgano o tejido del organismo tiene una sensibilidad y resistencia distinta para la pérdida total o parcial de su flujo sanguíneo, que varía desde pocos minutos en el caso del cerebro, a horas en el caso de las extremidades.

La primera fase del síndrome de isquemia reperfusión, se caracteriza por la lesión isquémica, en la que se interrumpe el aporte de oxígeno al órgano y el metabolismo celular del mismo se transforma de aerobio en anaerobio. A partir de este hecho, si el flujo sanguíneo no se restablece se produce una secuencia de hechos bioquímicos que llevan a la disfunción celular, al edema intersticial y finalmente a la muerte celular. El metabolismo anaerobio existente, junto con el aumento del ácido láctico local, provocan una acidosis metabólica, con disminución del nivel energético que se asocia a alteraciones del sistema de transporte transmembrana [1], lo que activa diferentes sistemas enzimáticos implicados fundamentales en la respuesta inflamatoria que posteriormente se desarrollará.

Durante la reperfusión, proceso imprescindible para la viabilidad del órgano, se produce el restablecimiento del flujo sanguíneo y se recupera el nivel energético que había disminuido durante la isquemia. Es en esta fase cuando se producen la mayoría de las lesiones o, al menos, se ponen de manifiesto aquellas que se habían iniciado durante la isquemia y que son consecuencia de los metabolitos tóxicos, que se habían formado durante la fase previa.

Las principales manifestaciones clínicas de la lesión por IR son:

- **Alteraciones cardiacas:** las consecuencias del síndrome de IR sobre el tejido cardiaco son fundamentalmente de dos tipos:

- Aturdimiento miocárdico: Se trata de la disfunción miocárdica reversible, al parecer provocada por la insuficiente síntesis de ATP tras la reperfusión, espasmos microvasculares coronarios y daño celular mediado por radicales libres de oxígeno [2].
- Arritmias cardiacas: Provocadas fundamentalmente por el descenso del pH por el metabolismo anaerobio durante la isquemia y la acumulación de ácido láctico. Su repercusión clínica es variable, pudiendo llegar incluso a producirse taquicardia o fibrilación ventricular.

- **Lesión a nivel del Sistema Nervioso Central:** Se produce por la disrupción de la barrera hematoencefálica, lo que provoca la infiltración de leucocitos en el tejido subyacente y producción de radicales libres de oxígeno que van a dañar de forma irreversible a los tejidos. Además la rotura de la barrera hematoencefálica por IR provoca el desarrollo de edema cerebral y aumento de la presión intracraneal, comprometiendo así la perfusión del cerebro y siendo potencialmente letal.

- **Afectación gastrointestinal:** A nivel intestinal, la IR provoca la disfunción de la barrera intestinal, lo cual lleva a un aumento de la permeabilidad intestinal y a la traslocación bacteriana. De este modo, las bacterias migrarán al torrente circulatorio, provocando sepsis e incluso shock séptico.

- **Isquemia reperfusión en pulmón:** el daño isquemia-reperfusión constituye la primera causa de fallo primario del injerto pulmonar y éste a su vez se ha relacionado con un aumento del riesgo de rechazo agudo y, a medio-largo plazo, desarrollo de bronquiolitis obliterante como expresión de rechazo crónico[3]. El síndrome IR típicamente, ocurre en las primeras 72 horas después del trasplante y se caracteriza por daño alveolar inespecífico, edema alveolar e intersticial pulmonar no cardiogénico, aumento de las resistencias vasculares pulmonares, disminución de la complianza e hipoxemia, todos

ellos en grado variable [4], variando desde un leve infiltrado radiológico, hasta un cuadro de distress respiratorio del adulto (SDRA).

- **Fenómeno de no reflujo:** es una consecuencia de la obstrucción progresiva en la microcirculación de diferentes órganos, provocada por un aumento de la adhesión de leucocitos al endotelio y al incremento de la agregabilidad plaquetaria. Va a suponer la imposibilidad de reperusión del órgano, con edema intersticial asociado.

- **Fallo multiorgánico:** El daño por isquemia repercusión iniciado en un órgano puede provocar una respuesta inflamatoria que desemboque en un daño a órganos remotos. Se trataría de un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica. Éste es capaz de desarrollar finalmente un fallo multiorgánico: el primer órgano en verse afectado suele ser el pulmón, luego sigue el fallo hepático, renal, gastrointestinal, miocárdico y del sistema nervioso central.

### **1.3. Efectos moleculares del síndrome de isquemia reperfusion.**

Los principales fenómenos moleculares que se inician cuando a un órgano se le priva de flujo, y que van a ser los desencadenantes del síndrome de isquemia-reperusión son:

#### **1.3.a) Estrés oxidativo:**

Consiste en la formación de reactivos del oxígeno como son el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo [5].

Estas moléculas, en especial el radical hidroxilo, son muy inestables por lo que reaccionan con gran facilidad, entre otros, con el componente lipídico de la membrana celular, lo cual provoca alteraciones en su permeabilidad, llevando finalmente a la lisis celular. También producen daño directo en otros componentes celulares, como proteínas

y DNA. Esto se ha demostrado en muchas células de parénquima pulmonar, incluidas las células endoteliales, neumocitos tipo II, células de Clara, células ciliadas y macrófagos [6].

Existen dos mecanismos por los que se producen los radicales libres de oxígeno:

a) Acumulación de hipoxantina: Durante el proceso de hipoxia, la falta de aporte de oxígeno al tejido hace que se detenga el transporte de electrones en la mitocondria y, como consecuencia, disminuyan los valores energéticos en las células, produciéndose así un acúmulo de hipoxantina a partir del ATP (adenosina trifosfato) [1].

Durante la isquemia se producen, además, cambios en los sistemas xantina deshidrogenasa (XDH)/xantina oxidasa (XOD), que después, frente a la hiperoxia, llevan a la formación de radicales libres. Existen dos isoformas de esta enzima:

- Xantina-deshidrogenasa: constituye el 90% de su actividad en tejido sano; cataliza el paso de hipoxantina a xantina y de ésta a ácido úrico, reduciendo el NADP A NADPH.

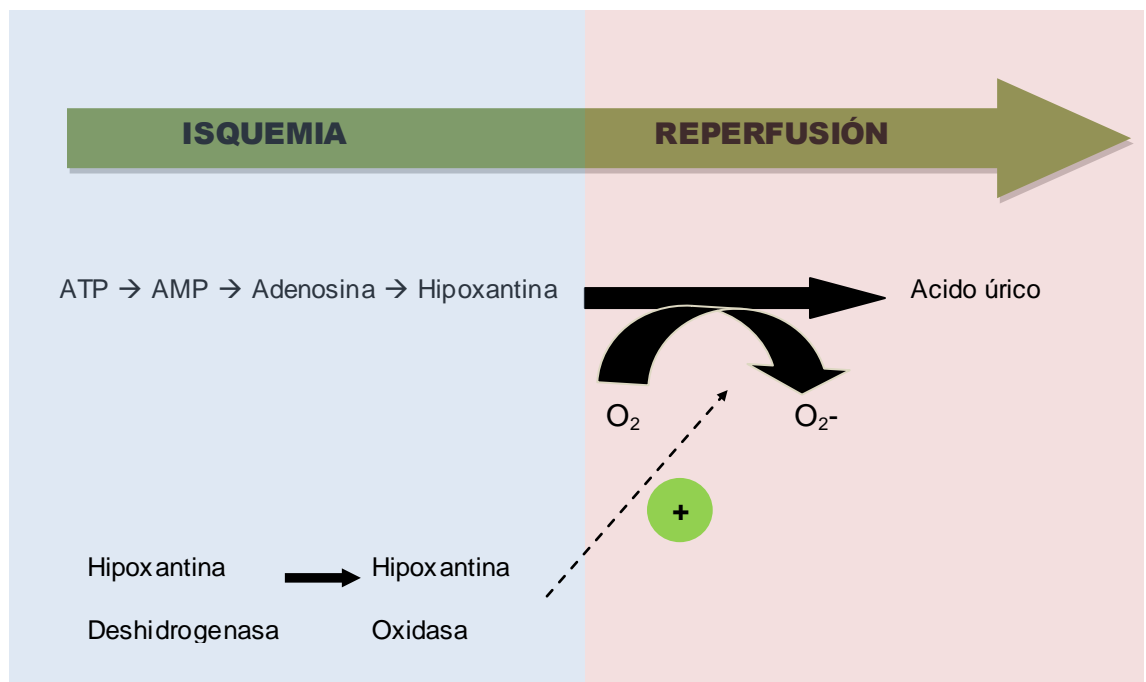


Gráfico 1. Formación de radicales libres en el síndrome de IR

- Xantina-oxidasa: cataliza la misma conversión, pero utiliza el oxígeno como

aceptor de electrones para generar  $O_2^-$  y ácido úrico. Es muy escasa en el tejido sano, pero aumenta considerablemente en situación de isquemia.

La depleción de ATP celular como consecuencia de la falta de oxígeno conlleva una elevación del AMP, que a su vez es catabolizado sucesivamente hasta hipoxantina, substrato de la xantina oxidasa. El aumento de la enzima en su forma xantina-oxidasa y del substrato (hipoxantina) explicaría la considerable producción de  $O_2^-$  en el tejido reperfundido.

b) Vía NADPH (Nicotiamida-Adenina Dinucleotido fosfato): Este mecanismo se halla en la membrana celular de neutrófilos y monocitos/macrófagos y cataliza la reducción de oxígeno molecular a peróxido de hidrógeno y anión superóxido [7].

Los radicales libres formados, durante el período de reperfusión atacan los enlaces insaturados de los ácidos grasos libres en la bicapa fosfolipídica de la membrana celular. Esta reacción, denominada lipoperoxidación, se propaga en cadena y provoca la fragmentación de la membrana celular y, con ello, severas alteraciones estructurales y funcionales de la membrana, finalizando en un daño celular irreversible.

El endotelio parece ser la fuente predominante de oxidantes durante la isquemia pulmonar no hipóxica. Estas células son altamente sensibles a los cambios en el flujo sanguíneo, y son capaces de transformar estas señales mecánicas en otras eléctricas y bioquímicas [8]. Otras células como macrófagos y /ó neutrófilos pueden contribuir en este proceso [9].

### 1.3.b) Activación leucocitaria:

Existe mucha controversia sobre el papel de los leucocitos en el síndrome de IR. Numerosos estudios han demostrado que, durante la fase de reperfusión, el número de neutrófilos en el órgano afecto se incrementa muy notablemente [1]. En contraste, algunos estudios postulan que se puede producir un daño pulmonar por isquemia reperfusión sin la participación de los leucocitos [10] [11]. Hoy en día, la hipótesis más admitida es 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 linfocitos [12] [13].

Los neutrófilos adheridos al tejido dañado pueden producir grandes cantidades de radicales libres de oxígeno, amplificando así el daño tisular. Esta formación de radicales es mediada por la mieloperoxidasa, enzima contenida en los gránulos azurofílicos de los neutrofilos, que cataliza la formación del altamente tóxico ácido hipocloroso (HOCl) [14] [15]. La mieloperoxidasa es un marcador fiel del grado de actividad leucocitaria y, por tanto, puede emplearse como método para cuantificar la respuesta leucocitaria a la isquemia-reperfusión.

El reclutamiento de neutrófilos al lugar de inflamación es un proceso complejo en el que intervienen diferentes moléculas de las membranas celulares, como las moléculas de adhesión o las integrinas. En el gradiente de leucocitos también ejercen un papel importante las quemoquinas. Se trata de pequeñas proteínas capaces de activar la migración celular. Dentro de esta familia, la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1) fue la primera en ser identificada [16] y regula la migración y activación de monocitos y macrófagos, aunque su función protectora o deletérea aún no ha sido bien definida [17] [16].

### 1.3.c) Expresión de moléculas en las membranas celulares:

- **Moléculas de adhesión:** Juegan un papel fundamental en la migración, adherencia, activación de los leucocitos. Aparecen en grandes cantidades en el endotelio pulmonar durante la isquemia. Así, diversos trabajos con bloqueadores específicos de algunas de éstas muestran una reducción del daño IR [18].
- **Factores protrombóticos y antifibrinolíticos:** La hipoxia puede inducir al endotelio y a los macrófagos a desarrollar propiedades procoagulantes, lo cual puede contribuir a la formación de trombosis microvasculares, impidiendo el retorno de sangre después de la reperfusión [19] [20].

### 1.3.d) Expresión de mediadores proinflamatorios:

- **Complemento:** Es un sistema formado por un gran número de proteínas con funciones inmunitarias, de manera que facilita la eliminación de antígenos y genera respuestas inflamatorias. Es capaz de provocar la contracción del músculo liso, el aumento de la permeabilidad vascular y la degranulación de los fagocitos, células cebadas y basófilos [18] [19].
- **Endotelinas:** Son moléculas sintetizadas por el endotelio y músculo liso sobre todo a nivel pulmonar. Existen tres isoformas. Pero sólo la endotelina-1 se eleva tras unas pocas horas de reperfusión, lo cual provoca un incremento de la permeabilidad vascular, aumentando así el daño IR [20].
- **Citoquinas:** Juegan un papel fundamental en procesos inflamatorios. En el caso del síndrome IR, numerosos estudios clínicos y experimentales han demostrado un rápido aumento de sus niveles en hígado [21], riñón [22], corazón [23] y pulmón [24]. Dentro de las citoquinas pro-inflamatorias destacan:

- Interleuquina 1 (IL-1): relacionada con la oclusión trombótica de la microcirculación pulmonar que tiene lugar en el síndrome IR, así como en el aumento de la permeabilidad vascular.
- TNF: junto con otras citoquinas, modula el proceso de migración de los leucocitos hacia las zonas de inflamación. Además induce la producción de segundos mensajeros, quienes a su vez amplifican y perpetúan la respuesta inflamatoria.

Existe una estrecha relación entre estrés oxidativo e inflamación. Se ha observado que ambos procesos se retroalimentan positivamente entre sí. Por una parte, como consecuencia del estrés oxidativo, se desencadenan cascadas de transducción de señales, que pueden estimular la producción de citoquinas proinflamatorias. Por otra parte, las moléculas mediadoras de la inflamación son capaces, de desencadenar la producción de radicales libres.

Las quinasas activadas por mitógenos (MAPK) han sido implicadas como mediadores en la liberación de citoquinas proinflamatorias, además de regular la respuesta inflamatoria inducida por las propias citoquinas. Se trata de serina-treonina quinasas que median señales intracelulares asociadas con una gran variedad de actividades celulares, incluyendo proliferación celular, diferenciación, apoptosis y transformación [25] [26] . En los mamíferos, la familia de las MAPK está formada por la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK), la MAPK p38, y la proteína-quinasa c-jun amino terminal (JNK), también llamada proteína quinasa activada por estrés (SAPK) [27]. Estas proteínas precisan de un proceso de fosforilación para adquirir su forma activa.

La activación de estas quinasas durante el proceso de isquemia reperfusión cardiaca ya ha sido ampliamente demostrada en estudios experimentales [28-30]. A pesar de eso, continúa existiendo controversia sobre el papel que desempeñan. Un estudio de Yue et al en año 2000 demostró que ERK representa un papel protector, mientras que p38 y JNK median apoptosis en el miocardio isquémico [28]. En contraposición a esto, Huot demostró que la MAPK p38 puede producir hipertrofia, o que incluso puede ser citoprotector [31]. La protección generada por el preconditionamiento isquémico también parece ser dependiente de la activación de p38 [32]. Esto podría explicarse por la activación de diferentes isoformas de p38: p38 $\alpha$  podría ser proapoptótica, mientras que p38 $\beta$  podría desempeñar un papel antiapoptótico en los miocitos [33]. El posible efecto apoptótico de p38 convierte su inhibición en una posible estrategia terapéutica frente al síndrome de IR cardiaco [34].

En pulmón también se han realizado estudios que avalan el posible papel proinflamatorio de las MAPK. En un modelo de isquemia reperfusión en roedores, la inhibición de la p38 resultó en niveles más bajos de la citoquina proinflamatoria IL1, y esto se asoció además con menor daño alveolar y menor edema intersticial, así como una mejor presión parcial de oxígeno arterial después de la reperfusión [35]. Además, la inhibición de MAPK p38 durante la isquemia en un modelo de trasplante pulmonar en perros mejoró notablemente la presión parcial de oxígeno arterial, las resistencias vasculares y el gasto cardiaco, y redujo el edema pulmonar y la infiltración por neutrófilos [36].

Un estudio de isquemia caliente en gatos mostró que los niveles de p38 fosforilada continúan elevándose durante las primeras 27 horas postreperfusión. Se objetivó además que el edema, la inflamación y la apoptosis que, en el periodo de reperfusión inmediato se dan en el pulmón que ha sido sometido a isquemia, al cabo de 27 horas se da también en el otro pulmón, lo que demuestra que se trata de un proceso sistémico [37].

Existen menos estudios acerca del papel que desempeñan JNK y ERK durante el síndrome de isquemia reperfusión pulmonar. En un modelo de roedores in vitro se encontró aumento de JNK, ERK y p38 durante la reperfusión pulmonar. Se vió además que los niveles de TNF alfa en el lavado broncopulmonar así como el grado de apoptosis disminuían cuando se empleaba un inhibidor de JNK [38]. Así mismo, en un estudio en trasplante pulmonar en humanos, se observó como después de la reperfusión, respecto a los periodos de isquemia fría e isquemia caliente, se producía un marcado aumento en la activación de ERK y JNK [39].

Organo sometido a IR	Estudio	MAPK p38	ERK	JNK
<b>Corazón</b>	<i>Yue (2000)</i>	Proapoptótica	Protectora frente a IR	Proapoptótica
	<i>Huot (1997)</i>	Protectora (induce hipertrofia de miocitos)		
	<i>Nakano (2000)</i>	Protectora en preconditionamiento isquémico		
	<i>Wang (1998)</i>	p38 $\alpha$ : proapoptótica p38 $\beta$ : antiapoptótica		
<b>Pulmón</b>	<i>Otani (2000)</i>	Proinflamatoria. p38 produce aumento del daño pulmonar y disminución de pO2 arterial		
	<i>Hashimoto (2002)</i>	p38 disminuye pO2 arterial y aumenta infiltración por neutrófilos		
	<i>Ishii (2004)</i>	p38 está aumentada en la reperfusión	ERK está aumentada en la reperfusión	JNK está aumentada en la reperfusión
	<i>Sakiyama (2005)</i>		ERK está aumentada en la reperfusión	JNK está aumentada en la reperfusión

Tabla 1 Papel de las MAPK en el síndrome IR.

### 1.3.e) Factor de transcripción nuclear NFκB

NFκB (del inglés Nuclear Factor-Kappa B) fue propuesto por Leonardo y Baltimore en 1989. Es un factor de transcripción pleiotrópico sensible a varios estímulos. Está implicado en procesos de diferenciación y apoptosis [40-42]; además de jugar un papel importante en los procesos inflamatorios y en la respuesta inmune, regulando muchas de las moléculas implicadas en ellos.

NFκB es una proteína heterodimérica compuesta por las diferentes combinaciones de los miembros de la familia de factores de transcripción Rel. Se compone de homo y heterodímeros de cinco miembros de la familia Rel incluyendo NFκB 1 (p50), NFκB 2 (p52), p65, Rel B y Rel C. Todas las proteínas Rel contienen una región conservada N-terminal, llamado RHD (del inglés Rel Homology Domain). Esta parte es la que contiene el dominio de unión al ADN, mientras que el dominio de dimerización está localizado en la región C-terminal de la RHD. Al final del extremo C-terminal se encuentra el NLS (del inglés Nuclear Localization Signal), que es esencial para el transporte de complejos activos de NFκB en el núcleo. Dependiendo de los dímeros que se formen, la función de este factor de transcripción puede ser anti o pro-apoptótica a la vez que anti o pro-inflamatoria. Cuando NFκB está inactivo se encuentra en el citoplasma de las células unido a proteínas inhibitorias (IκBs) o precursores inactivos como p100 y p105 [43]. En respuesta a un estímulo externo o interno, se activan proteínas quinasas que pueden activar IκB kinasas (IKKs), IKKα e IKKβ, que fosforilan a las IκBs las cuales son ubiquitinadas y degradadas en los proteasomas. A partir este momento, NFκB se trasloca al núcleo de la célula donde activa la transcripción de diversos genes especialmente de tipo inflamatorio [44] y activando la cascada de proteína-kinasas sensibles a mitógenos (MAP-kinasas) [45]. Varios genes inflamatorios están activados por NFκB, por ejemplo, citoquinas proinflamatorias como IL-1β [46], IL6 y TNFα, así como enzimas proinflamatorias como

ciclo-oxigenasa 2 (COX-2) y la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) [47]. El sistema NFkB actúa como un sensor citoplasmático contra cualquier estrés ya sea externo o interno como estrés oxidativo o hipoxia. En resumen, podemos afirmar que la activación de NF-kB conduce a la inducción de múltiples genes que regulan el sistema inmune y la respuesta inflamatoria. Además NFkB tiene un papel importante en el control de la regulación de la proliferación celular y la apoptosis [48].

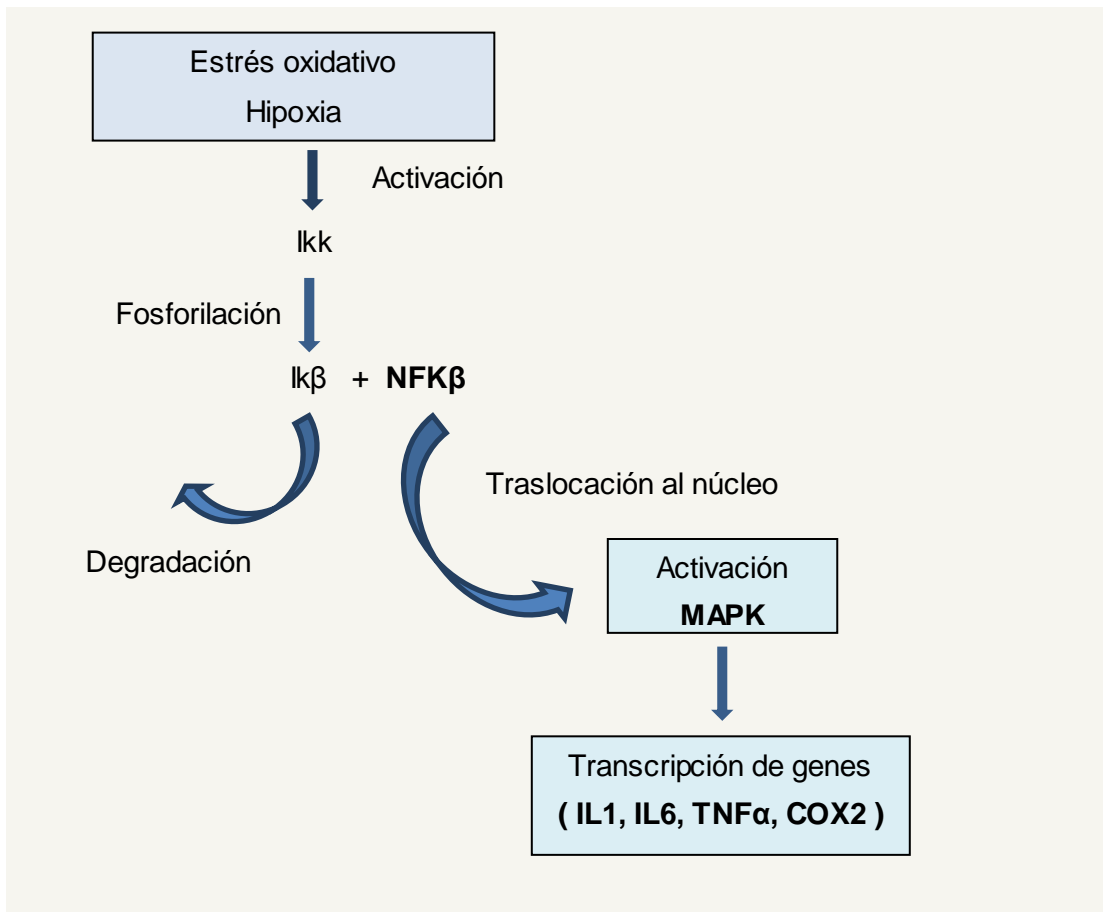


Ilustración 1. Activación y mecanismo de acción de NFkB

### 1.3.f) Apoptosis:

La apoptosis, también denominada muerte celular programada, constituye una forma fisiológica de “suicidio celular” programado. Es un mecanismo esencial en el mantenimiento de la homeostasis. Se observa prácticamente en todas las células

vivas y su desarrollo se traduce en una serie de cambios moleculares que tiene una contrapartida morfológica evidenciable.

La apoptosis es un fenómeno fisiológico que interviene tanto en la destrucción celular durante la embriogénesis, necesaria para la implantación, organogénesis e inducción al desarrollo, como en involución hormono-dependiente en individuos adultos, muerte celular inducida por linfocitos T, destrucción de células inmunes autorreactivas etc. Aunque también interviene en procesos anormales como la atrofia patológica hormono-dependiente, atrofia de órganos tras obstrucción ductal, muerte neuronal, muerte celular secundaria a enfermedades virales, muerte celular tras estímulos que a mayores dosis causarían necrosis y como mecanismo implicado en la muerte celular debida al síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (S.I.R.S.), entre otros [49]. Aunque los mecanismos implicados en la regulación de la apoptosis no son totalmente conocidos, es aceptado que la activación de las caspasas juega un papel central.

Las caspasas son una familia de cisteína-proteasas “aspartato-específicas” que poseen cisteína en su centro activo y se sintetizan como zimógenos, es decir, precursores enzimáticos inactivos. Tienen el papel principal en lo que a la destrucción celular se refiere; esto es, son el verdadero mecanismo efector. Actúan en cadena, de tal manera que se distinguen 2 grandes grupos: caspasas activadoras y caspasas efectoras. Las primeras serían sustrato de los numerosos estímulos tanto iniciales como intermedios de la apoptosis y activarían a las segundas, verdaderas encargadas de la destrucción celular mediante un mecanismo, muy similar a la cascada del complemento.

Se han identificado gran número de caspasas, pero no todas juegan un papel determinante en la apoptosis. De hecho, las caspasas 1 y 5 son predominantemente “inflamatorias”, mientras que las caspasas 3, 8 y 9 son las más características de los fenómenos de muerte celular programada. Las caspasas presentan claras similitudes

en su secuencia de aminoácidos, estructura y sustratos. Se presentan como proenzimas de 30-50 kDa con tres dominios regulares: Nterminal, una subunidad mayor de 20kDa y otra menor de unos 10kDa. Se secretan como zimógenos inactivos y aquellas relacionadas con la apoptosis pueden clasificarse como ya se ha comentado, en activadoras (2,8,9,10) y efectoras (3, 6, 7). La diferencia fundamental está en que las activadoras poseen grandes “pro-dominios” N-terminal que emplean para interacciones proteína-proteína. El modo de interactuar de estos dos grupos es en cascada [50]. De esta manera, la activación de las caspasas activadoras se traduce en interacción con las efectoras cuando son zimógenos inactivos y su ulterior activación. La activación de las caspasas efectoras conlleva a cambios moleculares y en definitiva, funcionales y morfológicos típicos de la apoptosis: detención del ciclo celular, alteraciones en la reparación del ADN, inhibición del “factor inhibidor de la apoptosis” (XIAP) y desestructuración del citoesqueleto.

INFLAMATORIAS	1, 5	
PROAPOPTÓTICAS	Activadoras	2, 8, 9 y 10
	Efectoras	3, 6 y 7

Tabla 2. Clasificación de las caspasas

#### 1.4. MODELOS CLÍNICOS Y EXPERIMENTALES DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN PULMONAR.

Se han descrito diferentes tipos de isquemia:

- La isquemia caliente, que sucede con la interrupción del flujo sanguíneo, y en la que la temperatura del órgano se mantiene al mismo nivel que tiene habitualmente en el

organismo.

- La isquemia fría, que se desarrolla con el órgano fuera del organismo, a una temperatura de 4 °C, con la finalidad de enlentecer el metabolismo del órgano al máximo antes de ser implantado. La isquemia fría es necesaria para el almacenamiento del órgano desde el momento que se extrae hasta que se implanta en el receptor. La hipotermia provoca un descenso de la tasa metabólica y de destrucción de componentes celulares esenciales. Sin embargo y pese a dicha hipotermia, existen numerosos eventos que activan los mediadores de la inflamación y son deletéreos para el órgano preservado en el momento de la reperfusión.

- Isquemia tibia: técnica desarrollada a raíz del surgimiento de los donantes a corazón parado. Consiste en la preservación in situ de los órganos para mantenerlos hasta que se pueda hacer la extracción multiorgánica de los mismos, donde el órgano se mantiene a unos 12-14 °C (isquemia tibia) durante el menor tiempo posible.

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 pulmonar postreperfusión. En muchos casos no es posible el enfriamiento progresivo del pulmón, ni perfundirlo con una solución de preservación antes de interrumpir la circulación sanguínea, para lograr así una isquemia fría. Entre estas situaciones clínicas destacan:

- Pacientes con función respiratoria límite que son sometidos a resección pulmonar y en los que prima, por tanto, preservar la mayor cantidad de parénquima pulmonar. Esto obliga a la realización de resecciones en manguito bronquial y / ó vascular, lo cual conlleva un periodo de isquemia pulmonar variable.

- En el trasplante de lóbulos pulmonares de donante vivo donde se produce un periodo de isquemia caliente de los lóbulos trasplantados y, a pesar de realizar procedimientos de protección, son frecuentes el edema de reperfusión y la ventilación asistida prolongada [51].

- En ciertos casos de complicaciones hemorrágicas, donde la reparación ex-situ del pulmón viable y su reimplantación posterior, puede evitar la realización de neumonectomías de urgencia.

- En determinados casos de tumores complicados, en los que el paciente no tolera funcionalmente una neumonectomía, se ha planteado la posibilidad de realizar la neumonectomía, lobectomía ex-situ y posterior reimplante del lóbulo restante, con el consiguiente proceso de reperfusión lobar [52] [53].

En este contexto y, para un mejor estudio del daño pulmonar por IR, y de potenciales terapias moduladoras del mismo, se requieren modelos experimentales de autotrasplante pulmonar. Hasta el momento actual, la mayor parte de los estudios para preservar el tejido pulmonar de los efectos de la IR se realizan en modelos experimentales o en situaciones clínicas de trasplante pulmonar con isquemia fría, usando diferentes soluciones de preservación [54]. Las conclusiones de estos trabajos no pueden ser aplicadas a la mayoría de las situaciones descritas, en las que la desvascularización pulmonar y el periodo de isquemia tienen lugar sin enfriamiento del órgano y sin sustitución de la sangre por una solución de preservación.

Por tanto, dentro de los modelos experimentales, resultan de mayor interés para la aplicación clínica posterior, los modelos animales de isquemia tibia-caliente pulmonar. La mayoría se realizan mediante clampaje in-situ de los vasos pulmonares [55] [56] y ocasionalmente con autotrasplante pulmonar, modelo más semejante a las situaciones clínicas descritas. En un modelo canino, Yamazaki y cols. observaron que el tiempo máximo de isquemia caliente tolerable para el reimplante de un pulmón no ventilado era de 120 minutos [57]. En los modelos porcinos hallamos estudios con clampaje aislado de bronquio y arteria principal izquierda, no habiendo hallado modelos de autotrasplante lobar como los hay descritos en perros [58].

## **2 MODULACIÓN DEL SÍNDROME DE ISQUEMIA REPERFUSIÓN: SEVOFLURANO**

Se han estudiado varios métodos para limitar la lesión de IR, tales como el preconditionamiento isquémico [59], la hipertermia inducida [60], y el preconditionamiento farmacológico [61-64]. Uno de los grupos farmacológicos más empleado ha sido el de los anestésicos inhalados, de los cuales el sevoflurano es el más empleado en nuestro medio.

### **2. 1. Farmacodinámica del sevoflurano:**

Se trata de un líquido volátil, derivado fluorado del metil-isopropil-éter que contiene un halógeno, el fluor, en una cantidad de siete átomos. Como principales efectos hemodinámicos destacan un inotropismo negativo, resultado de la inhibición de la actividad simpática, sin que se modifique la parasimpática. No modifica la frecuencia cardíaca, mientras que la presión arterial disminuye dependiendo de la concentración alveolar administrada. Asimismo, reduce el gasto cardíaco pero no modifica las resistencias vasculares sistémicas.

Existe controversia sobre el efecto del sevoflurano sobre la vasoconstricción pulmonar hipóxica. Hay varios estudios que demuestran que el sevoflurano no altera este mecanismo a nivel de la vasculatura pulmonar in vivo [65]. Sin embargo estudios in vitro y con pulmón denervado ponen de manifiesto una inhibición de la VPH concentración dependiente [66].

A nivel respiratorio, el sevoflurano es un depresor dosis dependiente. A nivel del sistema nervioso central, deprime la actividad electroencefalográfica de forma dosis dependiente y no provoca actividad convulsiva. No modifica los mecanismos de autorregulación

cerebral, pero produce depresión de la función cortical y un aumento discreto de la PIC.

A nivel hepático reduce muy poco el flujo hepático total. A nivel renal se ha comprobado que no modifica el flujo sanguíneo renal, siempre y cuando la tensión arterial media se mantenga por encima de 70 mmHg.

## **2. 2. Efecto citoprotector del Sevoflurano:**

Los anestésicos halogenados han sido ampliamente estudiados por sus efectos sobre el organismo. Se ha demostrado con anterioridad que podrían proteger contra el daño postreperusión en el corazón [67-71], cerebro [72] e hígado [73]. Existen estudios que evidencian que tanto halotano como isoflurano reducen el tamaño de los infartos en perros, y que estos efectos persistían incluso tras suspender su administración [74]. Los mecanismos precisos por los que estos agentes ejercen la protección frente a la isquemia han sido ampliamente estudiados en órganos como el corazón, y parece claro que no se debe exclusivamente al mejor balance entre aporte y demanda de oxígeno a los tejidos, efecto que consiguen por los cambios hemodinámicos. Estudios en miocardio muestran una disminución en la formación de radicales libres de oxígeno tras la oclusión y reperusión coronaria usando halogenados, protegiendo así del daño IR [75].

A nivel miocárdico, se ha objetivado además que los gases halogenados producen la apertura de canales de K<sup>+</sup>ATP mitocondriales y sarcolémico [76], al tiempo que reducen la sensibilidad de éstos para cerrarse por ausencia de ATP [77], aumentando así la probabilidad de que permanezcan abiertos. Esta apertura de los canales de K dependientes de ATP va a provocar en el músculo liso de los vasos coronarios una vasodilatación, lo cual va a mejorar el aporte de oxígeno, y en cierto modo protege durante la isquemia cuando la producción de ATP se ve reducida. Además el sevoflurano induce un incremento de la circulación colateral mediado por los canales de K calcio dependientes[68].

Un modelo celular de miocitos aislados de rata ha demostrado que la protección provocada por isoflurano y sevoflurano es dosis dependiente [78].

En pulmón existen menos investigaciones, y los efectos de los anestésicos inhalatorios sobre el síndrome de IR aún no son muy conocidos. En un modelo de disfunción multiorgánica en ratón, el isoflurano disminuye el daño pulmonar, probablemente modulando la respuesta inflamatoria [79]. En el pulmón del conejo se ha demostrado que administrar isoflurano o sevoflurano antes de la isquemia atenúa el aumento de la permeabilidad vascular, disminuye la relación peso húmedo/seco así como los niveles de TNF-alfa en el pulmón reperfundido después de la isquemia [80].

Los mecanismos moleculares por los que los gases halogenados modulan la respuesta inflamatoria no han sido aún aclarados, pero cada vez más estudios apuntan que las MAPK pueden jugar un papel muy importante en esta regulación, aunque los resultados encontrados hasta el momento son contradictorios. Estudios neuronales in vitro, han demostrado que la mejor tolerancia a la isquemia, así como el aumento de la supervivencia celular que se da al preconditionar las neuronas con isoflurano, está mediado por un aumento en la fosforilación de p38 [81] y ERK [82]. En concordancia con esto, el isoflurano también parece proteger a células humanas de neuroblastoma sometidas a isquemia y posterior reperfusión in vitro a través de la activación de ERK [83]. Bickler [84] sometió a preconditionamiento con isoflurano a neuronas hipóxicas y encontró resultados similares en lo que respecta a ERK. Halló también un aumento en la fosforilación de JNK. Sin embargo, y en contraposición a los estudios anteriores, se encontró con una disminución en la fosforilación de p38. Los escasos ensayos realizados con sevoflurano sobre tejido neuronal muestran una rápida tolerancia a la isquemia mediada por un aumento en la activación de ERK [85, 86]. Este efecto beneficioso es abolido si se pretrata al animal con un inhibidor de las MAPK [86].

También se ha estudiado el mecanismo de protección de los gases halogenados sobre células renales, tanto in vitro [87] donde se encontró un aumento de la fosforilación de ERK, como in vivo [88], donde se encontró disminución de ERK y JNK. Del mismo modo, recientes estudios sugieren que el preconditionamiento con sevoflurano puede proteger al tejido cardiaco del daño IR mediante el aumento en la activación de ERK [89].

<b>Estudio</b>	<b>Tejido estudiado</b>	<b>Halogenado empleado</b>	<b>Efecto del halogenado sobre las MAPK</b>
<b>Zheng (2004)</b>	Neuronas (in vitro)	Isoflurano	↑ fosforilación p38
<b>Bickler (2005)</b>	Neuronas (in vitro)	Isoflurano	↑ fosforilación ERK
<b>Zuo (2006)</b>	Neuroblastoma (in vitro)	Isoflurano	↑ fosforilación ERK
<b>Bickler (2006)</b>	Neuronas (in vitro)	Isoflurano	↑ fosforilación ERK y JNK. ↓ fosforilación p38
<b>Hasegawa (2006)</b>	Neuronas (in vitro)	Sevoflurano	↑ fosforilación ERK
<b>Ding (2009)</b>	Neuronas (in vitro)	Sevoflurano	↑ fosforilación ERK
<b>Lee (2008)</b>	Células renales (in vitro)	Sevoflurano	↑ fosforilación ERK
<b>Hashiguchi (2005)</b>	Células renales (in vivo)	Isoflurano	↓ fosforilación ERK y JNK
<b>Chen (2008)</b>	Células cardiacas (in vitro)	Sevoflurano	↑ fosforilación ERK

## HIPÓTESIS. OBJETIVOS

---

El daño por isquemia/reperfusión (I/R) está presente en muchas situaciones clínicas, aunque la más fácilmente reconocible son los trasplantes de órganos sólidos. En el pulmón se produce un cuadro clínico denominado lesión pulmonar inducida por la isquemia/reperfusión (LPIR), caracterizado por una lesión alveolar no específica con alteración de la permeabilidad, edema pulmonar e hipoxemia secundaria

Con objeto de intentar atenuar este daño se han intentado diferentes medidas. Una de ellas es la aplicación de un fármaco anestésico antes del inicio de la I/R. Esto se conoce con el nombre de preconditionamiento anestésico (PCA). Se ha visto que el PCA con sevoflurano protege de la lesión por I/R en hígado, riñón, corazón, médula espinal, SNC, y pulmón. Sin embargo los mecanismos moleculares por los que el PCA con sevoflurano ejerce estos efectos protectores en la I/R no están completamente aclarados.

La I/R es un proceso asociado con un agudo aumento en la producción de radicales libres de oxígeno y un significativo acúmulo de calcio intracelular. Ambos fenómenos son potentes inductores de la apoptosis. Las caspasas juegan un papel central en los procesos de apoptosis, y se ha observado que su activación durante la LPIR puede ser regulada por la actividad de una familia de proteínas denominadas genéricamente proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAPK). Estas proteínas tienen un papel determinante en los procesos de señalización intracelular en los procesos inflamatorios y en la regulación de la proliferación, diferenciación y apoptosis. Por otro lado, el NF- $\kappa$ B es un factor inducible de transcripción esencial para regular la expresión de muchos genes involucrados en la respuesta inflamatoria y la apoptosis de la célula en el daño por isquemia/reperfusión. En un modelo de I/R miocárdico se

ha visto que los efectos beneficiosos del PCA con sevoflurane provienen de la atenuación de la activación del NF- $\kappa$ B en la reperfusión

El objetivo general de este trabajo es investigar el posible papel de los mediadores proinflamatorios en el daño pulmonar agudo (Acute Lung Injury; ALI) secundario a la isquemia/reperfusión pulmonar, y si este daño podría estar mediado, al menos en parte, por modificaciones en la actividad de kinasas de stress, o en la expresión del factor de transcripción pulmonar NF $\kappa$ B, y/o el grado de apoptosis.

Para ello nos planteamos:

1. Determinar posibles modificaciones en la producción de mediadores proinflamatorios secundaria a la isquemia-reperfusión pulmonar en un modelo experimental de cirugía de autotransplante pulmonar en cerdos.
2. Determinar si estos cambios van acompañados por modificaciones en la activación de quinasas (MAPK, JNK, ERK, p38) y/o en la expresión del factor de transcripción nuclear, NF $\kappa$ B.
3. Determinar posibles modificaciones en los niveles de caspasas (mediadores pro apoptoticos)
4. Determinar el efecto de los anestésicos inhalatorios (sevoflurano) sobre los parámetros indicados anteriormente.

# MATERIAL Y MÉTODOS

---

## 1. Material

### 1.1. Material biológico: animales

Se han utilizado 20 cerdos de raza Large White de ambos sexos. Estos animales pertenecen a una línea desarrollada por Sachs en el Instituto Nacional de la Salud en Bethesda, Maryland, EE.UU.(Sachs, Leight et al. 1976) como modelo animal para la investigación en trasplante de órganos, mediante la selección de tres genotipos homocigotos independientes en relación con el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC).

Los animales proceden del Complejo Agropecuario de Aranjuez (finca "La Chimenea"), perteneciente al Instituto Tecnológico de Desarrollo Agrario (ITDA) de la Consejería de Medio Ambiente de la Comunidad de Madrid. El traslado de los animales a las instalaciones de la UMCE se realiza 24 h antes del procedimiento quirúrgico, en una jaula individual en la que permanece el animal hasta el momento de la intervención. El animalario dispone de un ambiente controlado con 20-22 °C y humedad relativa del 55%.

El manejo de los animales se ha realizado siguiendo la normativa legal según el Real Decreto 1201/2005. Protección de los Animales 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 para experimentación y otros fines científicos, de la Directiva del Consejo 86/609/CEE (Leg. CC.EE. 4390) aprobada el 24 de Noviembre de 1996.

La manipulación de los animales y el procedimiento quirúrgico se realizó 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 experimentación animal y del comité de investigación de la institución.

## **1.2. Quirófano e Instalaciones:**

Todas las experiencias fueron realizadas en el quirófano de la unidad de cirugía experimental del Hospital General Universitario Gregorio Marañón.



**Ilustración 2. Quirófano de la Unidad de Cirugía Experimental del Hospital Universitario Gregorio Marañón**

Dicho quirófano incluye dos mesas quirúrgicas, cuatro lámparas quirúrgicas de alta intensidad y equipo de instrumental quirúrgico estándar así como material de micro cirugía y específico de cirugía torácica.

En cuanto al material anestésico, el quirófano está equipado con 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 Swan-Ganz Gasto Continuo (Edwards, Irving, California, USA) y desfibrilador con palas Externas e Internas life pulse (HVE, Miami, USA).



**Ilustración 3. Instrumental quirúrgico**

Material fungible y sistemas de monitorización empleados:

- Tubo endotraqueal: Para la intubación orotraqueal se utilizó un tubo estándar del nº 5,5 al 7 dependiendo del peso del espécimen modelo Murphy con balón.
- Catéteres vasculares: Se emplean para canalizar las arteria y vena femorales (9 y 7,5 F respectivamente), mediante técnica de Seldinger.
- Catéter de Swan Ganz: se emplea para estimar el gasto cardiaco mediante técnica de termodilución, así como para medir Presion Capilar pulmonar, Presión arterial pumonar, Presión Venosa Central y Saturación Venosa mixta de Oxígeno. En nuestra experiencia usamos un catéter de Swan-Ganz Edwards de 7,5-F para monitorización continua del Gasto Cardiaco (Edwards, Irving, California, USA).

## 2. MÉTODOS

### 2. 1. Monitorización y técnica anestésica

Todos los cerdos permanecieron en ayunas para alimentos sólidos 24 horas antes de la intervención, permitiendo el consumo de agua hasta el momento de la cirugía. Quince minutos antes del comienzo de la inducción se les administró como premedicación ketamina (“Ketoral”, Parker Davis) intramuscular a 10 mg/kg de peso. A continuación se canalizó una vía periférica, preferiblemente la vena marginal del dorso de la oreja, con un catéter del calibre 20 ó 22 G. Se preoxigena a los animales con oxígeno al 100% administrado mediante mascarilla durante 2 ó 3 minutos. La inducción anestésica se llevó a cabo con fentanilo (“Fentanest”, Kern Pharma) a 3 µg/kg, propofol al 1% (“Diprivan”, Fresenius K) a 4 mg/kg y atracurio (“Tracrium” Glaxo Smith Kline) a 0,6 mg/kg. La intubación se realiza inicialmente por boca con un tubo orotraqueal.



Ilustración 4. Momento de la intubación orotraqueal

A continuación se inició la ventilación mecánica con un respirador modelo Drager SA 1, ajustado con los siguientes parámetros: ventilación controlada por volumen con un volumen corriente de 8 ml/kg, entre 12 y 15 respiraciones por minuto, relación entre inspiración y espiración de 1:2. Estos parámetros se modifican a lo largo de la cirugía con la finalidad de mantener un nivel de CO<sub>2</sub> en sangre arterial entre 35 y 40 mmHg de CO<sub>2</sub>. La FiO<sub>2</sub> se mantiene en 1 durante todo el procedimiento.

El siguiente paso de nuestro protocolo consistió en realizar traqueostomía infraístmica e

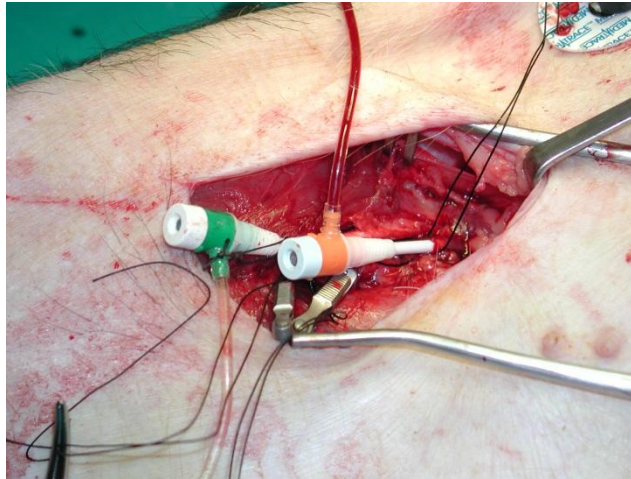
introducir un tubo endotraqueal a su través, que posteriormente progresaremos hasta el bronquio derecho para ventilar selectivamente dicho pulmón.

Los animales fueron agrupados aleatoriamente (Microsoft Excel 2003) para recibir el autotrasplante pulmonar sin Sevoflurano (grupo control CON, n = 10), o con Sevoflurano (grupo SEVO, n=10). Además, 5 animales fueron sometidos a una cirugía simulada (Sham Group).

En el grupo control (CON) el mantenimiento anestésico se realizó con propofol en perfusión continua (8-10 mg/kg/h) durante todo el procedimiento, mientras que en el grupo sevoflurano (SEV) se les administró sevoflurano al 3 % hasta el momento de iniciar la ventilación unipulmonar, momento en el que se inició perfusión continua de propofol hasta el final del experimento a las mismas dosis que en el grupo control. Además, en todos los grupos se emplearon el fentanilo y el atracurio en bolos, según necesidades. Se infundió una solución intravenosa de ringer lactato a 6-8 ml/kg/h y, en los casos en que fué necesario un mejor relleno vascular, se infundió además una sustancia coloidal, hidroxietil almidón ("Voluven", Fresenius K), según requerimientos.

La monitorización consistió en ECG de 3 derivaciones, pulsioximetría, capnografía, presión arterial invasiva y presión venosa central, para lo que se cateterizó la arteria y vena femorales. Los vasos femorales se canalizaron de modo percutáneo. En los casos en los que no resulta posible, se disecciona el paquete vasculo-nervioso de modo quirúrgico, aislando a continuación cada uno de los vasos e introduciendo un catéter vascular por el método de Seldinger. A través de la vena femoral se introduce, además, un catéter de Swan-Ganz de 4 lúmenes, de tamaño 7 French (Edwards Lifesciences), hasta el tronco de la arteria pulmonar o hasta la arteria pulmonar derecha, con la finalidad de monitorizar la presión arterial pulmonar de modo continuo y la presión pulmonar capilar enclavada en los momentos precisos. La colocación correcta del catéter de arteria pulmonar se realiza guiándose por monitorización continuada de la curva de presión, así como por

comprobación directa por parte de los cirujanos. Con estos datos se calculan las resistencias vasculares sistémicas y pulmonares durante los diferentes estudios hemodinámicos que tienen lugar a lo largo del experimento.



**Ilustración 5. Canalización quirúrgica de arteria y venas femorales.**

Se mide además a diuresis horaria. Para ello, el equipo quirúrgico realiza una cistostomía suprapúbica mediante mini-laparotomía.

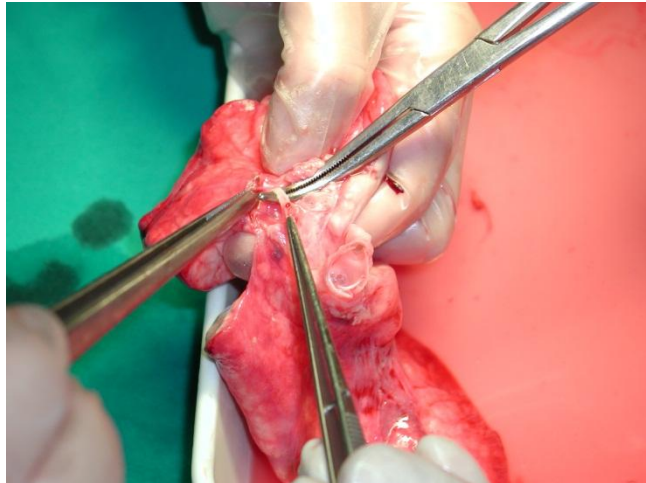
## **2. 2. Procedimiento quirúrgico:**

Es idéntico en ambos grupos del estudio. Consiste en la realización de un autotrasplante pulmonar izquierdo en cerdo, realizando secuencialmente una neumonectomía izquierda, la lobectomía craneal izquierda ex-situ (cirugía de banco) y la reimplantación del lóbulo caudal mediante anastomosis bronquial, arterial y venosa.

1. Fase de toracotomía: Con el cerdo en posición de decúbito lateral derecho se procede a toracotomía izquierda a través del cuarto espacio intercostal. Esta fase se realiza con ventilación bipulmonar.
2. Fase de apertura bronquial: En este momento se comienza con ventilación unipulmonar, progresando para ello el tubo endotraqueal hasta el bronquio derecho, dejando sin ventilación el bronquio izquierdo, que es seccionado a continuación. La ventilación unipulmonar protectora que se inició en ese momento consistió en

administrar un volumen tidal de 6 ml/kg, así como aumentar la frecuencia cardiaca entre 14-16 resp/min.

3. Fase de clampaje de vasos: A continuación se produce el clampaje del paquete vascular del pulmón izquierdo y su posterior sección, completando la neumonectomía izquierda. Para prevenir la trombosis de la arteria pulmonar que se mantiene pinzada durante la cirugía de banco y el reimplante, se administra un bolo intravenoso de 300 UI/Kg de heparina sódica ( Mayne Pharma España, S.L).
4. Fase de cirugía de banco: Se perfunde el injerto de modo anterógrado y retrógrado con solución de Wisconsin a 4 °C. El injerto es ventilado en todo momento con un ambú ( FiO2 21%). Se lleva a cabo la lobectomía craneal ex situ.



**Ilustración 6. Cirugía de banco.**

5. Fase de reimplantación del lóbulo caudal izquierdo y reperfusión: Para ello se realiza anastomosis con sutura continua de bronquio, arteria y vena siguiendo ese orden. Se reanuda ventilación bipulmonar y se mantiene la reperfusión durante 30 minutos.

Finalmente, se procede a la eutanasia del animal con profundización anestésica e inducción de cardioplejia con cloruro potásico.

### 2. 3. Momentos de medición y recogida de muestras:

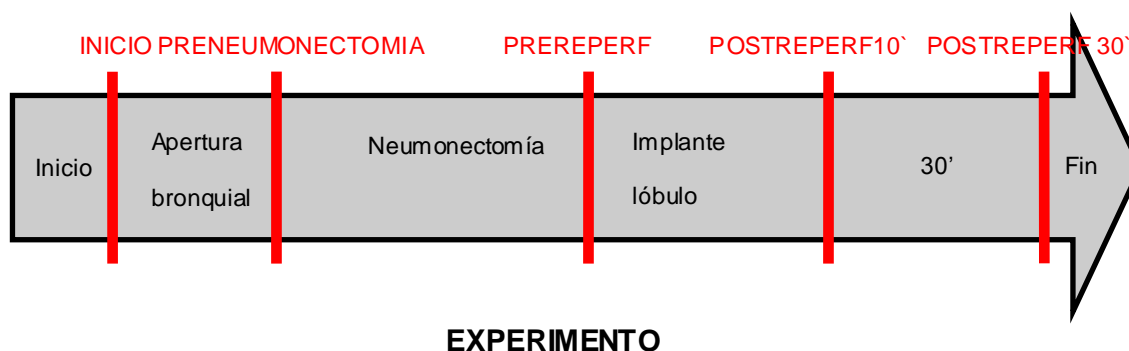


Ilustración 7. Momentos de recogidas de las muestras.

- Basal: a los 30 minutos de comenzar la toracotomía, estando todavía el animal con ventilación bipulmonar.
- Preneumonectomía: A los 10 minutos de la ventilación unipulmonar y en el caso del grupo de sevoflurano, a los 10 minutos de retirar el sevoflurano.
- Pre-reperfusión: 10 minutos antes de reperfundir el lóbulo pulmonar implantado.
- Post-reperfusión 10': A los 10 minutos de reperfundir el injerto.
- Postreperfusión 30': A los 30 minutos de reperfundir el injerto.

Momento de recogida de muestras	Gasometría arterial	Estudio hemodinámico	Biopsia de tejido pulmonar	Muestra de sangre venosa
BASAL	✓	✓		✓
PRENEUMONECTOMÍA	✓	✓	✓	✓
PRE-REPERFUSIÓN	✓	✓	✓	✓
POST-REPERFUSIÓN 10'	✓	✓	✓	✓
POST-REPERFUSIÓN 30'	✓	✓	✓	✓

Tabla 3. Estudios realizados en cada momento de recogida de muestras

En los momentos citados se recogen muestras de sangre arterial para análisis y de tejido pulmonar. Cada una de estas las biopsias pulmonares se conservan en nitrógeno líquido

a -80°C para posterior medición de marcadores de estrés oxidativo y mediadores inflamatorios. Además se realizan estudios hemodinámicos.

#### **2. 4. Obtención y preparación de las muestras**

- Sangre: Las muestras de sangre arterial se analizaron inmediatamente por medio del analizador de gases. Las de sangre venosa se centrifugaron durante diez minutos a 1000 x g. El suero sobrenadante se congeló a -40 °C hasta el momento de las diferentes determinaciones bioquímicas con posterioridad.
- Tejido pulmonar: las dos primeras muestras, preneumectomía y prerreperusión, se extraen del lóbulo craneal del pulmón izquierdo. Las dos muestras postreperusión se extraen del lóbulo reimplantado. Todas las muestras se introdujeron en criotubos y fueron congeladas en el momento en nitrógeno líquido y guardadas a -80°C hasta el estudio bioquímico.

#### **2. 5. Variables estudiadas**

- a) Hemodinámicas: presión arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) y media (PAM). Mediante el catéter de arteria pulmonar se registran la presión de arteria pulmonar sistólica (PAPS), diastólica (PAPD) y media (PAPM), la presión capilar pulmonar (PCP) y la presión venosa central (PVC). Por termodilución se registra además el índice cardiaco (IC) y el volumen sistólico (VS).

- b) Gasométricas: PaO<sub>2</sub>, PCO<sub>2</sub> y pH en sangre arterial. Además se obtienen gasometrías venosas procedentes de muestras obtenidas del catéter venoso femoral y directamente de la vena pulmonar del lóbulo reimplantado puncionando la misma a los 10 y 30 minutos post-reperusión.
- c) Determinaciones bioquímicas:
- **Aislamiento de RNA y transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR):** El RNA fue aislado de las muestras pulmonares porcinas utilizando el método descrito por Chomczynski [90], usando el kit TRI reactivo (Molecular Research Center, Inc, Cincinnati, OH, USA), siguiendo el protocolo de los productores. La pureza del RNA se midió con electroforesis en gel 1,5% agarosa, y las concentraciones de RNA fueron determinadas con espectrofotometría (260nm). La transcripción inversa de 2µg de RNA se realizó utilizando el sistema de transcripción inversa (Promega, Madison, WI, USA) y una hexámero pd(N)<sub>6</sub> aleatorio. La RT-PCR se realizó usando un aparato Applied Biosystems 7300 con SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK), y con concentraciones de 300nm de primers específicos (Tabla 3). La amplificación RT-PCR fue realizada de la forma siguiente: 50°C durante 2 minutos, 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15s, 60°C durante 1 minuto, 95°C durante 15s, 60°C durante 30s y 95°C durante 15s. Para la normalización de la carga del cDNA en PCR, se utilizó la amplificación del 18S rRNA por cada muestra. Los cambios relativos en la expresión génica fueron calculados utilizando el método 2- $\Delta\Delta CT$  [91]

Primer		Sequencia (5'-3')
18S	Forward	GGTGCATGGCCGTTCTT
	Reverse	A TCG TTCGTTATCGGAAT TAACC
TNF $\alpha$	Forward	ATGAGAAGTTCCTCAAAT
	Reverse	GGC CTCCACTTGGTGGTTTG CTA
IL-1 $\beta$	Forward	TGTGATGAAAGACGGC
	Reverse	ACAC CTTCTTCTTTGGGTATT GTTTGG

Tabla 4. RT-PCR

- Preparación de homogeneizados y determinación de caspasa, y actividad de quinasas de stress:** Las muestras congeladas fueron pesadas y transferidas a tubos de propileno de 50ml (Falcon; Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ) que contenían buffer de lisis (4°C) en un ratio de 10ml buffer/1 gr de tejido mojado. El buffer de lisis consistía en fenilmetilsulfonilfluoride 1mM (PMSF; Sigma Chemical Company), 1mg/ml pepsatin A (Sigma Chemical Company), aprotinina (Sigma Chemical Company), y leupeptina (Sigma Chemical Company) en una solución salina 1xbuffer fosfato de ph7.2 (Biofluids, Rockville, MD) conteniendo 0.05% sodium azide (Sigma Chemical Company). Las muestras fueron homogeneizadas durante 30s con un homogeneizador eléctrico (Polytron; Brinkmann Instruments, Westminister, NY) a velocidad máxima, y los tubos congelados en nitrógeno líquido. Las muestras fueron homogeneizadas tres veces para procesamiento óptimo. Las muestras fueron después incubadas en un baño maría a 37°C y centrifugadas a 119,000 x g (1h 4°C) para separar las organelas celulares. El sobrenadante fue congelado a -80°C para permitir la formación de agregados macromoleculares. Después de descongelar a 4°C, los agregados fueron centrifugados a 3000x g (4°C) y el homogeneizado final fue medido con una pipeta graduada. Los

homogeneizados se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la determinación de citoquinas (Biosource), caspasas (Sigma Chemical Company) siguiendo las instrucciones del fabricante.

- **Expresión de proteínas ( $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{NF}\kappa\text{B}$  e  $\text{I}\kappa\text{B}$ ):** Se realizó por WesternBlot utilizando anticuerpos específicos (Bio Genesis):  $\text{TNF}\alpha$  (1:4000),  $\text{IL-1}\beta$  (1:4000),  $\text{NF}\kappa\text{B}$  (1:2000,  $\text{I}\kappa\text{B}$  (1:2000). Las muestras se homogeneizaron en tampón de lisis (100mmol/L NaCl, 10mmol/L TRIS-Cl (pH 7,6) 1mmol/L EDTA (pH 8), 1  $\mu\text{g/ml}$  aprotinina, 100  $\mu\text{g/ml}$  PMSF). Todas las muestras se diluyeron (1:1) con tampón 2X (100mmol/L TRIS-HCl (pH 6,8), 4% SDS, 20% glicerol, 0,1 azul de bromofenol, 200mmol/L ditiotreitol) y se hirvieron 10 minutos a  $100^{\circ}\text{C}$ . Para corregir posibles variaciones en el tamaño de las muestras se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford. Cantidades equivalentes de proteína se sometieron a electroforesis en gel de SDS poliacrilamida (10%). Una vez separadas las proteínas, eran transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad, Mississauga, Ontario) a la que quedan unidas irreversiblemente y donde son más accesibles a los anticuerpos específicos. A continuación las membranas se incubaron 90 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  en un buffer (20mmol/L TRIS, 150 mmol/L NaCl, 0,2% Noninet P 40, 5% leche desnatada) para bloquear la unión inespecífica, y después se incubaron 60 minutos a  $20^{\circ}\text{C}$  en presencia de anticuerpos primarios específicos. Tras un lavado para eliminar el anticuerpo no unido, las membranas se incubaron de nuevo durante 60 minutos a  $20^{\circ}\text{C}$  en presencia de un anticuerpo secundario que reconoce inmunoglobulinas de conejo, acoplado covalentemente a una peroxidasa (horseradish peroxidase-conjugated polyclonal anti-rabbit IgG secondary antibody, Transduction Lab, Lexington, KY).

Después de lavar con T-TBS las membranas fueron incubadas con reactantes

de detección ECL Plus (Amersham Life Science Inc., Buckinghamshire, UK) y expuestas a una película de rayos X. Las películas fueron escaneadas con un densitómetro (BioRad GS 800) para determinar sus densidades ópticas relativas. Marcadores proteicos marcados previamente fueron usados para las determinaciones del peso molecular. La reproducibilidad dentro de los ensayos fue evaluada con tres experimentos independientes. Cada ensayo se realizó con tres replicados. El coeficiente de variación intra-ensayo fue menor de 5%. El coeficiente de variación inter-ensayo fue menor de 6%

## **2. 6. Estadística:**

Los valores de las variables se expresan como la media y su desviación estándar. El estudio estadístico se realizó mediante pruebas no paramétricas (test U de Mann-Whitney). Se consideró estadísticamente significativo valores para  $P \leq 0.05$ . Respecto a la comparación de la actividad de las caspasas 3 y 9 se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis. Para realizar los análisis estadísticos se utilizó el programa SPSS 14.0 (SPSS inc. Chicago, USA).

# RESULTADOS

---

## 1. Variables generales

No se encontraron diferencias entre el grupo control (CON) y el grupo SEVO (SEVO) ni en el peso de los animales, ni en el tiempo de ventilación unipulmonar, ni en el tiempo en que permaneció clampada la arteria pulmonar (tiempo de isquemia), ni en las presiones en la vía aérea durante la ventilación mecánica.

	GRUPO	VALOR	P
PESO (kilogramos)	CONTROL	34.3 ± 13.9	0,43
	SEVO	37.8 ± 13.4	
OLV (minutos)	CONTROL	167.5 ± 73.4	0,1
	SEVO	183.6 ± 86	
TIEMPO DE ISQUEMIA (minutos)	CONTROL	96.7 ± 13.8	0,09
	SEVO	91.8 ± 22.5	
PRESIONES PLATEAU (cm de H <sub>2</sub> O)	CONTROL	13 ± 7	0,09
	SEVO	14 ± 6	
PRESIONES PICO (cm de H <sub>2</sub> O)	CONTROL	25 ± 9	0,15
	SEVO	26 ± 10	

Tabla 5. Variables generales. Los datos son expresados como media ± error típico de la media.

*OLV: ventilación unipulmonar*

## 2. Citoquinas proinflamatorias

	GRUPO	Preneumonectomía	Pre-reperusión	Post 10'	Post 30'
IL-1 (pg/mg tejido)	CONTROL	1,24±0,01 (+, μ, &)	1,83±0,05 *	1,82±0,05 *	1,85±0,02 *
	SEVO	1,85±0,02 (μ,+)	1,16±0,07 (μ)	0,986±0,07	1,06±0,05
TNFα (pg/mg tejido)	CONTROL	0,71±0,01 (+, μ, &) *	0,85±0,03 (μ, &) *	0,96±0,02 (&) *	1,2±0,03 *
	SEVO	0,78±0,01 (+, μ, &)	0,6±0,02	0,63±0,03	0,64±0,01
MAPK p38 total (ng/mg proteína)	CONTROL	4,99±0,25 (+, μ)	9,51±1,67 (μ, &)	5,86±0,88	5,68±0,73
	SEVO	5,23±0,34	7,33±0,46 (μ, &)	4,63±0,32	4,72±0,13
MAPK p38 fosforilada (ng/mg)	CONTROL	16,52±1,82 (+, μ, &)	95,1±22,61	85,6±16,63	104,5±6,83 *
	SEVO	17,5±4,66 (+, μ, &)	94,1±16,12	109,73±12,32	72,65±11,16
ERK fosforilada (ng/mg proteína)	CONTROL	4,11±0,38 *	4,22±0,29 *	4,82 ±0,65	4,49±0,12
	SEVO	2,65±0,39	2,18±0,51 (μ)	3,82±0,48	3,42±0,70
JNK fosforilada (ng/mg proteína)	CONTROL	2,39±0,32	2,62±0,23 (&) *	2,08±1,12	2,00±0,11
	SEVO	1,97±0,17	1,84±0,13	1,65±0,86	1,52±0,21
MCP-1 ( pg/mg proteína)	CONTROL	0,34±0,04 (+, &)	0,7±0,08 *	0,4±0,04 *	0,56±0,01 *
	SEVO	0,32±0,03	0,3±0,01	0,32±0,02	0,33±0,01

Tabla 4. Mediadores inflamatorios, MAP Kinasas y Quemoquinas atrayentes de monocitos. Datos son Media ± SD. IL1: Interleuquina 1. TNF α: Factor de necrosis tumoral α. MAPK p38: quinasa activadas por mitogenos p38. ERK: kinasa regulada por señales extracelulares. JNK: protein-kinasa c-jun amino terminal. \* p< 0.05 entre el grupo sevo y control. (+) p < 0.05 respecto al valor prerreperusión. (μ) p< 0.05 respecto al valor post-reperfusion 10'. (&) p < 0.05 respecto al valor post-reperusión 30'.

### 2. 1. Interleuquina 1 (IL-1):

En el grupo control, se objetivó un aumento estadísticamente significativo en los valores de Interleuquina 1 con respecto a la medición preneumectomía tanto en el momento prerreperusión como a los 10 y 30 minutos post-reperusión. En el grupo SEVO encontramos, por el contrario, un descenso significativo de IL-1, comparado con el momento preneumectomía, tanto en la prerreperusión como a los 10 minutos post-reperusión (tabla 5).

	CONTROL	SEVO	P
<b>PRENEUMO</b>	1,24±0,01	1,23±0,04	
<b>PRERREPERF</b>	1,83±0,05	1,16±0,07	<0,05
<b>POSTREPERF 10</b>	1,82±0,05	0,98±0,07	<0,05
<b>POSTREPERF 30</b>	1,85±0,02	1,06±0,05	<0,05

Tabla 6. Valores de IL-1 (pg/mg tejido)

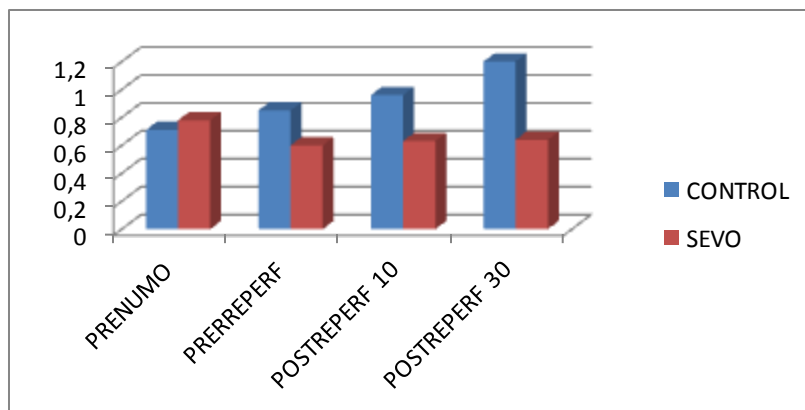


Gráfico 2. Valores de TNFα en ambos grupos a lo largo del experimento (pg/mg tejido).

Al inicio del experimento los valores de IL-1 son similares en ambos grupos, sin embargo, desde el momento de la prerreperusión hasta el final del estudio, los valores de IL1 son menores en el grupo SEVO con una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) (gráfico 1).

## 2. 2. Factor de Necrosis tumoral (TNF):

	CONTROL	SEVO	P
<b>PRENEUMO</b>	0,71±0,01	0,78±0,01	<0,05
<b>PRERREPERF</b>	0,85±0,03	0,6±0,02	<0,05
<b>POSTREPERF 10</b>	0,96±0,02	0,63±0,03	<0,05
<b>POSTREPERF 30</b>	1,2±0,03	0,64±0,01	<0,05

Tabla 7. Valores de TNF $\alpha$  (pg/mg tejido)

Dentro del grupo control, en la fase de pre-reperusión, así como a los 10 y 30 minutos de la reperusión, existe un incremento de TNF $\alpha$  en comparación a la fase pre-pneumonectomía, siendo en todas estas fases, dicho incremento estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ). Este ascenso en los niveles de TNF también es significativo ( $p < 0,05$ ) al comparar la fase de prerreperusión con ambas fases de postreperusión y al hacerlo comparando los 2 momentos posteriores al desclampaje del injerto (tabla 6). En el grupo SEVO, se produce un descenso estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) de los niveles de TNF en todos los momentos del experimento con respecto a la fase de preneumonectomía.

Al comparar ambos grupos entre sí, se observa que los valores de TNF $\alpha$  en el grupo SEVO son menores en todas las fases del estudio con una  $p < 0,05$  (gráfico 2), salvo en la fase de reperusión en la que los valores de TNF son significativamente mayores en el grupo expuesto a Sevofluorano.

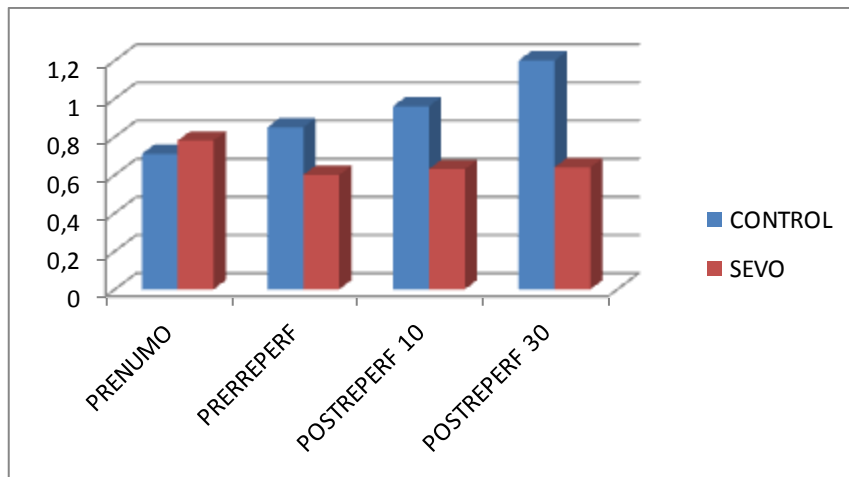


Gráfico 2. Valores de TNFα en ambos grupos a lo largo del experimento (pg/mg tejido).

### 3. Quinasas activadas por mitógenos (MAPK)

#### 3. 1. MAPK p38 total:

	CONTROL	SEVO	P
<b>PRENUMO</b>	4,99±0,25	5,23±0,34	>0,05
<b>PRERREPERF</b>	9,51±1,67	7,33±0,46	>0,05
<b>POSTREPERF 10</b>	5,86±0,88	4,63±0,32	>0,05
<b>POSTREPERF 30</b>	5,68±0,73	4,72±0,13	>0,05

Tabla 8. Valores de MAPK total (expresados en ng/mg proteína)

Con respecto a la pneumonectomía, en ambos grupos se produjo un aumento estadísticamente significativo en los niveles de MAPK p38 total en la fase de Prerreperfusión (tabla 7). En todas las fases posteriores, sin embargo, estos niveles decrecen de un modo significativo ( $p < 0,05$ ), siendo este descenso más marcado en el grupo SEVO, aunque no se alcance la significación estadística al comparar ambos grupos (gráfico 3).

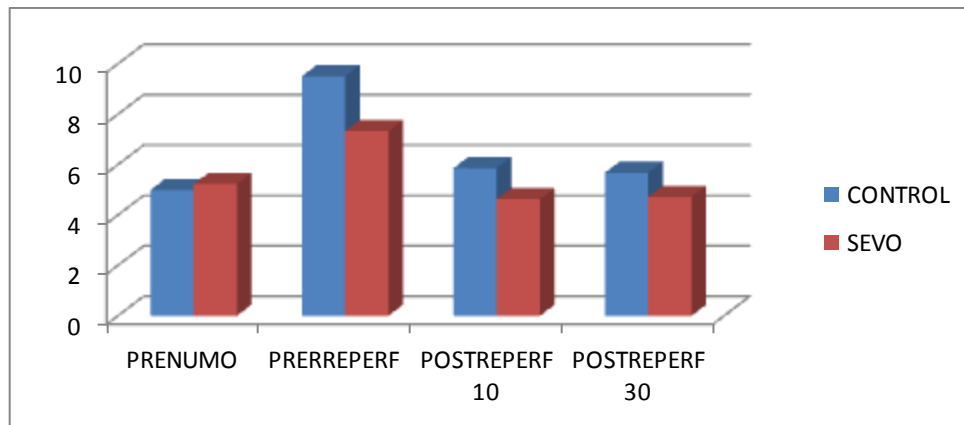


Gráfico 3. Valores de MAPK p38 total en ambos grupos a lo largo del experimento (ng/mg proteína).

### 3. 2. MAPK p38 fosforilada:

En la fase de pre-reperfusión, así como a los 10 y 30 minutos de la reperfusión, existe un incremento de MAPK-38-fosforilada (MAPK-38-P) en comparación a la fase pre-neumonectomía, siendo en todas estas fases, dicho incremento estadísticamente significativo ( $p < 0.01$ ) en el grupo CON. También se muestra un incremento en el grupo SEVO en la fase de pre-reperfusión y a los 10 y 30 minutos de la reperfusión (gráfico 5). A los 30 minutos de la reperfusión, existe una disminución significativa de MAPK p38-P en el grupo SEVO en comparación al grupo CON ( $p < 0.05$ ) (tabla 8).

	CONTROL	SEVO	P
<b>PRENEUMO</b>	16,52±1,82	17,5±4,66	
<b>PRERREPERF</b>	95,1±22,61	94,1±16,12	
<b>POSTREPERF 10</b>	85,6±16,63	109,73±12,32	
<b>POSTREPERF 30</b>	104,5±6,83	72,65±11,16	<0,05

Tabla 9. Valores de MAPK p38 fosforilada (ng/mg proteína)

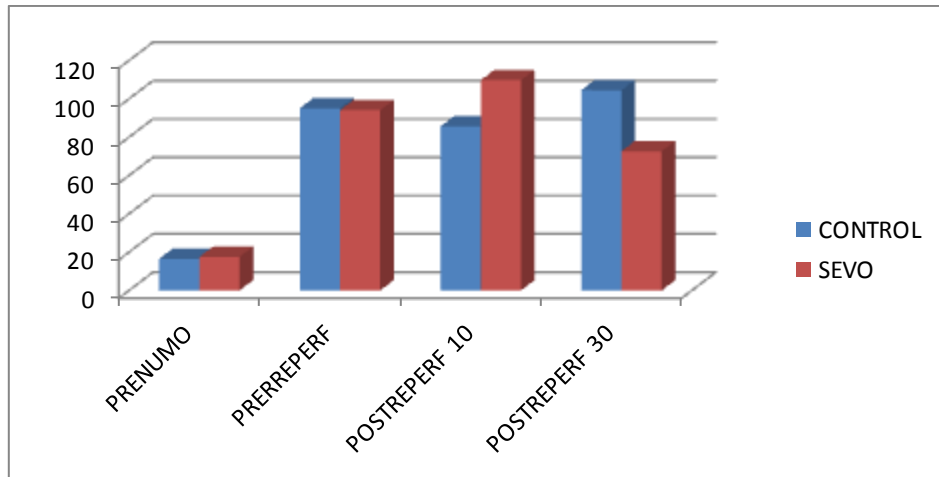


Gráfico 4. Valores de MAPK p38 fosforilada en ambos grupos a lo largo del experimento (ng/mg proteína).

### 3. 3. ERK fosforilada:

En el grupo control los valores de ERK tienden a aumentar desde la fase de pneumonectomía hasta los 10 minutos post-reperfusión, aunque sin alcanzar la significación estadística (gráfico 5).

En el grupo SEVO por el contrario, si encontramos diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) al comparar los momentos pre-reperfusión y post-reperfusión 10'.

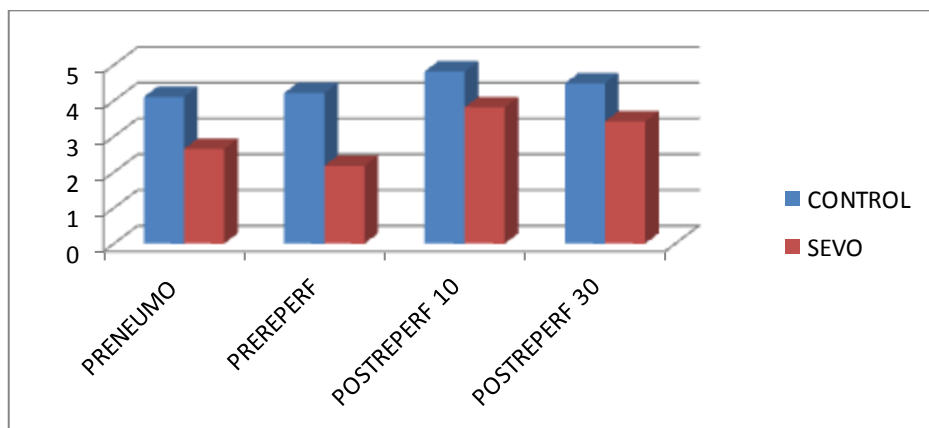


Gráfico 5. Valores de ERK fosforilada en ambos grupos a lo largo del experimento.

En los dos momentos de medición iniciales del estudio (Preneumectomía y Pre-reperusión) los niveles de ERK son menores en el grupo de animales precondicionados con Sevoflurano que en el grupo CONTROL, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ). En el resto de mediciones también son menores los valores en el grupo SEVO aunque no se alcanza la significación estadística (tabla 9).

	CONTROL	SEVO	P
<b>PRENEUMO</b>	4,11±0,38	2,65±0,39	<0,05
<b>PRERREPERF</b>	4,22±0,29	2,18±0,51	<0,05
<b>POSTREPERF 10</b>	4,82 ±0,65	3,82±0,48	
<b>POSTREPERF 30</b>	4,49±0,12	3,42±0,70	

Tabla 10. Valores de ERK (ng/mg proteína)

### 3. 4. JNK fosforilada:

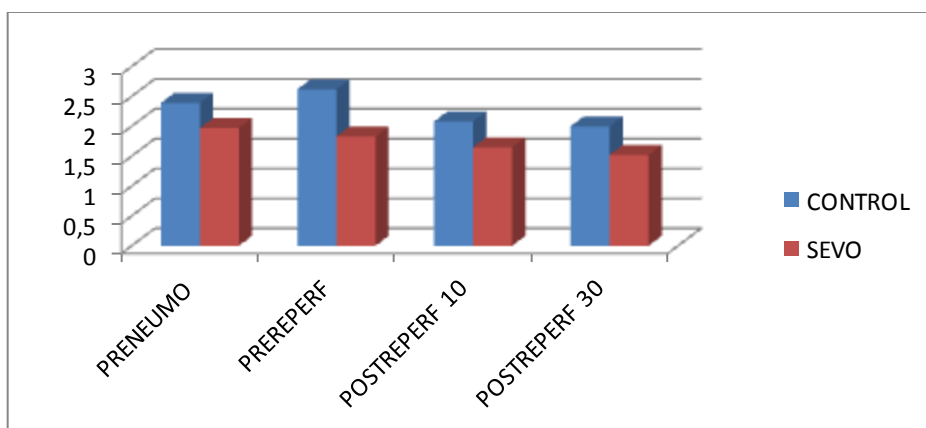


Gráfico 6. Valores de JNK en ambos grupos a lo largo del experimento (ng/mg proteína).

En el gráfico 6 se muestra como, los niveles de JNK en el grupo CONTROL tienen tendencia a aumentar desde el inicio hasta la prerreperusión. A partir de ese momento

comienza un descenso de dichos niveles que se hace significativo ( $p < 0,05$ ) al comparar la prerperfusión con la medición a los 30 minutos de la reperfusión. Por el contrario, en el grupo SEVO la tendencia es descendente desde el inicio a la reperfusión tardía.

Los niveles de JNK fosforilada son menores en el grupo SEVO con respecto al grupo CONTROL en todos los momentos del estudio, aunque sólo existe una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) durante la prerperfusión (tabla 10).

	CONTROL	SEVO	P
<b>PRENEUMO</b>	2,39±0,32	1,97±0,17	
<b>PRERREPERF</b>	2,62±0,23	1,84±0,13	<0,05
<b>POSTREPERF 10</b>	2,08±1,12	1,65±0,86	
<b>POSTREPERF 30</b>	2,00±0,11	1,52±0,21	

Tabla 10. Valores de JNK (ng/mg proteína)

#### 4. Proteína Quimiotáctica de Monocitos (MCP-1)

	CONTROL	SEVO	P
<b>PRENEUMO</b>	0,34±0,04	0,32±0,03	
<b>PRERREPERF</b>	0,7±0,08	0,3±0,01	<0,05
<b>POSTREPERF 10</b>	0,4±0,04	0,32±0,02	<0,05
<b>POSTREPERF 30</b>	0,56±0,01	0,33±0,01	<0,05

Tabla 11. Valores de MCP-1(pg/mg proteína)

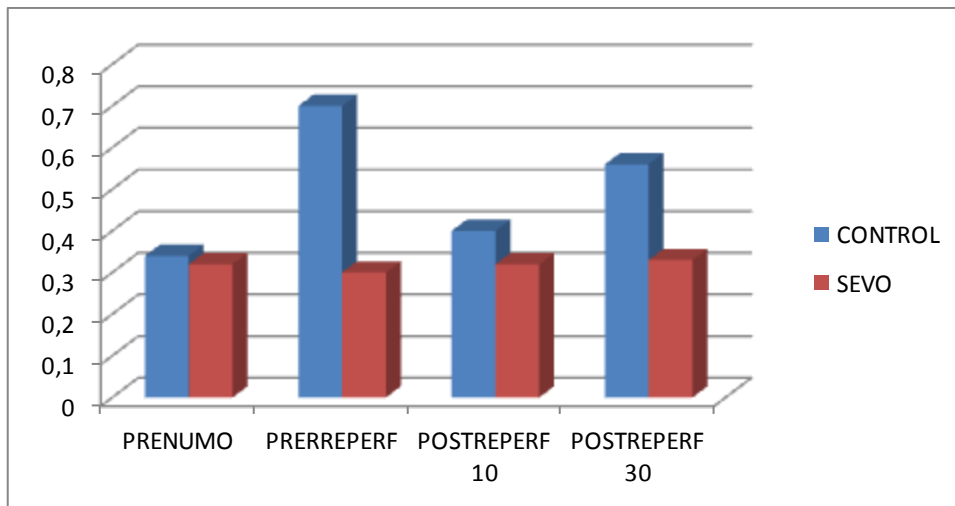


Gráfico 7. Valores de MCP-1 en ambos grupos a lo largo del experimento (pg/mg proteína).

Los valores hallados de MCP-1 fueron menores en el grupo precondicionado con Sevofluorano que en el grupo CONTROL en todos los momentos del estudio, encontrando significación estadística ( $p < 0,05$ ) durante la pre-reperusión y las dos mediciones post-reperusión.

Es llamativo el marcado incremento de los valores de MCP-1 en el grupo CON, algo que no sucede en el grupo precondicionado con Sevofluorano.

## 5. Factor Nuclear-Kappa $\beta$ (NFK $\beta$ )

La isquemia produjo un incremento del NF-kB p50 y p65 en el citoplasma de la célula en los dos grupos de animales y del NF-kB p50 en el núcleo. Tras la reperusión observamos un incremento del NF-kB p50 y p65 nuclear en ambos grupos. Únicamente el grupo CON mostró un aumento de NF-kB p52 respecto a los valores basales. También al comparar los valores de antes y después de la reperusión observamos únicamente en el grupo CON un descenso del IKB y del NF-kB p50 en el citoplasma y un aumento del NF-kB p65 nuclear. Al realizar la comparación entre ambos grupos se comprobó que los valores de NF-kB p50 eran significativamente menores en el grupo CON que en el grupo SEVO (tabla 12)

	GRUPO	PRENEUMO	PRERREPERF	POSTREPERF-10'	POSTREPERF-30'
NF_P50_Cit	CON	0.843 ±0.10	1.209 ±0.10 †	0.926 ±0.11 ‡	0.921 ±0.10 ‡
	SEVO	0.849 ±0.10	0.934 ±0.11 †	0.887 ±0.10	0.820 ±0.12
NF_P50_NUC	CON	0.898 ±0.05	1.569 ±0.11 †	1.479 ±0.10 †	1.503 ±0.03 †
	SEVO	0.884 ±0.02	<b>1.073 ±0.06* †</b>	<b>1.123 ±0.05* †</b>	<b>1.206 ±0.06* †</b>
NF_P52_CIT	CON	0.627 ±0.06	0.643 ±0.08	0.666 ±0.08	0.630 ±0.05
	SEVO	0.563 ±0.13	0.590 ±0.08	0.523 ±0.07	0.525 ±0.06
NF_P52_NUC	CON	0.483 ±0.04	0.577 ±0.09	0.616 ±0.06 †	0.577 ±0.06 †
	SEVO	0.473 ±0.04	0.498 ±0.06	0.545 ±0.12	0.535 ±0.09
NF_P65_CIT	CON	0.652 ±0.03	0.808 ±0.08 †	0.777 ±0.08	0.773 ±0.06
	SEVO	0.568 ±0.06	0.738 ±0.10 †	0.650 ±0.07	0.635 ±0.07
NF_P65_NUC	CON	0.387 ±0.02	0.387 ±0.03	0.483 ±0.03 † ‡	0.460 ±0.03 † ‡
	SEVO	0.379 ±0.03	0.397 ±0.02	0.463 ±0.03 †	0.372 ±0.03
IKB	CON	0.893 ±0.05	0.925 ±0.08	0.888 ±0.10	0.806 ±0.09 ‡
	SEVO	0.845 ±0.07	0.917 ±0.07	0.904 ±0.10	0.854 ±0.05

Tabla 12. Valores expresado en DO/mm<sup>2</sup>, como valores promedio. CON: Grupo control. SEV: Grupo sevoflorano. \* p<0.05 SEVO vs CON. † p<0.05 vs PreNeumo. ‡ p<0.05 vs PreReperf.

## 6. Caspasas

En ambos grupos, encontramos un significativo aumento de la caspasa 3 durante la prerperfusión, siendo mucho mas marcado en el grupo CON. En los pacientes pretratados con Sevoflorano, los valores decrecen durante el resto de fases del estudio. En el grupo CON, esta disminución es de menor intensidad, manteniéndose, por tanto, elevados con respecto a la medición basal (gráfico 8).

	GRUPO	PreNeumo	Prereperf	Postreperf-10'	Postreperf-30'
<b>Caspasa-3</b>	CON	4.39 ± 0.7	7.83 ± 0.7†	4.46 ± 0.7‡	3.9 ± 0.3‡
	SEVO	3.57 ± 0.6	5.42 ± 0.6†*	3.61 ± 0.6	3.73 ± 0.3‡
<b>Caspasa-9</b>	CON	14.33 ± 0.5	29.48 ± 2†	34.12 ± 2.7†	27.45 ± 2.5†‡
	SEVO	12.6 ± 1	16.17 ± 1.1*	16.32 ± 1.2*†	16.34 ± 0.8*†

SEV: Grupo sevonorano. \* p<0.05 SEVO vs CON. † p<0.05 vs Preneumo; ‡ p<0.05 vs Prereperfusion. # p<0.05 vs Post-reperfusion-10'.

Al comparar los valores de la caspasa 3 observamos que fueron inferiores en el grupo SEVO, de una forma estadísticamente significativa, con el grupo CON (p<0.05), únicamente en la medición de las muestras obtenidas antes de la reperfusión (tabla 13).

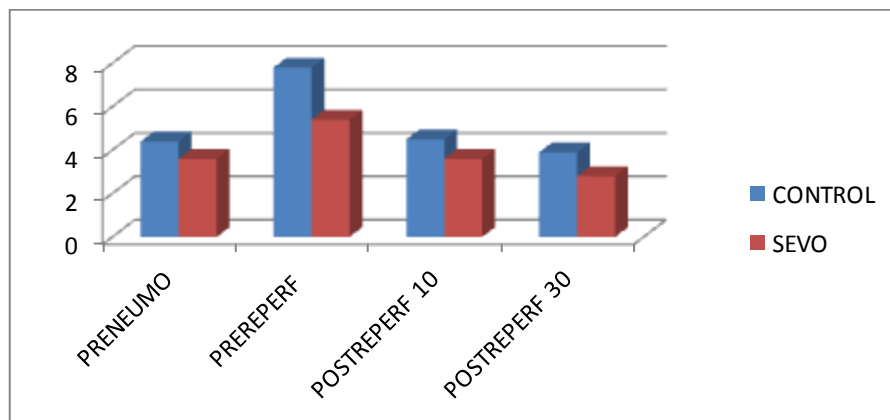
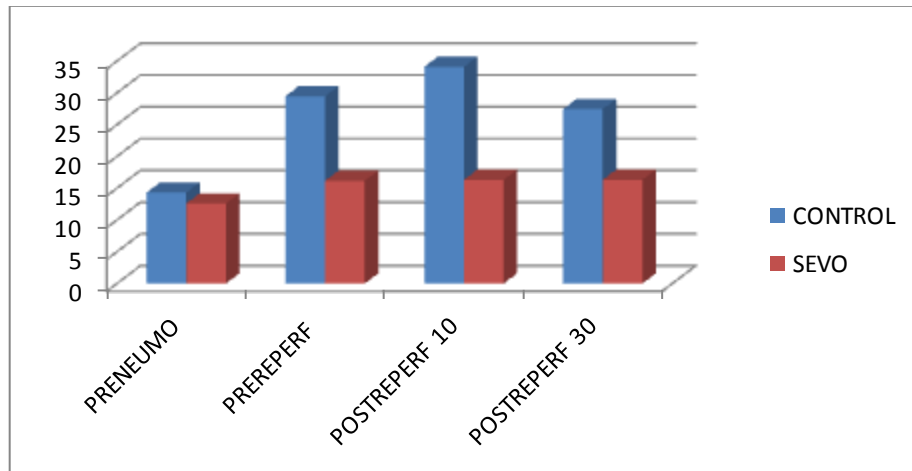


Gráfico 8. Valores de Caspasa 3 medidos en ambos grupos (UIs/microg proteína).

La caspasa 9 tiene un patrón de comportamiento similar a la efectora. En ambos grupos se produce un incremento significativo en la fase de reperfusión, aunque, en este caso, dicho aumento perdura durante el primer periodo post-reperfusion, para acabar descendiendo a los 30 min de la reperfusión, todo ello de modo significativo (gráfico 9). Además, los valores obtenidos en el grupo SEVO fueron significativamente

inferiores a los obtenidos en el grupo control tanto antes como después de reperfundir el autoinjerto pulmonar. (tabla 13).



**Gráfico 9. Valores de Caspasa 9 medidos en ambos grupos (Uls/microg proteína).**

## DISCUSIÓN

---

En 1976 Bland y Lowestein describen un menor ascenso en el registro electrocardiográfico del ST en un modelo de isquemia miocárdica en perros a los que se les sometía a periodos de oclusión coronaria [92]. Surge así el concepto de preconditionamiento isquémico. En consonancia con esto, Murry en 1986 [93], demuestra que el preconditionamiento con breves periodos de isquemia en corazones de perro, reduce el tamaño del infarto de miocardio. A partir de ese momento comienza un interés creciente, no sólo por el preconditionamiento isquémico, sino también por el preconditionamiento farmacológico. Es precisamente este mismo grupo el que posteriormente demostró que, en un grupo de perros expuestos a halotano, el tamaño del infarto era menor que en animales que no habían sido pretratados farmacologicamente [94]. Este trabajo, que fue el pionero a nivel del estudio del preconditionamiento in vivo, equiparó de alguna manera la protección de los anestésicos volátiles a la del preconditionamiento isquémico.

Nuestro estudio sigue la misma línea de los anteriores y demuestra que el grupo de cerdos anestesiados con sevoflurano tiene un menor daño tras la IR que el sometido a mantenimiento anestésico con propofol. Aunque el tiempo de perfusión es escaso (30 minutos), es el suficiente para mostrar diferencias entre ambos grupos respecto a diversos parámetros que otros grupos utilizan para medir el daño tras la IR como son mediadores de la inflamación (IL-1, TNF ), MAPK y marcadores de migración leucocitaria (MCP 1).

# **1. EFECTO CITOPROTECTOR DEL PRECONDICIONAMIENTO CON SEVOFLUORANO EN UN MODELO DE ISQUEMIA REPERFUSIÓN PULMONAR. EFECTO DE LA VENTILACIÓN UNIPULMONAR.**

Numerosos estudios ya apuntaban con anterioridad a que los gases halogenados podrían proteger contra el daño postreperusión en el corazón [67-71], cerebro [72] e hígado [73]. En pulmón existen menos investigaciones que en otros órganos, y los efectos de los anestésicos inhalatorios sobre el síndrome de IR aún no son muy conocidos. En un modelo de disfunción multiorgánica en ratón, el isoflurano disminuyó el daño pulmonar, probablemente modulando la respuesta inflamatoria [81]. Liu et al. demostraron en pulmón de conejo que, al administrar isoflurano o sevoflurano antes de la isquemia, se atenuaba el aumento de la permeabilidad vascular, disminuía la relación peso húmedo/seco así como los niveles de TNF-alfa en el pulmón reperfundido después de la isquemia [82]. Nosotros hemos obtenido estudios similares a los de Liu en términos de TNF  $\alpha$ . Demostramos también el descenso de otro mediador proinflamatorio, la IL-1. No sólo eso, nuestro objetivo es ir un paso más allá y valorar el efecto que la inhalación de dicho gas tiene sobre las cascadas de protein kinasas que posteriormente desencadenarán el resto de la cadena inflamatoria. Además, consideramos que el daño por Isquemia-Reperusión es un fenómeno más complejo, que no es posible reducir a sus efectos sobre las citoquinas proinflamatorias. Por este motivo, valoramos también el efecto que ejerce sobre la activación leucocitaria. Además, la principal ventaja de nuestro trabajo respecto a los previos es que se realiza sobre animales in vivo y no sobre células aisladas.

En algunos estudios experimentales, la exposición a halogenados durante la ventilación mecánica ha determinado una mayor respuesta inflamatoria pulmonar [95-

97]. Estos hallazgos contrastan con los de otros grupos que muestran una menor reacción inflamatoria al comparar los anestésicos volátiles y los intravenosos [98] y con el nuestro propio. Estas discrepancias podrían deberse a diferencias en los modelos experimentales analizados.

Algo que diferencia a nuestro modelo de otros es, que además de ser un modelo in vivo, se trata de un modelo de ventilación unipulmonar (OLV). Por si misma la OLV conlleva un fenómeno de IR intrínseco, causado fundamentalmente por los efectos de la vasoconstricción pulmonar hipóxica. Esta vasoconstricción promueve la circulación sanguínea hacia las zonas bien oxigenadas del pulmón, dejando las zonas hipóxicas prácticamente sin flujo. Cuando el pulmón vuelve a ser reexpandido y ventilado, se produce una reperfusión del mismo. Esto ha sido demostrado en cerdos sometidos a 60 minutos de OLV y una posterior reperfusión, en los que se objetivó una marcada congestión postreperfusión a nivel de los vasos pulmonares del pulmón que se mantuvo hipóxico [101]. Además, se ha observado que existe un daño en células epiteliales alveolares in vitro asociado a la hipoxia del pulmón no ventilado durante la OLV [99]. Esto fue confirmado en un modelo experimental de pulmones aislados de conejo, en los que la formación y re-expansión de atelectasias elevaban la producción de citoquinas [100]. Por tanto, son diversos los efectos que la OLV tiene sobre el pulmón y la respuesta inflamatoria. Jordan et al describieron la patogénesis del edema pulmonar postneumectomía y su origen multifactorial: alteración vascular pulmonar, balance hídrico, duración de la ventilación unipulmonar, respuesta inflamatoria y estrés oxidativo entre otros [101]. En nuestro trabajo no existen diferencias en cuanto a la duración de la OLV, por lo que uno de las variables más importantes para encontrar diferencias entre los grupos es eliminada. Tampoco encontramos diferencias en cuanto a la presión en la vía aérea, que es otro de los factores que podrían influir en el desarrollo del daño pulmonar.

De Conno et al [102] realizaron lavados broncoalveolares en pacientes sometidos a cirugía torácica antes y después de la OLV en el pulmón que va a ser excluido de la ventilación o no dependiente, encontrando un importante aumento de TNF-  $\alpha$ , IL 6, IL 8 y de la proteína 1 de quimiotaxis de monocitos. Se observó además una reducción significativa de dichos mediadores inflamatorios en el grupo que fue tratado con sevoflurano con respecto al que se trató con propofol. Los resultados son similares a los hallados por nosotros. De Conno no encontró diferencias en cuanto a estos mediadores a nivel sistémico. Sin embargo al realizar un seguimiento a los pacientes, concluye que los que han recibido sevoflurano y presentado una menor respuesta inflamatoria local, presentan un menor número de complicaciones y por tanto un mejor pronóstico [102]. Schilling et al por su parte encontraron que la administración de desflurano disminuía la respuesta inflamatoria, TNF-  $\alpha$ , IL 8, IL 10 y polimorfonucleares en el lavado broncoalveolar del pulmón dependiente [98]. Posteriormente este mismo grupo realiza otro estudio en el que compara pacientes anestesiados con sevoflurano con el grupo anestesiado con propofol y desflurano [103]. En este reciente trabajo se muestra una disminución de la respuesta inflamatoria en el pulmón ventilado bajo anestesia inhalatoria, tanto sevoflurano como desflurano. Además no encuentra diferencias a nivel sistémico en cuanto a aumento de mediadores tales como TNF-  $\alpha$  o interleuquinas. Sin embargo, en contrapartida a esto, existe un trabajo de ventilación unipulmonar para cirugías de esofagectomía en el que se produce un aumento de los mediadores proinflamatorios sistémicos [104]. Probablemente, el hecho de que la esofagectomía sea una cirugía de mayor agresividad, hace que este estudio no sea comparable a los previos, puesto que cabe esperar que dicha cirugía desencadene una mayor respuesta inflamatoria sistémica.

## 1.1 Efecto del Sevofluorano sobre las citoquinas proinflamatorias

En concordancia con los estudios previos, nuestro trabajo muestra un incremento progresivo a lo largo de todas las mediciones en los niveles de IL-1 en el tejido pulmonar en el grupo CONTROL causado por la isquemia y posterior reperfusión. En el grupo SEVO, por el contrario, los valores de IL-1 decrecen ya en el momento de la Prerreperfusión y continúan descendiendo de un modo significativo hasta diez minutos después de la reperfusión. A los treinta minutos se mantienen niveles similares. Estos resultados nos hacen pensar que el efecto protector del Sevofluorano tiene lugar desde un momento muy temprano de su administración y se mantiene hasta después de finalizada su administración. Sería necesario prolongar la duración del estudio para conocer la duración exacta de esta protección. Nuestro trabajo concuerda con el ensayo realizado por Schilling en el 2011 [106].

Una de las explicaciones posibles del efecto protector del sevofluorano es que produzca una inhibición reversible de la expresión génica de las citoquinas. Esta hipótesis ya quedó demostrada en un estudio que medía la expresión génica de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en tejido pulmonar en cerdos a los que se les administró tiopental versus otros a los que se les administró sevofluorano, siendo menor dicha expresión en el segundo grupo [109].

Con respecto a TNF $\alpha$ , en nuestro trabajo objetivamos un aumento progresivo a lo largo del estudio, 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 IR [105]. Se observa además que, en la primera de las mediciones que realizamos (Preneumonectomía), los niveles son mayores en el grupo SEVO. A partir de ese momento, los resultados se invierten y los niveles de TNF $\alpha$  pasan a ser significativamente mayores en el grupo CONTROL en el resto de mediciones del estudio. Además, mientras que en el grupo CONTROL los niveles de dicha citoquina

continúan aumentando todo el estudio, en el grupo SEVO sufren una marcada caída en la prerreperusión y se mantienen en esos valores bajos hasta el final del estudio. A medida que se manifiesta el daño que causa la OLV y posteriormente la IR, se hace patente el efecto protector del sevoflurano en cuanto a la expresión de TNF-  $\alpha$ . Esto sigue la línea del estudio de Liu [80], y concuerda también con los resultados de un estudio realizado in vitro sobre células neutrófilas aisladas, que sugieren que los anestésicos volátiles podrían inhibir significativamente la producción de TNF y así proteger contra el daño IR pulmonar [106].

## **1.2 Efecto del Sevoflurano sobre las MAP- Kinasas**

Ya hemos visto que diversos estudios postulan que la expresión de dichas citoquinas proinflamatorias podría estar mediada por una cadena de transducción de señales en la que participan las MAPK [25, 107]. Aún en el momento actual existe controversia sobre si dichas protein kinasas tienen un efecto proinflamatorio [28, 35, 36, 38, 39, 108], protector frente a la Isquemia-Reperusión [31, 32], o bien si, dependiendo de sus distintas isoformas, pueden presentar uno u otro efecto [33] . Nuestro estudio es pionero a la hora de estudiar el efecto del preconditionamiento anestésico sobre la cascada de señales de las MAPK en un modelo animal in vivo y sus resultados parecen más acordes con la primera hipótesis.

La posible interacción entre el Sevoflurano y la vía de las MAPKs ya había sido propuesta con anterioridad, si bien los resultados alcanzados fueron poco concluyentes [91], y fuera del contexto del daño pulmonar por Isquemia-Reperusión. En un reciente estudio en un modelo in vitro en tejido pulmonar de rata, se observó la capacidad del sevoflurano para disminuir el incremento de la permeabilidad mediado por TNF- $\alpha$  de células endoteliales pulmonares, así como para suprimir la activación de p38 [112].

El perfil temporal de la expresión de MAPK-p38 encontrado en nuestro trabajo nos lleva a pensar que, efectivamente, desempeña un papel proinflamatorio, puesto que la agresión producida por la neumectomía indujo un importante aumento de esta proteína en los dos grupos. La explicación más plausible a dicho comportamiento es que, ya desde el momento inicial, la isquemia induce la producción de MAPK p38. El hecho de que, desde la Prerreperusión, exista una tendencia en el grupo SEVO a presentar niveles más bajos de esta proteína sugiere el Sevoflurano podría proteger frente la Isquemia-Reperusión por medio de la inhibición de la expresión de estas proteínas. Haría falta un tamaño muestral mayor para estudiar esto. Del mismo modo, es posible que un mayor tiempo de reperusión acabase demostrando una diferencia significativa a favor del grupo SEVO. Nuestro tiempo de reperusión máximo estudiado de 30 minutos puede ser insuficiente para abarcar los procesos desencadenantes de la inflamación en el tejido pulmonar así como su amplificación mediante la activación de las MAPKs y la modulación de la expresión génica asociada.

De hecho, un estudio de isquemia caliente en gatos de mayor duración, mostró que los niveles de p38 fosforilada continúan elevándose durante las primeras 27 horas postreperusión. Se objetivó además que el edema, la inflamación y la apoptosis que, en el periodo de reperusión inmediato se dan en el pulmón que ha sido sometido a isquemia, al cabo de 27 horas se da también en el otro pulmón [54]. Surge así la hipótesis de que Isquemia-Reperusión sea un proceso sistémico. Esto iría en contra del trabajo de Schilling [103] que, como ya hemos mencionado, no encuentra diferencias a nivel sistémico en cuanto a aumento de mediadores proinflamatorios. Una de las limitaciones de nuestro estudio es, por tanto, que nos hemos limitado a realizar mediciones de marcadores proinflamatorios y de señales de activación de los mismos a nivel local, sin comprobar que ocurre a nivel plasmático. Futuras investigaciones deben ir encaminadas en ese sentido.

Dado que es la forma fosforilada de esta enzima la que es activa, es la MAPK p38 fosforilada la que puede darnos una mayor información sobre el efecto que el preconditionamiento anestésico ejerce sobre esta cascada de señalización.

La neumonectomía produjo un incremento significativo de la forma activa fosforilada, MAPK-p38-P, en los dos grupos de animales. Sin embargo, tras la reperusión la evolución de este marcador fue diferente en los dos grupos. A los 30 minutos de la reperusión, en el grupo SEVO se observa una disminución de esta marcador mientras que en el grupo CONTROL se produjo un aumento. Este patrón temporal sugiere que el Sevoflurano no sólo induce la expresión de la MAPK p38, sino que también induciría su activación por medio de la fosforilación.

En investigaciones posteriores, queda pendiente determinar si la posible activación diferencial de las distintas isoformas de la MAPK-p38 ( p38 $\alpha$  y p38 $\beta$  ) a nivel pulmonar ejerce efectos diferentes sobre la Isquemia-Reperusión, como ya se ha hecho a nivel cardiaco, en donde ya se ha demostrado su papel proapoptótico y antiapoptótico, respectivamente [108].

Otra MAPK, la JNK, también ha sido puesta en relación con el daño por Isquemia-Reperusión [38, 39]. Si bien es cierto que en nuestro estudio las diferencias entre ambos grupos en los valores de esta proteína sólo son significativos durante la Prerreperusión, no es menos cierto que, en todos los momentos de medición, en el grupo SEVO estos valores son menores, aunque no se alcance la significación. Igualmente, el pico máximo que se alcanza en el grupo CONTROL durante la Prerreperusión es inexistente en el grupo de animales preconditionados farmacológicamente. Esto parece concordar con la teoría de que el Sevoflurano comienza a proteger frente a la isquemia ya en una fase muy precoz.

Los resultados que hayamos de ERK fosforilada siguen esta misma línea. Una vez más, vemos como desde fases precoces del estudio, donde todavía sólo se ha producido la isquemia y no se ha iniciado aún el daño ocasionado por la reperusión, el

Sevoflurano, comienza a inhibir la expresión de ERK. Postulamos que, de este modo, en fases posteriores, podría disminuir la respuesta inflamatoria local.

Esto resulta compatible con las investigaciones que demuestran que el efecto amplificador de la inflamación de las MAPKs en el síndrome de IR ocurre desde los primeros minutos de la reperfusión [109]. En conclusión, el efecto protector del sevoflurano sobre la lesión pulmonar por isquemia-reperfusión, parece asociado a una disminución en la activación de las MAPK, aunque son necesarios más estudios que lo demuestren.

### 1.3. Efecto del Sevoflurano sobre la activación de los leucocitos

Existe mucha controversia sobre el papel de los leucocitos en el síndrome de IR y sobre si su actuación sobre el mismo se da en una fase precoz o tardía [12] [13]. Uno de los objetivos de nuestro estudio es valorar los efectos que el preconditionamiento anestésico provoca sobre esta activación leucocitaria. Escogimos la MCP-1 como marcador de la migración de las células polimorfonucleares porque ya ha demostrado jugar un papel primordial en el reclutamiento de neutrófilos en modelos de pulmones de ratas expuestos a hiperoxia [110].

El papel de esta quemoquina dentro del síndrome de Isquemia-Reperfusión aún no ha sido bien definida [17] [16], aunque el hecho de que su expresión esté regulada positivamente por citoquinas proinflamatorias, tales como TNF $\alpha$  e IL-1 [111, 112], nos lleva a pensar que puede jugar un papel deleterio dentro del daño por IR.

A nivel pulmonar, existen modelos de daño agudo que demuestran que MCP1 está involucrada en la acumulación de neutrófilos [116], así como otros que objetivan un incremento en los niveles de mRNA de MIP-1, proteína localizada en monocitos y macrófagos [117], durante un daño pulmonar hipóxico. Además se ha demostrado que, en células pulmonares aisladas, en el daño causado por el síndrome de

Isquemia-Reperfusión existe un aumento de la expresión de MCP-1 [113]. En un modelo similar, Naidu et al. probaron que la inhibición de esta quemoquina disminuía la expresión de mRNA de múltiples citoquinas así como la secreción de TNF $\alpha$  [114]. Nuestro grupo de trabajo ha demostrado que este incremento en la concentración de MCP-1 se da también in vivo, en un modelo de autotrasplante pulmonar en cerdos [115].

En contraposición a esto, otros estudios sugieren que la MCP-1 no juega un papel fundamental en el daño pulmonar agudo [116] o bien que, aunque esta proteína se secreta en cantidades apreciables ante una alveolitis inducida por lipopolisacáridos, (endotoxinas bacterianas capaces de producir reacciones inflamatorias muy similares a las que se dan en el daño pulmonar agudo) en un modelo in vivo en ratas, la antagonización de su función no tiene efecto en disminuir la respuesta inflamatoria o en reducir varios indicadores de daño pulmonar agudo [117]. Otro estudio, que emplea un modelo similar de daño pulmonar agudo por IR en ratas, sugiere que el bloqueo de la proteína MCP-1 es protector a los 30 minutos de la reperfusión, pero no a las 4 horas [12]. Este efecto protector de los anti-MCP-1 en una fase tan precoz de la reperfusión es difícil de explicar dado que la proteína MCP-1 todavía no es detectable por Western blot en ese momento.

En el año 2007, Suter et al. ya demuestran una disminución en la expresión de MCP-1 en células sometidas a tratamiento con Sevofluorano [118]. Para ello expusieron a células epiteliales alveolares a lipopolisacáridos. Con anterioridad ya se había descrito que estas endotoxinas aumentaban la expresión y producción de muchas quemoquinas, entre ellas de MCP1. Las células expuestas a sevofluorano tuvieron una disminución del 50% en la expresión de la proteína MCP1 con respecto a las células no expuestas.

Estos resultados concuerdan con los que encontramos en nuestro modelo in vivo, en donde objetivamos unos valores de MCP-1 menores en el grupo preconditionado con

Sevofluorano que en el grupo CONTROL, haciéndose especialmente significativas estas diferencias antes de iniciar la reperfusión y en las dos mediciones posteriores. Esto iría en contra del estudio de Eppinger que no encuentra dicha proteína mediante Western Blot en la reperfusión inmediata e iría acorde con todos los estudios que hablan de una posible protección multimodal del Sevofluorano frente al daño por IR, siendo la inhibición de la migración de los leucocitos una de las maneras de lograrlo. En contraposición nuestra, Krishnadasan et al, en un modelo de Isquemia-Reperfusión in vivo en ratas a las que someten a 90 minutos de isquemia caliente, tampoco detectaron la MCP-1 hasta 4 horas de reperfusión pulmonar [119]. Estas discrepancias podrían deberse a las diferencias en el modelo experimental o a la sensibilidad de la técnica de medición.

## **2. CONCLUSIONES**

- En el síndrome de Isquemia-reperfusión, originado por el cese de flujo sanguíneo a un órgano y su posterior reinstauración, se desencadenan varias respuestas a nivel molecular, que van a ser las causantes últimas de la clínica que se da en dicho síndrome. Estas respuestas son fundamentalmente la formación de radicales libres, la migración y activación de neutrófilos y la inducción de mediadores proinflamatorios, entre los que se encuentran las citoquinas, que desencadenan a su vez diversas señales de transducción, entre ellas las mediadas por MAPK.
- Este síndrome puede ser estudiado en un modelo experimental de Isquemia-Reperfusión pulmonar en cerdos.
- El preconditionamiento con Sevofluorano provoca una disminución de la liberación de TNF- $\alpha$  y de IL-1, citoquinas proinflamatorias cuyo papel en el daño por IR ya está sobradamente demostrado.

- Empiezan a surgir evidencias de que dicho gas inhibe la fosforilación, y por tanto la activación de las MAPK implicadas en la señalización del daño pulmonar agudo. Nuestro estudio sugiere que esto sucede ya durante la reperfusión inmediata con la MAPK-p38, ERK y JNK.
- Por otra parte, el Sevofluorano parece disminuir los niveles de MCP-1 en tejido pulmonar de animales sometidos a isquemia y posterior reperfusión. Esta quemoquina está implicada en la migración hacia los tejidos afectados y posterior activación de las células polimorfonucleares.
- Todos estos hallazgos sugieren el papel protector del Sevofluorano frente a la Isquemia-Reperfusión. Sin embargo, son necesarios más estudios, de mayor tiempo de reperfusión y con un tamaño muestral mayor para evidenciar esta capacidad de modulación por parte del Sevofluorano.

## BIBLIOGRAFÍA

---

1. de Perrot, M., et al., *Ischemia-reperfusion-induced lung injury*. Am J Respir Crit Care Med, 2003. **167**( 4) : p. 490-511.
2. Collard, C.D. and S. Gelman, *Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury*. Anesthesiology, 2001. **94**( 6) : p. 1133-8.
3. Varela de Ugarte, A., *[Primary graft failure following lung transplantation: is there hope for improvement?]*. Arch Bronconeumol, 2005. **41**( 9) : p. 473-4.
4. King, R.C., et al., *Reperfusion injury significantly impacts clinical outcome after pulmonary transplantation*. Ann Thorac Surg, 2000. **69**( 6) : p. 1681-5.
5. McCord, J.M., *Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury*. N Engl J Med, 1985. **312**( 3) : p. 159-63.
6. Al-Mehdi, A.B., H. Shuman, and A.B. Fisher, *Intracellular generation of reactive oxygen species during nonhypoxic lung ischemia*. Am J Physiol, 1997. **272**( 2 Pt 1) : p. L294-300.
7. Fisher, A.B., et al., *Oxygen-dependent lipid peroxidation during lung ischemia*. J Clin Invest, 1991. **88**( 2) : p. 674-9.
8. Lansman, J.B., *Endothelial mechanosensors. Going with the flow*. Nature, 1988. **331**( 6156) : p. 481-2.
9. Al-Mehdi, A.B., et al., *Endothelial NADPH oxidase as the source of oxidants in lungs exposed to ischemia or high K<sup>+</sup>*. Circ Res, 1998. **83**( 7) : p. 730-7.
10. Steimle, C.N., et al., *Neutrophils are not necessary for ischemia-reperfusion lung injury*. Ann Thorac Surg, 1992. **53**( 1) : p. 64-72; discussion 72-3.
11. Deeb, G.M., et al., *Neutrophils are not necessary for induction of ischemia-reperfusion lung injury*. J Appl Physiol, 1990. **68**( 1) : p. 374-81.
12. Eppinger, M.J., et al., *Pattern of injury and the role of neutrophils in reperfusion injury of rat lung*. J Surg Res, 1995. **58**( 6) : p. 713-8.
13. Fiser, S.M., et al., *Lung transplant reperfusion injury involves pulmonary macrophages and circulating leukocytes in a biphasic response*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2001. **121**( 6) : p. 1069-75.

14. Hazen, S.L., et al., *Human neutrophils employ myeloperoxidase to convert alpha-amino acids to a battery of reactive aldehydes: a pathway for aldehyde generation at sites of inflammation*. *Biochemistry*, 1998. **37**( 19) : p. 6864-73.
15. Zgliczynski, J.M., et al., *Chloramines as intermediates of oxidation reaction of amino acids by myeloperoxidase*. *Biochim Biophys Acta*, 1971. **235**( 3) : p. 419-24.
16. Wain, J.H., J.A. Kirby, and S. Ali, *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**( 3) : p. 436-44.
17. Morimoto, H., et al., *MCP-1 induces cardioprotection against ischaemia/reperfusion injury: role of reactive oxygen species*. *Cardiovasc Res*, 2008. **78**( 3) : p. 554-62.
18. Ivey, C.L., et al., *Neutrophil chemoattractants generated in two phases during reperfusion of ischemic myocardium in the rabbit. Evidence for a role for C5a and interleukin-8*. *J Clin Invest*, 1995. **95**( 6) : p. 2720-8.
19. Pierre, A.F., et al., *Effect of complement inhibition with soluble complement receptor 1 on pig allotransplant lung function*. *Transplantation*, 1998. **66**( 6) : p. 723-32.
20. Mizutani, H., et al., *Expression of endothelin-1 and effects of an endothelin receptor antagonist, TAK-044, at reperfusion after cold preservation in a canine lung transplantation model*. *J Heart Lung Transplant*, 1998. **17**( 8) : p. 835-45.
21. Gerlach, J., et al., *Local liberation of cytokines during liver preservation*. *Transpl Int*, 1999. **12**( 4) : p. 261-5.
22. Lemay, S., et al., *Prominent and sustained up-regulation of gp130-signaling cytokines and the chemokine MIP-2 in murine renal ischemia-reperfusion injury*. *Transplantation*, 2000. **69**( 5) : p. 959-63.
23. Oz, M.C., et al., *Ischemia-induced interleukin-8 release after human heart transplantation. A potential role for endothelial cells*. *Circulation*, 1995. **92**( 9 Suppl) : p. II428-32.
24. Serrick, C., et al., *The early release of interleukin-2, tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma after ischemia reperfusion injury in the lung allograft*. *Transplantation*, 1994. **58**( 11) : p. 1158-62.

25. McCubrey, J.A., M.M. Lahair, and R.A. Franklin, *Reactive oxygen species-induced activation of the MAP kinase signaling pathways*. *Antioxid Redox Signal*, 2006. **8**( 9-10) : p. 1775-89.
26. Dhillon, A.S., et al., *MAP kinase signalling pathways in cancer*. *Oncogene*, 2007. **26**( 22) : p. 3279-90.
27. Kim, E.K. and E.J. Choi, *Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases*. *Biochim Biophys Acta*. **1802**( 4) : p. 396-405.
28. Yue, T.L., et al., *Inhibition of extracellular signal-regulated kinase enhances Ischemia/Reoxygenation-induced apoptosis in cultured cardiac myocytes and exaggerates reperfusion injury in isolated perfused heart*. *Circ Res*, 2000. **86**( 6) : p. 692-9.
29. Force, T., et al., *Stress-activated protein kinases in cardiovascular disease*. *Circ Res*, 1996. **78**( 6) : p. 947-53.
30. Sugden, P.H. and A. Clerk, *"Stress-responsive" mitogen-activated protein kinases ( c-Jun N-terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinases) in the myocardium*. *Circ Res*, 1998. **83**( 4) : p. 345-52.
31. Huot, J., et al., *Oxidative stress-induced actin reorganization mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase/heat shock protein 27 pathway in vascular endothelial cells*. *Circ Res*, 1997. **80**( 3) : p. 383-92.
32. Nakano, A., et al., *Ischemic preconditioning activates MAPKAPK2 in the isolated rabbit heart: evidence for involvement of p38 MAPK*. *Circ Res*, 2000. **86**( 2) : p. 144-51.
33. Wang, Y., et al., *Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family*. *J Biol Chem*, 1998. **273**( 4) : p. 2161-8.
34. Ma, X.L., et al., *Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase decreases cardiomyocyte apoptosis and improves cardiac function after myocardial ischemia and reperfusion*. *Circulation*, 1999. **99**( 13) : p. 1685-91.
35. Otani, Y., et al., *The effect of FR167653 on pulmonary ischemia-reperfusion injury in rats*. *J Heart Lung Transplant*, 2000. **19**( 4) : p. 377-83.
36. Hashimoto, N., et al., *Effects of a p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor as an additive to Euro-Collins solution on reperfusion injury in canine lung transplantation1*. *Transplantation*, 2002. **74**( 3) : p. 320-6.
37. Matot, I., et al., *Lung injury after in vivo reperfusion: outcome at 27 hours after reperfusion*. *Anesthesiology*, 2008. **109**( 2) : p. 269-78.

38. Ishii, M., et al., *Inhibition of c-Jun NH2-terminal kinase activity improves ischemia/reperfusion injury in rat lungs*. J Immunol, 2004. **172**( 4) : p. 2569-77.
39. Sakiyama, S., et al., *Activation of mitogen-activated protein kinases during human lung transplantation*. J Heart Lung Transplant, 2005. **24**( 12) : p. 2079-85.
40. Baeza, I., et al., *Improvement of leucocyte functions in ovariectomised aged rats after treatment with growth hormone, melatonin, oestrogens or phyto-oestrogens*. J Reprod Immunol, 2009. **80**( 1-2) : p. 70-9.
41. Chung, H.Y., et al., *Molecular inflammation hypothesis of aging based on the anti-aging mechanism of calorie restriction*. Microsc Res Tech, 2002. **59**( 4) : p. 264-72.
42. Rodriguez, M.I., et al., *Melatonin administration prevents cardiac and diaphragmatic mitochondrial oxidative damage in senescence-accelerated mice*. J Endocrinol, 2007. **194**( 3) : p. 637-43.
43. Pereira, S.G. and F. Oakley, *Nuclear factor-kappaB1: regulation and function*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**( 8) : p. 1425-30.
44. Yamamoto, Y. and R.B. Gaynor, *Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer*. J Clin Invest, 2001. **107**( 2) : p. 135-42.
45. Rao, N., et al., *A novel splice variant of interleukin-1 receptor ( IL-1R) - associated kinase 1 plays a negative regulatory role in Toll/IL-1R-induced inflammatory signaling*. Mol Cell Biol, 2005. **25**( 15) : p. 6521-32.
46. Goto, M., et al., *Involvement of NF-kappaB p50/p65 heterodimer in activation of the human pro-interleukin-1beta gene at two subregions of the upstream enhancer element*. Cytokine, 1999. **11**( 1) : p. 16-28.
47. Taylor, B.S., et al., *Multiple NF-kappaB enhancer elements regulate cytokine induction of the human inducible nitric oxide synthase gene*. J Biol Chem, 1998. **273**( 24) : p. 15148-56.
48. Wickens, A.P., *Ageing and the free radical theory*. Respir Physiol, 2001. **128**( 3) : p. 379-91.
49. Chang, H.Y. and X. Yang, *Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases*. Microbiol Mol Biol Rev, 2000. **64**( 4) : p. 821-46.
50. Cohen, G.M., *Caspases: the executioners of apoptosis*. Biochem J, 1997. **326** ( Pt 1) : p. 1-16.

51. van der Kaaij, N.P., et al., *Ischemia of the lung causes extensive long-term pulmonary injury: an experimental study*. Respir Res, 2008. **9**: p. 28.
52. Reardon, M.J., J.C. Walkes, and D.C. Rice, *Autotransplantation for central non-small-cell lung cancer in a patient with poor pulmonary function*. Tex Heart Inst J, 2004. **31**( 4) : p. 360-2.
53. Hendrix, H., J. Schmitt, and H. Aebert, *[Ex situ sleeve resection and autotransplantation of the left lower pulmonary lobe after extended pneumonectomy]*. Chirurg, 2000. **71**( 7) : p. 820-3.
54. Christie, J.D., et al., *Primary graft failure following lung transplantation*. Chest, 1998. **114**( 1) : p. 51-60.
55. Tang, Y.J., et al., *Lung autotransplantation for treating bronchus neoplasms*. Chin Med J ( Engl) , 2007. **120**( 24) : p. 2325-6.
56. Khimenko, P.L., et al., *Tumor necrosis factor-alpha in ischemia and reperfusion injury in rat lungs*. J Appl Physiol, 1998. **85**( 6) : p. 2005-11.
57. Yamazaki, F., et al., *An evaluation of the tolerance of the autotransplanted canine lung against warm ischemia*. Jpn J Surg, 1989. **19**( 3) : p. 326-33.
58. Waldow, T., 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. **125**( 6) : p. 2253-9.
59. Soncul, H., E. Oz, and S. Kalaycioglu, *Role of ischemic preconditioning on ischemia-reperfusion injury of the lung*. Chest, 1999. **115**( 6) : p. 1672-7.
60. Javadpour, M., et al., *Thermotolerance induces heat shock protein 72 expression and protects against ischaemia-reperfusion-induced lung injury*. Br J Surg, 1998. **85**( 7) : p. 943-6.
61. Schutte, H., et al., *Short-term "preconditioning" with inhaled nitric oxide protects rabbit lungs against ischemia-reperfusion injury*. Transplantation, 2001. **72**( 8) : p. 1363-70.
62. Hirata, T., et al., *"Chemical preconditioning" by 3-nitropropionate reduces ischemia-reperfusion injury in cardiac-arrested rat lungs*. Transplantation, 2001. **71**( 3) : p. 352-9.
63. Lockinger, A., et al., *Protection against gas exchange abnormalities by pre-aerosolized PGE1, iloprost and nitroprusside in lung ischemia-reperfusion*. Transplantation, 2001. **71**( 2) : p. 185-93.

64. Thabut, G., et al., *Preventive effect of inhaled nitric oxide and pentoxifylline on ischemia/reperfusion injury after lung transplantation*. *Transplantation*, 2001. **71**( 9) : p. 1295-300.
65. Kerbaul, F., et al., *Effects of sevoflurane on hypoxic pulmonary vasoconstriction in anaesthetized piglets*. *Br J Anaesth*, 2000. **85**( 3) : p. 440-5.
66. Ishibe, Y., et al., *Effect of sevoflurane on hypoxic pulmonary vasoconstriction in the perfused rabbit lung*. *Anesthesiology*, 1993. **79**( 6) : p. 1348-53.
67. Mullenheim, J., et al., *Sevoflurane confers additional cardioprotection after ischemic late preconditioning in rabbits*. *Anesthesiology*, 2003. **99**( 3) : p. 624-31.
68. Novalija, E., et al., *Sevoflurane mimics ischemic preconditioning effects on coronary flow and nitric oxide release in isolated hearts*. *Anesthesiology*, 1999. **91**( 3) : p. 701-12.
69. Schlack, W., et al., *Effects of halothane, enflurane, isoflurane, sevoflurane and desflurane on myocardial reperfusion injury in the isolated rat heart*. *Br J Anaesth*, 1998. **81**( 6) : p. 913-9.
70. Preckel, B., V. Thamer, and W. Schlack, *Beneficial effects of sevoflurane and desflurane against myocardial reperfusion injury after cardioplegic arrest*. *Can J Anaesth*, 1999. **46**( 11) : p. 1076-81.
71. Preckel, B., et al., *Effects of enflurane, isoflurane, sevoflurane and desflurane on reperfusion injury after regional myocardial ischaemia in the rabbit heart in vivo*. *Br J Anaesth*, 1998. **81**( 6) : p. 905-12.
72. Lin, H.F., Z.R. Zhu, and Z.Y. Hu, *[Protective effects of sevoflurane preconditioning on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats]*. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2009. **89**( 41) : p. 2943-5.
73. Beck-Schimmer, B., et al., *A randomized controlled trial on pharmacological preconditioning in liver surgery using a volatile anesthetic*. *Ann Surg*, 2008. **248**( 6) : p. 909-18.
74. Kersten, J.R., et al., *Isoflurane mimics ischemic preconditioning via activation of K( ATP) channels: reduction of myocardial infarct size with an acute memory phase*. *Anesthesiology*, 1997. **87**( 2) : p. 361-70.
75. Novalija, E., et al., *Anesthetic preconditioning: triggering role of reactive oxygen and nitrogen species in isolated hearts*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002. **283**( 1) : p. H44-52.

76. Tanaka, K., et al., *Mechanisms of cardioprotection by volatile anesthetics*. *Anesthesiology*, 2004. **100**( 3) : p. 707-21.
77. Han, J., et al., *Effects of volatile anesthetic isoflurane on ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in rabbit ventricular myocytes*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996. **229**( 3) : p. 852-6.
78. Zaugg, M., et al., *Volatile anesthetics mimic cardiac preconditioning by priming the activation of mitochondrial K( ATP) channels via multiple signaling pathways*. *Anesthesiology*, 2002. **97**( 1) : p. 4-14.
79. Shayeitz, J.R., et al., *Halothane and isoflurane increase pulmonary artery endothelial cell sensitivity to oxidant-mediated injury*. *Anesthesiology*, 1991. **74**( 6) : p. 1067-77.
80. Liu, R., Y. Ishibe, and M. Ueda, *Isoflurane-sevoflurane administration before ischemia attenuates ischemia-reperfusion-induced injury in isolated rat lungs*. *Anesthesiology*, 2000. **92**( 3) : p. 833-40.
81. Zheng, S. and Z. Zuo, *Isoflurane preconditioning induces neuroprotection against ischemia via activation of P38 mitogen-activated protein kinases*. *Mol Pharmacol*, 2004. **65**( 5) : p. 1172-80.
82. Bickler, P.E., X. Zhan, and C.S. Fahlman, *Isoflurane preconditions hippocampal neurons against oxygen-glucose deprivation: role of intracellular Ca<sup>2+</sup> and mitogen-activated protein kinase signaling*. *Anesthesiology*, 2005. **103**( 3) : p. 532-9.
83. Zuo, Z., Y. Wang, and Y. Huang, *Isoflurane preconditioning protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against in vitro simulated ischemia-reperfusion through the activation of extracellular signal-regulated kinases pathway*. *Eur J Pharmacol*, 2006. **542**( 1-3) : p. 84-91.
84. Bickler, P.E. and C.S. Fahlman, *The inhaled anesthetic, isoflurane, enhances Ca<sup>2+</sup>-dependent survival signaling in cortical neurons and modulates MAP kinases, apoptosis proteins and transcription factors during hypoxia*. *Anesth Analg*, 2006. **103**( 2) : p. 419-29, table of contents.
85. Hasegawa, J., et al., *Sevoflurane stimulates MAP kinase signal transduction through the activation of PKC alpha and beta11 in fetal rat cerebral cortex cultured neuron*. *Acta Histochem Cytochem*, 2006. **39**( 6) : p. 163-72.
86. Ding, Q., et al., *Sevoflurane preconditioning induces rapid ischemic tolerance against spinal cord ischemia/reperfusion through activation of extracellular signal-regulated kinase in rabbits*. *Anesth Analg*, 2009. **109**( 4) : p. 1263-72.

87. Lee, H.T., et al., *Sevoflurane-mediated TGF-beta1 signaling in renal proximal tubule cells*. Am J Physiol Renal Physiol, 2008. **294**( 2) : p. F371-8.
88. Hashiguchi, H., et al., *Isoflurane protects renal function against ischemia and reperfusion through inhibition of protein kinases, JNK and ERK*. Anesth Analg, 2005. **101**( 6) : p. 1584-9.
89. Chen, H.T., et al., *Cardioprotection of sevoflurane postconditioning by activating extracellular signal-regulated kinase 1/2 in isolated rat hearts*. Acta Pharmacol Sin, 2008. **29**( 8) : p. 931-41.
90. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**( 1) : p. 156-9.
91. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**( 4) : p. 402-8.
92. Bland, J.H. and E. Lowenstein, *Halothane-induced decrease in experimental myocardial ischemia in the non-failing canine heart*. Anesthesiology, 1976. **45**( 3) : p. 287-93.
93. Murry, C.E., R.B. Jennings, and K.A. Reimer, *Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium*. Circulation, 1986. **74**( 5) : p. 1124-36.
94. Davis, R.F., et al., *The effect of halothane anesthesia on myocardial necrosis, hemodynamic performance, and regional myocardial blood flow in dogs following coronary artery occlusion*. Anesthesiology, 1983. **59**( 5) : p. 402-11.
95. Kotani, N., et al., *Volatile anesthetics augment expression of proinflammatory cytokines in rat alveolar macrophages during mechanical ventilation*. Anesthesiology, 1999. **91**( 1) : p. 187-97.
96. Takala, R.S., et al., *Pulmonary inflammatory mediators after sevoflurane and thiopentone anaesthesia in pigs*. Acta Anaesthesiol Scand, 2004. **48**( 1) : p. 40-5.
97. Kotani, N., et al., *Expression of genes for proinflammatory cytokines in alveolar macrophages during propofol and isoflurane anesthesia*. Anesth Analg, 1999. **89**( 5) : p. 1250-6.
98. Schilling, T., et al., *Effects of propofol and desflurane anaesthesia on the alveolar inflammatory response to one-lung ventilation*. Br J Anaesth, 2007. **99**( 3) : p. 368-75.

99. Beck-Schimmer, B., et al., *Hypoxia mediates increased neutrophil and macrophage adhesiveness to alveolar epithelial cells*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2001. **25**( 6) : p. 780-7.
100. Funakoshi, T., et al., *Effect of re-expansion after short-period lung collapse on pulmonary capillary permeability and pro-inflammatory cytokine gene expression in isolated rabbit lungs*. Br J Anaesth, 2004. **92**( 4) : p. 558-63.
101. Jordan, S., et al., *The pathogenesis of lung injury following pulmonary resection*. Eur Respir J, 2000. **15**( 4) : p. 790-9.
102. De Conno, E., et al., *Anesthetic-induced improvement of the inflammatory response to one-lung ventilation*. Anesthesiology, 2009. **110**( 6) : p. 1316-26.
103. Schilling, T., et al., *Effects of volatile and intravenous anesthesia on the alveolar and systemic inflammatory response in thoracic surgical patients*. Anesthesiology. **115**( 1) : p. 65-74.
104. Craig, S.R., et al., *Acute phase responses following minimal access and conventional thoracic surgery*. Eur J Cardiothorac Surg, 2001. **20**( 3) : p. 455-63.
105. Eppinger, M.J., et al., *Mediators of ischemia-reperfusion injury of rat lung*. Am J Pathol, 1997. **150**( 5) : p. 1773-84.
106. Mitsuhashi, H., Shimizu, R., and M.M. Yokoyama, *Suppressive effects of volatile anesthetics on cytokine release in human peripheral blood mononuclear cells*. Int J Immunopharmacol, 1995. **17**( 6) : p. 529-34.
107. Sun, S.X., B.X. Ge, and C.H. Miao, *Effects of Preconditioning with Sevoflurane on TNF-alpha-Induced Permeability and Activation of p38 MAPK in Rat Pulmonary Microvascular Endothelial Cells*. Cell Biochem Biophys.
108. Abe, J., C.P. Baines, and B.C. Berk, *Role of mitogen-activated protein kinases in ischemia and reperfusion injury : the good and the bad*. Circ Res, 2000. **86**( 6) : p. 607-9.
109. Toledo-Pereyra, L.H., et al., *Molecular signaling pathways in ischemia/reperfusion*. Exp Clin Transplant, 2004. **2**( 1) : p. 174-7.
110. Vozzelli, M.A., et al., *Antimacrophage chemokine treatment prevents neutrophil and macrophage influx in hyperoxia-exposed newborn rat lung*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004. **286**( 3) : p. L488-93.
111. Colotta, F., et al., *Expression of a monocyte chemotactic cytokine by human mononuclear phagocytes*. J Immunol, 1992. **148**( 3) : p. 760-5.

112. Deshmane, S.L., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 ( MCP-1) : an overview*. J Interferon Cytokine Res, 2009. **29**( 6) : p. 313-26.
113. Zhao, M., 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**( 5) : p. L1018-26.
114. Naidu, B.V., et al., *Novel broad-spectrum chemokine inhibitor protects against lung ischemia-reperfusion injury*. J Heart Lung Transplant, 2004. **23**( 1) : p. 128-34.
115. Simon C, G.-C.G., Azcárate L, Isea J, Vara E, García C, Garutti I, Casanova J, Giráldez A, Martín B, González-Aragoneses F., *Experimental swine lung autotransplant model to study lung ischemia-reperfusion injury*. Arch Bronconeumol, 2011. **47**( 6) : p. 283-289.
116. Bless, N.M., et al., *Role of CC chemokines ( macrophage inflammatory protein-1 beta, monocyte chemoattractant protein-1, RANTES) in acute lung injury in rats*. J Immunol, 2000. **164**( 5) : p. 2650-9.
117. Czemak, B.J., H.P. Friedl, and P.A. Ward, *Role and Regulation of Chemokines in Rodent Models of Lung Inflammation*. ILAR J, 1999. **40**( 4) : p. 163-166.
118. Suter, D., et al., *The immunomodulatory effect of sevoflurane in endotoxin-injured alveolar epithelial cells*. Anesth Analg, 2007. **104**( 3) : p. 638-45.
119. Krishnadasan, B., et al., *Beta-chemokine function in experimental lung ischemia-reperfusion injury*. Ann Thorac Surg, 2004. **77**( 3) : p. 1056-62.

## The Effects of Anesthetic Preconditioning with Sevoflurane in an Experimental Lung Autotransplant Model in Pigs

Javier Casanova, MD,\* Ignacio Garutti, PhD, MD,\* Carlos Simon, PhD, MD,† Ana Giraldez, MD,\* Beatriz Martin, MD,\* Guillermo Gonzalez, MD,† Leire Azcarate, MD,† Cruz Garcia, PhD, MD,‡ and Elena Vara, PhD, MD‡

**BACKGROUND:** Ischemia–reperfusion lung injury is doubly important in thoracic surgery because of the associated ventilation damage to 1 lung. In this study we evaluated the cytoprotective effects of sevoflurane in a pulmonary autotransplant model in pigs.

**METHODS:** Twenty Large White pigs undergoing pneumonectomy plus lung autotransplant were divided into 2 10-member groups on the basis of the anesthetic received (propofol or sevoflurane). Proinflammatory mediators, oxidative stress, nitric oxide metabolism, and hemodynamic and blood variables were measured at 5 different time points.

**RESULTS:** There was an increase of oxidative stress markers and proinflammatory mediators in the propofol group, whereas the hemodynamic variables were similar in both groups.

**CONCLUSIONS:** We demonstrated that sevoflurane decreased the inflammatory response and oxidative stress in a live ischemia–reperfusion lung model. (Anesth Analg 2011;113:742–8)

Ischemia–reperfusion (IR) lung injury is doubly important in thoracic surgery because of the associated ventilation damage to 1 lung. The aim of this study was to evaluate the cytoprotective effects of sevoflurane in a pulmonary autotransplant model in pigs.

Acute inflammatory responses are seen with all forms of lung surgery, and many factors are involved in this process apart from the surgical procedure itself. These factors include changes in the cytokine balance, oxidative stress, the use of one-lung ventilation (OLV), and IR injury.<sup>1</sup> IR-induced lung injury during lung transplantation is a consequence of endothelial and epithelial dysfunction after reperfusion and is characterized by postoperative nonspecific alveolar damage, lung edema, and hypoxemia. This injury could lead to primary graft failure and is considered a significant cause of morbidity and mortality after lung transplantation.

There are several pulmonary surgical procedures during which it is necessary to make complete lung ischemia for a given period of time with the consequent increased risk of IR injury (lung transplantation, arterial sleeve lung resections, pulmonary arterioplasties, living donor lobar lung

transplantation, and those cases that require ex situ surgery).<sup>2,3</sup>

Several mediators have been implicated in the pathogenesis of IR lung injury, and their identification determines the magnitude of the damage produced. Several authors have shown that the increase in lung biomarkers is related to postoperative pulmonary complications and poor postoperative outcome.<sup>4,5</sup>

Different methods have been developed to mitigate IR injury with relative success. One of them is anesthetic preconditioning (APC) with volatile anesthetics (sevoflurane, halothane, and isoflurane, among others). It has been shown that sevoflurane reduces IR damage in the myocardium, either through improved coronary flow or ventricle function or by reduced infarct size.<sup>6</sup> The efficacy of APC with volatile anesthetics has also been shown in other organs, including kidney, liver, spinal cord, and brain.<sup>7–10</sup> In the case of the lung, APC with isoflurane and sevoflurane has been shown to attenuate IR damage in isolated rat and rabbit lungs,<sup>11,12</sup> although as far as we know, no in vivo studies have been published.

Therefore, we hypothesized that the inflammatory response of alveolar epithelial cells to IR lung injury may also be altered by pretreatment with volatile anesthetics. The present lung autotransplant model was designed to evaluate the in vivo effects of sevoflurane in IR lung injury, including hemodynamic, gasometric, and biochemical markers.

### METHODS

This study was approved by the institution's Research and Animal Experimentation Committee. All experiments were performed according to European and Spanish law regarding the handling and care of experimental animals.

### Animal Model and Study Groups

Twenty Large White pigs weighing 30 to 50 kg each were subjected to an orthotopic left lung autotransplantation (left pneumonectomy, ex situ cranial lobectomy, and left caudal lobe reimplantation) with a subsequent 30-minute graft

From the \*Department of Anesthesiology and †Department of Thoracic Surgery, Gregorio Marañon University General Hospital, Madrid, Spain; and ‡Department of Biochemistry and Molecular Biology III, Faculty of Medicine, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain.

Accepted for publication May 31, 2011.

Funding: Research was supported by grants PI070840 and PI070481 from the Spanish Government and grant 06/121 from the Spanish Society of Pneumology and Thoracic Surgery (SEPAR).

The authors declare no conflict of interest.

Reprints will not be available from the authors.

Supplemental digital content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's Web site ([www.anesthesia-analgesia.org](http://www.anesthesia-analgesia.org)).

Address correspondence to Javier Casanova, MD, Department of Anesthesiology, Gregorio Marañon University General Hospital, c/querol 5,3<sup>o</sup>c, Madrid, 28033, Spain. Address e-mail to [Kasss1@yahoo.es](mailto:Kasss1@yahoo.es).

Copyright © 2011 International Anesthesia Research Society  
DOI: 10.1213/ANE.0b013e3182288e01

reperfusion. Animals were block randomized by random numbers (Microsoft Excel 2003) to receive either propofol in continuous perfusion as anesthetic maintenance throughout the procedure (control group, CON;  $n = 10$ ) or APC with sevoflurane from the anesthetic induction to the beginning of the OLV stage followed by propofol perfusion (sevoflurane group, SEV;  $n = 10$ ).

### Anesthesia

Drinking water was allowed ad libitum, but solid food was withheld for 18 hours before each experiment. Premedication was performed with IM ketamine (10 mg/kg; Ketolar, Parke Davis, Pfizer, Dublin, Ireland). Once in the operating room, the animals were placed in a supine position and pulse oxymetry and electrocardiographic monitoring were performed. Anesthesia induction was conducted with propofol (4 mg/kg; Diprivan, AstraZeneca, Macclesfield, Cheshire, UK), fentanyl (3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; Fentanest, Kern Pharmaceuticals, Houston, TX), and atracurium (0.6 mg/kg; Tracrium, Glaxo Smith Kline, Brentford, UK). Orotracheal intubation was performed with a 6- to 7-mm cuffed endotracheal tube. Mechanical ventilation with volume-controlled ventilation was used with 5 cm H<sub>2</sub>O positive end expiratory pressure and peak pressure <30 cm H<sub>2</sub>O throughout the study. A tidal volume approximately 8 mL/kg, a respiratory rate of 12 to 15 respirations per minute (rpm), and an inspiratory:expiratory ratio of 1:2 were chosen to maintain PaCO<sub>2</sub> in the range of 35 to 40 mm Hg. FiO<sub>2</sub> was maintained at 1 throughout the procedure. Intraoperative crystalloid infusion was maintained at 5 to 6 mL kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Anesthesia was maintained with propofol in continuous infusion (8 to 10 mg kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) (CON group) or 3% sevoflurane from the anesthetic induction to the beginning of OLV followed by propofol perfusion (8 to 10 mg kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) (SEV group). Supplemental doses of fentanyl and atracurium were used when required.

### Surgical Protocol

The surgical technique included preliminary procedures, thoracotomy, left pneumonectomy, back-table cranial lobectomy, caudal lobe reimplantation, and reperfusion.

The animals were scrubbed with betaiodine solution, and all subsequent invasive procedures were performed under aseptic conditions. A surgical tracheotomy was performed, the orotracheal tube was removed, and a 6-mm cuffed tube was inserted into the trachea through the tracheotomy that facilitated the insertion and withdrawal of the tube into and out of the right bronchus during the procedure. A 7F sterile pulmonary artery catheter (Edwards Lifesciences, Irvine, CA) was introduced through the femoral vein, and final position into the right pulmonary artery was confirmed intraoperatively. A 7F sterile femoral artery catheter was used to enable arterial blood pressure monitoring and blood sampling. A suprapubic cystostomy was performed to monitor urine output. After these procedures, a left thoracotomy was performed as described elsewhere.<sup>13</sup> Just before the completion of the pneumonectomy, a bolus of IV heparin (300 IU/kg; Mayne Pharma, Madrid, Spain) was administered to prevent thrombosis in the clamped pulmonary artery. Next, on the back table, the left lung was perfused through the pulmonary artery and veins with University of Wisconsin solution, and a cranial

lobectomy was performed to ensure that a thrombus did not form in the graft. The caudal left lobe was then implanted back into the swine, and reperfusion was performed initially in a retrograde direction by unclamping the left atrium. The endobronchial tube was then pulled back into the trachea, which enabled 2-lung ventilation. The left pulmonary artery was then unclamped, and bloodflow was maintained for 30 minutes. At the end of the experiment, the animal was euthanized by a potassium chloride injection while under deep anesthesia.

### Measurement and Sampling Time Points

Baseline (B) hemodynamic and arterial blood gas measurements were performed 30 minutes after the thoracotomy with the animal under 2-lung ventilation, but not lung biopsies or blood samples. Hemodynamic arterial gas measurements, blood samples, and lung biopsies were collected at the following time points: prepneumonectomy (PPn) before completing the pneumonectomy and with the animal under OLV; prereperfusion (PRp) before reperfusion and ventilation of the reimplanted left caudal lobe; 10 minutes postreperfusion (Rp10') of the reimplanted lobe; and 30 minutes postreperfusion (Rp30') of the reimplanted lobe.

### Hemodynamic Measurements

A femoral artery catheter was used to record the systolic, diastolic, and mean arterial blood pressure. We inserted a pulmonary artery catheter via the femoral vein and recorded the pulmonary artery systolic, diastolic, and mean pressures, pulmonary capillary pressure, and central venous pressure. In addition, the cardiac output monitor (Edwards Lifesciences) and thermodilution technique were used at the time points indicated previously (B, PPn, PRp, Rp10', Rp30') to record the cardiac index and systolic volume.

### Blood Gas Measurements

Arterial blood gas analyses were performed at the previously mentioned time points. In addition, blood gas samples were taken from the femoral arterial catheter and by puncturing the pulmonary vein of the reimplanted lobe at 10 and 30 minutes after reperfusion (Rp10' and Rp30').

### Blood Biochemical Measurements

Femoral venous blood samples were collected for biochemical determinations at the following time points: PPn, PRp, Rp10', and Rp30'. The serum nitric oxide (NO) concentration was measured by the Griess reaction<sup>14</sup> (see Appendix, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/AA/A296>).

### Biochemical Studies in Lung Tissue

Lung tissue biopsies were performed for biochemical studies and quantification of lung edema. The first 2 samples of lung tissue (PPn and PRp) were obtained from the cranial lobe (PRp lung sample was taken from the cranial lobe that remained on the back table just before reperfusion of the reimplanted caudal lobe), and the last 2 samples (Rp10' and Rp30') from the reimplanted caudal lobe. Every lung sample was divided into 2 parts: one part was stored in polypropylene tubes at -40°C until the quantification of lung edema, and the other part was placed in a cryotube, flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until biochemical analysis.

Assessment of lung edema: lung tissue samples were blotted and weighed. After baking in a vacuum oven for 24 hours at 60°C, the tissues were weighed to obtain dry weights. The tissues were again weighed after another 24 hours to verify that complete dehydration had occurred. The data were calculated as the wet weight minus the dry weight divided by the dry weight and used as an indicator of lung edema (as illustrated by an increase in the wet-to-dry weight ratio; mg/mg).

After preparation of tissue homogenates<sup>15</sup> (see Appendix, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/AA/A296>), oxidative stress, and the levels of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-1 $\beta$ , endothelial NO synthase (eNOS), neuronal NO synthase (nNOS), and inducible NO synthase (iNOS) were evaluated.

**Evaluation of oxidative stress.** Lipid hydroperoxides (LPO) indicate the degree of membrane lipid oxidation and were detected using a specific kit for use in lung tissue (K-assay LPO-CC, Kamiya Biochemical Company, Seattle, WA). Malondialdehyde (MDA), an end compound of lipid peroxidation, is a cell damage marker that was detected through the formation of thiobarbituric acid derivatives<sup>16</sup> in lung tissue. The myeloperoxidase (MPO) assay was used to quantitate lung tissue neutrophil accumulation, and it was detected by the modified Bradley method of Bradley et al.<sup>17</sup> (see Appendix, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/AA/A296>).

**Western blot analysis.** Western blot analysis was used to measure TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  levels, and the expression of nitric oxide synthase (NOS), eNOS, nNOS, and iNOS forms (see Appendix, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/AA/A296>).

com/AA/A296). Cytokine (TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ) levels were semiquantitatively measured by densitometric analysis.

Reproducibility within the assays was evaluated in 3 independent experiments, and each assay was performed with 3 replicates. The overall intra-assay coefficient of variation was calculated to be <5%. Assay-to-assay reproducibility was evaluated in 3 independent experiments; the overall interassay coefficient of variation was calculated to be <6%.

**Statistical analysis.** The data were expressed as the mean and the SEM (SE). Nonparametric tests were used; the Mann-Whitney *U* test was applied to establish differences between the analyzed groups, and the Wilcoxon test for paired data was used to study the evolution of the intragroup values and to make multiple comparisons between them to avoid type I errors. Statistical significance was considered for  $P < 0.05$ . The SPSS version 14.0 statistical package (SPSS Inc., Chicago, IL) was used in the statistical analysis.

## RESULTS

There were no differences between the CON and SEV groups in terms of animal weight, lung ischemia time, OLV time, pressure airways during mechanical ventilation, or duration of the entire procedure (Table 1).

### Hemodynamics

The hemodynamic variables showed great stability in both groups, the differences between them being limited to heart rate, which increased significantly after reperfusion in the CON group but not in the SEV group. The recorded postreperfusion heart rate was more rapid in the CON group than in the SEV group (Table 2).

### Blood Gas Analysis

Arterial oxygenation was similar in both groups during the entire procedure, except for the Rp10' sample. Also, Pao<sub>2</sub> measured in the pulmonary vein after reperfusion was significantly higher in the SEV group than in the CON group at both 10 and 30 minutes after reperfusion. No other significant differences were observed while comparing systemic arterial and pulmonary arterial Pco<sub>2</sub> and pH throughout the procedure (Table 3).

### Pulmonary Edema

Formation of lung edema, as assessed by the wet-to-dry weight ratio of the lung, was decreased only in SEV group

**Table 1. General Variables**

Variable	Group	Value
Weight (kg), $P = 0.43$	CON	34.3 $\pm$ 13.9
	SEV	37.8 $\pm$ 13.4
Duration of OLV (minutes), $P = 0.1$	CON	167.5 $\pm$ 73.4
	SEV	183.6 $\pm$ 86
Ischemia length (minutes), $P = 0.09$	CON	96.7 $\pm$ 13.8
	SEV	91.8 $\pm$ 22.5
Peak pressures in OLV (cm H <sub>2</sub> O), $P = 0.15$	CON	25 $\pm$ 9
	SEV	26 $\pm$ 10
Plateau pressures in OLV (cm H <sub>2</sub> O), $P = 0.09$	CON	13 $\pm$ 7
	SEV	14 $\pm$ 6

Data are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation. OLV = one-lung ventilation; SEV = sevoflurane.

**Table 2. Hemodynamics**

Hemodynamics	Group	B	PPn	PRp	Rp10'	Rp30'
MBP (mm Hg)	CON	99 $\pm$ 4	101 $\pm$ 4	90 $\pm$ 4	86 $\pm$ 4	81 $\pm$ 5
	SEV	76 $\pm$ 4*	85 $\pm$ 6	83 $\pm$ 4	74 $\pm$ 4	73 $\pm$ 5
PAMP (mm Hg)	CON	26 $\pm$ 3	28 $\pm$ 3	27 $\pm$ 2	29 $\pm$ 3	29 $\pm$ 2
	SEV	20 $\pm$ 1*	24 $\pm$ 2	24 $\pm$ 2	27 $\pm$ 2	26 $\pm$ 2
HR (bpm)	CON	99 $\pm$ 6	94 $\pm$ 8	103 $\pm$ 9	95 $\pm$ 7	93 $\pm$ 8
	SEV	107 $\pm$ 7	110 $\pm$ 5	106 $\pm$ 7	102 $\pm$ 6	105 $\pm$ 8
SV (mL/beat)	CON	58 $\pm$ 5	63 $\pm$ 8	46 $\pm$ 4	54 $\pm$ 4	54 $\pm$ 6
	SEV	50 $\pm$ 4	59 $\pm$ 6*	46 $\pm$ 5	52 $\pm$ 7	49 $\pm$ 6
CI (l $\times$ min <sup>-1</sup> $\times$ m <sup>-2</sup> )	CON	5.2 $\pm$ 0.4	5.2 $\pm$ 0.5	4.4 $\pm$ 0.4	4.8 $\pm$ 0.6	5.5 $\pm$ 1.1
	SEV	6.6 $\pm$ 0.8	7.8 $\pm$ 1	5.6 $\pm$ 0.6	6 $\pm$ 1	5.9 $\pm$ 0.8

Data are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean. MBP = mean arterial blood pressure; PAMP = pulmonary artery mean pressure; HR = heart rate; bpm = beats per minute; SV = systolic volume; CI = cardiac index; CON = control group; SEV = sevoflurane group; B = basal; PPn = prepneumonectomy; PRp = prereperfusion; Rp10' = 10 minutes postreperfusion; Rp30' = 30 minutes postreperfusion.

\*  $P < 0.05$  SEV vs CON group.

<b>Table 3. Blood Gas Variables</b>						
Blood source and variable	Group	B	PPn	PRp	Rp10'	Rp30'
Femoral artery						
PO <sub>2</sub> (mm Hg)	CON	330 ± 55	206 ± 37	302 ± 48	250 ± 48	297 ± 49
	SEV	305 ± 37	169 ± 23	315 ± 42	329 ± 44*	333 ± 49
PCO <sub>2</sub> (mm Hg)	CON	37 ± 2	44 ± 3	42 ± 3	44 ± 4	44 ± 5
	SEV	33 ± 1	49 ± 11	40 ± 2	42 ± 2	40 ± 2
pH	CON	7.52 ± 0.02	7.45 ± 0.03	7.45 ± 0.02	7.44 ± 0.02	7.45 ± 0.03
	SEV	7.56 ± 0.02	7.5 ± 0.03	7.48 ± 0.03	7.44 ± 0.03	7.45 ± 0.03
Pulmonary vein (reimplanted caudal left lobe)						
PO <sub>2</sub> (mm Hg)	CON	—	—	—	278 ± 52	262 ± 41
	SEV	—	—	—	418 ± 29*	391 ± 44*
PCO <sub>2</sub> (mm Hg)	CON	—	—	—	36 ± 4	36 ± 5
	SEV	—	—	—	33 ± 3	32 ± 5
pH	CON	—	—	—	7.54 ± 0.04	7.55 ± 0.05
	SEV	—	—	—	7.52 ± 0.04	7.52 ± 0.06

Data are expressed as the mean ± standard error of the mean. PO<sub>2</sub> = partial pressure of oxygen; PCO<sub>2</sub> = partial pressure of carbon dioxide; CON = control group; SEV = sevoflurane group; B = basal; PPn = prepneumectomy; PRp = prereperfusion; Rp10' = 10 minutes postreperfusion; Rp30' = 30 minutes postreperfusion.

\* *P* < 0.05 vs CON group.

<b>Table 4. Lung Edema, Oxidative Stress Metabolites, Myeloperoxidase Activity, and Cytokines</b>					
Biochemical and group	PPn	PRp	Rp10'	Rp30'	
Lung edema					
CON	4.82 ± 0.21 (4.1–5.6)	4.91 ± 0.48 (4.3–8.0)	4.82 ± 0.35 (3.5–6.5)	4.87 ± 0.01 (4.75–4.9)	<i>P</i> = 0.001
SEV vs CON	NS	NS	NS	NS	
SEV	4.29 ± 0.22 (3.8–5.7)	4.28 ± 0.28 (4.1–5.0)	4.55 ± 0.29 (3.3–5.4)	3.33 ± 0.2 (2.7–4.5)*†‡	
LPO mmol/mg protein					
CON	2.61 ± 0.07 (2.1–3.8)	3.61 ± 0.05 (3.2–4.0)	3.64 ± 0.09 (3.2–4.1)	3.88 ± 0.06 (3.5–4.1)	
SEV vs CON	NS	<i>P</i> = 0.047	<i>P</i> = 0.049	<i>P</i> = 0.02	
SEV	2.65 ± 0.11 (2.1–2.9)	3.06 ± 0.09 (2.7–3.5)*	2.87 ± 0.14 (2.3–3.3)	3.17 ± 0.11 (2.5–3.8)	
MDA (pmol/mg protein)					
CON	3.21 ± 0.13 (2.4–3.8)	3.87 ± 0.079 (3.25–4.8)*	4.99 ± 0.088 (4.7–5.4)*†	5.35 ± 0.093 (5.0–5.7)*	
SEV vs CON	NS	NS	<i>P</i> = 0.044	<i>P</i> = 0.04	
SEV	3.12 ± 0.182 (2.4–3.7)	3.52 ± 0.159 (3.3–4.7)*	3.64 ± 0.149 (3.3–4.6)*†	4.47 ± 0.159 (3.6–4.97)*†	
MPO (IU/mg protein)					
CON	0.07 ± 0.004 (0.04–0.09)	0.1 ± 0.003 (0.08–0.13)	0.18 ± 0.004 (0.14–0.2)†	0.23 ± 0.005† (0.21–0.28)	
SEV vs CON	NS	NS	<i>P</i> = 0.04	<i>P</i> = 0.02	
SEV	0.04 ± 0.003 (0.02–0.06)	0.07 ± 0.007 (0.05–0.1)	0.09 ± 0.006 (0.04–0.12)	0.1 ± 0.007 (0.03–0.12)	
IL-1 (arbitrary units)					
CON	1.23 ± 0.00 (1.17–1.26)	1.82 ± 0.04 (1.69–1.93)	1.81 ± 0.05 (1.43–1.98)*	1.85 ± 0.02 (1.74–1.94)*	
SEV vs CON	NS	<i>P</i> = 0.01	<i>P</i> = 0.049	<i>P</i> = 0.038	
SEV	1.23 ± 0.04 (0.99–1.3)	1.16 ± 0.06 (0.8–1.6)	0.98 ± 0.06 (0.68–1.15)*†	1.06 ± 0.04 (0.92–1.07)	
TNF-α (arbitrary units)					
CON	0.70 ± 0.01 (0.64–0.78)	0.84 ± 0.02 (0.7–0.97)*	0.96 ± 0.02 (0.94–1.07)*†	1.19 ± 0.02 (1.12–1.34)*†	
SEV vs CON	<i>P</i> = 0.046	<i>P</i> = 0.04	<i>P</i> = 0.04	<i>P</i> = 0.015	
SEV	0.77 ± 0.01 (0.7–0.81)	0.60 ± 0.01 (0.52–0.71)*	0.63 ± 0.02 (0.51–0.67)*	0.63 ± 0.00 (0.61–0.68)*	

Data are expressed as the mean ± standard error of the mean and range of values. LPO = lipid hydroperoxides; MDA = malondialdehyde; MPO = myeloperoxidase; IL-1 = interleukin-1; TNF-α = tumor necrosis factor-α; CON = control group; SEV = sevoflurane group; PPn = prepneumectomy; PRp = prereperfusion; Rp10' = 10 minutes postreperfusion; Rp30' = 30 minutes postreperfusion; NS = nonsignificant.

\* *P* < 0.05 in intragroup comparison respect PPn. † *P* < 0.05 in intragroup comparison respect PRp. ‡ *P* < 0.05 in intragroup comparison respect Rp10'.

The Appendix (Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/AA/A296>) contains significant *P* values for this table.

swines. When we used APC with sevoflurane, lung edema was reduced significantly after 30 minutes of reperfusion in comparison with the CON group (Table 4).

#### Oxidative Stress in Lung Tissue

MDA was increased progressively in both groups at each time point. The LPO levels were increased in the CON group continuously throughout the experiment, although they decreased after reperfusion and then again increased in the SEV group. However, when animals were submitted to APC, LPO and MDA levels in reperfused lung tissue were significantly lower than were those in the CON group (Table 4).

#### Lung Tissue Myeloperoxidase

Tissue MPO activity in biopsy specimens from reimplanted lungs increased significantly after reperfusion in the CON group, although this sharp increase was not observed when sevoflurane was administered. Moreover, recorded Rp10' and Rp30' MPO activity was higher in the CON group than in the SEV group (Table 4).

#### Western Blot Analysis of TNF-α and IL-1β

The proinflammatory cytokines IL-1 and TNF-α were significantly higher after IR in control lungs, although this increase was not recorded when APC with sevoflurane took place (Table 4).

**Table 5. Nitric Oxide Metabolism**

Biochemical and group	PPn	PRp	Rp10'	Rp30'
NO (nmol/mL)				
CON	43.2 ± 3.4 (20–52)	20 ± 1.7 (15.9–32.6)*	26 ± 2.8 (18.3–44.3)*	24.5 ± 2.2 (16–38.7)*
SEV vs CON	NS	<i>P</i> = 0.035	<i>P</i> = 0.00122	<i>P</i> = 0.0016
SEV	38.4 ± 2.3 (29.6–46)	37.9 ± 4.7 (19.2–48.9)	37 ± 3 (23.2–54.5)	41 ± 3.1 (26.8–57)
eNOS (nmol/mL)				
CON	1.66 ± 0.01 (1.53–1.75)	1.32 ± 0.01 (1.24–1.4)*	1.39 ± 0.02 (1.28–1.48)*	1.34 ± 0.01 (1.31–1.39)*
SEV vs CON	NS	<i>P</i> = 0.01	<i>P</i> = 0.02	<i>P</i> = 0.01
SEV	1.55 ± 0.04 (1.2–1.68)	1.56 ± 0.03 (1.44–1.69)*	1.60 ± 0.00 (1.56–1.63)*	1.65 ± 0.01 (1.64–1.7)*
nNOS (nmol/mL)				
CON	1.39 ± 0.04 (1.2–1.7)	1.04 ± 0.05 (0.98–1.4)*	1.24 ± 0.04 (1.04–1.51)*†	1.19 ± 0.04 (1.04–1.36)*
SEV vs CON	NS	<i>P</i> = 0.017	<i>P</i> = 0.038	<i>P</i> = 0.02
SEV	1.47 ± 0.03 (1.3–1.6)	1.49 ± 0.04 (1.2–1.6)	1.43 ± 0.06 (0.98–1.7)	1.44 ± 0.01 (1.34–1.49)
iNOS (nmol/mL)				
CON	1.73 ± 0.02 (1.59–1.87)	1.81 ± 0.06 (1.56–2.23)	1.97 ± 0.03 (1.89–2.28)*†	2.04 ± 0.03 (1.97–2.2)*†
SEV vs CON	NS	<i>P</i> = 0.045	<i>P</i> = 0.01	<i>P</i> = 0.01
SEV	1.89 ± 0.03 (1.97–2.2)	1.77 ± 0.02 (1.63–1.86)	1.55 ± 0.05 (1.46–1.9)*†	1.65 ± 0.02 (1.56–1.76)*†

Data are expressed as the mean ± standard error of the mean. NO = nitric oxide; eNOS = endothelial nitric oxide synthase; nNOS = neuronal nitric oxide synthase; iNOS = inducible nitric oxide synthase; CON = control group; SEV = sevoflurane group; PPn = prepneumectomy; PRp = reperfusion; Rp10' = 10 minutes postreperfusion; Rp30' = 30 minutes postreperfusion; NS = nonsignificant.

\* *P* < 0.05 in intragroup comparison respect PPn. † *P* < 0.05 in intragroup comparison respect PRp.

The Appendix (Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/AA/A296>) contains significant *P* values for this table.

### Serum NO and NOS Expression in Lung Tissue

A striking decrease in serum NO and NOS expression in lung tissue was found pre- and postreperfusion of the implanted lobe in control animal lungs. This decrease was not detected in the SEV group (Table 5).

### DISCUSSION

These results show that the administration of sevoflurane before ischemic damage attenuates the deleterious effect of IR on the lung in a pulmonary autotransplant model in pigs. In addition, this approach reduces oxidative stress and the inflammatory response generated during IR. To our knowledge, this is the first study that demonstrates the use of APC with sevoflurane to decrease the inflammatory response and oxidative stress in an in vivo lung transplantation model.

Despite broad experience with volatile anesthetics during mechanical ventilation, its effects on pulmonary inflammation are controversial. In some experimental studies, this approach has been shown to increase the inflammatory lung response during mechanical ventilation,<sup>18–20</sup> although other studies have reported a decrease in the inflammatory response when volatile anesthetics were compared with IV anesthesia.<sup>21</sup> This discrepancy could be based on differences in the experimental models analyzed. Also, it has been demonstrated that the use of volatile anesthetics before lipopolysaccharide-induced lung injury is related to attenuation of the lung inflammatory response and an improved outcome.<sup>22</sup>

The ability of volatile anesthetics to protect against induced acute lung injury has been studied only in an experimental setting. Liu et al. confirmed the protective effects of APC with sevoflurane in isolated rat and rabbit lungs that underwent IR.<sup>11,12</sup> We obtained similar results to Liu et al. in terms of TNF- $\alpha$  and NO metabolism using APC in the lungs of live animals as opposed to the experimental isolated lung model that the previous authors used. However, IR damage is a more complex phenomenon, and as such, it is not possible to rely on its effect on TNF- $\alpha$  as the sole determinant of lung damage. In our study, we measured the effects of sevoflurane on IR damage not only on

TNF- $\alpha$  in vivo (not in an isolated lung model) but also on oxidative stress, as reflected by MDA, LPO, and MPO. The proposed mechanism underlying volatile anesthetics' protection of the lung after reperfusion is not yet completely known. There are 2 ways to explain this protection. First, this protection appears to involve a decrease in Na, K-ATPase, and sodium channel activities similar to those found in myocardium.<sup>6</sup> The second is related to hypoxia and microvascular permeability; in a recent study, we observed the ability of sevoflurane to decrease TNF- $\alpha$ -induced microvascular endothelial permeability.<sup>23</sup> During OLV, alveolar hypoxia occurs in the nonventilated lung, which leads to the enhanced expression of adhesion molecules on alveolar epithelial cells with increased neutrophil adherence that enhance endothelial permeability and therefore lung damage, demonstrating that the lower respiratory epithelial compartment might play an important role in inflammatory mechanisms during hypoxia-induced lung injury<sup>24</sup> and altered surface phospholipids and apoprotein biosynthesis by type II alveolar epithelial cells. The effect of OLV hypoxia vasoconstriction reduces ventilation/perfusion mismatch, but it also results in tissue hypoxia. Yin et al. showed congested lung vasculature in an experimental model in pigs after 1 hour of OLV.<sup>25</sup> Therefore, the alveolar alterations and the vasculature findings by Yin et al. support the idea of compartmentalized lung inflammatory reactions.

### Oxidative Stress and the Inflammatory Response

OLV has been correlated with oxidative stress, and both in turn have been related to acute lung injury. In our study, there were no differences in the duration of OLV or in airway pressures between the 2 groups; as a result, we eliminated this factor as a source of bias when we compared oxidative stress between the groups. In our study, the only difference between the groups was the administration of sevoflurane for 90 minutes before ischemia.

We recorded an increase in LPO, MDA, and MPO in both groups after reperfusion, although there was evident attenuation of the increase in LPO and therefore of MDA in

the sevoflurane group versus the control group that is attributable only to the cytoprotective effect of sevoflurane.

A lower rate of tissue leukocyte infiltration was observed in the SEV group. Volatile anesthetics inhibit the endothelial adhesion and migration of neutrophils, reducing their activity both in vitro and in vivo,<sup>26,27</sup> and the lower tissue MPO levels in the SEV group probably occurred through this mechanism.

Cytokines are crucial mediators in the bidirectional interaction between leukocytes and endothelial cells. As other authors have found, we observed a reduced inflammatory response in the SEV group, as determined by the progressively lower and descending levels of IL-1 and TNF- $\alpha$ .<sup>4,28</sup>

### Nitric Oxide Metabolism

NO exerts both beneficial effects (eNOS or NOS III and nNOS or NOS I) and harmful effects (iNOS). Our results show that NO in the control group decreased drastically after ischemia, whereas the levels remained unchanged throughout the process in the preconditioned group. This may have been due to the decrease in the constitutive forms of NOS observed in the control group after ischemia. A number of studies have reported a reduction in endogenous NO after pulmonary IR in both humans and animals. This discovery could be associated with an increase in iNOS expression that would cause endogenous NO to be rapidly destroyed by reactive oxygen species after reperfusion.<sup>29</sup> Our findings are similar to those reported by other authors who describe increased NO release after preconditioning with sevoflurane in isolated hearts.<sup>30</sup> This observation could represent a cell-protective method based on the maintenance of NO metabolic homeostasis versus other methods such as the administration of exogenous NO in lung transplantation.<sup>31</sup>

### Hemodynamics and Oxygenation

Both anesthetic techniques afforded great hemodynamic stability, the differences only being observed in terms of heart rate after reperfusion, with higher values in the CON group. This could be due to the tachycardia generated by an increased amount of toxic metabolites that would recirculate after reperfusion in the CON animals in comparison with the SEV group. Arterial oxygenation was similar between the groups before reperfusion. However, after reperfusion, greater venous oxygenation was observed in swine that received sevoflurane before starting OLV than in the CON group. Oxygenation of reimplanted lobar lung was greater when APC with sevoflurane was used, perhaps indicating better lung function as a consequence of a reduction in the inflammatory response and a decrease in oxidative stress after IR occurred; therefore, there is less interstitial edema that would reduce gas exchange.

### Clinical Applicability of the Experimental Model

The experimental model of IR considered in our study was oriented towards clinical usefulness, because there are many published case series on lung tumor resections with cuff bronchoangioplasty.<sup>32,33</sup> This technique has emerged as a valid alternative to pneumonectomy in patients with central tumors and scant respiratory reserve, and also in live donor lobar transplantation,<sup>34</sup> which are characterized

by IR damage. Lastly, there are cases of complicated tumors in which the patient does not functionally tolerate pneumonectomy. In such situations, pneumonectomy is followed by ex situ lobectomy and posterior reimplantation of the remaining lobe,<sup>35</sup> with the subsequent lobar reperfusion process. Also, one could surmise that attenuation of lung injury by administering sevoflurane in donor lung cadavers during organ extraction or when ex situ lung surgery is required could be a promising option for clinical application to decrease IR injury in lung recipients. However, clinical studies evaluating the efficacy of this promising pathway are required to improve lung transplantation outcomes.

In conclusion, the results of the present study indicate that sevoflurane exerts an early cell-protective effect against pulmonary IR damage, as evidenced by the decrease in oxidative stress and in the intensity of the inflammatory response. In addition, sevoflurane affords adequate homeostasis of NO metabolism. ■■

### DISCLOSURES

**Name:** Javier Casanova, MD.

**Contribution:** This author helped conduct the study, analyze the data, and write the manuscript.

**Attestation:** Javier Casanova has seen the original study data, reviewed the analysis of the data, approved the final manuscript, and is the author responsible for archiving the study files.

**Name:** Ignacio Garutti, PhD, MD.

**Contribution:** This author helped design the study, analyze the data, and write the manuscript.

**Attestation:** Ignacio Garutti has seen the original study data, reviewed the analysis of the data, and approved the final manuscript.

**Name:** Carlos Simon, PhD, MD.

**Contribution:** This author helped design the study, conduct the study, and analyze the data.

**Attestation:** Carlos Simon has seen the original study data, reviewed the analysis of the data, and approved the final manuscript.

**Name:** Ana Giraldez, MD.

**Contribution:** This author helped conduct the study.

**Attestation:** Ana Giraldez has seen the original study data, reviewed the analysis of the data, and approved the final manuscript.

**Name:** Beatriz Martin, MD.

**Contribution:** This author helped conduct the study and analyze the data.

**Attestation:** Beatriz Martin has seen the original study data and approved the final manuscript.

**Name:** Guillermo Gonzalez, MD.

**Contribution:** This author helped conduct the study and analyze the data.

**Attestation:** Guillermo Gonzalez has seen the original study data and approved the final manuscript.

**Name:** Leire Azcarate, MD.

**Contribution:** This author helped conduct the study and analyze the data.

**Attestation:** Leire Azcarate reviewed the analysis of the data and approved the final manuscript.

**Name:** Cruz Garcia, PhD, MD.

**Contribution:** This author helped conduct the study and analyze the data.

**Attestation:** Cruz Garcia has seen the original study data, reviewed the analysis of the data, and approved the final manuscript.

**Name:** Elena Vara, PhD, MD.

**Contribution:** This author helped design the study, conduct the study, and analyze the data.

**Attestation:** Elena Vara has seen the original study data, reviewed the analysis of the data, and approved the final manuscript.

**This manuscript was handled by:** Marcel E. Durieux, MD, PhD.

## REFERENCES

- Lohser J. Evidence-based management of one-lung ventilation. *Anesthesiol Clin* 2008;26:241–72
- Matsumoto I, Oda M, Tsunezuka 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
- 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
- De Conno E, Steurer M, Wittlinger M, Zalunardo M, Weder W, Schneider D, Schimmer R, Klaghofer R, Neff T, Schmid E, Spahn D, Z'graggen B, Urner M, Beck-Schimmer B. Anesthetic-induced improvement of the inflammatory response to one-lung ventilation. *Anesthesiology* 2009;110:1316–26
- Misthos P, Katsaragkis S, Theodorou D, Milingos N, Skottis I. The degree of oxidative stress is associated with major adverse effects after lung resection: a prospective study. *Eur J Cardiothorac Surg* 2006;29:591–5
- Tanaka K, Ludwig LM, Kersten JR, Pagel PS, Warltier DC. Mechanisms of cardioprotection by volatile anesthetics. *Anesthesiology* 2004;100:707–21
- Lee HT, Kim M, Jan M, Emala CW. Anti-inflammatory and antinecrotic effects of the volatile anesthetic sevoflurane in kidney proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;291:F67–78
- Beck-Schimmer B, Breitenstein S, Urech S, De Conno E, Wittlinger M, Puhon M, Jochum W, Spahn DR, Graf R, Clavien P-A. Randomized controlled trial on pharmacological preconditioning in liver surgery using a volatile anesthetic. *Ann Surg* 2008;248:909–18
- Ding Q, Wang Q, Deng J, Gu Q, Hu S, Li Y, Su B, Zeng Y, Xiong L, MD. Sevoflurane preconditioning induces rapid ischemic tolerance against spinal cord ischemia/reperfusion through activation of extracellular signal-regulated kinase in rabbits. *Anesth Analg* 2009;109:1263–72
- Zheng S, Zuo Z. Isoflurane preconditioning induces neuroprotection against ischemia via activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Mol Pharmacol* 2004;65:1172–80
- Liu R, Ishibe Y, Ueda M. Isoflurane-sevoflurane administration before ischemia attenuates ischemia-reperfusion-induced injury in isolated rat lungs. *Anesthesiology* 2000;92:833–40
- Liu R, Ishibe Y, Ueda M, Hang Y. Isoflurane administration before ischemia and during reperfusion attenuates ischemia/reperfusion-induced injury of isolated rabbit lungs. *Anesth Analg* 1999;89:561–5
- Simon CM, Gonzalez G, Azcarate L, Isea J, Vara E, Garcia C, Garutti I, Casanova J, Giraldez A, Martin B, Gonzalez-Aragoneses F. Procedimiento de autotrasplante pulmonar en el cerdo como modelo experimental para el estudio del síndrome de isquemia-reperfusion. *Arch Bronconeumol* 2011;doi:10.1016/j.arbres.2011.02.008
- Castillo C, Salazar V, Ariznavarreta C, Vara E, Tresguerres JAF. Effect of growth hormone and estrogen administration on hepatocyte alterations in old ovariectomized female wistar rats. *Endocrine* 2005;26:11–8
- Mester M, Carter EA, Tompkins RG, Gelfand JA, Dinarello CA, Burke JF, Clark BD. Thermal injury induces very early production of interleukin-1 alpha in the rat by mechanisms other than endotoxemia. *Surgery* 1994;115:588–96
- 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
- Kotani N, Takahashi S, Sessler DI, Hashiba E, Kubota T, Hashimoto H, Matsuki A. Volatile anesthetics augment expression of proinflammatory cytokines in rat alveolar macrophages during mechanical ventilation. *Anesthesiology* 1999;91:187–97
- Kotani N, Hashimoto H, Sessler DI, Yasuda T, Ebina T, Muraoka M, Matsuki A. Expression of genes for proinflammatory cytokines in alveolar macrophages during propofol and isoflurane anesthesia. *Anesth Analg* 1999;89:1250–6
- Takala RS, Soukka HR, Salo MS, Kirvelä OA, Kääpä PO, Rajamäki AA, Riutta A, Aantaa RE. Pulmonary inflammatory mediators after sevoflurane and thiopentone anaesthesia in pigs. *Acta Anaesthesiol Scand* 2004;48:40–5
- Schilling T, Kozian A, Kretzschmar M, Huth C, Welte T, Buhling F, Hedenstierna G, Hachenberg T. Effects of propofol and desflurane anaesthesia on the alveolar inflammatory response to one-lung ventilation. *Br J Anaesth* 2007;99:368–75
- Steurer M, Schläpfer M, Steurer M, Z'graggen BR, Booy C, Reyes L, Spahn DR, Beck-Schimmer B. The volatile anaesthetic sevoflurane attenuates lipopolysaccharide-induced injury in alveolar macrophages. *Clin Exp Immunol* 2009;155:224–30
- Sun SX, Ge BX, Miao CH. Effects of preconditioning with sevoflurane on TNF- $\alpha$ -induced permeability and activation of p38 MAPK in rat pulmonary microvascular endothelial cells. *Cell Biochem Biophys* 2011 Feb 19. [Epub ahead of print]
- Beck-Schimmer B, Schimmer RC, Madjdpour C, Bonvini JM, Pasch T, Ward PA. Hypoxia mediates increased neutrophil and macrophage adhesiveness to alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;25:780–7
- Yin K, Gribbin E, Emanuel S, Orndorff R, Walker J, Weese J, Fallahnejad M. Histochemical alterations in one lung ventilation. *J Surg Res* 2007;137:16–20
- Mobert J, Zahler S, Becker B, Conzen P. Inhibition of neutrophil activation by volatile anesthetics decreases adhesion to cultured human endothelial cells. *Anesthesiology* 1999;90:1372–81
- Kowalski C, Zahler S, Becker BF, Flaucher A, Conzen PF, Gerlach E, Peter K. Halothane, isoflurane and sevoflurane reduce postschemic adhesion of neutrophils in the coronary system. *Anesthesiology* 1997;86:188–95
- Takala R, Soukka H, Salo M, Kirvelä O, Kääpä P, Aantaa R. Gene expression of pulmonary cytokines after sevoflurane or thiopentone anaesthesia in pigs. *Acta Anaesthesiol Scand* 2006;50:163–7
- Perrot M, Liu M, Waddell T, Keshavjee S. Ischemia-reperfusion-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:490–511
- Novalija E, Fujita S, Kampine J, Stowe D. Sevoflurane mimics ischemic preconditioning effects on coronary flow and nitric oxide release in isolated hearts. *Anesthesiology* 1999;91:701–12
- Hermle G, Schutte H, Walmrath D, Geiger K, Seeger W, Grimminger F. Ventilation-perfusion mismatch after lung ischemia-reperfusion protective effect of nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:1179–87
- Rendina EA, De Giacomo T, Venuta F, Ciccone A, Coloni GF. Lung conservation techniques: bronchial sleeve resection and reconstruction of the pulmonary artery. *Semin Surg Oncol* 2000;18:165–72
- Deslauriers J, Grégoire J, Jacques LF, Piraux M, Guojin L, Lacasse Y. Sleeve lobectomy versus pneumonectomy for lung cancer: a comparative analysis of survival and sites or recurrences. *Ann Thorac Surg* 2004;77:1152–6
- Bowdish ME, Barr ML. Living lobar lung transplantation. In: Lynch JP, ed. *Lung and Heart-Lung Transplantation*. New York: Taylor and Francis, 2006:255–67
- Reardon MJ, Walkes JC, Rice DC. Autotransplantation for central non-small-cell lung cancer in a patient with poor pulmonary function. *Tex Heart Inst J* 2004;31:360–2



Original

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

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

<sup>a</sup> Servicio de Cirugía Torácica, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, España

<sup>b</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España

<sup>c</sup> 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 reperusión (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- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y MCP-1), de actividad leucocitaria (mieloperoxidasa o MPO), de actividad óxido nítrico sintasa inducible y de la proteína quinasa MAPK p38, 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

**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.

#### Keywords:

Acute lung injury

Warm ischemia

Reperfusion injury

Experimental models

Autotransplant

Inflammatory mediators

\* 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- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  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 fría<sup>1</sup>. 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 pulmonar<sup>2-4</sup> 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 viables<sup>5</sup>. 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 postoperatorio<sup>6</sup>.

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  $\mu$ 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 Dräger 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 (FiO<sub>2</sub>) 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 coloide, 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 (FiO<sub>2</sub>: 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-neumonecemia (PreN) –antes de completar la neumonecemia, 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 cardíaca 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 cardíaco y volumen sistólico.

#### Estudios gasométricos

En los momentos mencionados, en sangre arterial sistémica se midió la presión parcial de oxígeno (PO<sub>2</sub>) y de dióxido de carbono (PCO<sub>2</sub>), 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 PO<sub>2</sub>, PCO<sub>2</sub> y pH.

#### Determinaciones bioquímicas en plasma

- Óxido nítrico (NO): la concentración sérica de NO se basó en la reacción de Griess<sup>7</sup>.
- 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 Sato<sup>8</sup>.

#### 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 tiobarbitúricos<sup>9</sup> en tejido pulmonar. La actividad de la mieloperoxidasa (MPO) indica el acúmulo de polimorfonucleares neutrófilos y se determina mediante el método de Bradley<sup>10</sup> modificado.

#### Mediadores inflamatorios en tejido pulmonar: Expresión de citoquinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ), óxido nítrico sintasas (endotelial-NOS<sub>e</sub>, neuronal-NOS<sub>n</sub> e inducible-NOS<sub>i</sub>) y hemoxigenasas (HO-1, HO-2)

Se realizan por Western blot utilizando anticuerpos específicos anti TNF- $\alpha$  (Endogen), anti-IL-1 $\beta$  (Bio Génesis), anti-nitric oxide Synthase I, anti-nitric oxide Synthase II y anti-nitric oxide Synthase III (Chemicon International, Inc.), anti-Heme Oxygenase I y anti-Heme Oxygenase 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 <sup>5</sup> .m <sup>2</sup> )	1.287 ± 138	1.500 ± 111	1.476 ± 219	1.368 ± 246	1.280 ± 256
IRVP (dinas. seg/cm <sup>5</sup> .m <sup>2</sup> )	178 ± 11	205 ± 54	196 ± 48	179 ± 37	139 ± 23
IVS (ml/latido/m <sup>2</sup> )	51 ± 6	56 ± 8	45 ± 4	51 ± 6	69 ± 22
IC (l/min/m <sup>2</sup> )	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 PO<sub>2</sub> arterial (p < 0,05) en las muestras extraídas antes de completar la neumectomía y a los 10 min de reperfundir el pulmón implantado. La capacidad de oxigenación pulmonar mejoró significativamente tras 30 min de reperusión.

### 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 reperusión (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 reperusión del implante (tabla 3).

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

Durante la reperusión, 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 reperusión (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 reperusión del mismo, como se refleja en la tabla 3.

**Tabla 2**  
Parámetros gasométricos

		B	PreN	PreR	Rep-10'	Rep-30'
Sangre arterial sistémica	PO <sub>2</sub> (mmHg)	359 ± 74	231 ± 56*	315 ± 65	243 ± 64*†	302 ± 66†‡
	PCO <sub>2</sub> (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 <sub>2</sub> (mmHg)	-	-	-	260 ± 55	295 ± 46
	PCO <sub>2</sub> (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; PO<sub>2</sub>: presión parcial de oxígeno; PCO<sub>2</sub>: 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 reperusión 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 de 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 reperusión (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<sup>11,12</sup>, 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 (UI/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: hemoxigenasa 1, 2; IL-1β: interleuquina-1β; JNK: quinasa c-jun N-terminal; LPO: hidropéroxido 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: preneumectomía; 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 auto-trasplante pulmonar en grandes mamíferos cumple en gran medida este objetivo; ha sido descrito en perros<sup>13-17</sup>, ovejas<sup>18</sup> y cerdos<sup>19</sup>, pero pocos de estos trabajos profundizan en los mediadores inflamatorios durante la IR normotérmica<sup>20</sup>.

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 h<sup>21</sup> 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 sobreviviera<sup>22</sup>. 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<sup>15,23,24</sup>. 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 membranas<sup>25</sup>. El grado de lipoperoxidación, e indirectamente la presencia de RLO, puede medirse por la presencia de lipoperoxidos (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 rata<sup>26</sup> y mediante oclusión *in situ* de la arteria pulmonar en perros<sup>27</sup>.

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 linfocitos<sup>25</sup>. 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 reperusión<sup>28</sup>. 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 Fe<sup>+++</sup>. Existe una creciente evidencia del papel protector de esta enzima y sus metabolitos frente a la lesión por IR<sup>29</sup>. 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)<sup>30</sup>. 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 hepática<sup>31</sup> y pulmonar<sup>30</sup>.

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<sup>25,32</sup>. 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<sup>32,33</sup>. 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- $\alpha$ , 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 IR<sup>34</sup>. Nuestros datos podrían relacionarse con un estudio de Krishnadasan et al, realizado en ratones, en el que se observa un aumento de IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$  en tejido pulmonar a los 60 min de su reperfusión, tras un periodo de 90 min de isquemia caliente<sup>11</sup>. Sin embargo, en el mismo modelo experimental, la MCP-1 sólo es detectada tras 4 h de reperfusión pulmonar<sup>35</sup>, 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 NO<sup>25</sup>. 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 IR<sup>36</sup>. 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 discutido<sup>37</sup>. Las dos primeras son activadas por citoquinas proinflamatorias como la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$ , y también por los RLO<sup>38</sup>. También se ha observado que la MCP-1 es capaz de activar las tres rutas de señalización<sup>39</sup>. Además, estudios *in vitro* (con células de endotelio pulmonar) e *in vivo* (IR caliente pulmonar en ratas) demuestran que el CO tiene un efecto anti-apoptótico durante la IR y que este efecto es mediado por la MAPK p38<sup>30</sup>. 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 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , 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*<sup>40</sup> 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, Kluin 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, Priebat 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, Rabinowitsch 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 WG, 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, Tsuneyuka 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, Mourageon 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.